

Міністерство освіти і науки України
Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна

Ткачова Тетяна Миколаївна

УДК [546.65:577.115.7-022.532]:576.314

**МЕХАНІЗМИ ВЗАЄМОДІЇ КОМПЛЕКСІВ НА ОСНОВІ НЕОРГАНІЧНИХ
НАНОЧАСТИНОК І ОРГАНІЧНИХ МОЛЕКУЛ З МОДЕЛЬНИМИ
МЕМБРАНАМИ ТА ЖИВИМИ КЛІТИНАМИ**

03.00.02 – біофізика

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фізико-математичних наук

Харків – 2015

Дисертацією є рукопис.

Роботу виконано в Інституті сцинтиляційних матеріалів Науково-технологічного концерну «Інститут монокристалів» НАН України.

Науковий керівник: доктор фізико-математичних наук, старший науковий співробітник **Єфімова Світлана Леонідівна**, Інститут сцинтиляційних матеріалів НАН України, завідувач відділу нанокристалічних матеріалів.

Офіційні опоненти:

доктор фізико-математичних наук, професор **Горбенко Галина Петрівна**, Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, професор кафедри ядерної та медичної фізики

кандидат фізико-математичних наук, старший науковий співробітник, **Пашинська Влада Анатоліївна**, Фізико-технічний інститут низьких температур імені Б.І. Веркіна НАН України, старший науковий співробітник відділу молекулярної біофізики

Захист відбудеться " ____ " _____ 2015 р. о ____ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.051.13 Харківського національного університету імені В.Н. Карабіна, 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4, ауд. 7-4.

З дисертацією можна ознайомитись у Центральній науковій бібліотеці Харківського національного університету імені В.Н. Каразіна за адресою: 61022, м. Харків, майдан Свободи, 4.

Автореферат розісланий " ____ " _____ 2015 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Берест В.П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. За оцінками експертів, значна кількість новостворених лікарських препаратів виявляє серйозні недоліки фармакокінетичних параметрів і має виражені побічні ефекти. Вихід на фармацевтичний ринок багатьох перспективних лікарських засобів стримується їх поганою розчинністю в біологічних рідинах, високою токсичністю, необхідністю використання високих доз для досягнення терапевтичного ефекту, неспецифічною акумуляцією в організмі, швидкою деградацією і малими часами циркуляції в організмі. Тому на сьогоднішній день одним з найактуальніших завдань сучасної медицини та фармації є створення нових лікарських форм, здатних збільшити терапевтичну ефективність вже відомих лікарських речовин, арсенал яких величезний, знизити побічні ефекти, збільшити комфортність лікування для пацієнта. Одним з перспективних напрямків у цій галузі, здатним вирішити поставлене завдання, є використання різних нанорозмірних матеріалів і засобів, що надаються нанотехнологіями. Саме з таким підходом пов'язується очікуваний прорив у лікуванні таких захворювань як рак, деякі спадкові, інфекційні хвороби, атеросклероз, діабет тощо.

Суть даного підходу полягає у використанні нанорозмірного носія (платформи, наноконтейнеру) та діючої лікарської або діагностичної речовини, інкапсульованої, диспергованої або адсорбованої на наноплатформі. Серед переваг застосування нанорозмірних носіїв для спрямованої доставки лікарських препаратів слід зазначити: зниження обсягу розподілу препарату в органах і тканинах організму; зниження токсичності препарату за рахунок його вибіркового накопичення в пошкодженій тканині і меншого надходження в здорові органи; можливість доставки гідрофобних речовин за рахунок введення їх в наноконтейнер (НК), що дозволяє парентеральне введення таких препаратів; захист лікарської речовини від небажаної дії навколишнього середовища тощо. Використання нанорозмірних контейнерів та їх функціоналізація дозволяє також певною мірою вирішувати проблему резистентності ракових пухлин до лікарських препаратів.

Неорганічні нанокристали діоксиду церію та ортованадатів рідкісноземельних елементів в останні роки привертають все більшу увагу дослідників завдяки їх біологічній активності, зокрема, антиоксидантним властивостям, здатності селективно накопичуватись в окремих клітинах та клітинних органелах, здатності пригнічувати ріст злоякісних пухлин, радіопротекторним та адаптогенним властивостям. Тому розробка новітніх лікарських форм складу неорганічні наночастинки/органічна речовина з використанням біологічно активних нанокристалів є дуже перспективною і дозволяє сподіватись на отримання синергетичного ефекту від використання обох складових «наноліків». Також дуже актуальним є встановлення механізмів взаємодії органічної речовини з неорганічним наноносієм, особливостей вилучення органічної речовини з комплексу при взаємодії з клітинною

мембраною. Тому дисертаційна робота, яка присвячена вирішенню цієї мети, є актуальною науковою роботою.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась відповідно до планів науково-дослідних робіт Інституту сцинтиляційних матеріалів НАН України в рамках НДР «Розробка нових люмінесцентних матеріалів для застосування в нанобіотехнологіях» (2011-2012 рр. № Держреєстрації 0111U008840) Державної цільової науково-технічної та соціальної програми «Наука в університетах»; «Розробка методів отримання і дослідження механізмів модифікації поверхні наноструктурованих гібридних матеріалів «неорганічний нанокристал-органічна молекула» (2011-2012 рр., номер держреєстрації 0112U004622); «Розробка методів отримання і дослідження механізмів модифікації поверхні наноструктурованих гібридних матеріалів «неорганічний нанокристал - органічна молекула» (№ держ. реєстрації: 0113U001841, 2013 рр.); «Розробка технологій отримання гібридних органіко-неорганічних наноструктурованих люмінесцентних матеріалів» (№ держреєстрації: 0112U001897, 2012-2016 рр.).

Мета і задачі дослідження. Метою дисертаційної роботи було встановлення механізмів взаємодії комплексів на основі неорганічних наночастинок $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ та CeO_2 і органічних молекул (барвників сімейства поліметинів) з модельними мембранами та живими клітинами.

Для досягнення встановленої мети було поставлено та вирішено *такі основні задачі:*

- за допомогою методів спектрофотометрії та флуоресцентної спектроскопії встановити особливості взаємодії між неорганічними наночастинами (НЧ) та гідрофільними і гідрофобними органічними молекулами (барвниками); отримати кінетичні та термодинамічні параметри стабільності комплексів неорганічні НЧ/органічні молекули;

- використовуючи методику ратіометричної детекції флуоресценції, вивчити взаємодію комплексів на основі неорганічних (НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ та CeO_2) та органічних (міцел додецилсульфата натрію (ДСН) та ліпосом фосфатидилхоліну (ФХ)) наноносіїв з модельними мембранами;

- оцінити ефективність та кінетичні параметри акумулювання наноносіїв різних типів живими клітинами (гепатоцити щурів) за допомогою методу флуоресцентної мікроскопії;

- за допомогою методів флуоресцентної мікроспектроскопії та ратіометричної детекції флуоресценції встановити кінетичні параметри вилучення ліпофільного вмісту з наноносіїв різних типів (неорганічні НЧ, міцел ДСН та ліпосом ФХ) при взаємодії з модельними мембранами;

- встановити можливі механізми впливу на кінетичні параметри вилучення активної речовини (органічної молекули) з комплексу неорганічні НЧ/органічні молекули при взаємодії з живою клітиною.

Об'єкт дослідження – механізми взаємодії комплексів на основі неорганічних (НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ та CeO_2) та органічних (міцели ДСН та ліпосоми ФХ) наноносіїв з модельними мембранами та клітинами гепатоцитів

щурів, взаємодія між органічною молекулою та неорганічним наноконтейнером.

Предмет дослідження – флуоресцентні властивості комплексів неорганічні НЧ/органічні молекули, безвипромінювальний перенос енергії електронного збудження між органічними молекулами в нанорозмірних комплексах.

Методи дослідження – спектрофотометрія; флуоресцентна спектроскопія та спектроскопія збудження флуоресценції; флуоресцентна мікроскопія та мікроспектроскопія, просвічуюча електронна мікроскопія, метод фазового аналізу світлорозсіювання.

Наукова новизна отриманих результатів:

1. Показано, що у водних розчинах неорганічних НЧ $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Y}, \text{La}, \text{Gd}$), при додаванні катіонних барвників завдяки електростатичній взаємодії відбувається адсорбція молекул барвників на поверхні НЧ, а в деяких випадках, їх впорядкована агрегація та утворення складних комплексів неорганічні НЧ/органічні молекули. Запропонована модель комплексів, що утворюються.

