

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

на правах рукописи

Гудкова Виктория Родионовна

**Гибридные системы для доставки фотосенсибилизаторов на основе
наноалмазов**

1.5.2. Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Работа выполнена на кафедре биофизики биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Научный руководитель: *Максимов Евгений Георгиевич*, доктор биологических наук

Официальные оппоненты: *Абакумов Максим Артемович*, кандидат химических наук, Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС», лаборатория «Биомедицинские наноматериалы», заведующий лабораторией

Киреев Игорь Игоревич, доктор биологических наук, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, отдел электронной микроскопии, заведующий отделом

Тюрин-Кузьмин Пётр Алексеевич, доктор биологических наук, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Медицинский научно-образовательный институт, факультет фундаментальной медицины, доцент

Защита диссертации состоится «18» декабря 2025 года в 14:00 на заседании диссертационного совета МГУ.015.5 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 24, ауд. «Новая».

E-mail: fursova@biophys.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3640>

Автореферат разослан «__» 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук

Фурсова П.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Фотодинамическая терапия (ФДТ) – один из перспективных методов для лечения онкологических и бактериальных заболеваний. В основе действия ФДТ лежит облучение светом молекулы фотосенсибилизатора, приводящее к генерации активных форм кислорода (АФК). На эффективность ФДТ влияет ряд параметров, таких как избирательность в отношении патогенных клеток, глубина тканей, которые подвергаются лечению, избирательное освещение поражённой области и склонность фотосенсибилизаторов к агрегации в водной среде. Для увеличения эффективности ФДТ создаются гибридные системы (ГС) фотосенсибилизаторов с платформой для доставки. Материал платформы для доставки должен удовлетворять ряду требований: биологическая совместимость, малые размеры (до 100 нм), химическая стабильность, возможность связывания с молекулами лигандов. Перспективным материалом для такой платформы являются наноалмазы (НА). НА представляют собой частицы размером 2-100 нм, в центре которых находится углерод в sp^3 -гибридизации, а на поверхности – углерод в sp^2 -гибридизации. Такой состав обеспечивает НА высокую химическую стабильность. В процессе обработки НА их поверхность дополнительно покрывается слоем органических функциональных групп, которые могут выступать в качестве сайта связывания с различными молекулами. Можно заключить, что эффективность ГС на основе НА зависит от характера взаимодействия между составными компонентами системы. Существует ряд работ, посвящённых использованию ГС НА-фотосенсибилизатор, однако в них не изучается влияние НА на фотодинамическую активность фотосенсибилизатора. Поэтому мы решили провести работу по оценке взаимодействия между НА и фотосенсибилизатором и получению комплекса НА-фотосенсибилизатор.

Цели и задачи

Целью данной работы является выявление механизмов взаимодействия между наноалмазом и фталоцианином для разработки гибридных систем на основе наноалмазов.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать гибридные системы на основе наноалмазов и изучить их физико-химических свойства (ζ -потенциал, интенсивность и длительность флуоресценции) как результат взаимодействия составных компонентов.
2. Изучить роль углерода в sp^2 -гибридизации и органических функциональных групп на поверхности наноалмазов при взаимодействии с фталоцианином в формировании гибридных систем.
3. Определить сравнительную фотодинамическую эффективность гибридных систем в зависимости от их состава и характера взаимодействия элементов.

Научная новизна

В работе показано, что фотодинамическая эффективность ГС НА-Фц определяется главным образом составом и характером взаимодействия элементов ГС, таких как π - π стекинг и электростатическое взаимодействие. В механизме связывания с Фц определяющую роль играет состав поверхности НА: углерод в sp^2 -гибридизации связывается с π -электронной системой Фц за счёт π - π стекинга, а функциональные группы осуществляют электростатическое взаимодействие с заряженными заместителями Фц. Полученные результаты могут использоваться в разработке принципов конструирования новых ГС.

Теоретическая и практическая значимость работы

Установлены физико-химические основы и механизмы функциональной активности ГС для доставки фотосенсибилизаторов на основе НА. π - π стекинг между π -электронными системами углерода в sp^2 -гибридизации и Фц в составе ГС негативно влияет на фотодинамическую активность Фц. Показано, что наличие аморфного углерода на поверхности НА препятствует образованию π - π стекинга с Фц. Функциональные группы на поверхности НА могут обеспечивать связывание с Фц за счёт электростатических взаимодействий. За счёт образования ГС на основе НА увеличена фотодинамическая эффективность отрицательно заряженного Фц. Установленные закономерности свойств ГС от состава и взаимодействия компонентов позволяют оценивать перспективность использования НА с различным характером поверхности в качестве платформы для доставки фотосенсибилизаторов.

Методология и методы исследования

В исследовании использовали цинковые и алюминиевые фталоцианины с различными заместителями, а также наноалмазы, полученные детонационным методом.

Для описания основных физико-химических свойств наноалмазов использовали комплекс методов на основе электронной микроскопии, ИК-Фурье микроскопии, комбинационного рассеяния и динамического светорассеяния. Для определения механизмов связывания НА и Фц использовали измерение спектров поглощения Фц. Методом время-коррелированного счёта единичных фотонов исследовали влияние НА на фотодинамическую активность Фц. Осуществляли доставку ГС на основе НА и Фц в клетки эпидермоидной карциономы человека. С помощью МТТ-теста и конфокальной микроскопии оценивали эффективность ФДТ и локализацию Фц, НА и ГС в клетке. Дополнительно была создана установка для освещения клеток в 96-луночном планшете светом с максимумом 660 нм для проведения фотодинамических исследований.

Объект и предмет исследования

Объектом данного исследования являются фталоцианины (Фц) с различными заместителями и наноалмазы. Мы использовали следующие образцы Фц: цинковый Фц с холиниловыми заместителями ($ZnPcChol+8$) с суммарным зарядом +8, цинковый Фц с пиримидиновыми заместителями ($ZnPcPym+8$) с суммарным зарядом +8, цинковый Фц с карбоксильными заместителями ($ZnPc-16$) с суммарным зарядом -16 и алюминиевый Фц с карбоксильными заместителями ($AlPc-8$) с суммарным зарядом -8 (Рисунок 1). В качестве НА мы использовали НА с различным типом обработки, обозначаемые как НА ТАН, НА СТП и НА, обработанные воздухом при $400^{\circ}C$ (тетрил-НА).

Предметом исследования являются спектральные свойства гибридной системы Фц-НА.

Общая структурная формула фталоцианина	Me	R	Обозначение
			ZnPcChol+8
	Zn		ZnPcPym+8
			ZnPc-16
	Al	COONa	AlPc-8

Рисунок 1. Структурные формулы использованных в работе Фц.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Раскрытие механизмов взаимодействия наноалмаза и фталоцианинов в составе гибридной системы возможно за счёт комплексного определения факторов, влияющих на эффективность гибридной системы.
2. В основе образования гибридной системы ZnPc-16/НА-СТП лежит исключительно электростатическое взаимодействие между функциональными группами на поверхности наноалмаза и заряженными заместителями фталоцианина, а в основе образования гибридной системы ZnPcChol+8/тетрил-НА – электростатическое взаимодействие и π - π стекинг между π -электронными системами углерода в sp^2 -гибридизации и фталоцианина.
3. Аморфный углерод на поверхности НА-СТП препятствует образованию π - π стекинга с фталоцианином.
4. π - π стекинг приводит к образованию нефлуоресцирующих форм фталоцианина, что снижает фотодинамическую активность гибридной системы с π - π стекингом в отношении клеток эпидермоидной карциномы человека.
5. Электростатическое взаимодействие между ZnPc-16 и НА-СТП в гибридной системе не снижает фотодинамическую активность фталоцианина в отношении клеток эпидермоидной карциномы человека.

6. ZnPc-16 может проникать в клетку в составе гибридной системы на основе НА-СТП, где отсутствует π - π стекинг взаимодействия.

Апробация работы

Результаты проведённых исследований были представлены на семинарах лаборатории физико-химии биомембран и на российских и международных конференциях: VII Съезд биофизиков России, Краснодар, Россия, 2023 г; I Региональное собрание Российского фотобиологического общества и Всероссийская конференция с международным участием «Современные проблемы фотобиологии и биофотоники», Нижний Новгород, Россия, 2024 г.

Личный вклад

Личный вклад автора заключается в анализе литературных данных, построении схемы экспериментов, работе со спектральными методами (измерение поглощения, интенсивности флуоресценции, работа с системой время-коррелированного счёта фотонов), определении гидродинамических характеристик образцов методом динамического светорассеяния, химической модификации НА, выращивании клеточных культур, микроскопировании и работе с системой FLIM, анализе полученных данных и определении типов взаимодействия между НА и Фц, а также публикации полученных данных.

