

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК УКРАИНЫ
ИНСТИТУТ СЦИНТИЛЯЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ

на правах рукописи

Ткачева Татьяна Николаевна

УДК [546.65:577.115.7-022.532]:576.314

МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ КОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ
НЕОРГАНИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦ И ОРГАНИЧЕСКИХ МОЛЕКУЛ С
МОДЕЛЬНЫМИ МЕМБРАНАМИ И ЖИВЫМИ КЛЕТКАМИ

03.00.02 – биофизика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
Ефимова Светлана Леонидовна
доктор физ.-мат. наук,
старший научный сотрудник

Харьков – 2015

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
РАЗДЕЛ 1. НАНОРАЗМЕРНЫЕ НОСИТЕЛИ ДЛЯ ДОСТАВКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В КЛЕТКУ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Применение нанотехнологий в медицине (наномедицина)	14
1.2. Применение наночастиц в биологии и медицине	16
1.2.1. <i>Наночастицы в диагностике</i>	17
1.2.2. <i>Наночастицы в терапии</i>	19
1.2.2.1. <i>Липосомы</i>	21
1.2.2.2. <i>Диэлектрические нанокристаллы-люминофоры.</i>	23
1.2.2.3. <i>Диоксид церия</i>	24
1.3. Основные стратегии направленной доставки.....	26
1.3.1. <i>Пассивный перенос</i>	27
1.3.2. <i>Активный перенос</i>	29
1.4. Основные механизмы взаимодействия наночастиц с живой клеткой ..	32
1.5. Использование флуоресцентных методов для исследования взаимодействия наночастиц с живыми клетками	35
1.5.1. <i>Флуоресцентные методы исследования</i>	35
1.5.2. <i>Метод ратиометрической детекции флуоресценции</i>	36
1.6. Постановка задачи диссертационной работы	37
РАЗДЕЛ 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕХНИКА И МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	40
2.1. Техника оптической спектроскопии.....	40
2.1.1. <i>Измерение спектров поглощения.</i>	40
2.1.2. <i>Измерение спектров флуоресценции</i>	41
2.2. Флуоресцентная микроскопия и микроспектроскопия	42
2.3. Оценка эффективности накопления НК разных типов в клетках гепатоцитов крыс	45

2.4. Методики приготовления образцов для исследований.	45
2.4.1. Синтез наночастиц $ReVO_4:Eu^{3+}$ ($Re = Y, Gd, La$) и CeO_2	47
2.4.2. Приготовление водных растворов, содержащих наночастицы и молекулы красителей.	49
2.4.2.1. Водные растворы, содержащие наночастицы и гидрофильные красители $DiOC_2$, $DiIC_1$ и $DiDC_1$	49
2.4.2.2. Водные растворы, содержащие наночастицы и гидрофобные красители $JC-1$, $JC-1/C4$, $JC-1/C18$ и $JC-1/C3S$	50
2.4.2.3. Водные растворы, содержащие наночастицы и красители $DiOC_{18}$ и $DiIC_{18}$	50
2.4.2.4. Водные растворы, содержащие наночастицы, красители $DiOC_{18}$ и $DiIC_{18}$ и холестерин.	50
2.4.3. Водные растворы, содержащие мицеллы ДСН с красителями..	51
2.4.4. Водные растворы, содержащие липосомы ΦX с красителями..	51
2.4.5. Методика инкубации клеток с наноконтейнерами разных типов.	52
2.5. Характеристика объектов исследования.....	52
2.5.1. Характеристика комплексов НК/красители $DiOC_{18}$ и $DiIC_{18}$	52
2.5.2. Живые клетки: гепатоциты печени крыс.	56
Выводы к разделу 2	57
РАЗДЕЛ 3. СПЕКТРОСКОПИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НЕОРГАНИЧЕСКИХ НАНОКОНТЕЙНЕРОВ НА ОСНОВЕ НЧ $ReVO_4:Eu^{3+}$ ($Re = Y, La, Gd$) С ПОЛИМЕТИНОВЫМИ КРАСИТЕЛЯМИ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ	58
3.1. Исследование эффективности взаимодействия гидрофильных полиметиновых красителей с неорганическими наночастицами $ReVO_4:Eu^{3+}$ в водных растворах.....	59
3.2. Исследование формирования упорядоченных гибридных комплексов между агрегатами красителей и наночастицами $ReVO_4:Eu^{3+}$ ($Re = Y, Gd, La$)	68
3.2.1. Спектральные проявления взаимодействия между красителем $JC-1$ и наночастицами в растворах.	68

