

На правах рукописи

Рыбкин Александр Юрьевич

ФОТОФИЗИЧЕСКИЕ И ФОТОДИНАМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
ВОДОРАСТВОРИМЫХ ГИБРИДНЫХ СТРУКТУР
ФУЛЛЕРЕН-КРАСИТЕЛЬ

03.01.02 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Черноголовка – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институте проблем химической физики РАН

Научный руководитель: профессор, доктор физико-математических наук,
Котельников Александр Иванович

Официальные оппоненты:

Якубовская Раиса Ивановна, доктор биологических наук, профессор,
руководитель отделения модификаторов и протекторов противоопухолевой
терапии филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки
«Национальный медицинский исследовательский радиологический центр»
Министерства здравоохранения Российской Федерации – Московского научно-
исследовательского онкологического института имени П. А. Герцена

Левин Петр Петрович, доктор химических наук, ведущий научный сотрудник
лаборатории физико-химических основ регуляции биологических систем
Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биохимической физики имени Н. М. Эмануэля РАН

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической физики им. Н. Н. Семёнова РАН

Защита состоится « 7 » апреля 2016 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного
совета Д 501.001.96 при Московском государственном университете имени
М. В. Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 24,
МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики, аудитория «новая».

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Московского
государственного университета имени М.В. Ломоносова и на сайте

<http://www.bio.msu.ru/dissertations/view.php?ID=741>

Автореферат разослан « ___ » _____ 2016 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



М.Г. Страховская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время большое внимание уделяется исследованию биологической активности фуллерена C_{60} и его водорастворимых производных. Особый интерес представляют выраженные прооксидантные свойства фуллерена, обусловленные его способностью с квантовым выходом порядка единицы переходить в возбужденное триплетное состояние при поглощении кванта света. С этой точки зрения перспективно использование фуллеренов в качестве фотосенсибилизаторов (ФС) для фотодинамической терапии (ФДТ).

Однако слабое поглощение исходного C_{60} в красной области видимого света, в так называемой области окна проницаемости живых тканей, а также нерастворимость его в воде делает проблематичным применение нативного C_{60} для ФДТ. Перспективным путем создания нового типа фотосенсибилизаторов может быть создание гибридных структур путем присоединения к водорастворимому производному фуллерена подходящего красителя, хорошо поглощающего в красной области спектра и способного передать возбуждение или электрон на ядро фуллерена.

Выбор потенциальных препаратов для ФДТ в настоящее время ограничен достаточно узкой группой соединений: как правило, это производные порфирина, фталоцианина или хлорина. Данные соединения чрезвычайно гидрофобны и не соответствуют в полной мере современным требованиям, предъявляемым к фотосенсибилизаторам.

Создание водорастворимых диад фуллерен-краситель могло бы существенно расширить спектр красителей, пригодных для применения в ФДТ. Фуллерен в подобной структуре оказывается способным осуществлять перевод энергии возбужденного в триплетное или в синглетное состояние красителя в эффективную генерацию активных радикальных частиц.

Настоящая работа посвящена исследованию фотофизических свойств и фотодинамического действия гибридных структур фуллерен-краситель на основе водорастворимых полизамещенных производных фуллерена C_{60} (ППФ), синтезированных в ИПХФ РАН.

Цели и задачи работы. Основной целью работы являлось исследование фотофизических и фотодинамических свойств водорастворимых гибридных структур фуллерен-краситель для развития научных основ создания фотосенсибилизаторов нового поколения.

Для достижения цели были поставлены и решены следующие **задачи:**

1. Разработка методов создания комплексов фуллерен-краситель, образованных за счет нековалентных взаимодействий и ковалентных конъюгатов фуллерен-краситель.
2. Исследование процессов дезактивации возбужденных состояний красителя в составе комплекса и ковалентного конъюгата с фуллереном.
3. Исследование фотодинамической активности комплексов и ковалентных конъюгатов фуллерена и красителя в водных растворах и в модельных биологических мембранах при облучении светом в полосе поглощения красителя.
4. Изучение фотодинамического действия структур фуллерен-краситель на биологические модельные системы: на молекулы ДНК и на эукариотические клетки при облучении светом в полосе поглощения красителя.

Научная новизна работы. В работе впервые исследуются фотофизические свойства и фотодинамическое действие нового уникального класса водорастворимых производных фуллерена и их гибридных структур с красителями, образованных как за счет нековалентных взаимодействий, так и с помощью образования ковалентной связи. Объединение красителя и фуллерена в одну гибридную структуру вызывает эффективную дезактивацию как триплетных, так и синглетных возбужденных состояний красителей в водных растворах.

Обнаруженный эффект интенсивного тушения именно синглетных возбужденных состояний красителя ядром фуллерена позволяет значительно повысить фотохимическую и фотодинамическую активность диад фуллерен-краситель по сравнению со свободными красителем и фуллереном, даже в случае, если свободный краситель не проявляет фотодинамической активности.

Научно-практическая значимость исследования. Результаты данной работы представляют большой интерес для дальнейших фундаментальных и прикладных исследований фотодинамического действия водорастворимых диад фуллерен-краситель.

Была показана возможность использования синглетно возбуждаемых красителей для применения в фотодинамической терапии, что значительно расширяет круг красителей для создания новых потенциальных препаратов-фотосенсибилизаторов.

Личный вклад автора. Все включенные в диссертацию данные получены лично автором или при его непосредственном участии. Постановка экспериментов по определению фотодинамического действия на плазмидной ДНК проводилась совместно с к.б.н. Файнгольд И.И., экспериментов по определению фотодинамического действия на клеточной культуре HeLa проводилась совместно с к.б.н. Пархоменко И.И. Планирование исследований, обсуждение и обобщение полученных результатов осуществлялось совместно с руководителем д.ф.-м.н., проф. Котельниковым А. И.

Положения, выносимые на защиту.

1. Разработана концепция создания фотодинамически активных водорастворимых гибридных структур на основе полианионных или поликатионных производных фуллерена и красителей, образованных за счет нековалентных взаимодействий или за счет образования ковалентной связи.
2. Установлено, что в составе водорастворимых гибридных структур на основе фуллерена и красителя происходит эффективная дезактивация не только триплетных, но и синглетных возбужденных состояний красителя за счет переноса электрона или возбуждения на фуллерен, что значительно расширяет возможности поиска новых красителей для создания фотодинамически активных структур.
3. На биологических модельных системах показано значительное усиление фотодинамической активности гибридных структур на основе фуллерена и

синглетно-возбуждаемых красителей по сравнению со свободными фуллереном и красителем, что позволяет рекомендовать подобные структуры для дальнейших исследований в качестве потенциальных фотосенсибилизаторов.

Апробация работы. Результаты проведенных исследований были представлены в виде устных и стендовых докладов на российских и международных конференциях: на XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, 2015), на конкурсе молодых ученых ИПХФ РАН им. С.М. Батурина (г. Черноголовка, 2015), на VI Троицкой конференции «Медицинская физика и инновации в медицине» (Троицк, 2014), на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике» (Москва, 2014), на Первой Российской конференции по медицинской химии с международным участием (MedChem Russia, Москва, 2013), на третьем Международном Симпозиуме имени академика А.Н. Теренина «Молекулярная фотоника» (Репино, Санкт-Петербург, 2012), и на V Троицкой конференции «Медицинская физика и инновации в медицине» (Троицк, 2012).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 работ, из них 4 статьи в реферируемых журналах, входящих в перечень ВАК, две главы в монографиях и 10 тезисов в сборниках Всероссийских и международных научных конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 167 страницах машинописного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Работа содержит 38 рисунков и 10 таблиц. Список литературы включает 270 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Во введении обоснована актуальность проблемы, сформулированы цели и задачи исследования, показана научная новизна и практическая значимость.