2. Вперше, використовуючи метод ратіометричної детекції флуоресценції та явище безвипромінювального перенесення енергії електронного збудження (Förster resonance energy transfer, FRET), вивчено кінетичну та термодинамічну стабільність комплексів НК/органічні молекули на основі неорганічних (НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ та CeO_2) та органічних (міцели ДСН та ліпосоми ФХ) наноносіїв. Встановлено, що комплекси на основі неорганічних НЧ є інертними високостабільними системами за кімнатної та фізіологічної температури.

3. Вперше за допомогою методів флуоресцентної мікроскопії за аналізом зміни у часі загальної яскравості флуоресцентних зображень оцінено ефективність та динаміку накопичення наноносіїв різних типів у живих клітинах (гепатоцити щурів).

4. Вперше, використовуючи метод мікроспектроскопії, експериментально продемонстровано акумуляцію комплексів на основі сферичних НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ та барвника JC-1 в ядрах гепатоцитів щурів, що підтверджує ефективність цих НЧ як наноносіїв для транспортування ліпофільних органічних молекул у живу клітину.

5. Вперше, в експериментах *in vitro* показано, що неорганічні наноносії здатні забезпечити швидке вилучення ліпофільних органічних молекул при взаємодії з клітинною мембраною. Отримано кінетичні параметри процесу вилучення органічного вмісту.

6. Експериментально доведено, що процес акумуляції комплексів на основі неорганічних НЧ та вилучення ліпофільного вмісту може бути сповільнено додаванням ліпофільних компонентів (холестерину).

Практичне значення отриманих результатів. В дисертаційній роботі вперше показано можливість використання неорганічних НЧ ортованадатів $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ та діоксиду церію CeO_2 у якості носіїв ліпофільних органічних молекул, що є дуже перспективним для розробки новітніх лікарських форм з використанням неорганічних НЧ, наприклад, протиракових агентів, у тому числі для фотодинамічної терапії злоякісних новоутворень, антибіотиків та інших лікарських речовин, які є переважно ліпофільними. В роботі також

отримано дані стосовно характеру взаємодії органічних та неорганічних наноконтейнерів з мембраною живої клітини, які можуть бути використані при розробці нових нанорозмірних гібридних матеріалів біомедичного призначення. Запропоновані флуоресцентні методи оцінки термодинамічних та кінетичних параметрів комплексоутворення можуть бути використані для вивчення інших подібних систем наноконтейнер/активна речовина.

Особистий внесок здобувача. Всі результати досліджень, які викладені у дисертації, отримані особисто авторкою роботи або за безпосередньою її участю. Вибір об'єктів дослідження, постановку мети роботи та наукових завдань проведено спільно з науковим керівником д.ф.-м.н. С.Л. Єфімовою. Авторка брала безпосередню участь у розробці та відпрацюванні експериментальних методик приготування зразків для досліджень та у проведенні всіх експериментів. Колоїдні розчини НЧ $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ та CeO_2 отримані к.х.н. В.К. Клочковим. Живі клітини для експериментів *in vitro* виділялись за допомогою к.б.н. Н.С. Кавок. В опублікованих зі співавторами наукових працях особистий внесок здобувачки полягає у наступному:

- у наукових працях [1,8,9] здобувачем запропоновано методику та визначено сорбційну ємність неорганічної НЧ;

- у наукових працях [2,4,10-12] здобувачем проведено детальне дослідження взаємодії обраних органічних барвників з неорганічними НЧ у бінарних розчинах;

- у науковій праці [3] здобувачем оцінено кінетичні і термодинамічні параметри процесу комплексоутворення наноконтейнер/органічна молекула;

- у роботах [5,6,13-15] автором було досліджено динаміку взаємодії органічних та неорганічних наноконтейнерів з модельними мембранами та живими клітинами;

- у праці [7] автором вивчено особливості впливу мікрооточення на параметри флуоресценції деяких поліметинових барвників.

Разом із науковим керівником д.ф.-м.н. С.Л. Єфімовою, проведено обговорення, систематизацію й інтерпретацію одержаних результатів, підготовані до публікації наукові праці та доповіді на наукових конференціях.

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертаційної роботи доповідалися та обговорювалися на таких міжнародних та вітчизняних конференціях: 2nd International conference “Nanomaterials: Application & Properties”, Alushta (Crimea), 2012; 9-th International Conference “Electronic Processes in Organic Materials (ICEPOM-9)”, Lviv (Ukraine), 2013; Fourth “International Workshop on Advanced Spectroscopy and Optical Materials (IWASOM-2013)”, Gdańsk (Poland), 2013; IV International Conference for Young Scientists “Low Temperature Physics”, Kharkiv (Ukraine), 2013; XXI Galyna Puchkovska International School-Seminar “Spectroscopy of Molecules and Crystals”, Beregove (Crimea), 2013; 3rd International Scientific-Technical Conference for Young Scientists “Luminescent Processes in Condensed State of Matter (LUMCOS – 2013)”, Kharkiv (Ukraine), 2013.

Публікації. Основні результати дисертації опубліковані у 15 наукових працях; з них: 7 статей у міжнародних та вітчизняних фахових наукових журналах та 8 тез доповідей на конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 5 розділів, висновків та переліку використаних літературних джерел. Повний обсяг дисертації становить 146 сторінок, дисертація містить 49 рисунків. Список використаних джерел складається з 201 найменування.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **вступі** обґрунтовано актуальність теми, зв'язок дисертаційної роботи з науковими програмами та темами, сформульовано мету та основні задачі дослідження, показано новизну й практичну значимість отриманих результатів, вказано особистий внесок здобувача в опубліковані зі співавторами роботи.

Перший розділ «*Нанорозмірні носії для доставки активних речовин в клітину. Огляд літератури*» є оглядовим. У цьому розділі проаналізовано сучасний стан нанотехнологій та розглянуто питання стосовно використання різних типів наночастинок в біологічних дослідженнях та медицині. Наведено дані щодо механізмів доставки активних речовин за допомогою наноносіїв, зокрема розглянуто питання стосовно механізмів активного та пасивного націлювання. У розділі також детально описано сучасні уявлення про механізми взаємодії органічних та неорганічних наноконтейнерів (НК) із живими клітинами. Проаналізовано сучасний стан використання флуоресцентних методів візуалізації та дослідження біооб'єктів, надано розширений критичний розгляд робіт присвячених використанню саме неорганічних наночастинок у якості носіїв активних сполук.

У **другому розділі** «*Експериментальна техніка та методика дослідження*» надано опис експериментального обладнання для вимірювання спектрів поглинання, флуоресценції та збудження флуоресценції, наведено методику флуоресцентної мікроскопії та мікроспектроскопії, методики підготовки зразків та приготування клітин та їх інкубування з наноконтейнерами.

Спектри поглинання вимірювались на спектрофотометрі Specord 200 (Analytic Jena, Німеччина) за двохпроменевою оптичною схемою. Використовували набір кювет з різною довжиною оптичного шляху (0,2; 0,5 або 1 см).

Вимірювання спектрів флуоресценції та збудження флуоресценції проводилось на спектрофлуорометрі Lumina (Thermo Scientific, USA), який забезпечував корекцію отриманих спектрів відносно спектральної чутливості прибору. При дослідженні спектрів флуоресценції за різних температур кювети термостатували.

Флуоресцентні зображення клітин отримували за допомогою флуоресцентного мікроскопу Olympus IX71, обладнаного цифровою камерою Olympus C-5060. Для збудження флуоресценції застосовували фільтри BP 460–490. Для реєстрації спектрів флуоресценції з окремих клітин, флуоресцентний

мікроскоп був обладнаний волоконно-оптичним спектральним детектором USB 4000 (Ocean Optics, США).

В дисертаційній роботі у якості нанорозмірних носіїв використовували НЧ на основі нанокристалів ортованадатів рідкісноземельних елементів $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Y}, \text{La}, \text{Gd}$) та діоксиду церію CeO_2 , а також органічні молекулярні кластери: ліпосоми ФХ та міцели ДСН (рис. 1). У якості органічної речовини, що транспортується, використовували гідрофобні та гідрофільні похідні барвників сімейства поліметинів, структурні формули яких наведено на рис. 1.

Водні розчини наночастинок на основі нанокристалів ортованадатів $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Y}, \text{La}, \text{Gd}$) сферичної ($d=2$ нм), веретеноподібної (7×35 нм) та стрижнеподібної (10×80 нм) форми та сферичних нанокристалів CeO_2 ($d=2$ нм) синтезовані в Інституті сцинтиляційних матеріалів НАН України. НЧ були охарактеризовані методом електронної мікроскопії (ПЕМ-125К електронний мікроскоп, «Selmi», Україна, рис. 1). ζ -потенціал синтезованих НЧ аналізували методом фазового аналізу світлорозсіювання (ZetaPALS/BI-MAS аналізатор, Brookhaven Instruments Corp., США).