<i>3.2.2. Особенности образования комплексов неорганическая НЧ/краситель JC-1/C4.....</i>	80
<i>3.2.3. Особенности взаимодействия НЧ с красителем JC-1/C18.</i>	83
<i>3.2.4. Исследование взаимодействия НЧ с молекулами красителя JC-1/C3S.</i>	86
<i>3.2.5. Взаимодействие комплексов сферические НЧ/агрегаты JC-1 с клетками гепатоцитов.....</i>	89
<i>Выводы к разделу 3</i>	90
РАЗДЕЛ 4. ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИЧЕСКОЙ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ КОМПЛЕКСОВ НК/КРАСИТЕЛЬ НА ОСНОВЕ ОРГАНИЧЕСКИХ И НЕОРГАНИЧЕСКИХ НАНОКОНТЕЙНЕРОВ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА РАТИОМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ.....	92
<i>4.1. Кинетическая стабильность комплексов НК/краситель</i>	95
<i>4.2. Термодинамическая стабильность комплексов НК/краситель</i>	100
<i>Выводы к разделу 4</i>	104
РАЗДЕЛ 5. ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА РАТИОМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ И FRET-МЕЧЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ И НЕОРГАНИЧЕСКИХ НАНОКОНТЕЙНЕРОВ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ И ИССЛЕДОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАНОКОНТЕЙНЕРОВ С МОДЕЛЬНЫМИ СИСТЕМАМИ И ЖИВЫМИ КЛЕТКАМИ В ДИНАМИКЕ.....	106
<i>5.1. Взаимодействие органических и неорганических наноконтейнеров с модельными мембранами</i>	109
<i>5.2. Взаимодействие органических и неорганических наноконтейнеров с живыми клетками <i>in vitro</i>.....</i>	114
<i>5.2.1. Эффективность накопления комплексов НК/красители в клетках гепатоцитов крыс</i>	114
<i>5.2.2. Кинетика высвобождения красителей из НК в клетки гепатоцитов крыс 117</i>	
<i>Выводы к разделу 5</i>	122

ВЫВОДЫ	124
ПРИМЕЧАНИЯ	126
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	127

СПИСОК УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

НЧ	наночастица
НК	наноконтейнер
РЗ	редкоземельный
ФДТ	фотодинамическая терапия
DiOC ₂	3,3'-диэтилоксакарбоцианин перхлорат
DiIC ₁	1,1'-диметил-3,3,3',3'-тетраметилиндокарбоцианин перхлорат
DiDC ₁	1,1'-диметил-3,3,3',3'-тетраметилиндодикарбоцианин тетрафторборат
DiOC ₁₈	3,3'-диоктадецилоксакарбоцианин перхлорат
DiIC ₁₈	1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндокарбоцианин перхлорат
JC-1	5,5',6,6'-тетрахлоро-1,1',3,3'-тетраэтилбензимидазолил карбоцианин йодид
JC-1/C4	5,5',6,6'-тетрахлоро-3,3'-диэтил-1,1'-дибутилбензимидазолил карбоцианин йодид
JC-1/C18	5,5',6,6'-тетрахлоро-3,3'-диэтил-1,1'-диоктадецилбензимидазолил карбоцианин йодид
JC-1/C3S	5,5',6,6'-тетрахлоро-3,3'-диэтил-1,1'-дисульфопропилбензимидазолил карбоцианин йодид
FRET	безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
ДСН	додецилсульфат натрия
ФХ	фосфатидилхолин яичного желтка

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. По оценкам экспертов значительное количество вновь создающихся лекарственных препаратов имеет серьезные недостатки фармакокинетических параметров и выраженные побочные эффекты. Выход на фармацевтический рынок многих перспективных лекарственных средств сдерживается их плохой растворимостью в биологических жидкостях, высокой токсичностью, необходимостью использования высоких доз для достижения терапевтического эффекта, неспецифической аккумуляцией в организме, быстрой деградацией и малыми временами циркуляции в организме. Поэтому на сегодняшний день одной из актуальнейших задач современной медицины и фармации является создание новых лекарственных форм, способных увеличить терапевтическую эффективность уже известных лекарственных веществ, арсенал которых огромен, снизить побочные эффекты, увеличить комфортность лечения для пациента. Одним из перспективных направлений в этой области, способным решить поставленную задачу, является использование разных наноразмерных материалов и средств, предоставляемых нанотехнологиями. Именно с таким подходом связывается ожидаемый прорыв в лечении таких заболеваний как рак, некоторые наследственные, инфекционные болезни, атеросклероз, диабет и другие.