Глава 1. Обзор литературы

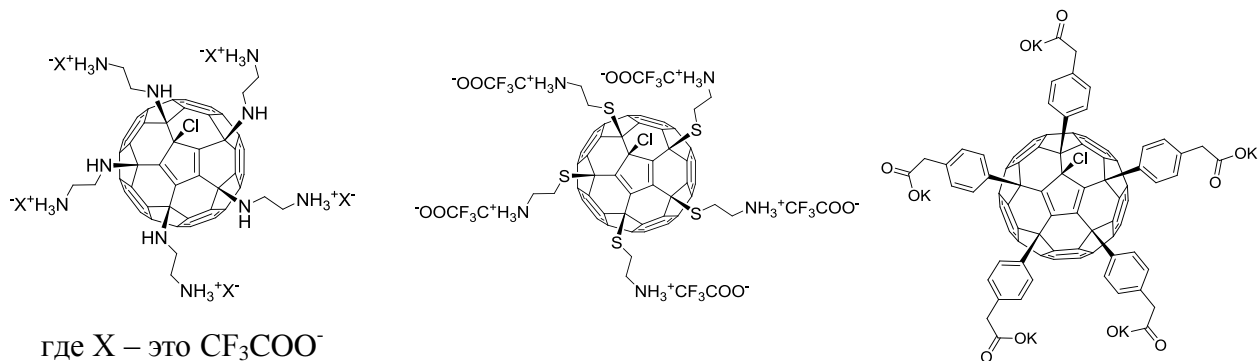
В главе 1 представлен литературный обзор, в котором отражены современные представления о механизмах действия фотосенсибилизаторов, о прооксидантных свойствах фотовозбужденного фуллерена C_{60} и его производных, а также о фотодинамическом действии структур фуллерен-краситель.

Опубликованные литературные данные свидетельствуют о большом интересе исследователей к созданию структур фуллерен-краситель. Однако подавляющее большинство представленных в литературе структур нерастворимо в воде и предназначено для применения в фотовольтаике. Созданию диад фуллерен-краситель как потенциальных фотосенсибилизаторов посвящено весьма ограниченное число работ, и только единицы из них описывают создание структур, обладающих приемлемой растворимостью в воде. Большая часть представленных в литературе диад фуллерен-краситель требует применения специальных методов солюбилизации или введения соразтворителей, что может негативно отразиться на фармакологических свойствах данных соединений. Таким образом, актуальной проблемой является создание водорастворимых структур фуллерен-краситель и исследование фундаментальных закономерностей дезактивации возбужденных состояний красителей и фотодинамической активности гибридных структур с целью создания нового класса фотосенсибилизаторов.

Глава 2. Материалы и методы

В работе исследовались водорастворимые полизамещенные производные фуллерена – ППФ-1, ППФ-2, ППФ-3, ППФ-4, нековалентные комплексы «ППФ+краситель», ковалентные конъюгаты ППФ-Рубоксил, ППФ(К)-флуоресцеин и ППФ(А)-флуоресцеин, структурные формулы данных соединений

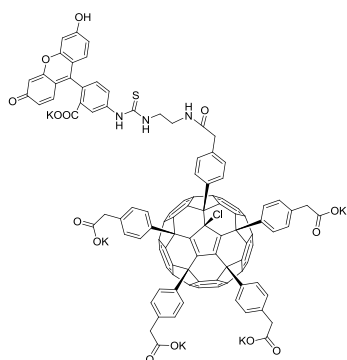
представлены на рис. 1. Для создания нековалентных комплексов «ППФ+краситель» были использованы ксантеновые красители флуоресцеин, эозин Y, эритрозин В и коммерческий препарат фталоцианинового ряда «Фотосенс» (рис. 2).



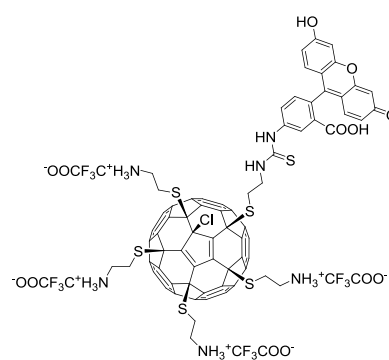
ППФ-1

ППФ-2

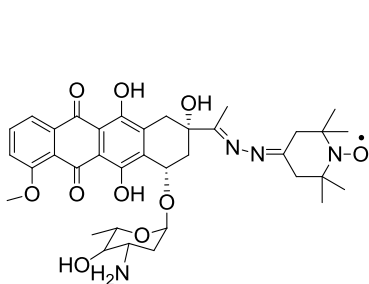
ППФ-3



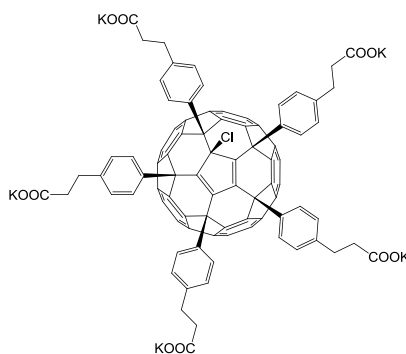
Ковалентный конъюгат анионного ППФ с флуоресцеином
ППФ(А)-флуоресцеин



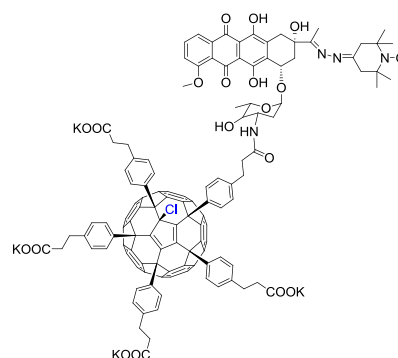
Ковалентный конъюгат катионного ППФ с флуоресцеином
ППФ(К)-флуоресцеин



Рубоксил



ППФ-4



ППФ-Рубоксил

Рис. 1. Структурные формулы водорастворимых полизамещенных производных фуллереина и ковалентных конъюгатов ППФ-краситель.

ППФ и конъюгаты ППФ-краситель были синтезированы Трошиным П.А., Корневым А.Б., Хакиной Е.А. и Краевой О.А. (ИПХФ РАН). Структура производных фуллерена доказывалась методами ИК- и УФ-спектроскопии, спектроскопии ядерного магнитного резонанса на ядрах ^1H и ^{13}C и электроспрей масс-спектрометрии.

Также в данной главе описаны метод определения фотохимической активности ППФ с помощью красителя НСТ, метод оценки коэффициента распределения октанол-вода, а также методы определения фотодинамической активности ППФ на плазмидной ДНК и клетках HeLa.