Публикации

По результатам работы было опубликовано 4 статьи в журналах, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования "eLibrary Science Index".

Структура и объём диссертации

Объём диссертации составляет 96 страниц машинописного текста и включает введение, литературный обзор, методы исследования, результаты и обсуждения, заключение, выводы и список литературных источников, состоящий из 80 наименований. Работа содержит 28 рисунков и 1 таблицу.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Во введении сформулированы цели и задачи исследования, обоснована актуальность и практическая значимость работы, сформулированы положения, выносимые на защиту.

Обзор литературы

В обзоре литературы представлена информация о типах реакций фотосенсибилизации и история исследований фотосенсибилизаторов. Показано, что наиболее эффективным способом повышения эффективности ФДТ является создание ГС определенного состава для доставки фотосенсибилизаторов. В литературе существует небольшое количество работ, посвященных использованию НА в качестве материала для такой ГС. Представлен обзор основных типов НА, способов их получения и их основных свойств. Обоснована целесообразность использования НА в качестве платформы для доставки фотосенсибилизаторов. Сформулирована задача изучения взаимодействия НА и Фц в составе ГС.

Материалы и методы

В главе «Материалы и методы» приведено описание основных методов и реагентов, использованных в данной работе, а также параметров культивирования клеточных линий и получения клеточных изображений.

Гидродинамические характеристики образцов НА и ГС анализировали с помощью дзета-сайзера Zetasizer Nano ZS (Malvern Pananalytical, Великобритания). Для регистрации спектров поглощения Фц источником света являлся SLS201L/M (ThorLabs Inc, США), в качестве детектора выступал спектрометр Maya 2000 PRO (Ocean Optics, США). Регистрация спектров осуществляли в программе SpectraSuite (Ocean Optics, США). Измерения проводили в термостатируемой ячейке Qpod 2e (Quantum Northwest, США) при температуре 25°C. Регистрацию кинетики затухания флуоресценции Фц проводили методом Time-correlated single photon counting (TCSPC). В качестве источника излучения использовали лазер InTop 660 (ООО «Интегрально-оптические системы»), сигнал от образца проходил через

монохроматор ML44 (Solar Laser Systems, Belarus), затем попадал на детектор HPM-100-07-C (Becker & Hickl GmbH, Германия).

Для культивирования клеток использовали среду DMEM/F-12, содержащую 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 2 мМ глутамина. Инкубацию осуществляли при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Все реагенты для культивирования клеток были приобретены у компании «ПанЭко» (Россия). Флуоресцентную визуализацию выполняли на инвертированном микроскопе Eclipse Ti2-U (Nikon, США). Регистрацию сигнала осуществляли посредством конфокальной сканирующей системы DCS-120 Confocal Scanning FLIM System с детектором HPM-100-40C (Becker & Hickl GmbH, Германия). Анализ изображений проводили в программном обеспечении SPCImage NG (Becker & Hickl GmbH, Германия).

Результаты и обсуждения

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из трех разделов, соответствующих трем поставленным задачам.

Основные структурные свойства НА

В данном разделе охарактеризованы структурные свойства НА. Методом просвечивающей электронной микроскопии оценили размер наночастиц (Рисунок 2А-В). Методом динамического светорассеяния провели измерение гидродинамического диаметра НА в воде и их ζ -потенциала (Рисунок 2Д). Диаметр НА составляет около 7 нм, однако в воде все три типа исследованных нами НА образуют агрегаты диаметром порядка 100 нм.

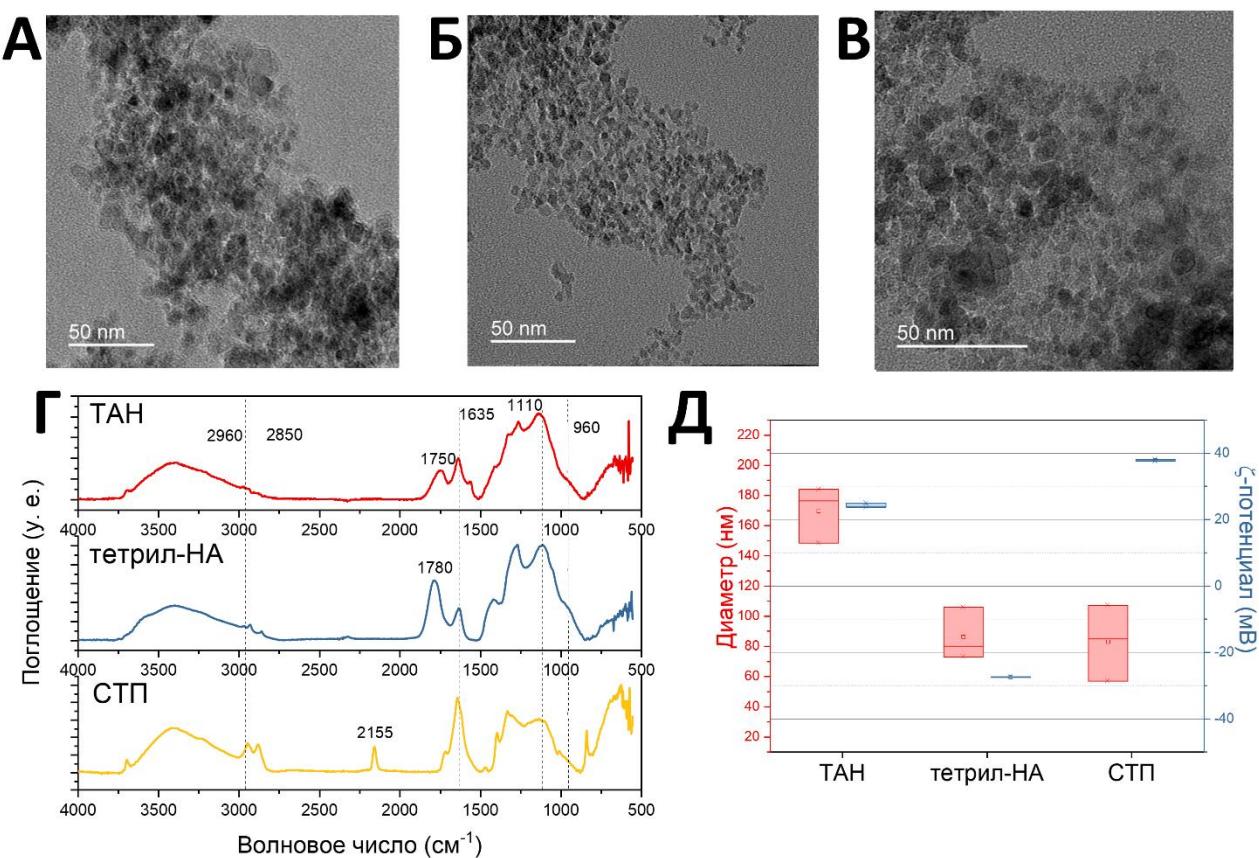


Рисунок 2. А-В ПЭМ-изображения наноалмазов ТАН, тетрил-НА и СТП соответственно; Г – ИК-спектры наноалмазов ТАН, тетрил-НА и СТП; Д – гидродинамический диаметр и ζ -потенциал наноалмазов ТАН, тетрил-НА и СТП.

Методом ИК-Фурье спектроскопии измерили основные области поглощения НА в ИК-диапазоне и соотнесли их с функциональными группами на поверхности частиц (Рисунок 2Г). ИК-спектры НА характеризуются широкой полосой с максимумом в районе 3400 см^{-1} , соответствующей растяжению связей О-Н. Также в спектрах обнаружена полоса 1635 см^{-1} , которая соответствует колебанию связей О-Н. Эти полосы могут относиться как к гидроксильным группам на поверхности НА, так и к сорбированной воде. Установлено, что на поверхности НА представлены эфирные связи (полоса 1110 см^{-1} – асимметричное изгижение, 960 см^{-1} – асимметричное растяжение), кетоновые группы (полосы $1715-1780\text{ см}^{-1}$) и метильные группы (полосы 2960 и 2980 см^{-1}). В спектре НА-СТП обнаружена полоса поглощения 2155 см^{-1} , соответствующая азидной группе. Таким образом, функциональные группы Фц (холиниловые, пиримидиновые и карбоксильные)

могут взаимодействовать с гидрокисильными и метильными группами на поверхности НА.