Суть данного подхода заключается в использовании наноразмерного носителя (платформы, наноконтейнера) и действующего лекарственного или диагностического вещества, инкапсулированного, диспергированного или адсорбированного на наноплатформе. Среди преимуществ применения наноразмерных носителей для направленной доставки лекарственных препаратов следует отметить: снижение объема распределения препарата в органах и тканях организма; снижение токсичности препарата за счет его избирательного накопления в поврежденной ткани и меньшего поступления в здоровые органы; возможность доставки гидрофобных веществ за счет

введения их в наноконтейнер, что позволяет парентеральное введение таких препаратов; защиту лекарственного вещества от нежелательного действия окружающей среды и другие. Использование наноразмерных контейнеров и их функционализация позволяет также в определенной степени разрешать проблему резистентности раковых опухолей к лекарственным препаратам.

Неорганические нанокристаллы диоксида церия и ортovanадатов редкоземельных элементов в последние годы привлекают все большее внимание исследователей благодаря их биологической активности, в частности, антиоксидантным свойствам, способности селективно накапливаться в отдельных клетках и клеточных органеллах, способности ингибировать рост злокачественных опухолей, радиопротекторным и адаптогенным свойствами. Поэтому разработка новейших лекарственных форм состава «неорганический нанокристалл/органическое вещество» с использованием биологически активных нанокристаллов является очень перспективным и позволяет надеяться на получение синергического эффекта от использования обоих составляющих «нанолекарств». Также очень актуальным является установление механизмов взаимодействия органического вещества с неорганическим наноносителем, определение термодинамической и кинетической стабильности комплекса «неорганический нанокристалл/органическая молекула», особенностей высвобождения органического вещества из комплекса при взаимодействии с клеточной мембраной. Поэтому диссертационная работа, которая посвящена решению этих задач, является актуальной научной работой.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Работа выполнялась в соответствии с планами научно-исследовательских работ Института сцинтилляционных материалов НАН Украины в рамках НИР «Разработка новых люминесцентных материалов для применения в нанобиотехнологиях» (2011-2012 гг. № Госрегистрации 0111U008840) Государственной целевой научно-технической и социальной программы «Наука в университетах»; «Разработка методов получения и исследования

механизмов модификации поверхности наноструктурированных гибридных материалов «неорганический нанокристал – органическая молекула» (2011-2012 гг., номер госрегистрации 0112U004622); «Разработка методов получения и исследования механизмов модификации поверхности наноструктурированных гибридных материалов «неорганический нанокристалл – органическая молекула» (№ госрегистрации: 0113U001841, 2013 гг.); «Разработка технологий получения гибридных органико-неорганических наноструктурированных люминесцентных материалов» (№ гос. регистрации: 0112U001897, 2012-2016 гг.).

Цель и задачи исследования. Целью диссертационной работы было установление механизмов взаимодействия комплексов на основе неорганических наночастиц $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ и CeO_2 и органических молекул (красителей семейства полиметинов) с модельными мембранными и живыми клетками.

Для достижения поставленной цели были поставлены и решены *такие основные задачи:*

- с помощью методов спектрофотометрии и флуоресцентной спектроскопии установить особенности взаимодействия между неорганическими наночастицами (НЧ) и гидрофильными и гидрофобными органическими молекулами (красителями); получить кинетические и термодинамические параметры стабильности комплексов неорганические НЧ/органические молекулы;
- используя методику ратиометрической детекции флуоресценции, изучить взаимодействие комплексов на основе неорганических (НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ и CeO_2) и органических (мицелл додецилсульфата натрия (ДСН) и липосом фосфатидилхолина (ФХ)) наноносителей с модельными мембранными;
- оценить эффективность и кинетические параметры аккумулирования наноносителей разных типов живыми клетками (гепатоциты крыс) с помощью метода флуоресцентной микроскопии;

- с помощью методов флуоресцентной микроспектроскопии и ратиометрической детекции флуоресценции установить кинетические параметры высвобождения липофильного содержимого из наноносителей разных типов (неорганические НЧ, мицелл ДСН и липосом ФХ) при взаимодействии с модельными мембранами;
- установить возможные механизмы влияния на кинетические параметры высвобождения активного вещества (органической молекулы) из комплекса неорганические НЧ/органические молекулы при взаимодействии с живой клеткой.