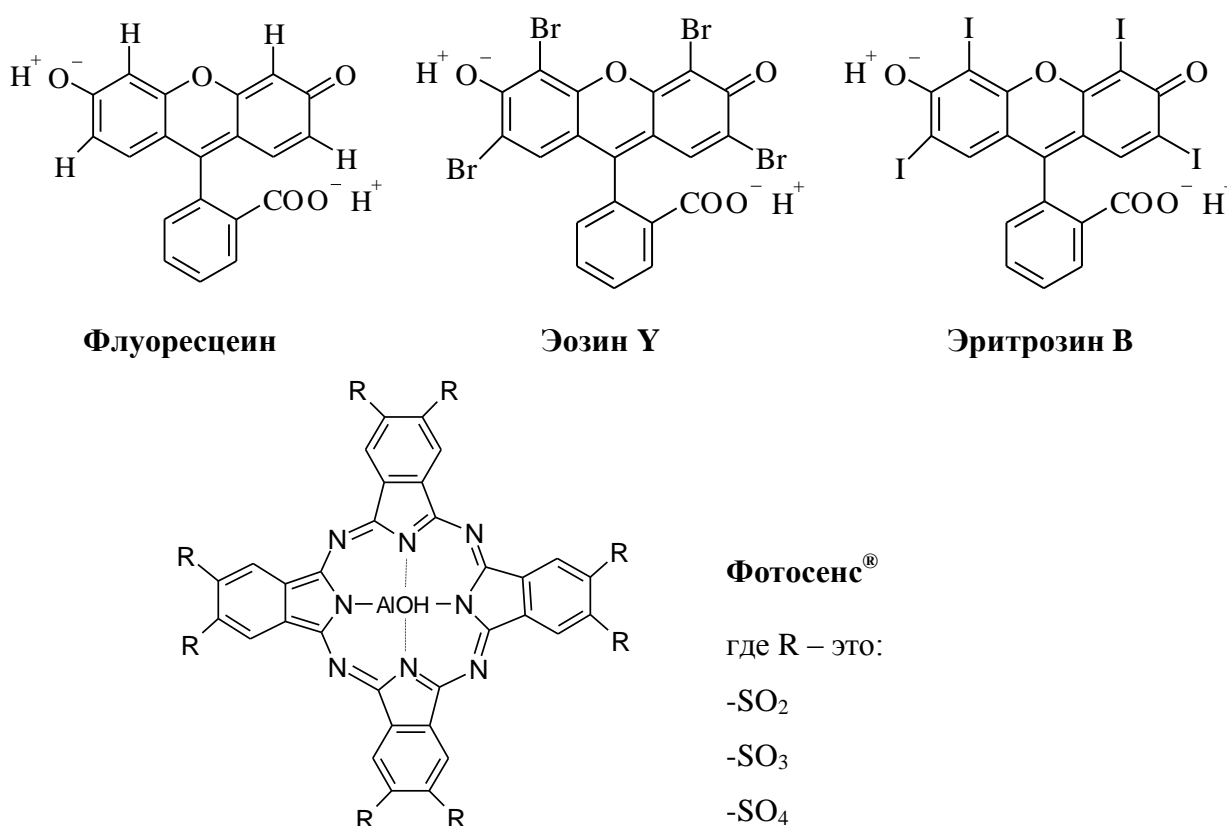


Рис. 2. Ксантеновые красители и коммерческий препарат Фотосенс.

Глава 3

В главе исследуются гибридные структуры фуллерен-краситель на основе нековалентных комплексов красителей с водорастворимыми полизамещенными производными фуллерена (ППФ).

Было обнаружено, что при добавлении соединения ППФ-1 в водный раствор эозина или других красителей (флуоресцеина, эритрозина В, Фотосенса) происходит образование статических комплексов «ППФ+краситель» за счет нековалентных взаимодействий. Это следует как из изменения спектра поглощения красителя (в качестве примера приведены спектры поглощения эозина – рис. 3, А), так и из выраженного тушения интенсивности флуоресценции красителя без изменения времени ее затухания (рис. 3, Б).

Следует отметить, что характер тушения интенсивности флуоресценции как эозина, так и других красителей, соединением ППФ-1 в бидистилляте и в буферном растворе не описывается линейной зависимостью в координатах Штерна-Фольмера (глава 4, рис 6). Наиболее вероятной причиной такого характера зависимости является агрегация молекул ППФ с ростом их концентрации.

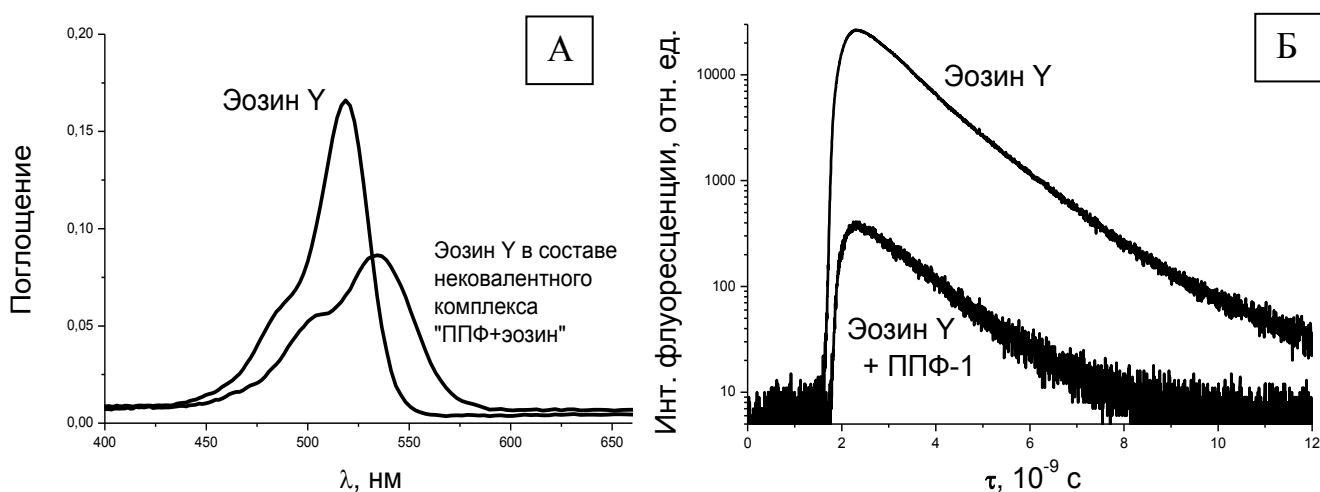


Рис. 3. Образование нековалентных комплексов «ППФ+эозин»: изменение спектра поглощения эозина (А) и тушение интенсивности флуоресценции эозина (Б) при взаимодействии с ППФ-1.

Все вещества растворены в бидистилляте (рН 6.5) в концентрации $2 \cdot 10^{-6}$ М.

Учитывая спектральные и донорно-акцепторные свойства фуллеренов, можно предположить два механизма тушения флуоресценции красителя в составе комплекса с ППФ: по механизму переноса электрона и за счет индуктивно-резонансного диполь-дипольного переноса энергии.

Анализ экспериментальных данных тушения флуоресценции эозина в составе нековалентного комплекса «ППФ+эозин» на основании теории Ферстера позволяет рассчитать расстояние R_0 , на котором тушение флуоресценции осуществляется на 50%

$$R_0^6 = \frac{9000 \ln 10 \times k^2 Q_f}{128 \pi^5 n^4 N_A} \int_0^{\infty} f_s(\nu) \times \varepsilon_A(\nu) \times \frac{d\nu}{\nu^4}, \quad (1)$$

где Q_f – квантовый выход флуоресценции донора; n – показатель преломления растворителя; N_A – число Авогадро, $\varepsilon_A(\nu)$ – молярная экстинкция акцептора энергии, $f_s(\nu)$ – спектр флуоресценции люминофора, нормированный по площади в шкале волновых чисел, ν – волновое число, k – фактор ориентации.

Зная величину R_0 и эффективность тушения флуоресценции за счет переноса возбуждения с донора на акцептор, выражаемую отношением F_0/F , где F_0 – интенсивность флуоресценции в отсутствии акцептора, F – интенсивность флуоресценции в присутствии акцептора, по формуле

$$R = \frac{R_0}{\sqrt[6]{\frac{F_0 - F}{F}}} \quad (2)$$

можно определить расстояние R между донором и акцептором, на котором осуществляется перенос энергии. Для пары ППФ-эозин при тушении флуоресценции в 1000 раз данное расстояние составило 8 Å.

Согласно теории Маркуса при оптимальных условиях реакции для оценки скорости реакции переноса электрона может быть применена формула

$$k_{et}^{NA} = k_0 \exp(-\alpha R) \quad (3)$$

которая была получена в результате обобщения данных по переносу электрона в различных молекулярных структурах, в том числе с участием фотовозбужденных молекул. Здесь $k_0 = 10^{16} \text{ c}^{-1}$, R – расстояние между центрами переноса, α – параметр, характеризующий влияние среды на перекрывание волновых функций донора и акцептора. Было получено, что за время жизни возбужденного синглетного состояния красителя эозина (порядка 10^{-9} c), перенос электрона на ядро фуллерена возможен на расстояние до 17 Å.