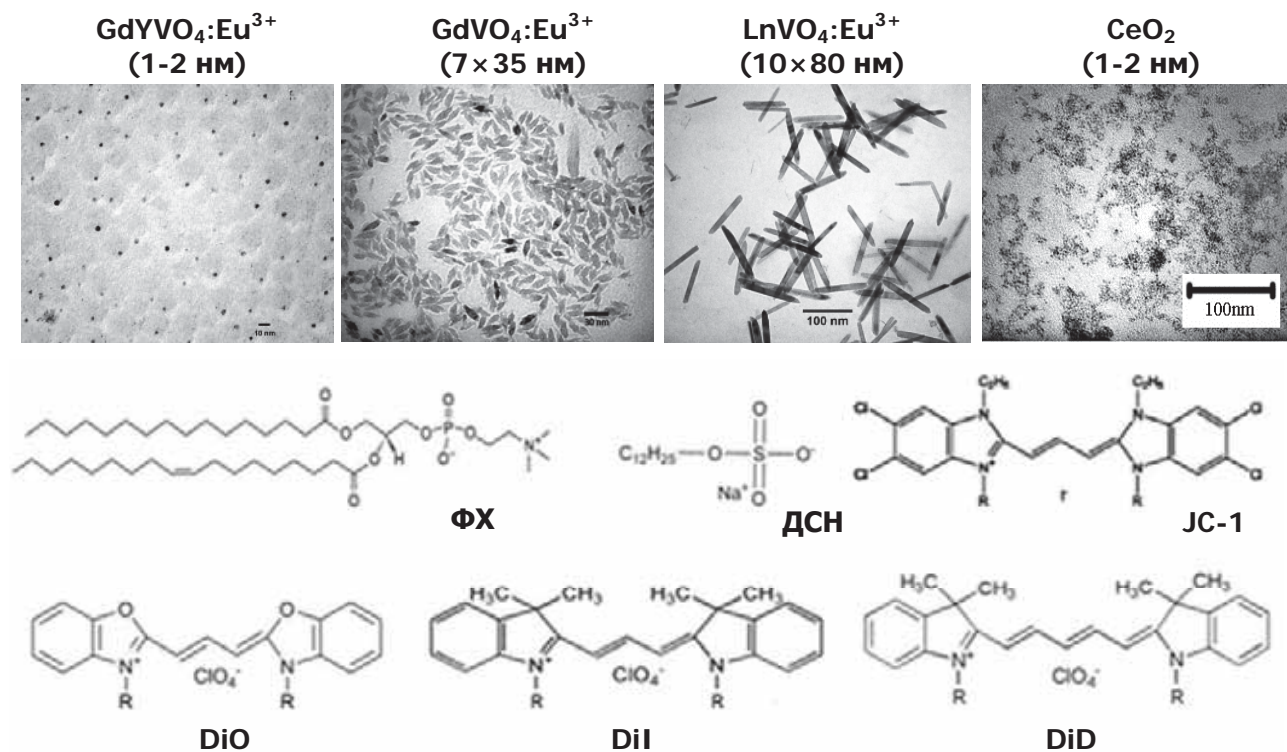


Рисунок 1. ПЕМ зображення НЧ, що досліджувались, та структурні формули барвників і ПАР.

Методична частина розділу містить методику приготування водних розчинів гідрофільних барвників (DiOC_2 , DiIC_1 та DiDC_1) та бінарних розчинів ДМСО/водний буфер барвників похідних JC-1 (JC-1, JC-1/C4, JC-1/C18 та JC-1/C3S) з НЧ різного типу. При виконанні дисертаційної роботи було розроблено оригінальну методику приготування стійких колоїдних розчинів, які містять комплекси неорганічні наночастинок/органічні барвники DiOC_{18} та/або DiIC_{18} .

Для приготування комплексів НЧ з гідрофобними барвниками DiOC_{18} та/або DiIC_{18} , 5 мл водного колоїдного розчину НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ або CeO_2 (0,83 г/л) та 5 мл барвників DiOC_{18} та DiIC_{18} ($3,3 \times 10^{-5}$ М) в ізопропіловому спирті змішували в колбі, потім додавали 10 мл бідистильованої води. Суміш упарювали використовуючи роторний випарник (Rotavapor R-3, Buchi, Швейцарія) впродовж 1 години до повного випаровування ізопропілового спирту. Кінцева концентрація барвника складала 2×10^{-5} М, концентрація $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ та CeO_2 НЧ 0,5 г/л. Якщо комплекси містили холестерин, його розчин в ізопропіловому спирті (0.1 М) додавали на стадії приготування суміші. Кінцева концентрація холестерину складала 0,25 г/л.

У роботі наведено також методики приготування одношарових ліпосомних везикул (діаметр 150 нм) та міцел ДСН (діаметр 5 нм) з інкорпорованими молекулами DiOC_{18} та/або DiIC_{18} .

Ефективності накопичення барвників у клітинах впродовж різних часових інтервалів інкубації клітин з різними НК оцінювалась за методикою, яка заснована на аналізі яскравості зображення за допомогою гістограми (аналіз растрових зображень, програмний пакет Adobe Photoshop CS3). Оцінювали середньозважений рівень яскравості зображення відносно власної флуоресценції клітини (аутофлуоресценції), яку приймали за нульову точку.

Третій розділ «Спектроскопія взаємодії неорганічних наноконтейнерів на основі НЧ $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Y}, \text{La}, \text{Gd}$) з поліметиновими барвниками у водних розчинах» присвячений дослідженню взаємодії аніонних за рахунок стабілізації цитратом натрію НЧ $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Y}, \text{La}, \text{Gd}$) і гідрофільних катіонних барвників DiOC_2 , DiIC_1 та DiDC_1 (рис. 1) у водних розчинах. Показано, що у водних розчинах, у присутності НЧ має місце утворення комплексів між протилежно зарядженими молекулами поліметинових барвників та НЧ $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$. Відповідно до моделі, що пропонується (рис. 2), адсорбція барвника відбувається в стабілізуючому шарі цитрат-іона за рахунок електростатичного тяжіння між катіоном барвника і цитрат-аніоном. Використовуючи запропоновану автором методику, розраховано адсорбційну здатність наночастинок, яка складає 0,61, 1,83, 2,4 мг/г DiOC_2 , DiIC_1 та DiDC_1 , відповідно (для сферичних НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$); 0,33, 0,73, 0,97 мг/г (для веретеноподібних НЧ $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$); 0,37, 0,92, 0,74 мг/г (для стрижнеподібних НЧ $\text{LaVO}_4:\text{Eu}^{3+}$), що корелює з розрахованою питомою площею поверхні наночастинок $S_{\text{пит}} = 1304 \text{ м}^2/\text{г}$ ($\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$), $208 \text{ м}^2/\text{г}$ ($\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$) і $182 \text{ м}^2/\text{г}$ ($\text{LaVO}_4:\text{Eu}^{3+}$).

У розділі також наведено результати дослідження впливу структури катіонних

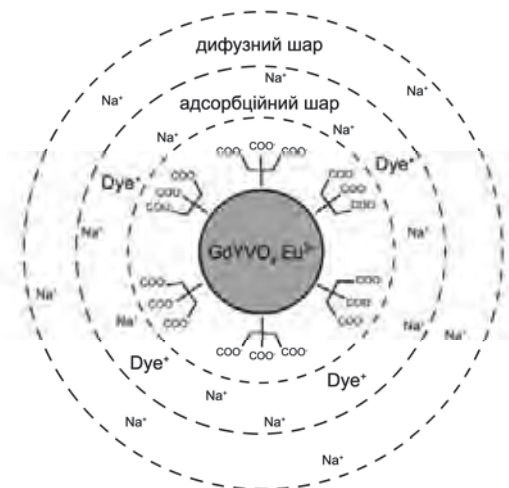


Рисунок 2. Схематичне зображення адсорбції барвників на сферичній наночастинці $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$.

барвників та їх схильності до агрегації на взаємодію з НЧ $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Y}, \text{La}, \text{Gd}$). Для цього використано похідні барвника JC-1 з різною довжиною вуглеводневих радикалів (JC-1, JC-1/C4, JC-1/C18) та його аніонний аналог JC-1/C3S (рис. 1).