Объект исследования – механизмы взаимодействия комплексов на основе неорганических (НЧ GdYVO₄:Eu³⁺ и CeO₂) и органических (мицелл ДСН и липосом ФХ) наноносителей с модельными мембранами и клетками гепатоцитов крыс, взаимодействие между органической молекулой и неорганическим наноконтейнером.

Предмет исследования – флуоресцентные свойства комплексов неорганические НЧ/органические молекулы, безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения между органическими молекулами в наноразмерных комплексах.

Методы исследования – спектрофотометрия; флуоресцентная спектроскопия и спектроскопия возбуждения флуоресценции; флуоресцентная микроскопия и микроспектроскопия, просвечивающая электронная микроскопия, метод фазового анализа светорассеяния.

Научная новизна полученных результатов:

1. Показано, что в водных растворах неорганических НЧ ReVO₄:Eu³⁺ (Re=Y, La, Gd) при добавлении катионных красителей благодаря электростатическому взаимодействию происходит адсорбция молекул красителей на поверхности НЧ, а в некоторых случаях, их упорядоченная агрегация и образование сложных комплексов неорганические НЧ/органические молекулы. Предложена модель образующихся комплексов.

2. Впервые, используя метод ратиометрической детекции флуоресценции и явление безызлучательного переноса энергии электронного возбуждения (Förster resonance energy transfer, FRET), изучена кинетическая и термодинамическая стабильность комплексов НЧ/органические молекулы на основе неорганических ($\text{НЧ } \text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ и CeO_2) и органических (мицеллы ДСН и липосомы ФХ) наноносителей. Установлено, что комплексы на основе неорганических НЧ являются инертными высокостабильными системами при комнатных и физиологических температурах.

3. Впервые, с помощью методов флуоресцентной микроскопии по анализу изменения во времени общей яркости флуоресцентных изображений оценена эффективность и динамика накопления наноносителей разных типов в живых клетках (гепатоциты крыс).

4. Впервые, используя метод микроспектроскопии, экспериментально продемонстрирована аккумуляция комплексов на основе сферических НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ и красителя JC-1 в ядрах гепатоцитов крыс, что подтверждает эффективность этих НЧ как наноносителей для транспортировки липофильных органических молекул в живую клетку.

5. Впервые, в экспериментах *in vitro* показано, что неорганические наноносители способны обеспечить быстрое высвобождение липофильных органических молекул при взаимодействии с клеточной мембраной. Получены кинетические параметры процесса высвобождения органического содержимого.

6. Экспериментально доказано, что процесс аккумуляции комплексов на основе неорганических НЧ и высвобождение гидрофобного содержимого может быть замедлен добавлением липофильных компонентов.

Практическое значение полученных результатов. В диссертационной работе впервые показана возможность использования неорганических НЧ ортованадатов $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ и диоксида церия CeO_2 в качестве носителей липофильных органических молекул, что является очень перспективным для разработки новейших лекарственных форм с использованием

неорганических НЧ, например, противораковых агентов, в том числе для фотодинамической терапии злокачественных новообразований, антибиотиков и других лекарственных веществ, которые являются преимущественно липофильными. В работе также получены данные относительно характера взаимодействия органических и неорганических наноконтейнеров с мембраной живой клетки, которые могут быть использованы при разработке новых наноразмерных гибридных материалов биомедицинского назначения. Предложенные флуоресцентные методы оценки термодинамических и кинетических параметров комплексообразования могут быть использованы для изучения других подобных систем наноконтейнер/активное вещество.