Методом динамического светорассеяния измерили ζ -потенциал на поверхности частиц НА (Рисунок 2Д). НА ТАН и СТП заряжены положительно со значениями ζ -потенциала $24,2 \pm 0,7$ мВ и $37,9 \pm 0,3$ мВ соответственно. ζ -потенциал тетрил-НА составил $-27,4 \pm 0,1$ мВ. На основе полученных данных мы предположили возможность электростатического взаимодействия НА ТАН и СТП с отрицательно заряженными Фц, и взаимодействие тетрил-НА – с положительно заряженными Фц.

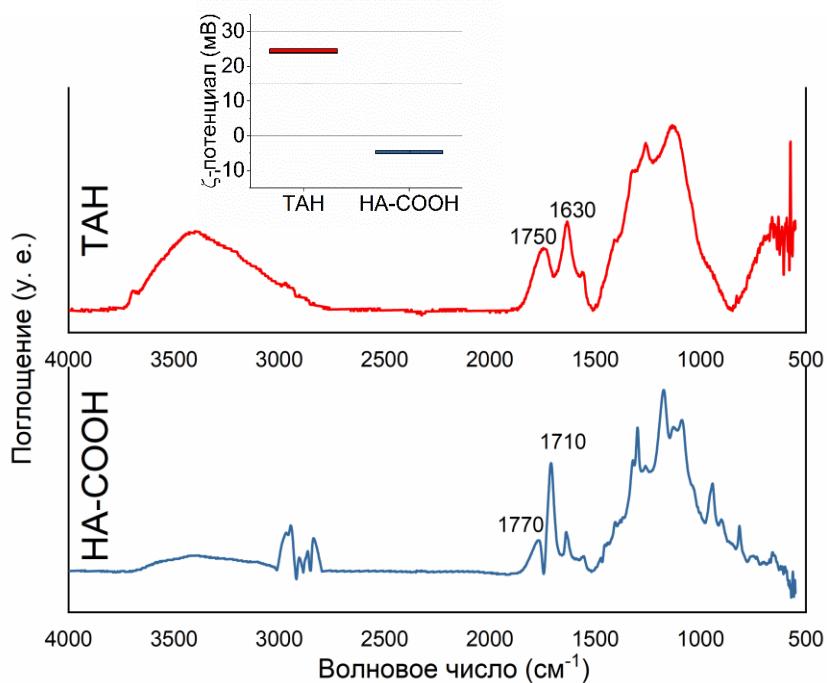


Рисунок 3. ИК-спектры и ζ -потенциал (на вставке) НА ТАН до и после карбоксилирования. Изменение ζ -потенциала с положительного на отрицательный и появление полос 1770 см^{-1} и 1710 см^{-1} говорит об успешном карбоксилировании НА.

Мы провели карбоксилирование НА ТАН с метильными и кетоновыми группами на поверхности для получения ещё одного образца отрицательно заряженных НА. Карбоксилирование проводилось за счёт инкубации НА в смеси азотной и серной кислот (массовое соотношение 3:1) при температуре 80°C в течение 24 часов. При сравнении ИК-спектров и ζ -потенциалов исходных и обработанных НА подтвердили успешное карбоксилирование (Рисунок 3). В дальнейшем карбоксилированные НА мы будем обозначать как НА-СООН.

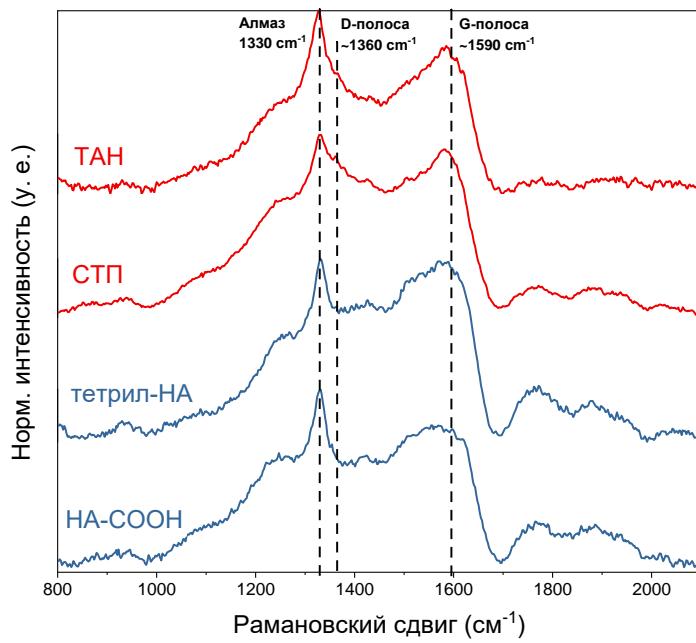


Рисунок 4. Спектры комбинационного рассеяния НА. Полоса 1360 см^{-1} соответствует аморфному углероду, наиболее выражена у НА ТАН и СТП.

Методом комбинационного рассеяния мы установили углеродный состав НА (Рисунок 4). Все четыре образца НА имеют на спектрах характерную алмазную полосу в районе 1330 см^{-1} . Полоса в районе 1590 см^{-1} ассоциирована с sp^2 -углеродом, который образуется на поверхности НА в процессе синтеза. Полоса в районе 1360 см^{-1} может быть соотнесена с D-полосой, которая соответствует аморфному углероду. Она наиболее ярко выражена у НА ТАН и СТП, что говорит о преобладании аморфного углерода на их поверхности. Таким образом, исследуемые нами НА состоят из углерода в sp^3 -гибридизации, углерода в sp^2 -гибридизации (согласно литературным данным, находится на поверхности) и аморфного углерода, наиболее выраженного у НА ТАН и СТП.

Мы показали, что исследуемые нами НА имеют квазисферическую форму и диаметр около 7 нм. В воде НА образуют агрегаты диаметром до 100 нм, что является допустимым размером для проникновения частиц в клетку. На поверхности НА находятся различные функциональные группы, обеспечивающие положительный или отрицательный ζ -потенциал частиц. Также на поверхности НА находится углерод в sp^2 -гибридизации, на поверхности НА ТАН и СТП особенно

выражен аморфный углерод. Далее необходимо исследовать взаимодействие описанных нами структур с Фц.

Образование комплекса между НА и Фц

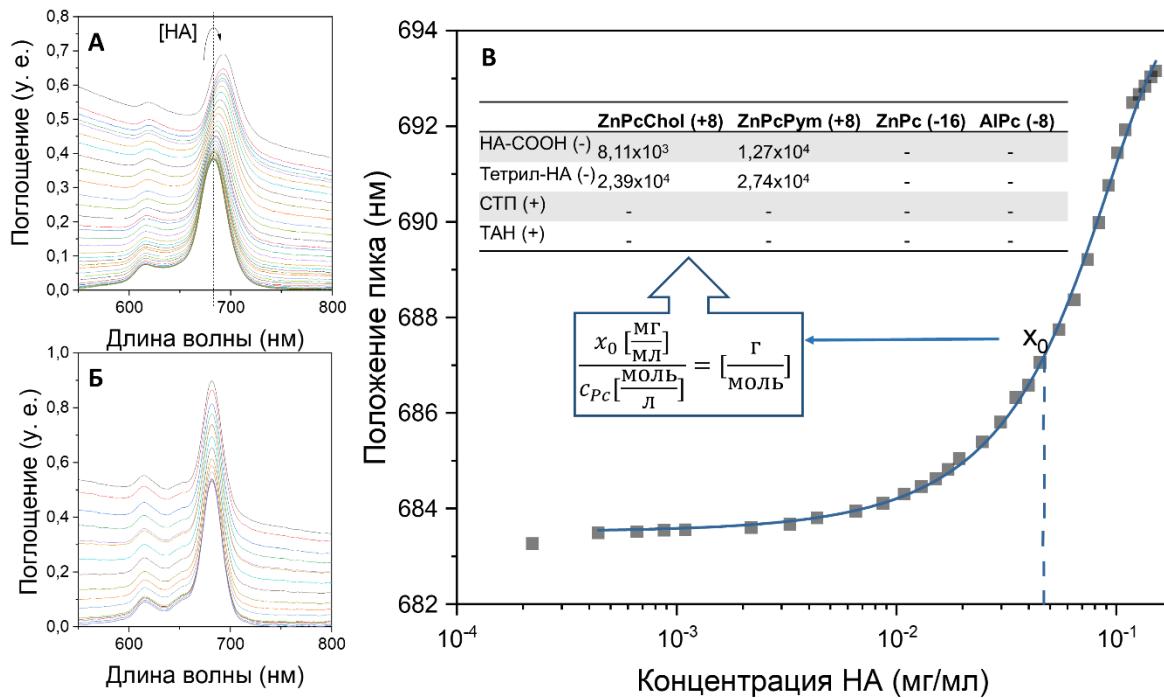


Рисунок 5. А – батохромный сдвиг максимума поглощения Фц после взаимодействия с НА, Б – увеличение оптической плотности в связи с рассеянием НА без батохромного сдвига, В – пример кривой титрования НА-Фц построенной на батохромном сдвиге максимума поглощения Фц. На вставке представлена таблица значений x_0 , разделённая на концентрацию Фц для разных пар Фц-НА (размерность г/моль). Если спектр Фц не смешался, в таблице ставили прочерк.