Таким образом, сопоставляя эти оценки с реальной структурой комплекса, нельзя сделать однозначный вывод о преобладании какого-либо из механизмов тушения. Можно предположить, что тушение возбужденного синглетного состояния красителя может происходить как за счет переноса возбуждения, так и по механизму переноса электрона в зависимости от полярности среды.

С помощью нековалентных комплексов «ППФ+краситель» была показана принципиальная возможность значительного (до девяти и более раз) усиления фотохимической активности фуллера за счет его взаимодействия с красителем (рис. 4).

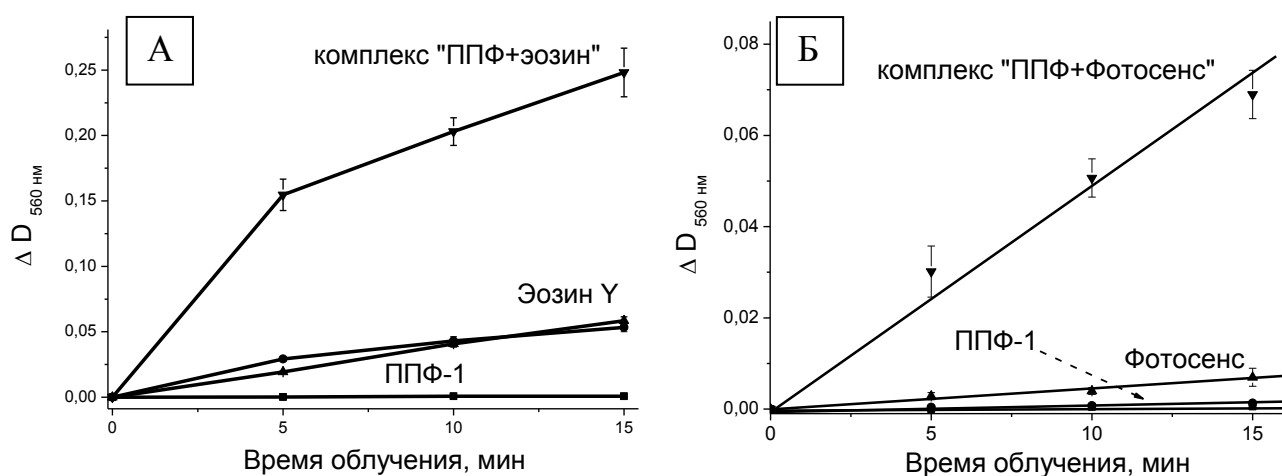


Рис. 4. Кинетика образования $O_2^{\cdot-}$ в результате фотохимической реакции при облучении нековалентного комплекса «ППФ-эозин» ($\lambda = 450 - 550 \text{ nm}$, А) и «ППФ-Фотосенс» ($\lambda > 650 \text{ nm}$, Б). Все вещества растворены в бидистилляте (рН 6.5) в концентрации $2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

Было обнаружено, что фотохимическая активность нековалентных комплексов не зависит от величины квантового выхода красителя в триплетное состояние. Наибольшая фотохимическая активность была у нековалентного комплекса «ППФ+флуоресцеин», имеющего минимальный квантовый выход в триплетное состояние и максимальный – в синглетное (табл. 1). Данная активность снижалась в ряду флуоресцеин > эозин > эритрозин.

На основании этого был сделан вывод, что перенос возбуждения на ядро фуллера в данных комплексах происходит именно с синглетных возбужденных уровней красителя. Обнаруженный эффект позволяет создавать гибридные структуры фуллерен-краситель с использованием красителей, возбуждаемых

только в синглетное состояние, что значительно расширяет круг потенциальных препаратов-фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии, который в настоящее время ограничен главным образом триплетно-возбуждаемыми красителями.

Таблица 1. Сравнение фотохимической активности нековалентных комплексов ППФ-1 с различными ксантоновыми красителями.

Краситель	$\Phi_{\text{триплет}}$	$\Phi_{\text{синглет}}$	Относительная фотохимическая активность комплекса с ППФ-1, %
Флуоресцеин	0.03	0.97	100 ± 8.9
Эозин Y	0.32	0.68	46 ± 5.8
Эритрозин B	0.97	0.02	37 ± 2.3

Ксантоновые красители поглощают только в зеленой области спектра, что не удовлетворяет требованиям фотодинамической терапии. С целью создания структуры, поглощающей в красной области спектра, был исследован нековалентный комплекс соединения ППФ-1 с коммерческим фотосенсибилизатором «Фотосенс». Было обнаружено, что фотохимическая активность данного комплекса «ППФ+Фотосенс» превышает суммарную фотохимическую активность свободного ППФ-1 и Фотосенса более чем в 9 раз (рис. 4, Б). Однако тестовые испытания на опухолевых клетках показали, что не происходит выраженного усиления фотодинамического действия данного комплекса по сравнению со свободными соединениями, как можно предположить, вследствие распада комплекса в структуре клеточных мембран. Очевидно, что для успешного создания фотодинамических структур, активных по отношению к биологическим структурам, требуется создание прочных ковалентных диад фуллерен-краситель.

Для решения поставленных в работе задач были синтезированы три гибридные структуры фуллерен-краситель. В двух диадах краситель флуоресцеин был присоединен к поликатионному и полианионному производным фуллерена, а также была создана диада ППФ-Рубоксил (рис. 1). Следует отметить, что оба

красителя (как флуоресцеин, так и Рубоксил) обладают пренебрежимо малым квантовым выходом в триплетное состояние.

Первоначально была синтезирована и исследована диада ППФ-флуоресцеин на основе анионного ППФ (ППФ(А)-флуоресцеин). При присоединении к ППФ происходит значительное уменьшение амплитуды поглощения флуоресцеина (рис 5, А). Было обнаружено, что флуоресценция красителя в составе данной диады потушена слабо – всего лишь в 1.4 раза с незначительным увеличением времени ее жизни (с 3.65 до 3.72 нс). Фотохимическая активность данной диады превышает суммарную фотохимическую активность свободных ППФ-3 и флуоресцеина всего лишь в 1.5 раза (рис 6, А).

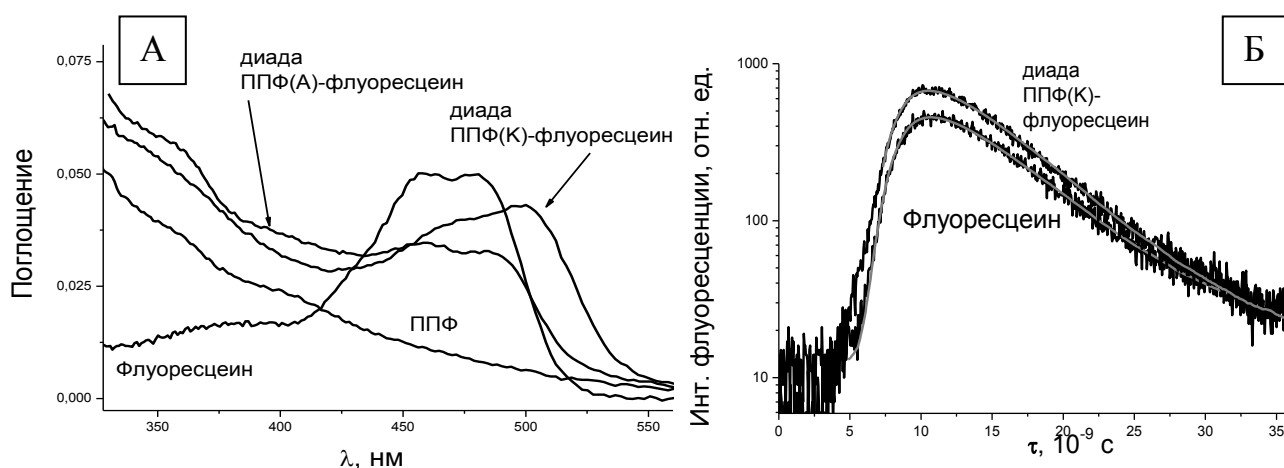


Рис. 5. Ковалентные диады ППФ(А)-флуоресцеин и ППФ(К)-флуоресцеин: спектры поглощения (А) и кинетики затухания флуоресценции (Б).