Личный вклад соискателя. Все результаты исследований, изложенные в диссертации, получены лично автором работы или при непосредственном его участии. Выбор объектов исследования, постановка цели работы и научных задач проведены совместно с научным руководителем д.ф.-м.н. С.Л. Ефимовой. Автор принимал непосредственное участие в разработке и отработке экспериментальных методик приготовления образцов для исследований и в проведении всех экспериментов. Коллоидные растворы НЧ $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ и CeO_2 получены к.х.н. В.К. Клочковым. Живые клетки для экспериментов *in vitro* выделялись с помощью к.б.н. Н.С. Кавок. В опубликованных с соавторами научных трудах личный вклад соискательницы заключается в следующем:

- в научных работах [1-3] соискателем предложена методика и определена сорбционная емкость неорганической НЧ;
- в научных работах [4-8] соискателем проведено детальное исследование взаимодействия выбранных органических красителей с неорганическими НЧ в бинарных растворах;
- в научной работе [9] соискателем оценены кинетические и термодинамические параметры процесса комплексообразования наноконтейнер/органическая молекула;

- в работах [10-14] автором была исследована динамика взаимодействия органических и неорганических наноконтейнеров с модельными мембранами и живыми клетками;

- в работе [15] автором изучены особенности влияния микроокружения на параметры флуоресценции некоторых полиметиновых красителей.

Вместе с научным руководителем д. ф.-м.н. С.Л. Ефимовой, проведены обсуждения, систематизация и интерпретация полученных результатов, подготовлены к публикациям научные труды и доклады на научных конференциях.

Апробация результатов диссертации. Материалы диссертационной работы докладывались и обсуждались на таких международных и отечественных конференциях: 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.

Публикации. Основные результаты диссертации опубликованы в 15 научных трудах; из них: 7 статей в международных и отечественных научных журналах и 8 тезисов докладов на конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из вступления, 5 разделов, выводов и перечня использованных литературных источников. Полный объем диссертации составляет 146 страниц, диссертация содержит 49 рисунков и 7 таблиц. Список использованных источников состоит из 201 наименования.

РАЗДЕЛ 1

НАНОРАЗМЕРНЫЕ НОСИТЕЛИ ДЛЯ ДОСТАВКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В КЛЕТКУ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Применение нанотехнологий в медицине (наномедицина)

В последнее десятилетие нанотехнологии, долгое время находившиеся почти исключительно в поле зрения материаловедения, физики и химии, активно внедряются в биологию и медицину, что привело к появлению термина «наномедицина» [16-23].

Наномедицина – бурно развивающаяся область медицинских знаний, посвященная совершенствованию профилактики, диагностики и лечения заболеваний с помощью нанотехнологии [16-21]. Основными направлениями, в которых сосредоточились наномедицинские исследования, являются разработка способов направленной доставки лекарственных препаратов в поврежденные ткани, изучение диагностических подходов с использованием молекулярной визуализации, повышение чувствительности и разрешающей способности методов лабораторной диагностики. Формирование концепции наномедицины началось еще в середине XX в. В 1959 г. Ричард Фейнман [24] опубликовал свою лекцию под названием «Там, внизу, много места», в которой он обосновал основные принципы использования нанотехнологий в медицине и предсказал неизбежность перехода медицинских технологий от макроуровня к микроуровню и далее вплоть до атомарного уровня.

Все варианты применения нанотехнологий в медицине можно разделить на три большие группы: 1) терапевтические подходы, основанные на применении нанотехнологии, 2) диагностические наномедицинские процедуры, 3) использование наноматериалов в технологии изготовления различных изделий медицинского назначения.

Терапевтические наномедицинские подходы включают использование различных типов наночастиц для обеспечения адресной доставки в поврежденные ткани лекарственных препаратов и генетического материала. Нанотехнологии могут обеспечивать доставку препаратов в определенный тип клеток, в отдельные клетки, в конкретный внутриклеточный компартмент и даже в субклеточные структуры (ядро клетки, митохондрии и др.).

По некоторым оценкам, до 95% вновь созданных лекарственных препаратов демонстрируют серьезные недостатки фармакокинетических параметров и/или обладают выраженными побочными эффектами [25]. В связи с этим, *актуальную задачу представляет разработка методов направленной (таргетной) доставки лекарственных препаратов к поврежденным тканям.*

Способы направленной доставки лекарств обеспечивают достижение действующей концентрации препарата в поврежденной ткани без выраженного системного эффекта. Нанотехнологии способствуют решению этой задачи, что, в свою очередь, позволяет снизить дозировки препаратов, увеличить их терапевтический эффект и повысить безопасность их применения.

Под «нанолекарствами» понимают наноразмерный (1-100 нм) переносчик, содержащий инкапсулированное, диспергированное, адсорбированное или конъюгированное лекарственное вещество [16,17,19,21,23,26,27], рис.1.1.