При добавлении тетрил-НА и НА-COOH к ZnPcChol+8 и ZnPcPym+8 мы наблюдали смещение Q-полосы поглощения Фц, что является характерным признаком образования ГС (Рисунок 5А). Зависимость положения пика Q-полосы поглощения Фц от концентрации НА (Рисунок 5В) аппроксимировали функцией вида:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x-x_0}{dx}}} + A_2,$$

где A_1 – положение максимума Q-полосы поглощения Фц без НА, A_2 – положение максимума Q-полосы поглощения Фц при полном связывании Фц с НА, x_0 – концентрация НА, при которой половина Фц, находящихся в растворе, связана с НА. Получены оценки количества НА, необходимого для связывания 1 моля Фц.

Наименьшее значение мы наблюдали для пар с НА-СООН. Однако НА-СООН имели низкую агрегативную устойчивость, поэтому для дальнейшей работы мы выбрали пару ZnPcChol+8/тетрил-НА.

Мы показали, что интенсивность флуоресценции Фц ZnPcChol+8 при образовании ГС с тетрил-НА значительно уменьшалась (Рисунок 6А). Анализ кинетик затухания флуоресценции показал, что тушение флуоресценции происходило по статическому механизму, т.е. без изменения длительностей флуоресценции. Таким образом, образование ГС приводит к полному тушению флуоресценции Фц. Литературные данные указывают, что основным типом взаимодействия между НА и Фц является π - π стекинг. В этом случае происходит взаимодействие между π -электронными системами Фц и углерода в sp^2 -гибридизации на поверхности НА. π - π стекинг, вероятно, является причиной тушения Фц при образовании агрегатов.

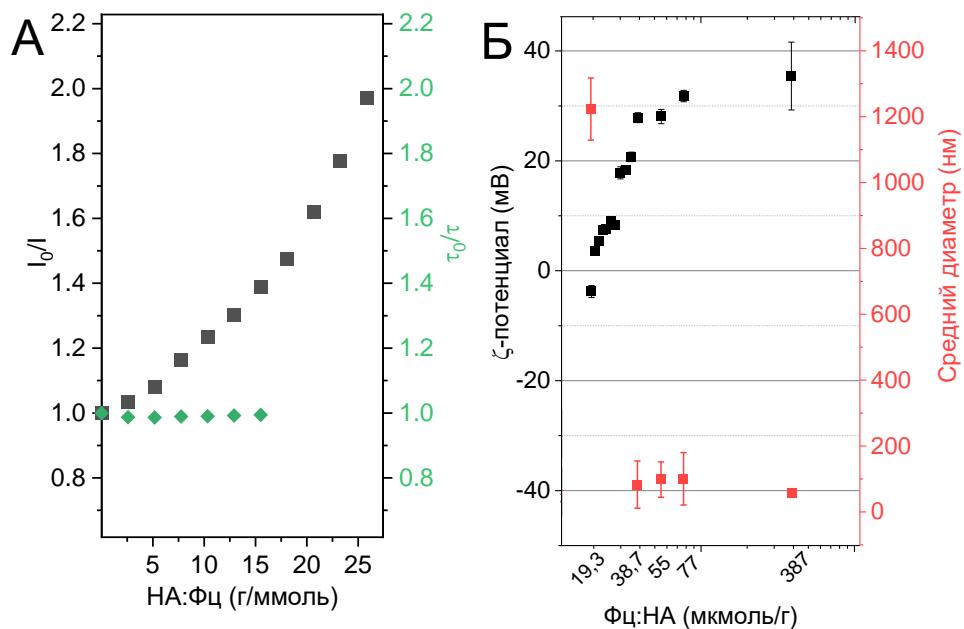


Рисунок 6. А – тушение флуоресценции ZnPcChol+8 тетрил-НА в координатах Штерна-Фольмера, полученные зависимости соответствуют статическому тушению, **Б** – изменение ζ -потенциала и гидродинамического диаметра частиц в системе ZnPcChol+8/тетрил-НА при увеличении концентрации наноалмазов.

При взаимодействии тетрил-НА и ZnPcChol+8 меняется ζ -потенциал частиц (Рисунок 6Б). На поверхности тетрил-НА находятся отрицательно заряженные группы (карбоксильные и гидроксильные), что обуславливает возможность электростатической адсорбции положительно заряженных Фц с холиниловым

заместителями. Суммарный заряд ГС тетрил-НА/ZnPcChol+8 положительный. Таким образом, при образовании ГС между НА и Фц, помимо смещения Q-полосы поглощения, происходит тушение флуоресценции Фц и изменение ζ -потенциала частиц в системе.

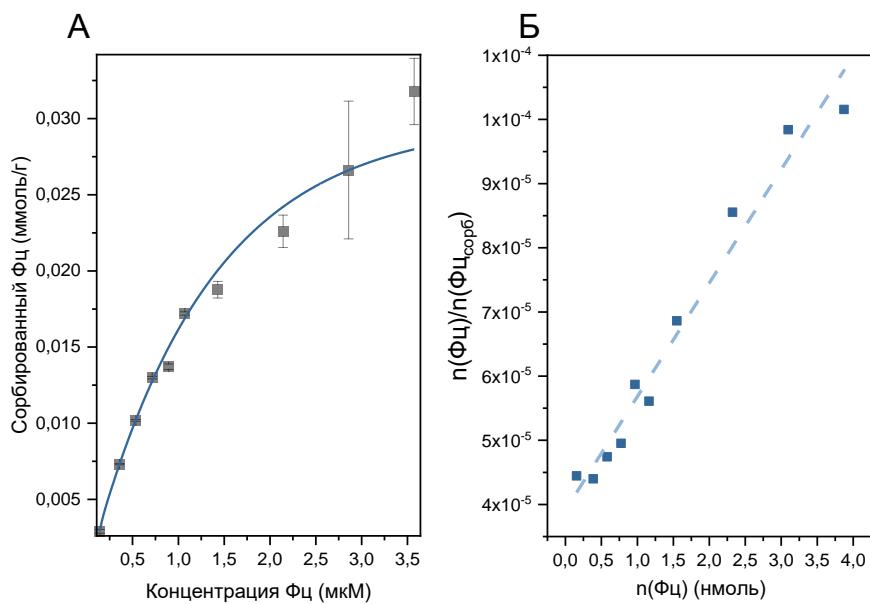


Рисунок 7. А – изотерма адсорбции фталоцианина на наноалмазе в стандартных координатах; **Б** – изотерма адсорбции фталоцианина на наноалмазе в координатах линеаризованной формы изотермы Ленгмюра.

Также для определения максимально возможного числа Фц ZnPcChol+8, связанных с тетрил-НА, мы построили изотерму адсорбции Фц (Рисунок 7А). Для этого использовали соосаждение Фц с НА в ГС. Растворы Фц центрифугировали с добавлением НА одинаковой концентрации. После центрифугирования измеряли оптическую плотность супернатанта, делали поправку на смещение Q-полосы поглощения Фц, определяли концентрацию Фц в супернатанте и из этого рассчитывали концентрацию связанного с наноалмазами Фц. По полученным данным строили зависимость количества сорбированного Фц от концентрации Фц. Для расчёта максимума адсорбции Фц на НА использовали линеаризованную форму изотермы Ленгмюра (Рисунок 7Б): $\frac{n}{a} = \frac{1}{k \cdot a_{max}} + \frac{n}{a_{max}}$, где n – количество адсорбата, моль, a – количество адсорбированного вещества, a_{max} – максимально возможное количество адсорбированного вещества (полное насыщение), k – константа сорбции.

Расчёты показали, что максимально возможное количество адсорбированного ZnPcChol+8 на тетрил-НА составляет $5,65 \times 10^{-5}$ моль/г (56,5 мкмоль/г).