Все вещества растворены в бидистилляте (рН 6.5) в концентрации $2 \cdot 10^{-6}$ М.

Полученные данные говорят о малой эффективности передачи энергии возбуждения с красителя на фуллерен. Можно предположить, что данная анионная диада ППФ-флуоресцеин имеет вытянутую конформацию, в которой одноименно заряженные адденды ППФ и флуоресцеин разнесены на максимально возможное расстояние за счет сил электростатического отталкивания.

С целью повышения фотохимической активности системы ППФ-флуоресцеин была синтезирована диада на основе поликатионного производного фуллерена ППФ(К)-флуоресцеин. В отличие от диады ППФ(А)-флуоресцеин, в данной диаде происходит не только уменьшение амплитуды поглощения

флуоресцеина, но и наблюдается значительный красный сдвиг максимума его поглощения (рис 5, А). Было обнаружено, что в данной диаде интенсивность флуоресценции красителя потушена более чем в 35 раз, при этом регистрируется уменьшение времени ее жизни с 4.55 до 3.97 нс (рис. 5, Б). Фотохимическая активность данной диады превосходит суммарную фотохимическую активность свободных ППФ-2 и флуоресцеина более чем в 15 раз (рис 6, Б).

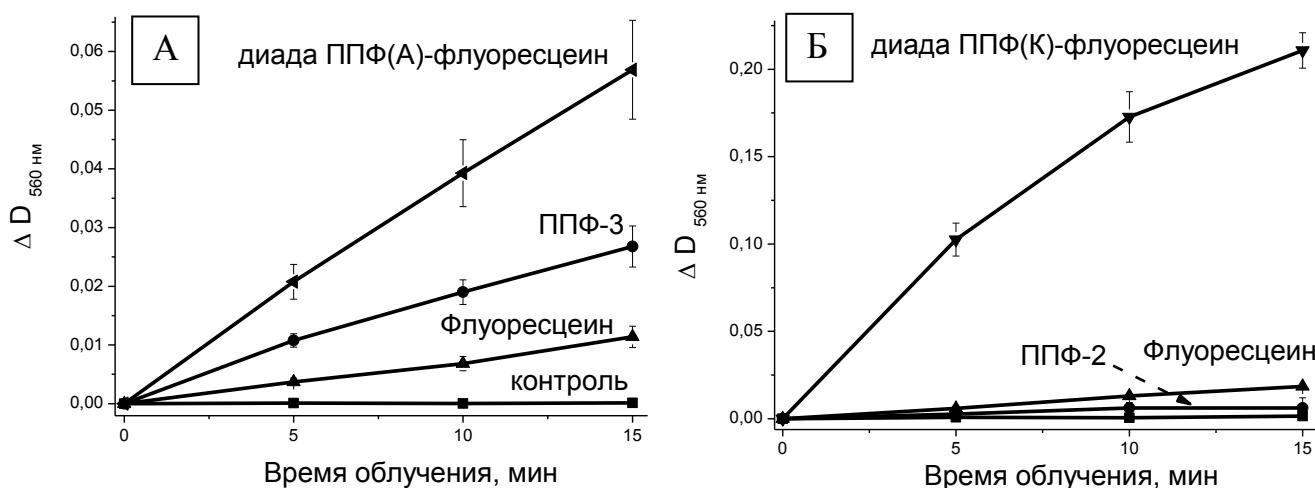


Рис. 6. Кинетика образования $O_2^{\cdot -}$ в результате фотохимической реакции при облучении ($\lambda = 450 - 550 \text{ nm}$) ковалентной диады ППФ(А)-флуоресцеин (А) и ППФ(К)-флуоресцеин (Б). Все исследуемые вещества растворены в бидистилляте (рН 6.5) в концентрации $2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$.

Можно предположить, что диада ППФ(К)-флуоресцеин в растворе имеет свернутую конформацию, в которой положительные заряды катионных аддендов ППФ взаимодействуют с отрицательными зарядами дианиона флуоресцеина. В результате расстояние между ядром фуллерена и флуоресцеином значительно сокращается, что существенно облегчает миграцию энергии возбуждения или электрона с красителя на фуллерен.

Глава 4

С целью приближения условий эксперимента к биологическим структурам в работе был исследован процесс протекания фотохимической реакции с участием нековалентных и ковалентных структур ППФ-краситель в модельной системе на основе лецитиновых липосом.

Было обнаружено, что образование нековалентных комплексов «ППФ+краситель» и процесс протекания фотохимической реакции с их участием значительно различаются между водным раствором и модельной системой на основе липосом.

Согласно нашим и литературным данным, подобные водорастворимые производные фуллерепа обладают выраженными липофильными свойствами и способны эффективно встраиваться в липидный бислой мембран клеток и липосом. В результате такого встраивания происходит разрушение ассоциатов ППФ, что приводит к изменению характера зависимости тушения интенсивности флуоресценции красителей при переходе от водного раствора к липосомам для всех исследованных нековалентных комплексов «ППФ+краситель» (рис. 7 и 8).

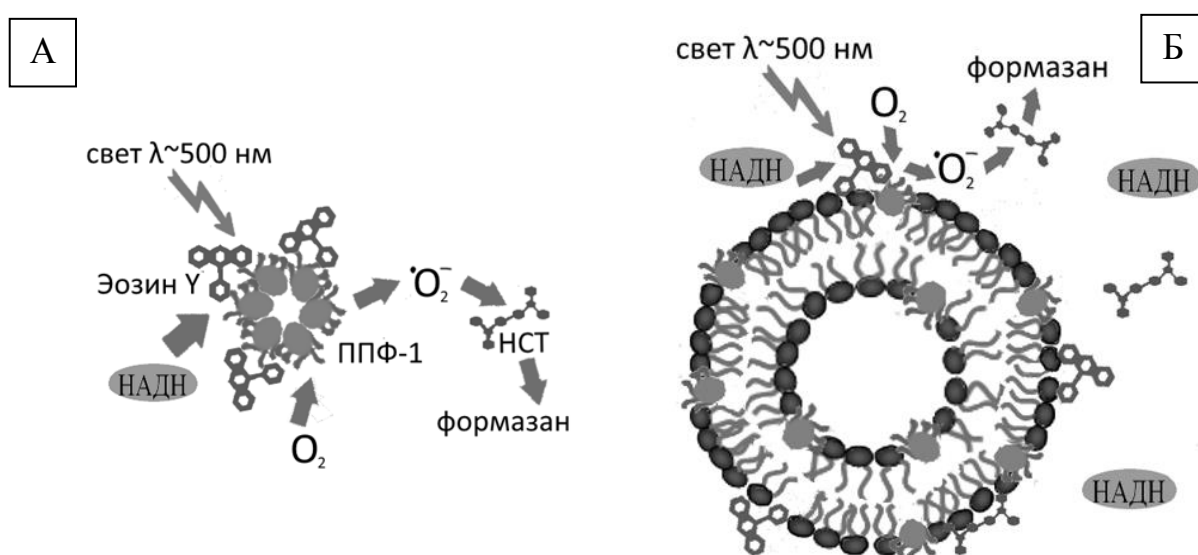


Рис. 7. Схема протекания фотохимической реакции нековалентного комплекса «ППФ+эозин» в бидистилляте (А) и в структуре лецитиновых липосом (Б).

Помимо разрушения ассоциатов ППФ, в структуре липосом значительно затрудняется процесс образования нековалентных комплексов «ППФ+краситель» вследствие специфического взаимодействия зарядов красителя и ППФ с диполями полярных головок липидов.