Було проаналізовано вплив наночастинок з різним форм-фактором на оптичні характеристики барвника JC-1. Як видно з рис. 3а, крива 1, додавання сферичних наночастинок до розчину барвника приводить до суттєвої трансформації його спектру поглинання, а саме, появи двох додаткових, по відношенню до смуги мономеру барвника, смуг: короткохвильової (так званої Н-смуги), та довгохвильової (J-смуги). Така трансформація спектру поглинання однозначно вказує на ефективну взаємодію між НЧ та молекулами JC-1, що приводить до складної агрегації барвника. Збільшення концентрації НЧ викликає зростання інтенсивності як Н-, так і J-смуги. Додавання до водного розчину барвника JC-1 веретеноподібних або стрижнеподібних НЧ приводить до такого ж самого ефекту. Однак, відносна інтенсивність нових смуг та значення повної ширини на половині максимуму відрізняються для НЧ з різними форм-факторами (рис. 3а). У спектрах флуоресценції спостерігається дуже інтенсивна довгохвильова смуга, інтенсивність якої в розчинах без НЧ низька, і яка свідчить про утворення саме флуоресціюючих агрегатів (рис. 3б).

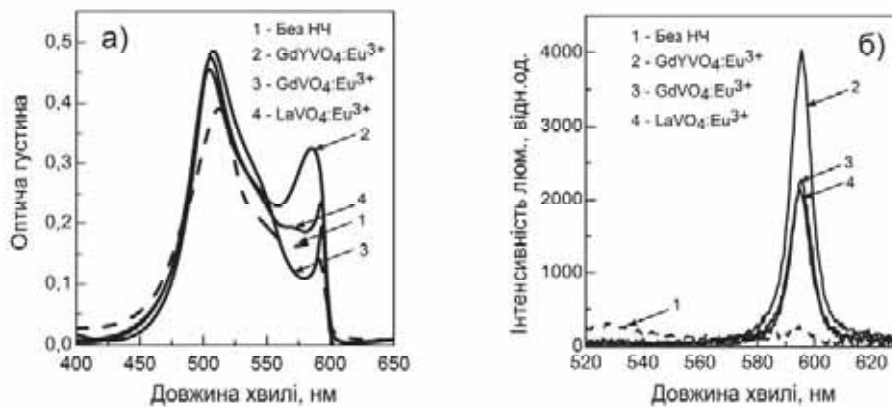


Рисунок 3. Спектри поглинання (а) та флуоресценції (б) барвника JC-1 в бінарних розчинах ДМСО/водний буфер (1:9), які містять наночастинок з різним форм-фактором. $[\text{НЧ}] = 0,5 \text{ г/л}$. $[\text{JC-1}] = 1 \times 10^{-5} \text{ М}$.

Геометричні параметри агрегатів, що утворюються у розчинах при додаванні НЧ з різним форм-фактором, аналізували в рамках моделі МакРея-Каши. Смугу мономерів (пунктирна смуга) було віднято із загального спектру поглинання барвника JC-1 (рис. 4). Як видно, навіть у розчині без НЧ (рис. 4а) отримана смуга агрегату в спектрі поглинання складається з чотирьох накладених смуг (дві короткохвильові та дві довгохвильові смуги), що вказує на існування двох типів агрегатів з двома нееквівалентними молекулами в елементарній комірці агрегату (так звана структура «риб'яча кістка») з різною довжиною делокалізації екситонів (скоріш за все, димеру і більш протяжного агрегату).

У розчинах, що містять НЧ (рис. 4б,в,г) можна виділити ще одну довгохвильову смугу, яка відповідає утворенню агрегатів J-типу. Як видно на рис. 4б,в,г, відносні інтенсивності смуг, що складають спектр агрегату, відрізняються для розчинів, що містять НЧ з різним форм-фактором. Найбільш значні зміни в спектрах поглинання в присутності НЧ в розчинах спостерігаються для сферичних наночастинок.

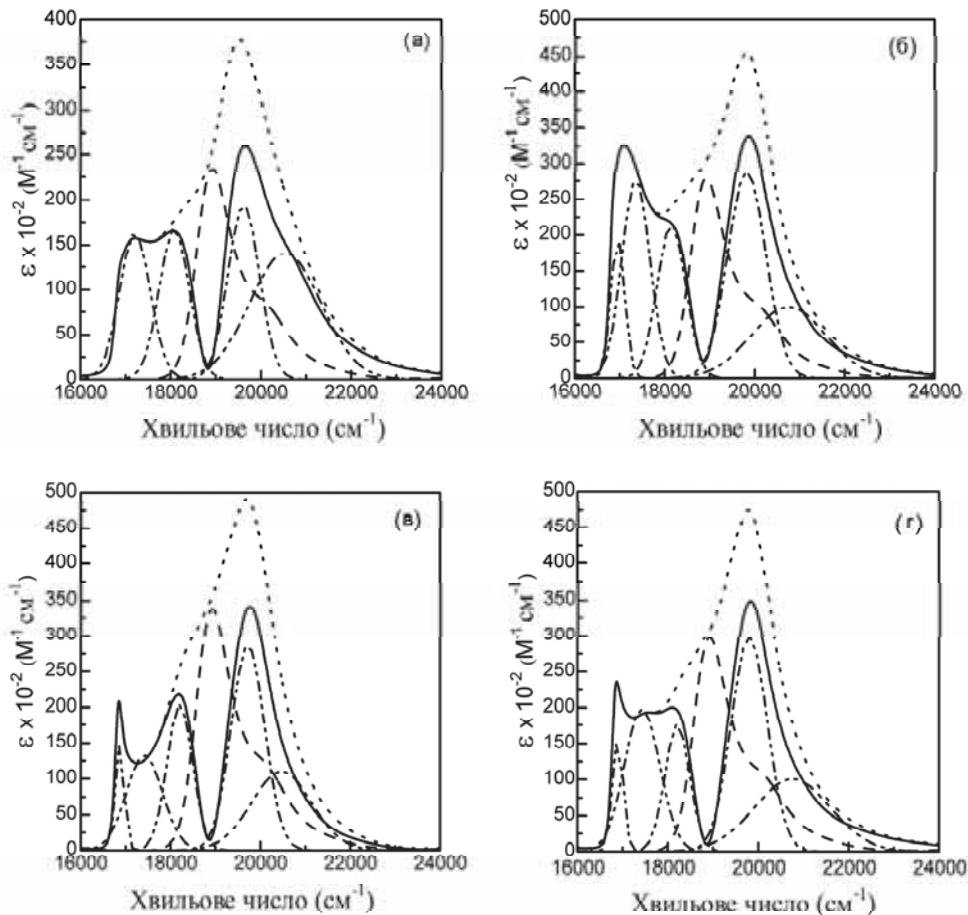


Рисунок 4. Спектри поглинання барвника JC-1 в розчинах, що містять наночастинок з різним форм-фактором: без НЧ (а); сферичними (б); веретеноподібними (в); та стрижнеподібними (г) НЧ. $[НЧ] = 0,5$ г/л; $[JC-1] = 1 \times 10^{-5}$ М. Пунктирна лінія відображає вписаний спектр мономерів, лінія з крапок – сумарний спектр, суцільна лінія – смуга агрегатів, штрих пунктирна лінія – вписані контури Гауса.

Грунтуючись на даних оптичної спектроскопії та застосовуючи похилу геометрію розташування молекул, що утворюють елементарну комірку агрегатів, були розраховані такі параметри геометрії агрегату як енергія міжмолекулярної взаємодії (ΔE), кут нахилу молекул мономера до осі, яка проходить крізь центри молекул (φ), кут між дипольними моментами переходу молекул (α) та відстані між молекулами (R) (Табл.1).

Розраховані геометричні параметри свідчать про те, що у розчинах із додаванням НЧ відбувається реорганізація структури агрегатів обох типів

(димерів та агрегатів), а саме, зміна кутів α та φ і утворення нового типу агрегатів – J-агрегатів. Ці зміни пояснюються утворенням складних комплексів між НЧ і барвником у розчинах.

Таблиця 1.

Параметри геометрії агрегатів JC-1 у розчинах, що містять наночастинки різних типів

	Димери				Агрегати			
	$\Delta E, \text{см}^{-1}$	α	φ	$R, \text{Å}$	$\Delta E, \text{см}^{-1}$	α	φ	$R, \text{Å}$
Без НЧ	1539	85	48	5,35	3334	71	55	4,02
GdYVO ₄ :Eu ³⁺ , сферичні	1675	74	53	5,1	3398	91	44	4,2
GdVO ₄ :Eu ³⁺ , веретеноподібні	1515	78	51	5,3	3054	81	49	4,25
LaVO ₄ :Eu ³⁺ , стрижнеподібні	1539	65	58	5,1	3863	90	45	2,88

Таким чином, можна зазначити, що додавання до водного розчину катіонного барвника JC-1 неорганічних НЧ приводить до адсорбції барвника на поверхні наночастинок за рахунок електростатичних сил з подальшою впорядкованою агрегацією молекул барвника внаслідок підвищення його ефективної концентрації в приповерхневому шарі НЧ, та утворення складних гібридних комплексів «неорганічні наночастинки / агрегати барвника».