Преимуществами использования наночастиц в качестве переносчиков лекарственных препаратов являются следующие:

- при использовании наноразмерных переносчиков объем распределения препарата в тканях обычно снижается;
- происходит снижение токсичности препарата за счет его избирательного накопления в поврежденной ткани и меньшего поступления в здоровые ткани;

- многие нанопереносчики увеличивают растворимость гидрофобных веществ в водной среде и, таким образом, делают возможным их парентеральное введение;
- системы доставки способствуют повышению стабильности препаратов на основе пептидов, олигонуклеотидов и небольших гидрофобных молекул;
- нанопереносчики представляют собой биосовместимые материалы.



Рис.1.1. Наноконструкции для селективной внутриклеточной доставки лекарств. Взято из [28].

1.2. Применение наночастиц в биологии и медицине

Живые организмы состоят из клеток, которые, как правило, имеют размер около 10 мкм. Однако компоненты клеток намного меньше и находятся в области субмикронных размеров. Так, размер некоторых белков составляет всего всего 5 нм, что сравнимо с размерами маленьких искусственных наночастиц. Это простое сравнение размера дало идею использования наночастиц как маленьких зондов, которые позволили бы наблюдать за клеточными механизмами без нарушения их функций. Понимание

биологических процессов на наноуровне является движущей силой развития нанотехнологии. Ниже приведены примеры использования наноматериалов в биологии и медицине [29]:

- люминесцентные биологические метки [30-32];
- лекарственная и генная доставка [33,34];
- био детектирование патогенов [35];
- детектирование белков [35];
- исследование структуры ДНК [37];
- тканевая инженерия [39,39];
- уничтожение опухоли с помощью нагрева (гипертермии) [40];
- выделение и очистка биологических молекул и клеток [41];
- повышение контраста МРТ [42];
- фагокинетические исследования [43];

Наночастицы, как правило, образуют ядро нанобиоматериала. Они могут быть использованы в качестве удобной поверхности для молекулярных ансамблей и могут состоять из неорганического или полимерного материала [29]. Само ядро нанобиоматериала может иметь несколько слоев и быть многофункциональным.

Наиболее часто наночастицы имеют сферическую форму, однако возможны и другие формы. Размер и распределение по размеру является важной характеристикой в тех случаях, например, если необходимо проникновение через пористую структуру клеточной мембранны. Кроме того, размер становится чрезвычайно важным, квантово-размерный эффект используются для управления свойствами материала. Благодаря такому контролю размера частиц возможно создание очень эффективных флуоресцентных зондов, которые характеризуются узкими полосами флуоресценции в очень широком спектральном диапазоне [29].

1.2.1. Наночастицы в диагностике. Наночастицы в диагностике заболеваний можно использовать только придерживаясь определенных условий, таких как биосовместимость и низкая токсичность, химическая и

коллоидная стабильность в различных физиологических средах, дисперсность в водных растворах и т.д. [44,45].

В диагностике чаще используют квантовые точки и наночастицы золота.

Поскольку квантовые точки обладают способностью абсорбировать свет, они нашли свое применение в качестве оптических меток. Различные по природе типы квантовых точек имеют, соответственно, различную длину волны эмиссии света [46]. Есть очень много методов детектирования квантовых точек, таких как флуорометрия, флуоресцентная и конфокальная микроскопия, атомносиловая и мультифотонная микроскопия и др. [46].

Квантовые точки чаще всего используют при диагностике рака, для визуализации клеток опухоли [47]. Кроме того, их применяют и в диагностировании вирусных заболеваний [44]. Особенno актуальной для квантовых точек является проблема вывода их из организма человека. Это касается всех наночастиц, которые не могут быть биодеградируемыми и должны выводиться из организма человека, чтобы уменьшить их токсичность. H. Choi и соавт. показали, что функционализированные квантовые точки размером меньше, чем 6 нм, которые могут адресно достигать раковых клеток, выводятся почками [48].

Наночастицы используют также как контраст для окрашивания компонентов клеток и тканей для их обнаружения. Наночастицы суперпарамагнитного оксида железа используют в клинической практике для визуализации брюшных структур и выявление микрометастаз рака простаты в лимфатических узлах с помощью МРТ [44, 49-51].