Было обнаружено, что в бидистилляте фотохимическая активность ковалентной диады ППФ(К)-флуоресцеин и нековалентного комплекса «ППФ+флуоресцеин» практически не отличаются вследствие эффективного

электростатического взаимодействия противоположно заряженных производного фуллерена и красителя (рис. 9, А).

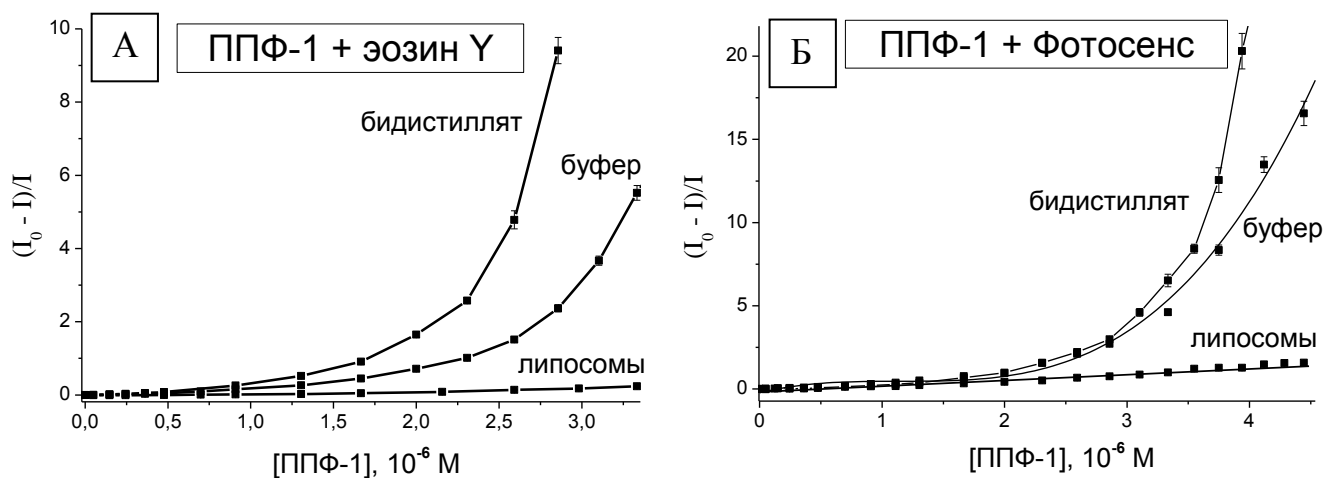


Рис. 8. Тушение интенсивности флуоресценции эозина Y (А) и Фотосенса (Б) соединением ППФ-1 в липосомах из лецитина; в буфере Трис-НС1 0.02 М, рН 7.4; в бидистилляте.

График построен в координатах Штерна-Фольмера.

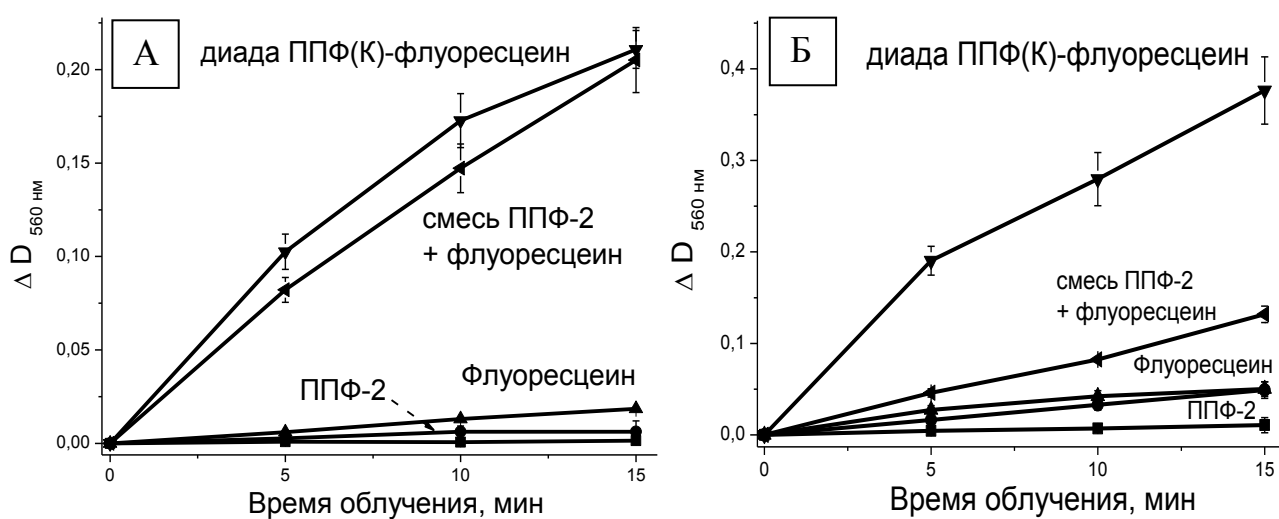


Рис. 9. Кинетика образования $O_2^{\cdot -}$ в результате фотохимической реакции при облучении ($\lambda = 450 - 550$ нм) ковалентной диады ППФ(К)-флуоресцеин в бидистилляте (А) и в модельной системе лецитиновых липосом (Б).

Все ППФ в действующей концентрации $2 \cdot 10^{-6}$ М.

Однако при введении нековалентного комплекса «ППФ+флуоресцеин» в структуру липосом его фотохимическая активность существенно снижается и незначительно отличается от суммарной фотохимической активности свободных ППФ-2 и флуоресцеина (рис. 9, Б). При этом фотохимическая активность

ковалентной диады ППФ(К)-флуоресцеин превышает фотохимическую активность нековалентного комплекса более чем в 5 раз (рис. 9, Б).

Таким образом, в отличие от нековалентных комплексов, фотохимическая активность ковалентных диад не снижается при введении их в структуру липосом.

Это позволяет предположить, что при введении в биологические структуры ковалентных диад ППФ(К)-флуоресцеин и ППФ-Рубоксил их фотодинамическая активность будет значительно превышать суммарную фотодинамическую активность исходного красителя и ППФ.

Глава 5

Заключительным этапом настоящей работы была оценка фотодинамического действия данных диад на биологических модельных системах.

Первым биологическим тестом была оценка влияния конъюгатов ППФ(К)-флуоресцеин и ППФ-Рубоксил на структуру кольцевой ДНК плазмиды рЕТ-21 при облучении в полосе поглощения красителя.

Особенностью плазмид данного типа является их способность переходить, в зависимости от типа повреждений, из суперскрученной в кольцевую или линейную формы, что легко детектируется методом горизонтального электрофореза.

В эксперименте было обнаружено, что в условиях темновой инкубации в присутствии диады ППФ-Рубоксил повреждения ДНК не наблюдается, как и в контрольных экспериментах, когда в раствор вводят индивидуальные соединения ППФ-4 или Рубоксил (рис. 10).

Если раствор, содержащий плазмиду, НАДН и ковалентную диаду ППФ-Рубоксил, подвергнуть облучению светом в области поглощения Рубоксила, то наблюдается заметное фотодинамическое повреждение ДНК (рис. 10).