Барвник JC-1/C4 має вуглеводневі радикали $R = C_4H_9$, рис. 1. У бінарних розчинах ДМСО/водний буфер JC-1/C4 утворює агрегати J-типу, інтенсивність яких залежить від концентрації барвника. Додавання в розчин НЧ приводить до посилення агрегації барвника, а саме до збільшення долі агрегатів по відношенню до розчину без НЧ до 80% і до впорядкування його структури (звуження J-смуги). Проте геометрія агрегатів, що утворюються, виявилась не чутливою до типу НЧ.

Барвник JC-1/C18 ($R = C_{18}H_{37}$, рис. 1) та НЧ також утворюють у водних розчинах складні гібридні комплекси, але молекули барвника сорбуються на поверхні НЧ в мономерній формі, аналогічно до барвників сімейства поліметинів, як було описано раніше.

Барвник JC-1/C3S є аніонним похідним барвника JC-1 ($R = C_3H_6-SO_3^-$, рис. 1). У бінарних розчинах ДМСО/водний буфер JC-1/C3S утворює агрегати J-типу, інтенсивність смуг поглинання та флуоресценції яких залежить від концентрації барвника. Додавання НЧ у розчин барвника не призводить до появи нових смуг у спектрі поглинання. Крім того, не відбувається і падіння інтенсивності смуг поглинання барвника при збільшенні концентрації НЧ незалежно від їх форм-фактору. Все це свідчить про те, що барвник JC-1/C3S з НЧ не взаємодіє, що підтверджує ключову роль електростатичних взаємодій в комплексоутворенні «неорганічна наночастинка/органічна молекула».

Вперше, використовуючи метод мікроспектроскопії, було продемонстровано накопичення комплексу сферичні НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ /агрегати JC-1 в ядрах гепатоцитів щурів, тоді як сам барвник JC-1 акумулюється в клітинних мітохондріях (рис. 5). Цей результат є перспективним для біомедичного застосування подібних комплексів.

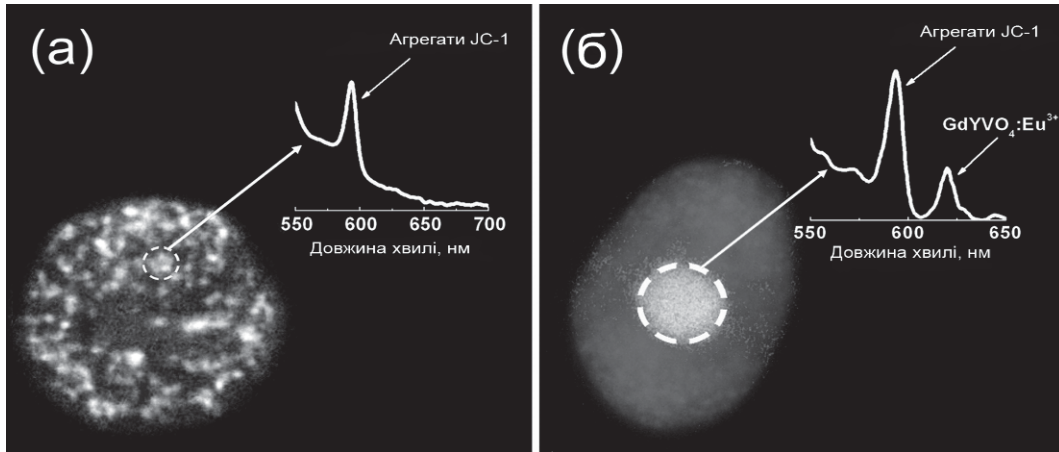


Рисунок 5. Флуоресцентне зображення гепатоцитів щурів при акумуляції барвника JC-1 в клітинних мітохондріях (а) та накопичення комплексу НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ / агрегати JC-1 в ядрах гепатоцитів (б).

Четвертий розділ «Дослідження кінетичної та термодинамічної стабільності комплексів НК/барвник на основі органічних і неорганічних наноконтейнерів за допомогою методу радіометричної детекції флуоресценції». При дослідженні комплексів наноконтейнер/барвник (НК/барвник), їх стабільність прийнято розглядати в термінах термодинамічної і кінетичної стабільності. Термодинамічна стабільність описує енергетичні параметри системи, кінетична же стабільність описує поведінку системи в часі і під дією різних чинників, які можуть призвести до руйнування комплексу.

Кінетична стабільність комплексів НК/барвник оцінювалася по динаміці обміну гідрофобними молекулами барвників, які завантажували окремо у НК, між НК у часі, використовуючи явище безвипромінювального перенесення енергії електронного збудження (FRET). У роботі використовували FRET пару DiOC_{18} (донор енергії електронного збудження) і DiIC_{18} (акцептор енергії електронного збудження) та різні типи наноконтейнерів (міцели ДСН, ліпосоми ФХ, та НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$). В експерименті аналізували зміну у часі долі флуоресценції донора DiOC_{18} у загальному сигналі флуоресценції $I_{\text{DiO}}/(I_{\text{DiO}} + I_{\text{DiI}})$, де I_{DiO} та I_{DiI} – інтенсивність флуоресценції, виміряна в максимумі флуоресценції DiOC_{18} і DiIC_{18} , відповідно, при збудженні в смузі поглинання DiOC_{18} (метод радіометричної детекції флуоресценції).

Аналіз зміни у часі величини $I_{\text{DiO}}/(I_{\text{DiO}} + I_{\text{DiI}})$ для різних типів НК дозволяє розрахувати константу швидкості розпаду комплексів складу НК/ DiOC_{18} та НК/ DiIC_{18} і утворення комплексів складу НК/($\text{DiOC}_{18} + \text{DiIC}_{18}$), або коефіцієнт перерозподілу барвників між наноконтейнерами K (год^{-1}) як:

$$\left(\frac{I_{DiO}}{I_{DiO} + I_{DiI}} \right)_{(t)} = \left(\frac{I_{DiO}}{I_{DiO} + I_{DiI}} \right)_{(0)} e^{-K \cdot t}, \quad (1)$$

а також отримати час життя комплексів, який є мірою кінетичної стабільності:

$$\tau_{1/2} = \frac{\ln 2}{K} \quad (2)$$

Використовуючи константи швидкості розпаду комплексів K за різних температур можна розрахувати енергії активації процесу (E_a) за рівнянням Арреніуса:

$$\ln K = \ln K_0 - \frac{E_a}{RT} \quad (3)$$

Отримані параметри, наведені в Табл.2, дозволяють зробити висновок про досить високу кінетичну стабільність комплексів, що досліджувались, в умовах кімнатних та фізіологічних температур.

Таблиця 2

Кінетичні параметри процесу розпаду комплексу НК/барвник

Наноконтейнер	T , К	K , год ⁻¹	$\tau_{1/2}$, ГОД	E_a , кДж/моль
Міцели ДСН	293	0,01	69,3	68,1
	303	0,052	13,3	
	313	0,054	12,8	
	323	0,056	12,4	
	343	1,49	0,46	
Ліпосоми ФХ	293	0,011	63	134,5
	313	0,437	1,59	
	323	1,04	0,67	
	333	5,18	0,13	
GdYVO ₄ :Eu ³⁺	293	0,012	57,8	104,2
	303	0,014	49,5	
	313	0,119	5,82	
	323	0,524	1,32	

Найбільшу кінетичну стабільність виявили комплекси з наноконтейнерами на основі НЧ GdYVO₄:Eu³⁺ (Табл.2). Для оцінки термодинамічної стабільності досліджуваних комплексів НК/барвник було розраховано термодинамічні параметри (енергія Гібса, ΔG^0 , ентальпія, ΔH^0 , ентропія, ΔS^0) процесу перерозподілу барвників DiOC₁₈ і DiIC₁₈ між НК, пов'язаного з руйнуванням комплексів складу НК/DiOC₁₈ та НК/DiIC₁₈ і утворенням нових комплексів складу НК/(DiOC₁₈+DiIC₁₈). Константу рівноваги цього процесу (K_p) визначали по співвідношенню рівноважної концентрації змішаних комплексів [НК/(DiOC₁₈+DiIC₁₈)] до добутку рівноважних концентрацій комплексів [НК/DiOC₁₈] та [НК/DiIC₁₈] з врахуванням вихідних концентрацій барвників та

долі зруйнованих комплексів складу НК/DiOC₁₈ та НК/DiIC₁₈, яка визначалась з кривих залежності величин $I_{DiO}/(I_{DiO} + I_{DiI})$ від часу.