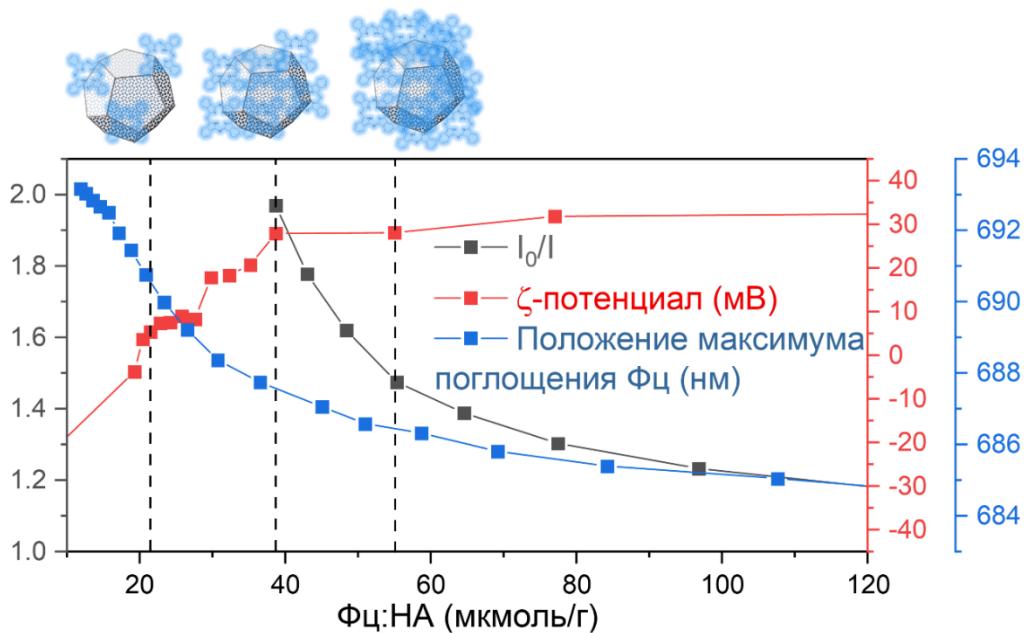


Рисунок 8. Ключевые соотношения ZnPcChol+8 и тетрил-НА в ГС и её свойства. При соотношении Фц:НА 21 мкмоль/г и ниже наблюдается максимально возможный батохромный сдвиг и тушение флуоресценции (взаимодействия за счёт π - π стекинга), в диапазоне соотношений 21-38,7 мкмоль/г происходит перезарядка частицы (электростатические взаимодействия), ГС с соотношением 56,5 мкмоль/г стабильна при центрифугировании.

Значения максимального количества сорбированного ZnPcChol+8 на тетрил-НА отличаются при определении по максимуму сдвига Q-полосы поглощения, по изотерме адсорбции и по ζ -потенциалу поверхности НА (Рисунок 8). Так, максимальный батохромный сдвиг Q-полосы поглощения Фц наблюдается в ГС с соотношением 21 мкмоль/г и ниже. При этом Фц в комплексе не флуоресцирует, ζ -потенциал близок к нулю. При увеличении концентрации Фц в ГС ζ -потенциал увеличивается пока не достигает +30 мВ при соотношении компонентов 38,7 мкмоль/г. Фц в такой ГС флуоресцирует, но с низкой интенсивностью. Сама ГС при этом стабильна при центрифугировании (604 g). При увеличении доли Фц в ГС вплоть до соотношений компонентов 56,5 мкмоль/г стабильность комплекса сохраняется. Дальнейшее увеличение количества молекул Фц не приводит к взаимодействиям между Фц и НА, а интенсивная флуоресценция обусловлена свободными Фц в растворе. Установленные закономерности указывают на

существование, как минимум, двух механизмов образования ГС между Фц и НА: один механизм приводит к смещению Q-полосы поглощения и тушению флуоресценции, второй – к перезарядке частицы.

Для определения природы механизмов связывания Фц и НА, было изучено взаимодействие между Фц с отрицательно заряженными группами (ZnPc-16) и положительно заряженным НА-СТП. Ранее нами было показано (Рисунок 4Б-В), что при добавлении НА-СТП к ZnPc-16 смещение Q-полосы поглощения Фц не происходит. Однако методом динамического светорассеяния мы показали, что при этом происходит изменение ζ -потенциала частицы НА (Рисунок 9А), что свидетельствует о взаимодействии между Фц и НА. В этом случае мы наблюдаем возможное взаимодействие между положительно заряженными группами на поверхности НА-СТП (метильными) и карбоксильными заместителями Фц. Также мы показали соосаждение Фц с НА, что также свидетельствует об образовании ГС (Рисунок 9В). Однако при образовании такой ГС, происходит не тушение флуоресценции, а её разгорание (Рисунок 9Б). Увеличение интенсивности флуоресценции может быть обусловлено частичной мономеризацией ZnPc-16 при взаимодействии с НА. В отличие от ZnPcChol+8, ZnPc-16 в водном растворе частично димеризован, что приводит к тушению флуоресценции. При взаимодействии ZnPc-16 с НА-СТП, вероятно, Фц мономеризуется и интенсивность флуоресценции увеличивается. Длительность флуоресценции при этом не меняется (Рисунок 9Б). Это говорит о наличии принципиально другого типа взаимодействия между Фц и НА в такой паре. Такая закономерность может объясняться свойствами поверхности НА-СТП: в спектре комбинационного рассеяния НА-СТП выражена D-полоса поглощения, соответствующая аморфному углероду (Рисунок 4). Аморфный углерод на поверхности НА препятствует взаимодействию π -электронных систем Фц и sp^2 -углерода. Таким образом, в ГС ZnPc-16/НА-СТП реализуется только электростатическое взаимодействие, а в ГС ZnPcChol+8/тетрил-НА – π - π стекинг и электростатическое взаимодействие.

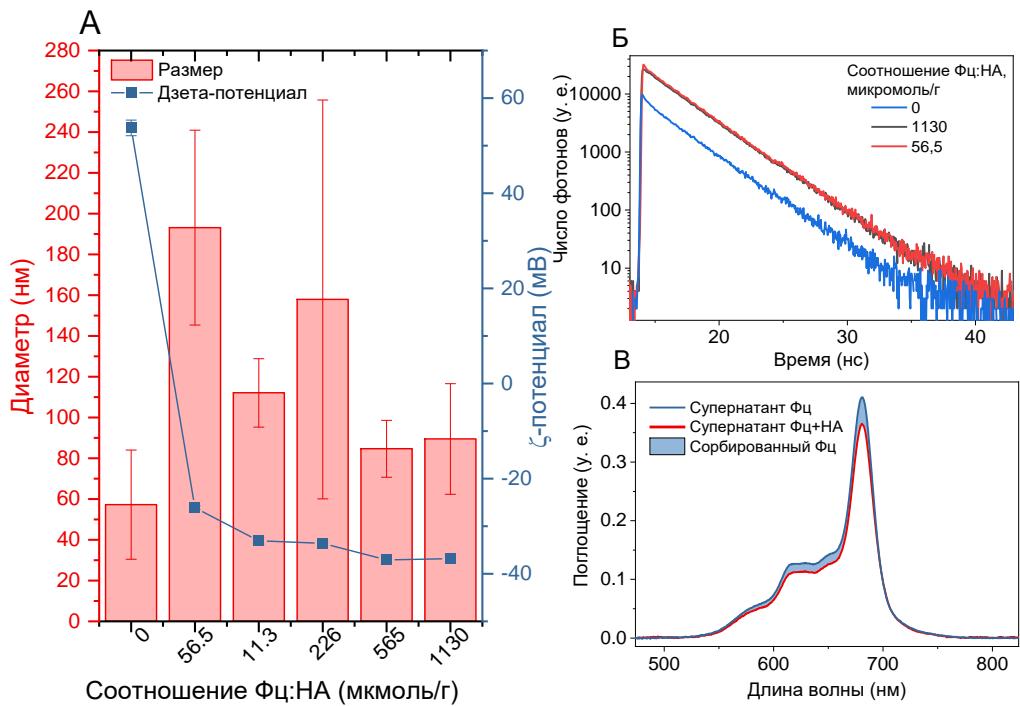


Рисунок 9. А – Изменение гидродинамического диаметра и ζ -потенциала положительно заряженного наноалмаза СТП при добавлении фталоцианина ZnPc-16; Б – кинетика затухания флуоресценции фталоцианина до и после добавления наноалмазов; В – Поглощение супернатанта раствора фталоцианина после центрифугирования на скорости 604 г в контроле и в присутствии наноалмазов.