Важно отметить характер повреждения ДНК ковалентной диадой ППФ-Рубоксил: было обнаружено образование линейной формы с увеличением количества кольцевой формы, в то время как ее суперскрученная форма исчезает полностью. Данный факт говорит об образовании как одноцепочечных, так и двухцепочечных разрывов молекулы ДНК (рис. 10). Полученные данные

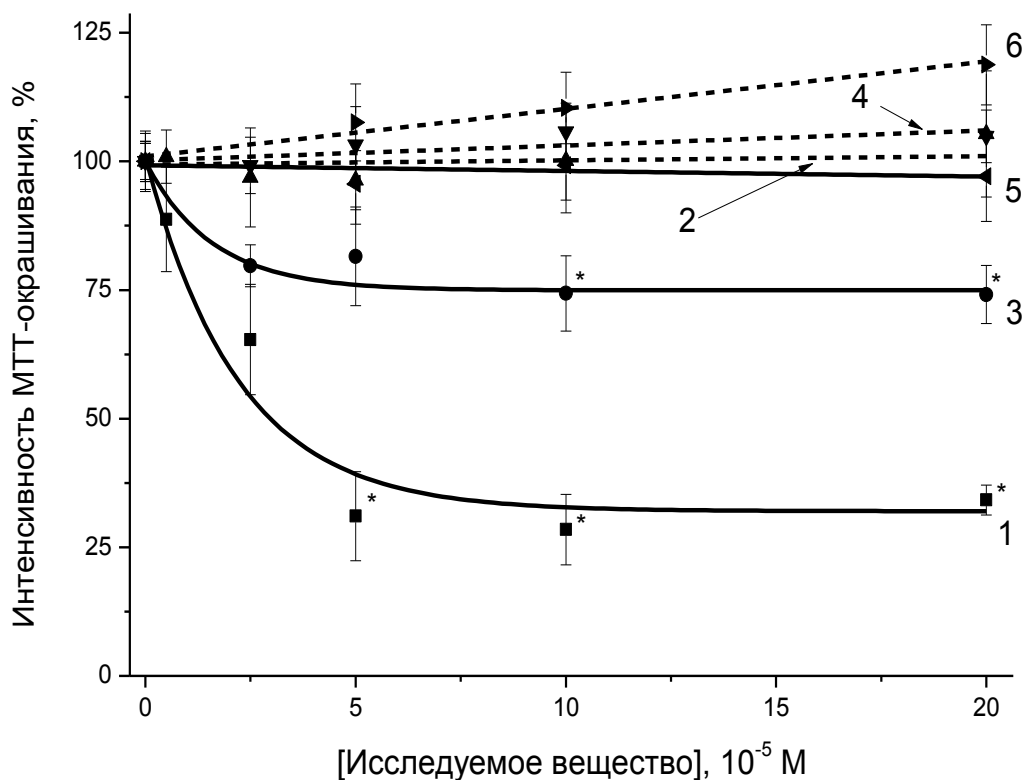


Рис. 11. Фотодинамическое действие ковалентной диады ППФ(К)-флуоресцеин и исходных соединений на клетки HeLa при облучении светом (20 минут, $\lambda = 450-550$ нм):
 1 – ППФ(К)-флуоресцеин + освещение; 2 – ППФ(К)-флуоресцеин без освещения;
 3 – ППФ-2 + освещение; 4 – ППФ-2 без освещения;
 5 – флуоресцеин + освещение; 6 – флуоресцеин без освещения.

Как можно видеть из рис. 11, облучение светом в области 450-550 нм живых клеток без добавления ППФ не вызывает их гибели. Свободный флуоресцеин также не обладает ни выраженным фотодинамическим действием, ни регистрируемой темновой токсичностью в условиях эксперимента (рис. 11).

Отсутствие фотодинамической активности флуоресцеина обусловлено его незначительным квантовым выходом в триплетное состояние, а, значит, и слабой способностью генерировать как синглетный кислород, так и другие активные формы кислорода при облучении светом.

Было показано, что в условиях эксперимента производное фуллерена ППФ-2 обладает выраженной фотодинамической активностью и способно вызывать гибель клеток HeLa при освещении светом (рис. 11), что хорошо согласуется с литературными данными.

Однако ковалентный конъюгат ППФ(К)-флуоресцеин превосходит по фотодинамической активности соединение ППФ-2 более чем в 3 раза в концентрациях от $2.5 \cdot 10^{-5}$ М при облучении светом в области поглощения красителя (450-550 нм, рис. 11).

Следует подчеркнуть, что в эксперименте перед облучением мы отбирали среду с конъюгатом ППФ(К)-флуоресцеин и заменяли ее на среду, не содержащую конъюгат. Таким образом, фотодинамическое действие на клетки могли оказывать только молекулы конъюгата, которые сорбировались на клеточной мембране или проникали внутрь клетки. Наличие выраженного фотодинамического действия конъюгата ППФ(К)-флуоресцеин при данной постановке эксперимента следует считать прямым доказательством мембранотропных свойств исследуемого конъюгата.

При этом важно отметить, что оба соединения ППФ-2 и ППФ(К)-флуоресцеин не обладают каким-либо заметным цитотоксическим действием в отсутствие освещения.

Таким образом, в результате проведенных исследований на уровне биологических модельных систем было показано, что присоединение синглетного красителя флуоресцеина, не обладающего регистрируемым фотодинамическим действием, к фуллерену значительно повышает общую фотодинамическую активность диады ППФ-краситель. С помощью данного подхода можно существенно расширить спектр красителей, применяемых в фотодинамической терапии.

Высокая фотодинамическая эффективность комплексов ППФ-Фотосенс, ковалентных конъюгатов ППФ(К)-флуоресцеин и ППФ-Рубоксил позволяет прогнозировать возможность создания на основе структур фуллерен-краситель высокоэффективных водорастворимых фотосенсибилизаторов нового поколения, поглощающих в красной области спектра.

Заключение

Приведенные в настоящей работе экспериментальные данные и их анализ показывают принципиальную возможность создания водорастворимых гибридных

структур фуллерен-краситель, обладающих высокой фотодинамической активностью.

Первоначально нами были созданы гибридные структуры фуллерен-краситель на основе нековалентных комплексов красителей с водорастворимыми полизамещенными производными фуллерена (ППФ). Для исследуемых структур было обнаружено значительное (до 9 раз) усиление фотохимической активности по сравнению со свободными соединениями. Однако данные нековалентные комплексы «ППФ+краситель» нестабильны и разрушаются при встраивании в липидный бислой мембран, что делает их непригодными для использования в медицине.

Для дальнейшего проведения исследований фотодинамической активности структур фуллерен-краситель на биологических модельных системах нами были синтезированы три гибридные структуры, в которых краситель присоединен прочной ковалентной связью к ядру фуллерена. Экспериментально было показано наличие фотохимической активности синтезированных диад и способности вызывать эффективное фотодинамическое повреждение ДНК и опухолевых клеток. Таким образом, присоединение к фуллерену красителя, имеющего незначительный квантовый выход в триплетное состояние и не обладающего регистрируемой фотодинамической активностью, значительно усиливает общую фотодинамическую активность диады фуллерен-краситель. Это открывает возможность создания на основе фуллеренов эффективных фотодинамических препаратов нового поколения с использованием красителей, возбуждаемых только в синглетное состояние, что значительно расширяет возможности выбора красителей.

В результате было продемонстрировано, что синтезированные ковалентные диады фуллерен-краситель обладают высокой фотодинамической активностью, низкой темновой токсичностью, высокой растворимостью в воде, выраженными липофильными свойствами, что позволяет рекомендовать подобные структуры для дальнейшего исследования в качестве потенциальных препаратов-фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии.