Термодинамічні параметри руйнування комплексів (ΔG^0 , ΔH^0 та ΔS^0) були розраховані, використовуючи значення K_p за різних температур стандартними методами. Усі розраховані параметри наведено в Табл.3.

Таблиця 3

Константи рівноваги і термодинамічні параметри процесу руйнування комплексів НК/барвник

Наноконтейнер	T, K	K_p , л·моль ⁻¹	ΔG^0 , кДж/моль	ΔH^0 , кДж/моль	ΔS^0 , Дж/К·моль
Міцели ДСН	293	$0,55 \times 10^4$	-20,9	75,2	328,3
	303	$0,32 \times 10^4$	-20,3		315,2
	313	$3,12 \times 10^4$	-26,9		326,3
	323	$11,1 \times 10^4$	-31,2		329,4
	343	$23,9 \times 10^4$	-35,3		322,2
Ліпосоми ФХ	293	$0,26 \times 10^4$	-19,2	98,7	402,3
	313	$4,44 \times 10^4$	-27,8		404,3
	323	$22,6 \times 10^4$	-33,1		408,1
	333	$25,5 \times 10^4$	-34,4		399,9
GdYVO ₄ :Eu ³⁺	293	$0,78 \times 10^4$	-21,8	14,0	122,3
	303	$1,13 \times 10^4$	-23,5		123,8
	313	$0,99 \times 10^4$	-23,9		121,2
	323	$1,48 \times 10^4$	-25,8		123,2

Аналіз отриманих параметрів дає змогу зробити висновок, що процес комплексоутворення НК/(DiOC₁₈+DiIC₁₈) є енергетично вигідним процесом ($\Delta G^0 < 0$), а позитивні величини ΔH^0 вказують на те, що досліджуваний процес є ендотермічним. Крім того, отримані позитивні значення ΔH^0 підтверджують малу ефективність процесу перерозподілу барвників між НК усіх типів, спостережувану при кімнатних температурах. Зміни ентропії ΔS^0 для всіх наноконтейнерів теж виявилися позитивними, досить великими значеннями, що є критерієм принципової здійсненності процесу при досить високих температурах (Табл.3).

Таким чином, отримані термодинамічні параметри однозначно вказують на те, що процес перерозподілу барвників можливий тільки за умови високих температур ($\Delta G^0 < 0$, $\Delta H^0 > 0$, $\Delta S^0 > 0$). Ще раз слід зазначити, що найбільшу кінетичну і термодинамічну стабільність виявили комплекси з наноконтейнерами на основі НЧ GdYVO₄:Eu³⁺.

П'ятий розділ «Застосування методу ратіометричної детекції флуоресценції та FRET-мічення органічних і неорганічних наноконтейнерів для візуалізації та дослідження взаємодії наноконтейнерів з модельними системами та живими клітинами в динаміці» присвячено практичному

використанню НК, що розробляються. В розділі розвинуто ратіометричні підходи до детектування взаємодії FRET-мічених наноконтейнерів із модельними мембранами та живими клітинами за допомогою спектроскопії та мікроспектроскопії. В роботі використовували FRET-пару DiOC₁₈ і DiIC₁₈. Обидва барвники інкорпорували в НК різних типів. У даному випадку, аналізували зміну у часі долі флуоресценції акцептора DiIC₁₈ в загальному сигналі флуоресценції $I_{DiI} / (I_{DiO} + I_{DiI})$, тобто зміну FRET-сигналу, яка спостерігається при взаємодії НК з модельною мембраною або живою клітиною та вилучення барвників з контейнеру у ліпідний бішар мембрани, або завдяки іншому механізму. Така взаємодія між комплексами НК/(DiOC₁₈+DiIC₁₈) та мембраною клітини (модельною мембраною) буде призводити до збільшення відстані між донором та акцептором, тобто до падіння сигналу FRET.

У якості модельної системи мембран використовували концентровану суспензію «порожніх» ліпосом ФХ. Розраховані з використанням кривих залежності зміни FRET-сигналу $I_{DiI} / (I_{DiO} + I_{DiI})$ від часу інкубування НК з ліпідами (рис. 6а, крива 1) за рівнянням (1) константи швидкості вилучення ($K = 0,008 \text{ год}^{-1}$) та за рівнянням (2) час життя (час напіввиведення) комплексів НК/барвники ($\tau_{1/2} = 86$ годин) свідчать про високу стабільність міцели ДСН. Це можна пояснити роллю електростатичної взаємодії, яка утримує катіонні барвники у протилежно зарядженій міцелі, а також наявності в молекулах барвників довгого вуглеводневого радикалу, який утримує молекули в міцелі ДСН. Для решти НК процес вивільнення барвників був набагато швидшим. Вихід барвників з наноконтейнерів займав не більш ніж 5 годин, після чого всі криві виходять на плато (рис. 6а). Для ліпосом ФХ константа швидкості K склала $0,82 \text{ год}^{-1}$, $\tau_{1/2} = 0,85$ години, що набагато швидше, ніж у випадку міцел. Показано, що НК на основі наночастинок GdYVO₄:Eu³⁺ та CeO₂ забезпечують швидке вилучення ліпофільного вмісту (у нашому випадку, ліпофільні барвники DiOC₁₈ і DiIC₁₈) у ліпідні бішари модельної мембрани у експериментах *in vitro*, $\tau_{1/2}$ складає менш ніж півгодини. Додавання у наноконтейнер негативно заряджених або ліпофільних сполук (холестерин) дозволяє уповільнити процес вилучення активного компонента, тобто дозволяє контролювати цей процес (рис. 6а).

При вивченні взаємодії органічних (ліпосомами ФХ) та неорганічних (на основі НЧ CeO₂ та GdYVO₄:Eu³⁺) НК з клітинами гепатоцитів аналізували (і) динаміку та ефективність накопичення комплексів НК/барвник з клітинами та (ii) кінетику вилучення барвників з НК у живу клітину. Для цього аналізували флуоресцентні зображення клітин, зміну загальної яскравості зображень впродовж інкубації, а також перерозподіл відносної інтенсивності смуг донора та акцептора, зареєстровані в різні часові інтервали інкубації (рис. 6 б,в). Було показано, що НК на основі НЧ GdYVO₄:Eu³⁺ проявляють ефективне накопичення в клітинних мембранах з часом насичення $\tau_{sat} \sim 9$ годин і забезпечують швидке вивільнення ліпофільного вантажу (барвників) при взаємодії з клітинними мембранами ($\tau_{1/2} = 0.19$ годин, рис. 6б,в, крива 1). Така

висока ефективність пояснюється ефективною адсорбцією комплексів на клітинній мембранній поверхні завдяки позитивно зарядженим молекулам барвників, тоді як швидке вивільнення барвників може бути пов'язане з наявністю градієнта ліпофільності. Додавання в комплекс ліпофільного компонента (холестерину) значною мірою знижує швидкість виходу барвників ($\tau_{1/2} = 2.56$ годин) та зменшує взаємодію комплексу НЧ/барвники з клітинами ($\tau_{sat} \sim 50$ годин).

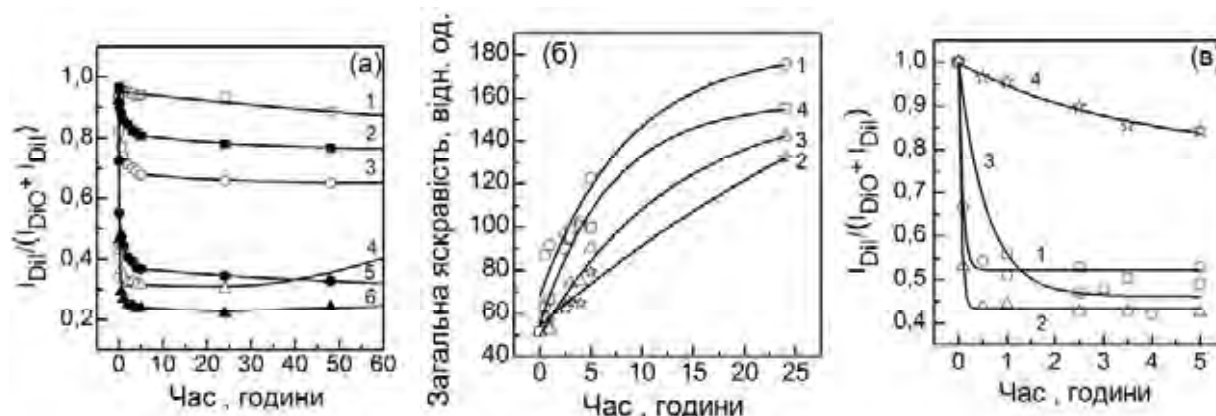


Рисунок 6. Зміна у часі долі флуоресценції акцептора $DiIC_{18}$ (а,в) та загальної яскравості зображень клітин в залежності від часу інкубації з НК (б) де (а): 1 – міцели ДСН/барвники, 2 – ліпосоми ФХ/10% ДСН/барвники, 3 – ліпосоми ФХ/барвники, 4 – $GdYVO_4:Eu^{3+}$ /барвники, 5 – $GdYVO_4:Eu^{3+}$ /барвники/холестерин, 6 – CeO_2 /барвники; (б),(в): 1– $GdYVO_4:Eu^{3+}$ /барвники, 2 – $GdYVO_4:Eu^{3+}$ /барвники/холестерин, 3 – CeO_2 /барвники, 4 – ліпосоми ФХ/барвники.