Мы проанализировали фотодинамическую активность Фц в составе различных ГС с НА. В ГС, сформированной с участием π - π стекинга, фотодинамическая активность Фц снижается с увеличением доли НА в ГС. Это подтверждается и сниженной скоростью выцветания ловушки АФК, и сниженным фотовыцветанием Фц (Рисунок 10А, 10В). В ГС, сформированной за счёт исключительно электростатических взаимодействий (Рисунок 10Б, 10Г), наблюдается незначительное снижение фотодинамической активности Фц. Таким образом, мы установили, что формирование ГС за счёт π - π стекинга снижает фотодинамическую активность Фц.

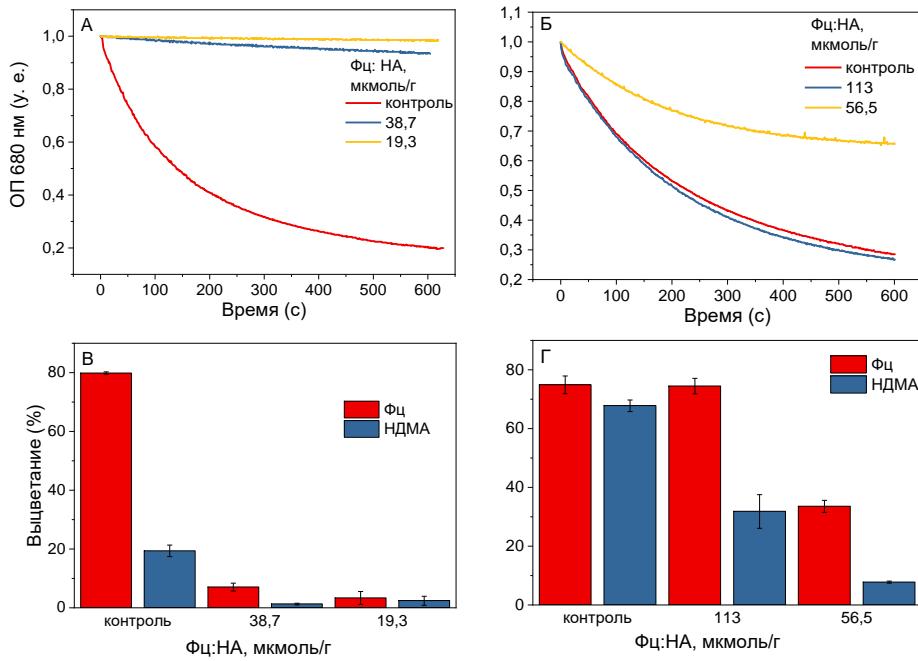


Рисунок 10. А – фотовыцветание ZnPcChol+8 в контроле и в комплексе сnanoалмазами, Б – фотовыцветание ZnPc-16 в контроле и в комплексе с nanoалмазами, В – степень выцветания ZnPcChol+8 и ловушки АФК НДМА в контроле и в комплексе с nanoалмазами, Г – степень фотовыцветания ZnPc-16 и ловушки АФК НДМА в контроле и в комплексе с nanoалмазами.

Стоит отметить, что у НА-СТП, в отличие от НА-тетрил, в спектре комбинационного рассеяния наблюдалась выраженная D-полоса, соответствующая аморфному углероду (Рисунок 3). Аморфный углерод на поверхности НА, вероятно, препятствует взаимодействию π -электронной системы НА с π -электронной системой Фц, поэтому при взаимодействии ZnPc-16 с НА-СТП мы не наблюдаем признаков, характерных для π - π стекинга. Наличие аморфного углерода на поверхности определяется обработкой НА: так, НА-ТАН до карбоксилирования не взаимодействовали с Фц по типу π - π стекинга, а после карбоксилирования мы наблюдали все признаки, характерные для π - π стекинга.

Мы установили, что при взаимодействии ZnPcChol+8 с тетрил-НА образуется ГС на основе электростатических взаимодействий и π - π стекинга. При этом снижается фотодинамическая активность Фц. При взаимодействии ZnPc-16 и НА-СТП образуется ГС на основе электростатических взаимодействий с сохранением фотодинамических свойств Фц. При этом аморфный углерод на поверхности НА-

СТП препятствует взаимодействию π -электронных систем НА и Фц. Следующим этапом нашей работы было изучение фотодинамического действия полученных нами ГС в отношении клеток.

Оценка фотодинамического действия различных гибридных систем Фц-НА в отношении эпидермоидной карциномы человека (A431)

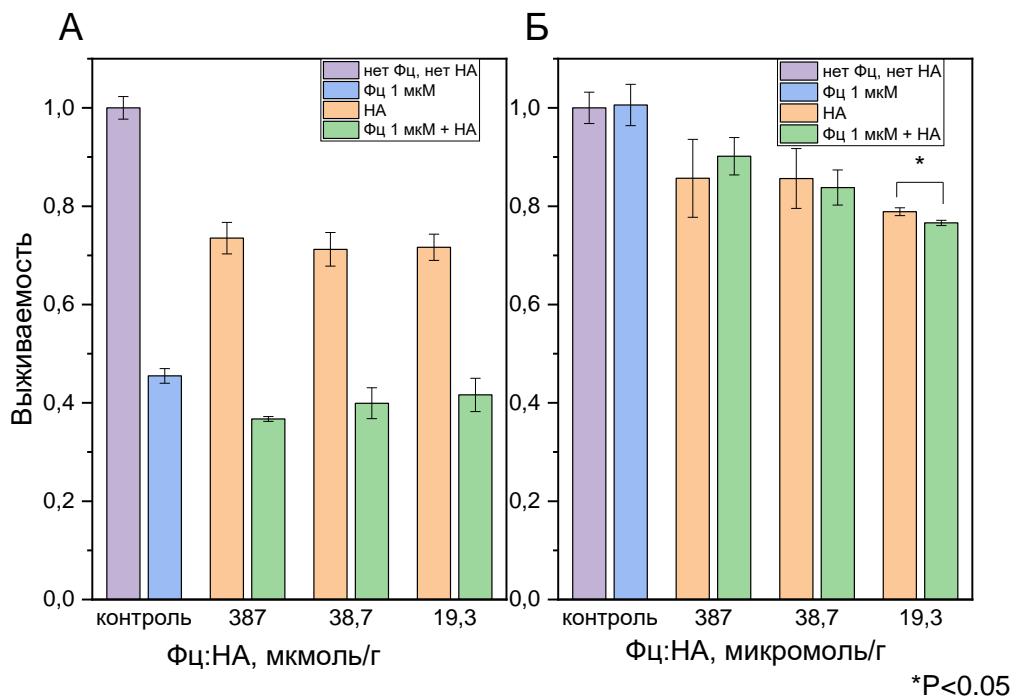


Рисунок 11. Доля выживших клеток линии А431 после облучения красным светом в присутствии положительно заряженных ZnPcChol+8 и их ГС с тетрил-НА (А) и отрицательно заряженных ZnPc-16 и их ГС с НА-СТП (Б).

Исследуемые нами НА обладают слабым токсическим действием в отношении клеток эпидермоидной карциномы человека линии А431 (Рисунок 11), однако в отношении клеток эмбриональных почек человека линии НЕК293 токсического действия выявлено не было. Токсический эффект НА в отношении раковых клеток известен в литературе и связан с избыточным накоплением НА в клетках из-за повышенной пролиферации. Таким образом, исследуемые нами НА отвечают критериям для применения на биологических объектах.