Выводы

1. Разработаны методы создания водорастворимых гибридных структур фуллерен-краситель на основе нековалентных комплексов и ковалентных диад фуллерен-краситель.
2. Показано значительное усиление фотодинамической активности гибридных структур фуллерен-краситель по сравнению с суммарной активностью индивидуальных молекул красителя и фуллерена при возбуждении в полосе поглощения красителя.
3. Методами абсорбционной спектроскопии, стационарной и кинетической флуориметрии установлено, что усиление фотодинамического эффекта достигается за счет эффективной дезактивации возбужденных синглетных состояний красителя при переносе электрона или возбуждения с красителя на фуллерен, что значительно расширяет возможности выбора эффективного красителя.
4. Обнаружено, что нековалентные комплексы фуллерен-краситель встраиваются в структуру липидного бислоя липосомальных мембран, при этом происходит разрушение ассоциатов водорастворимых производных фуллерена и их нековалентных комплексов с красителями, что обуславливает необходимость создания ковалентных диад фуллерен-краситель.
5. *In vitro* на примере плазмиды рЕТ-21 продемонстрирована способность ковалентных диад фуллерен-краситель вызывать одно- и двуцепочечные разрывы ДНК при облучении светом в полосе поглощения красителя.
6. Для ковалентной диады фуллерен-флуоресцеин показана возможность вызывать фотосенсибилизированную гибель клеток HeLa при облучении светом в полосе поглощения красителя, что указывает на перспективность подобных гибридных структур с использованием синглетно возбуждаемых красителей как потенциальных фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, включенных в перечень ВАК

1. Kotelnikov A.I., Rybkin A.Yu., Khakina E.A., Kornev A.B., Barinov A.V., Goryachev N.S., Ivanchikhina A.V., Peregudov A.S., Martynenko V.M., Troshin P.A. Hybrid photoactive fullerene derivative–ruboxyl nanostructures for photodynamic therapy // Org. Biomol. Chem., 2013, Vol. 11, №26, P. 4397–4404.
2. Котельников А.И., Рыбкин А.Ю., Горячев Н.С., Белик А.Ю., Корнев А.Б., Трошин П.А. Фотодинамическая активность гибридной наноструктуры на основе поликатионного производного фуллерена и фталоцианинового красителя Фотосенса // Доклады АН, 2013, Т. 452, № 4, С. 408-412.
3. Баринов А.В., Горячев Н.С., Полетаева Д.А., Рыбкин А.Ю., Корнев А.Б., Трошин П.А., Шмит Ф.И., Ренгер Г., Эйхлер Г.И., Котельников А.И. Фотодинамическая активность гибридной наноструктуры на основе поликатионного производного фуллерена и ксантенового красителя эозина Y // Российские нанотехнологии. 2012, Т. 7, № 7-8, С.86-90.
4. Полетаева Д.А., Мищенко Д.В., Рыбкин А.Ю., Смолина А.В., Файнгольд И.И., Трошин П.А., Корнев А.Б., Хакина Е.А., Котельников А.И. Оценка мембранотропности водорастворимых полизамещенных производных фуллеренов люминесцентными методами // Российские нанотехнологии, 2012, Т. 7, № 5-6, С.107-111.

Главы в монографиях

5. Котельников А.И., Рыбкин А.Ю., Горячев Н.С., Белик А.Ю., Полетаева Д.А., Файнгольд И.И., Котельникова Р.А., Корнев А.Б., Трошин П.А. "Дизайн гибридных наноструктур на основе фуллеренов и красителей для фотодинамической терапии", в сборнике «Органические и гибридные наноматериалы: тенденции и перспективы», Иваново: Иван. гос. ун-т., 2013, С. 364-391.
6. Котельников А.И., Рыбкин А.Ю. "Новое поколение фотодинамических препаратов на основе гибридных наноструктур фуллерен-краситель", в сборнике «Органические и гибридные наноматериалы: получение и перспективы применения», Иваново: Иван. гос. ун-т., 2015, С. 461-529.

Тезисы докладов

7. Рыбкин А.Ю., Полетаева Д.А., Белик А.Ю., Горячев Н.С., Пархоменко И.И., Терентьев А.А., Михайлов П.А., Хакина Е.А., Краевая О.А., Трошин П.А., Котельников А.И. Фотодинамическое действие водорастворимых диад фуллерен-флуоресцеин и фуллерен-эозин в модельной среде и на культуре клеток HeLa. // Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты», Москва, 31 марта – 1 апреля 2015 г, Российский биотерапевтический журнал, 2015, Т. 14, №1, С. 152.
8. Котельников А.И., Рыбкин А.Ю., Горячев Н.С., Белик А.Ю., Михайлов П.А., Хакина Е.А., Трошин П.А. Фотодинамические препараты нового поколения на основе гибридных наноструктур фуллерен-краситель. // Материалы XII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» Москва, 31 марта – 1 апреля 2015 г, Российский биотерапевтический журнал, 2015, Т. 14, №1, С. 153.
9. Котельников А.И., Рыбкин А.Ю., Горячев Н.С., Полетаева Д.А., Котельникова Р.А., Корнев А.Б., Хакина Е.А., Трошин П.А. Фотодинамические препараты нового поколения на основе гибридных наноструктур фуллерен-краситель // Сборник тезисов VI Троицкой конференции «Медицинская физика и инновации в медицине» (ТКМФ-6) г. Троицк, г. Москва, 2-6 июня 2014 г., С. 12-14.
10. Рыбкин А.Ю., Горячев Н.С., Белик А.Ю., Файнгольд И.И., Костюк Г.В., Терентьев А.А., Корнев А.Б., Трошин П.А., Котельников А.И. Фотодинамическое действие водорастворимых диад фуллерен-краситель в биологических модельных системах // Сборник VI Троицкой конференции “Медицинская физика и инновации в медицине” (ТКМФ-6), г. Троицк, г. Москва, 2-6 июня, 2014г., С. 254-255.
11. Файнгольд И.И., Рыбкин А.Ю., Костюк Г.В., Терентьев А.А., Котельникова Р.А., Котельников А.И. Фотодинамическое действие конъюгатов полифункциональных производных фуллерена и красителей на плазмидную молекулу ДНК // Материалы Всероссийской научно-

- практической конференции с международным участием «Противоопухолевая терапия: от эксперимента к клинике», Москва, 20-21 марта 2014 г., Российский биотерапевтический журнал, 2014, Т.13, №1, С.135.
12. Котельников А.И., Рыбкин А.Ю., Горячев Н.С., Белик А.Ю., Корнев А.Б., Трошин П.А. Фотодинамические препараты нового поколения на основе гибридных наноструктур фуллерен-краситель // Тезисы докладов Первой Российской конференции по медицинской химии (MedChem Russia-2013) с международным участием. Москва, 8-12 сентября 2013 г., С. 76.
 13. Рыбкин А.Ю., Баринов А.В., Горячев Н.С., Белик А.Ю., Файнгольд И.И., Костюк Г.В., Терентьев А.А., Корнев А.Б., Трошин П.А., Котельников А.И. Водорастворимые диады фуллерен-краситель как потенциальные препараты для фотодинамической терапии // Сб. Тезисов докладов на II Всероссийской молодежной конференции Успехи химической физики, М.: Издательская группа «Граница», 2013, С. 183.
 14. Kotelnikov A.I., Rybkin A.Yu., Goryachev N.S., Kornev A.B., Khakina E.A., Troshin P.A. Hybride nanostructures on the basis of water soluble fullerene derivatives and dyes for photodynamic therapy // Тезисы в сборнике докладов 3-го Международного Симпозиума имени академика А.Н. Теренина “Молекулярная фотоника”, Репино, Санкт-Петербург, 24-29 июня 2012 г, С.63.
 15. Rybkin A.Yu., Varinov A.V., Goryachev N.S., Kornev A.B., Troshin P.A., Kotelnikov A.I. Hybride molecular systems based on fullerene derivative and dye as potential drugs for photodynamic therapy // Тезисы в сборнике докладов 3-го Международного Симпозиума имени академика А.Н. Теренина “Молекулярная фотоника”, Репино, Санкт-Петербург, 24-29 июня 2012 г, С.182.
 16. Рыбкин А.Ю., Баринов А.В., Горячев Н.С., Корнев А.В., Трошин П.А., Котельников А.И. Гибридные структуры на основе поликатионного производного фуллерена и красителя как потенциальные препараты для фотодинамической терапии // Тезисы в сборнике материалов V Троицкой конференции «Медицинская физика и инновации в медицине» г. Троицк, 4-8 июня, 2012г., С. 277-279.