Комплекси НЧ/барвники на основі НЧ CeO_2 виявили нижчу ефективність їх взаємодії з клітинами в порівнянні з комплексами на основі НЧ $GdYVO_4:Eu^{3+}$. Після інкубації 24 години, загальна яскравість клітин набагато менша, а час насичення більший ($\tau_{sat} = 13$ годин), рис. 6б, крива 3. Для ліпосом ФХ, загальна яскравість клітин після 24 годин інкубації трохи менша, ніж для комплексів НЧ $GdYVO_4:Eu^{3+}$ /барвники, тоді як динаміка взаємодії комплексів ліпосоми/барвники виявилася схожою з комплексами НЧ $GdYVO_4:Eu^{3+}$ /барвники ($\tau_{sat} = 7$ годин), рис. 6б, крива 4. Кінетичні параметри взаємодії ліпосом ФХ з гепатоцитами щурів виявилися подібними до описаної раніше модельної системи мембран.

Таким чином, можна зробити висновок, що процес взаємодії НК/клітина може бути керованим, а НЧ $GdYVO_4:Eu^{3+}$ та CeO_2 можуть бути використані як наноплатформа для внутрішньоклітинної доставки гідрофобних компонентів.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі було розв'язано поставлену наукову задачу щодо встановлення механізмів взаємодії комплексів на основі неорганічних наночастинок $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ та CeO_2 і органічних молекул (барвників сімейства поліметинів) з модельними мембранами та живими клітинами.

1. Показано, що у водних розчинах неорганічних НЧ $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Y}, \text{La}, \text{Gd}$) стабілізованих цитрат-аніоном при додаванні катіонних барвників завдяки електростатичній взаємодії відбувається адсорбція молекул барвників в приповерхневому шарі НЧ, а також, в залежності від властивостей барвників, їх впорядкована агрегація та утворення складних комплексів неорганічні НЧ/органічні молекули. Неорганічні наночастинки виступають у ролі своєрідних «шаблонів» для утворення агрегатів барвника. Запропоновано модель комплексів, що утворюються.

2. За розробленою методикою розраховано сорбційну здатність неорганічних НЧ $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Y}, \text{La}, \text{Gd}$) по відношенню до гідрофільних барвників, яка в середньому становить 1,6 мг/г для сферичних НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$, 0,7 мг/г для веретеноподібних НЧ $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ та стрижнеподібних НЧ $\text{LaVO}_4:\text{Eu}^{3+}$, що корелює з розрахованою питомою площею поверхні наночастинок з різним форм-фактором.

3. Розроблено методику та з її використанням досліджено кінетичну та термодинамічну стабільність комплексів НЧ/органічні молекули на основі неорганічних (НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ та CeO_2) та органічних (міцели ДСН та ліпосоми ФХ) наноконтейнерів та барвників сімейства поліметинів. Розраховано константи швидкості розпаду комплексів, (K), часи життя комплексів ($\tau_{1/2}$), енергії активації процесу розпаду комплексів (E_a), константи рівноваги процесу (K_p), зміни вільної енергії Гібса (ΔG^0), ентальпії (ΔH^0) та ентропії (ΔS^0) процесу та встановлено, що комплекси на основі НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ та CeO_2 є інертними високостабільними системами за кімнатної та фізіологічної температури.

4. Встановлено, що комплекси НЧ/органічні молекули на основі НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ефективно накопичуються в клітинних мембранах при їх сумісному інкубуванні з клітинами гепатоцитів щурів з часом насичення $\tau_{\text{sat}} \sim 9$ годин. Додавання до складу комплексу ліпофільного компоненту (холестерину) уповільнює процес акумуляції ($\tau_{\text{sat}} \sim 50$ годин).

5. Розраховано константи швидкості вилучення та часи напіввиведення барвників з НК різних типів при їх взаємодії з модельними мембранними системами та живими клітинами в експериментах *in vitro*. Встановлено, що НК на основі НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ та CeO_2 забезпечують швидке вивільнення ліпофільного вмісту (ліпофільні барвники), у порівнянні з іншими носіями (міцели ДСН, ліпосоми ФХ).

6. Показано, що додавання у наноконтейнер негативно заряджених або ліпофільних сполук дозволяє уповільнити процес вилучення активного компонента, тобто дозволяє управляти цим процесом.

7. Продемонстровано транспортування агрегатів барвника JC-1 в ядра гепатоцитів щурів за допомогою сферичних НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$, замість звичного акумулювання барвника в мітохондріях клітин, що підтверджує ефективність цих НЧ як наноносіїв для транспортування ліпофільних органічних молекул в ядро живої клітини.

8. Показано, що НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ та CeO_2 можуть бути використані як наноплатформа для внутрішньоклітинної доставки гідрофобних компонентів.

Перелік опублікованих праць за темою дисертації.

1. Спектроскопия взаимодействий неорганических наночастиц $n\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ и органических полиметиновых красителей в водных растворах / **Т.Н. Ткачева**, С.Л. Ефимова, В.К. Клочков, А.В. Сорокин, И.А. Боровой, Ю.В. Малюкин // Біофізичний вісник. – 2012. – Вып. 28, № 1. – С. 12–19.
2. Spectroscopic study of ordered hybrid complexes formation between dye aggregates and $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ (Re=Y, Gd, La) nanoparticles / **T.N. Tkacheva**, Svetlana L. Yefimova, Vladimir K. Klochkov, Igor A. Borovoy, Yuri V. Malyukin // Journal of Molecular Liquids. – 2014. – V. 199. – P. 244–250.
3. Кинетическая и термодинамическая стабильность органических и неорганических наноконтейнеров / С.Л. Ефимова, **Т.Н. Ткачева**, В.К. Клочков А.В. Сорокин, Ю.В. Малюкин // Журнал прикладной спектроскопии. – 2015. Т.82, №2. – С. 206–213.
4. Впорядкована адсорбція органічних молекул на неорганічних наночастинках / Ю.В. Малюкін, С.Л. Єфімова, **Т.М. Ткачова**, Г.В. Григорова // Вісник НАНУ. – 2015. – № 6. – С. 34–42.
5. *In vitro* study of NCs/dyes complexes accumulation and dyes release kinetics in rat hepatocytes / Svetlana L. Yefimova, **T.N. Tkacheva**, Nataliya S. Kavok, Vladimir K. Klochkov, Alexander V. Sorokin // Functional Materials. – 2015. – V. 22, №2. – P. 199–206.
6. Dynamics of dye release from nanocarriers of different types in model cell membranes and living cells / **T.N. Tkacheva**, S.L. Yefimova, V.K. Klochkov, A.V. Sorokin, Yu.V. Malyukin // Biopolymers and Cell. – 2014. – V. 30, № 4. – P. 314–320.
7. Спектрально-люминесцентные свойства производных скварилиевых зондов при взаимодействии с изолированными клетками печени крыс / **Т.Н. Ткачева**, Н.С. Кавок, И.А. Боровой, Е.Н. Обухова, С.А. Климов, Ю.В. Малюкин // Биополимеры и клетка. – 2012. – 28. №3. – С. 229–233.
8. Взаимодействие полиметиновых красителей с наночастицами $n\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ с образованием гибридных комплексов в водных растворах / **Т.Н. Ткачева**, С.Л. Ефимова, В.К. Клочков, И.А.Боровой, Ю.В. Малюкин // Международная школа-семинар молодых ученых «ФМНТ-2012». – Харьков (Украина), 2012. – С. 46.
9. Spectroscopic study of cationic carbocyanine dye binding to $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}$ nanoparticles / **T.N. Tkacheva**, S.L. Yefimova, V.K. Klochkov, A.V. Sorokin, Yu.V. Malyukin // 2nd International conference “Nanomaterials: Application & Properties”. – Alushta, 2012. – P. 02NNBM20-1–02NNBM20-2.