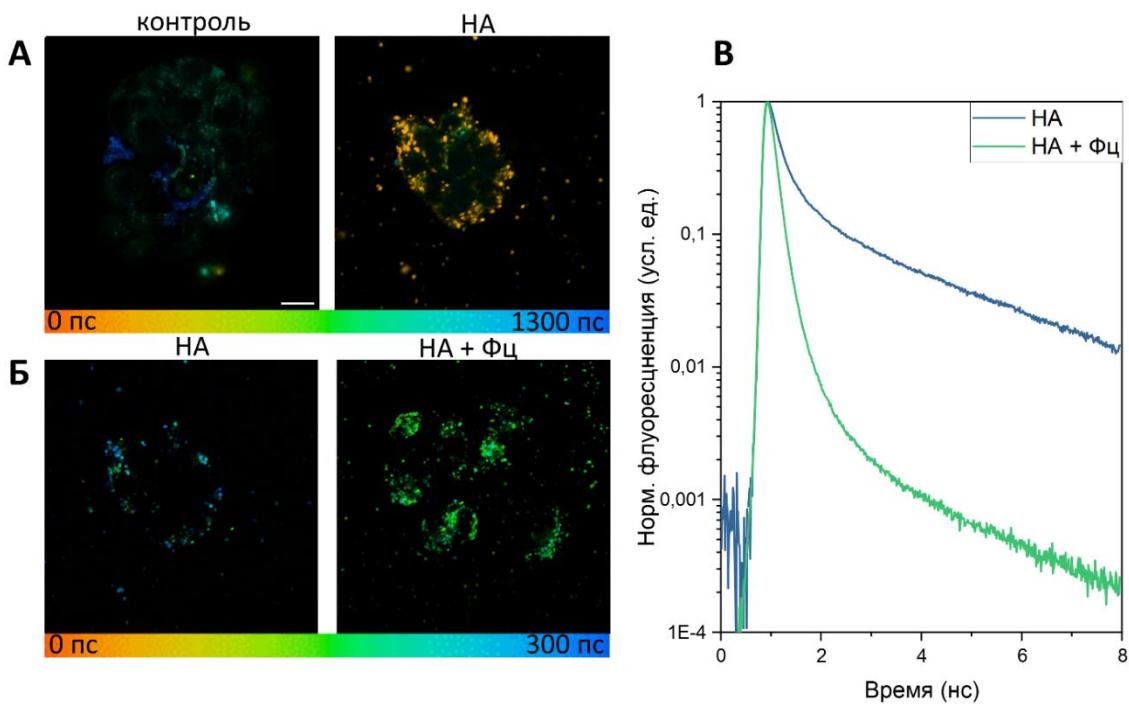
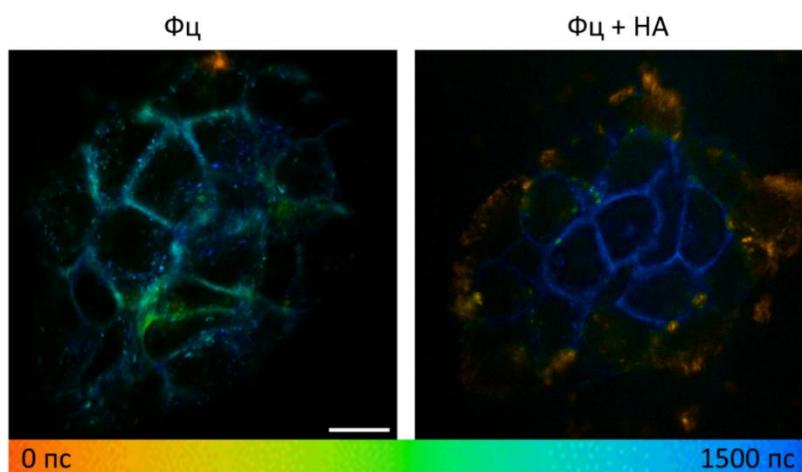


Рисунок 12. FLIM-изображения клеток линии A431 в контроле, после инкубации с НА СТП и после инкубации с ГС ZnPc-16/СТП с соотношением компонентов 19,3 мкмоль/г, **А** – длина волны возбуждения 473 нм, наблюдается автофлуоресценция клеток в контроле и флуоресценция НА с коротким временем жизни, **Б** – длина волны возбуждения 640 нм, наблюдается флуоресценция НА и флуоресценция ГС, **В** – кинетика затухания флуоресценции в клетках линии A431 на длине волны возбуждения после инкубации с НА СТП и с ГС ZnPc-16/СТП. Различия во времени жизни говорят о связывании Фц с НА. Масштаб 20 мкм.

Мы оценили фотодинамическое действие различных ГС в отношении клеток линии A431. Нами установлено, что ZnPcChol+8 проникает в клетки (Рисунок 13) и обладает высокой фотодинамической активностью (Рисунок 11А). Тетрил-НА с большим количеством ZnPcChol+8 на поверхности обладают усиленной (по сравнению с ZnPcChol+8 самим по себе) фотодинамической активностью, однако при аналогичной концентрации ZnPcChol+8 и большем содержании тетрил-НА в ГС фотодинамическая активность падает. Это, вероятно, объясняется увеличением количества Фц, связанных с НА за счёт π - π стекинга. Методом Fluorescence-lifetime imaging microscopy (FLIM) мы установили, что ГС ZnPcChol+8/тетрил-НА после проникновения в клетку распадается (Рисунок 13). Распад ГС может частично нивелировать негативный эффект от π - π стекинговых взаимодействий, что объясняет усиленную фотодинамическую активность ГС на основе тетрил-НА с большим количеством ZnPcChol+8 на поверхности.

ZnPc-16 практически не обладает фотодинамической активностью в отношении клеток линии A431 (Рисунок 11Б). Методом FLIM мы показали, что ZnPc-16 не проникает в клетки. Положительно заряженные НА-СТП в клетки проникают и обладают слабым токсическим действием (Рисунок 12А). Так как мембрана клеток заряжена отрицательно, заряд Фц и НА существенно влияют на проникновение в клетку и, как следствие, жизнеспособность клеток. При связывании с НА-СТП ZnPc-16 проникают в клетку (Рисунок 12Б-В). При увеличении количества НА-СТП в ГС фотодинамическое действие увеличивается, и в итоге превосходит токсическое действие НА (Рисунок 11Б). Таким образом, использование ГС на основе электростатического взаимодействия предпочтительнее, так как не происходит снижение фотодинамической активности



Фц.

Рисунок 13. FLIM-изображения клеток линии A431 после инкубации с ZnPcChol+8 и после инкубации с ГС ZnPcChol+8/НА-тетрил с соотношением компонентов 19,3 мкмоль/г на длине волны возбуждения 640 нм. Различная локализация областей с короткой и быстрой флуоресценцией говорит о распаде ГС после попадания в клетку. Масштаб 20 мкм.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках данной работы для увеличения эффективности ФДТ разработана платформа для доставки фотосенсибилизаторов на основе НА. Для этого мы определили основные физические характеристики НА, проведена успешная модификация НА карбоксильными группами. Получены различные ГС Фц с НА (тетрил-НА с ZnPcChol+8 и НА-СТП с ZnPc-16). Различными спектральными методами определено максимально возможное число Фц, способных связаться с НА. Выявлено два механизма образования ГС: π - π стекинг и электростатическое притяжение. Установлено, что электростатическое притяжение реализуется за счёт заряженных функциональных групп на поверхности НА, а π - π стекинг – за счёт π -электронов углерода в sp^2 -гибридизации. Однако аморфный углерод на поверхности НА может препятствовать взаимодействию π -электронных систем НА и Фц. Так как π - π стекинг снижает фотодинамическую активность Фц, ГС на основе электростатического взаимодействия предпочтительнее для использования в рамках ФДТ (Рисунок 14В-Г). Установлено, что ZnPc-16 не могут самостоятельно проникать в клетки, однако в составе ГС их проникновение в клетку становится возможным (Рисунок 14А-Б).

Связывание Фц с наночастицей для доставки, не нарушающей его фотодинамические свойства, даёт возможность увеличить эффективность ФДТ за счёт использования лигандов для рецептор-опосредованного эндоцитоза. Известны случаи успешного связывания НА с такими лигандами, например, с трансферрином. Такая стратегия позволяет увеличить избирательность доставки. НА в таком случае выступает нейтральным связующим звеном, не влияющим на работоспособность компонентов платформы. Проделанное нами исследование может стать основой для разработки эффективного препарата на основе фотосенсибилизатора для лечения онкологических и бактериальных заболеваний.