10. Interaction of cationic dyes with lanthanide vanadate nanoparticles with different size and form: spectroscopic study / **T.N. Tkacheva**, S.L. Yefimova, V.K. Klochkov, A.V. Sorokin, Yu.V. Malyukin // Book of abstracts of 9-th International Conference “Electronic Processes in Organic Materials (ICEPOM-9)”. – Lviv (Ukraine), 2013. – P. 99–100.
11. JC-1 derivatives ordered aggregation in colloidal solution of Re vanadate nanoparticles / **T.N. Tkacheva**, S.L. Yefimova, V.K. Klochkov, A.V. Sorokin, I.A. Borovoy, Yu.V. Malyukin // Book of abstracts of the Fourth “International Workshop on Advanced Spectroscopy and Optical Materials (IWASOM-2013)”. – Gdańsk (Poland), 2013. – P. 86.
12. Spectroscopic study of the interaction between inorganic nanoparticles and the organic carbocyanine dyes in aqueous solutions / S.L. Yefimova, **T.N. Tkacheva**, V.K. Klochkov, A.V. Sorokin, Yu.V. Malyukin, I.Yu. Ropakova // Book of abstracts of Third International Conference “NBP-2013”. – Kharkiv (Ukraine), 2013. – P. 78.
13. Fluorescent labeling of nano-scale carriers: visualization of nanocarriers – membrane interaction in model systems and living cells / **T.N. Tkacheva**, S.L. Yefimova, V.K. Klochkov, A.V. Sorokin, Yu.V. Malyukin // Book of Abstracts of XXI Galyna Puchkovska International School-Seminar “Spectroscopy of Molecules and Crystals”. – Beregove (Crimea), 2013. – P. 182.
14. Comparative study of dye release from nanocarriers of different types / **T.N. Tkacheva**, S.L. Yefimova, V.K. Klochkov, A.V. Sorokin, Yu.V. Malyukin // Book of Abstracts of 3rd International Scientific-Technical Conference for Young Scientists “Luminescent Processes in Condensed State of Matter (LUMCOS – 2013)”. – Kharkiv (Ukraine), 2013. – P. 59.
15. Lambda-ratiometric fluorescence detection as an effective tool to study nanocarriers interaction with living cells in dynamics / S.L. Yefimova, **T.N. Tkacheva**, Yu.V. Malyukin // Book of abstracts of V International Conference for Young Scientists “Low Temperature Physics”. – Kharkiv (Ukraine), 2014. – P. 35.

АНОТАЦІЯ

Ткачова Т.М. Механізми взаємодії комплексів на основі неорганічних наночастинок і органічних молекул з модельними мембранами та живими клітинами. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика. Харківський національний університет імені В.Н. Каразіна, Харків, 2015.

Дисертаційна робота присвячена встановленню механізмів взаємодії органічних молекул з неорганічними наночастинами на основі ортованадатів рідкісноземельних елементів $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Y}, \text{La}, \text{Gd}$) та діоксиду церію CeO_2 , та гібридних комплексів неорганічні наночастинки/органічні молекули з модельними мембранами та живими клітинами.

Встановлено, що у водних розчинах неорганічних НЧ $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Y}, \text{La}, \text{Gd}$) при додаванні катіонних барвників завдяки електростатичній взаємодії

відбувається адсорбція молекул барвника в приповерхневому шарі НЧ, а в деяких випадках, їх впорядкована агрегація та утворення складних комплексів неорганічні НЧ/органічні молекули. Запропонована модель комплексів, що утворюються.

Використовуючи метод ратіометричної детекції флуоресценції та явище безвипромінювального перенесення енергії електронного збудження (Förster resonance energy transfer, FRET), вивчено кінетичну та термодинамічну стабільність комплексів НК/органічні молекули на основі неорганічних (НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ та CeO_2) та органічних (міцели ДСН та ліпосоми ФХ) наночастин. Встановлено, що комплекси на основі неорганічних НЧ є інертними високостабільними системами за кімнатної та фізіологічної температури.

Оцінено ефективність та динаміку накопичення наночастин різних типів у живих клітинах. Розраховані константи швидкості наночастин $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ та CeO_2 забезпечують більш швидке вивільнення вилучення та «час напіввиведення» барвників з наноконтейнерів різних типів при їх взаємодії з модельними мембранами та живими клітинами в експериментах *in vitro*, показують, що у випадку модельних систем, наноконтейнери на основі ліпофільного вмісту (ліпофільні барвники), у порівнянні з іншими носіями (міцели, ліпосоми). Показано, що додавання у наноконтейнер негативно заряджених або ліпофільних (холестерин) сполук дозволяє уповільнити процес вилучення активного компоненту, тобто дозволяє контролювати цей процес. Параметри взаємодії НК з гепатоцитами щурів виявилися подібними до модельної системи мембран. Було показано, що процес взаємодії НК/клітина може бути керованим, а НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ та CeO_2 можуть бути використані у якості наноплатформи для внутрішньоклітинної доставки гідрофобних компонентів.

Ключові слова: наноконтейнер, барвник, метод ратіометричної детекції флуоресценції, комплекс неорганічні наночастинки/органічні молекули, модельні мембрани, живі клітини.

АННОТАЦІЯ

Ткачева Т.Н. Механизмы взаимодействия комплексов на основе неорганических наночастиц и органических молекул с модельными мембранами и живыми клетками. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание учёной степени кандидата физико-математических наук по специальности 03.00.02 – биофизика. Харьковский национальный университет имени В.Н. Каразина, Харьков, 2015.

Диссертационная работа посвящена установлению механизмов взаимодействия органических молекул с неорганическими наночастицами на основе ортованадатов редкоземельных элементов $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Y}, \text{La}, \text{Gd}$) и диоксида церия CeO_2 и гибридных комплексов «неорганическая наночастица/органическая молекула» с модельными мембранами и живыми клетками.

Установлено, что в водных растворах неорганических НЧ $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Y}, \text{La}, \text{Gd}$) при добавлении катионных красителей благодаря электростатическому взаимодействию происходит адсорбция молекул красителей в приповерхностном слое НЧ, а в некоторых случаях, их упорядоченная агрегация и образование сложных комплексов неорганические НЧ/органические молекулы.

Изучена кинетическая и термодинамическая стабильность комплексов НК/органические молекулы на основе неорганических и органических наночастиц. Оценена эффективность и динамика накопления наночастиц разных типов в живых клетках. Рассчитаны константы скорости высвобождения и «время полувыведения» красителей из наноконтейнеров разных типов при их взаимодействии с модельными системами мембран клеток и живыми клетками в экспериментах *in vitro*. Показано, что процесс взаимодействия НК – клетка может быть управляемым, а НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ и CeO_2 могут быть использованы в качестве наноплатформы для внутриклеточной доставки гидрофобных компонентов.

Ключевые слова: наноконтейнер, краситель, метод ратиометрической детекции флуоресценции, комплекс «неорганическая наночастица–органическая молекула», модельные мембраны и живые клетки.

ABSTRACT

Tkacheva T.N. Mechanisms of interaction of complexes based on inorganic nanoparticles and organic molecules with model membranes and living cells. – Right of manuscript.

Thesis for scientific degree of Candidate of Sciences in Physics and Mathematics. Speciality 03.00.02 – Biophysics. V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, 2015.

The dissertation work is devoted to the establishment of mechanisms of interaction of organic molecules with inorganic nanoparticles based on Re ($\text{Re} = \text{Gd}, \text{Y}, \text{La}$) vanadate and cerium dioxide CeO_2 , and hybrid complexes inorganic nanoparticles/organic molecules with model membranes and living cells. Adding cationic dyes to aqueous solutions of inorganic NP results in the adsorption of dye molecules on the NP near-surface layer and, in some cases, their ordered aggregation and formation of complex inorganic nanoparticles/organic molecules.

The kinetic and thermodynamic stabilities of the NCs/organic molecules complexes based on inorganic and organic nanocarriers have been studied. The efficiency and dynamics of different types of nanocarriers accumulation in living cells have been estimated. The dye release constants (K) and half-lives ($\tau_{1/2}$) have been analyzed. It is shown that the NCs – cell interaction can be controlled, and $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ and CeO_2 NPs can be used as nanoplatforms for intracellular delivery of hydrophobic components.

Key words: nanocarriers, dye, ratiometric fluorescence detection method, inorganic nanoparticles/organic molecules complexes, model membranes, living cells.