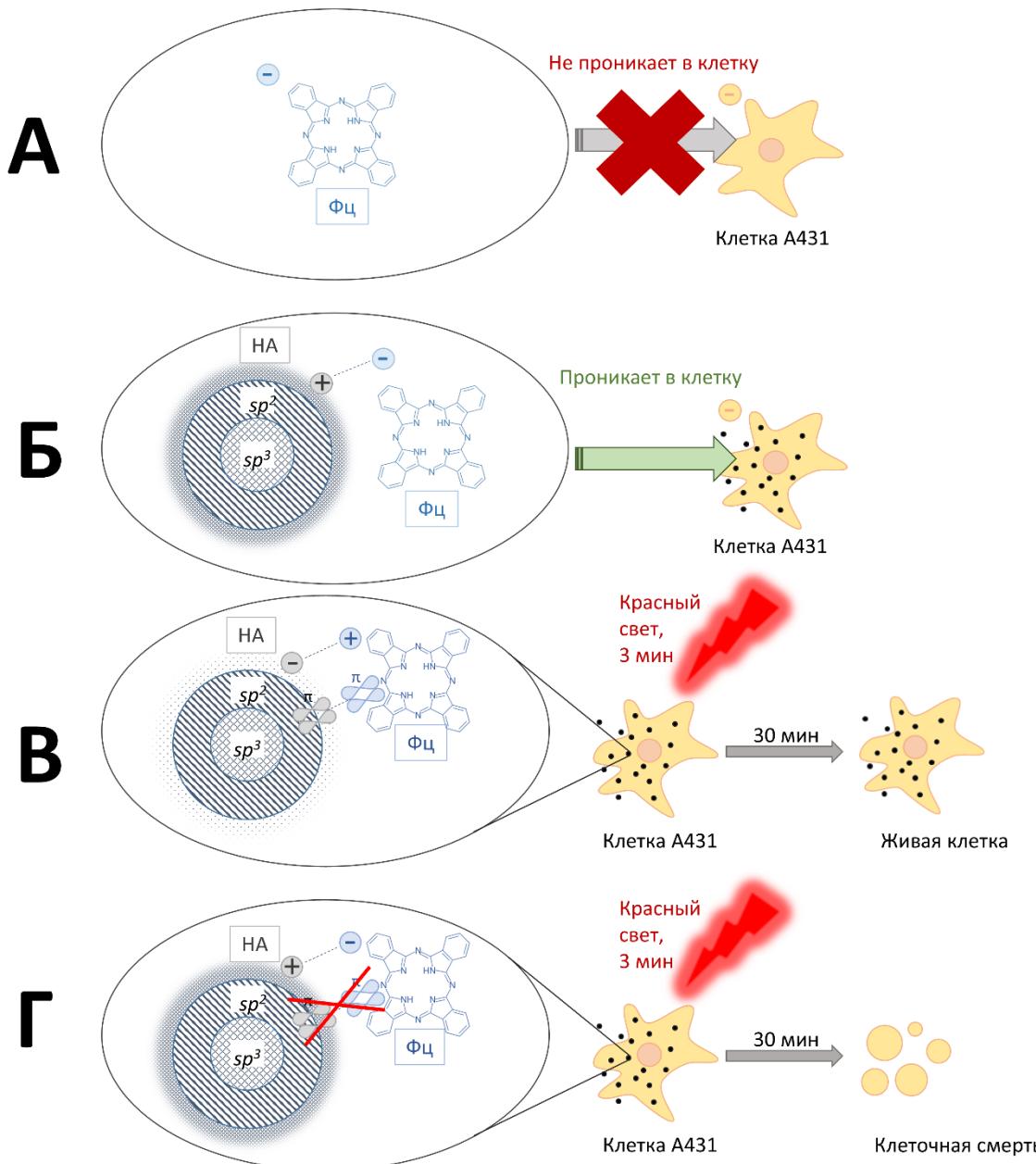


Рисунок 14. Основные закономерности, установленные в работе. **А** – отрицательно заряженный ZnPc-16 не проникает в клетку, так как поверхность клетки имеет отрицательный заряд, **Б** – в составе ГС на основе электростатических взаимодействий с положительно заряженными группами на поверхности НА-СТП ZnPc16- проникает в клетку, **В** – π - π стекинг между π -электронными системами углерода в sp^2 -гибридизации на тетрил-НА и ZnPcChol+8 снижает фотодинамическую активность Фц в ГС, **Г** – аморфный углерод на поверхности НА-СТП препятствует взаимодействию с ZnPc-16 по типу π - π стекинга и Фц в ГС на основе электростатических взаимодействий сохраняет свою фотодинамическую активность.

Выводы:

1. Установлено, что гибридные системы наноалмаз-фталоцианин образуются за счёт π - π стекинга и электростатических взаимодействий. π - π стекинг осуществляется между π -электронной системой углерода в sp^2 -гибридизации на поверхности наноалмаза и π -электронной системой фталоцианина. Электростатическое взаимодействие осуществляется между заряженными функциональными группами на поверхности наноалмаза и заместителями в составе фталоцианина.
2. π - π стекинг при образовании гибридной системы между тетрил-НА и ZnPcChol+8 приводит к батохромному смещению Q-полосы поглощения и снижению интенсивности флуоресценции фталоцианина без изменения времени жизни.
3. В спектре комбинационного рассеяния НА-СТП выражена полоса, соответствующая аморфному углероду. Аморфный углерод на поверхности НА-СТП препятствует взаимодействию π -электронных систем наноалмаза и фталоцианина, и в гибридной системе ZnPc-16/НА-СТП реализуется только электростатическое взаимодействие без π - π стекинга.
4. Количество аморфного углерода на поверхности наноалмазов определяется их химической обработкой, так как после карбоксилирования НА ТАН количество аморфного углерода на их поверхности уменьшилось.
5. По скорости выцветания химической ловушки для активных форм кислорода выявлено, что генерация активных форм кислорода фталоцианином в гибридной системе ZnPcChol+8/тетрил-НА с π - π стекингом снижена по сравнению с гибридной системой ZnPc-16/НА-СТП, образованной исключительно за счёт электростатических взаимодействий.
6. При уменьшении соотношения фталоцианин:наноалмаз в гибридной системе ZnPcChol+8/тетрил-НА с π - π стекингом фотодинамическая активность фталоцианина в отношении клеток эпидермоидной карциномы человека (линия А431) снижается.

7. При уменьшении соотношения фталоцианин:наноалмаз в гибридной системе ZnPc-16/НА-СТП без π - π стекинга обеспечивается проникновение фталоцианина в клетки линии А431 и фотодинамическую активность фталоцианина увеличивается.

Публикации Гудковой Виктории Родионовны по теме диссертационной работы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базе ядра Российского индекса научного цитирования "eLibrary Science Index", рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности и отрасли наук 1.5.2. Биофизика (биологические науки) (в скобках приведен импакт-фактор журнала, объем публикации в печатных листах/вклад автора в печатных листах):

1. Gvozdev D.A., Ramonova A.A., Slonimskiy Y.B., **Gudkova V.R.**, Nikelshparg E.I., Moisenovich A.M., Moisenovich M.M., Zaitsev A.V., Olshevskaya V.A., Paschenko V.Z., Maksimov E.G. Nanodiamonds as a platform for targeted delivery of chlorin-based photosensitizers to cancer cells // Diamond and Related Materials. – 2021. – Vol. 120. – P. 108676. EDN: KLAOUK (Импакт-фактор 5,1 (JIF), 1,13/0,35 п. л.).
2. Gvozdev D.A., **Gudkova V.R.**, Moisenovich A.M., Ramonova A.A., Strakhovskaya M.G., Maksimov E.G. Detonation nanodiamonds as enhancers of *E. coli* photodynamic inactivation by phthalocyanines in a high molarity buffer solution // Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology – 2022. – Vol. 227. – P. 112387. EDN: QANIJA (Импакт-фактор 3,7 (JIF), 0,96/0,27 п. л.).
3. **Гудкова В.Р.**, Гвоздев Д.А., Цораев Г.В., Мойсенович А.М., Максимов Е.Г. Осветительная установка для определения эффективности действия фотосенсибилизаторов в отношении клеточных культур на основе светодиодов высокой мощности // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология – 2024. – Том 79. – №4. – Р. 306-314. EDN: MASREQ (Импакт-фактор 0,31 (РИНЦ), 0,81/0,54 п. л.) [Gudkova V.R., Gvozdev D.A., Tsoraev G.V., Moysenovich A.M., Maksimov E.G. High-Power LED-Based Light Source for Determining the Efficiency of Photosensitizers against Cell Cultures // Moscow University Biological Sciences Bulletin. – 2025. – Vol. 79. – №4. – Р. 225-231. EDN: QJBPHT (Импакт-фактор 0,41 (РИНЦ), 0,79/0,52 п. л.)]
4. **Gudkova V.R.**, Dolmatov V.Yu., Parshina E.Yu., Kormschikov I.D., Gvozdev D.A., Maksimov E.G. Phthalocyanine-nanodiamond conjugating mechanisms and their influence on photodynamic activity // Diamond and Related Materials – 2025. – Vol. 159. – P. 112930. DOI: 10.1016/j.diamond.2025.112930 (Импакт-фактор 5,1 (JIF), 2,59/1,82 п. л.)