Для диагностирования заболеваний фотоакустическим методом используют наноразмерное золото [44]. Благодаря мощной оптической абсорбции, высокой стабильности и размеру, золотые наночастицы являются идеальным контрастным агентом. Наночастицы золота используют для диагностики рака путем визуализации метастаз опухоли, например, в лимфатических узлах [52].

1.2.2. Наночастицы в терапии. Благодаря нанотехнологиям стала возможна *терапия на генном уровне* [44]. Для транспортировки нуклеиновых кислот используют наночастицы различной природы. Это могут быть катионные структуры [53], протеины [54], неорганические наночастицы [55,56] и наночастицы, состоящие из нескольких компонент (рис.1.2). Квантовые точки обычно применяют для биовизуализации, но их способность к транспорту ДНК и РНК *in vitro* и *in vivo* было также доказано [57,58].

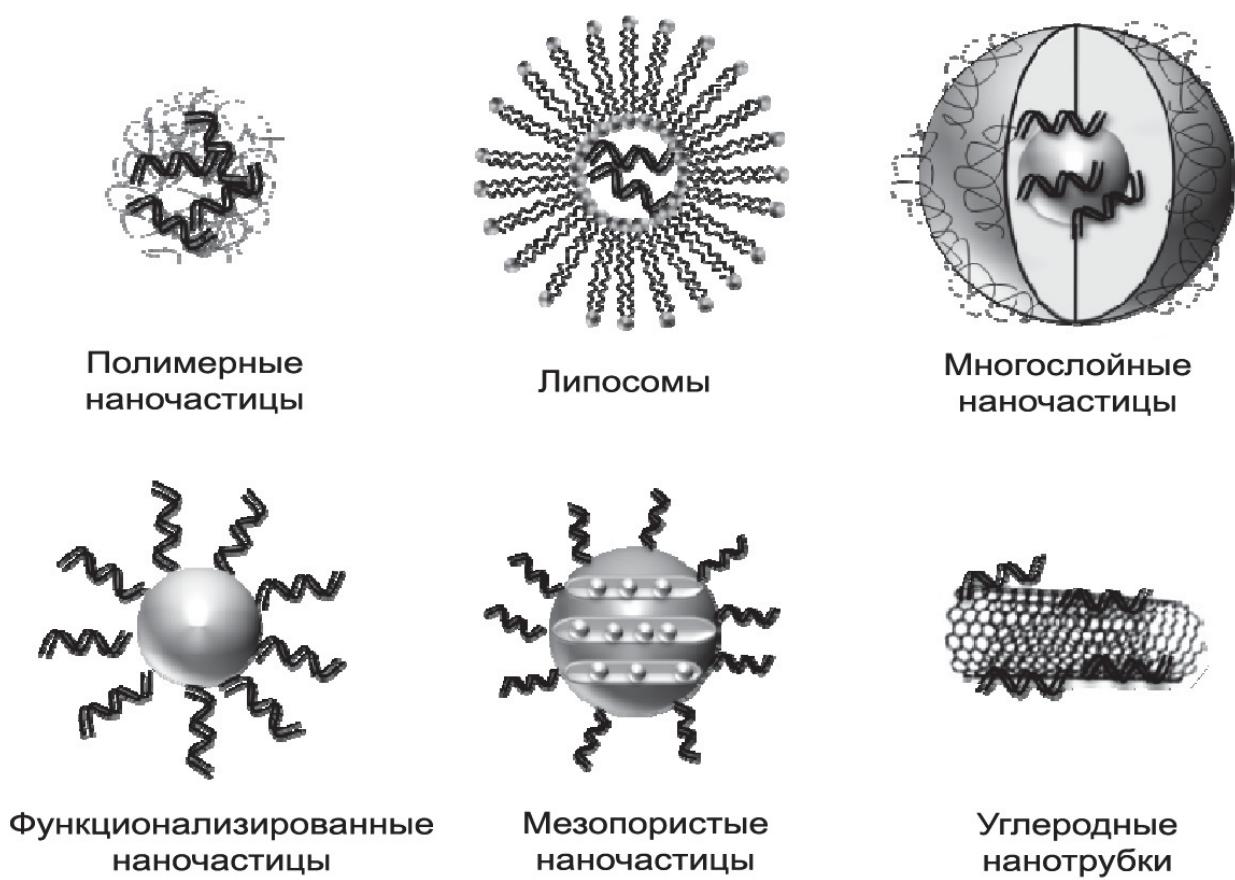


Рис.1.2. Некоторые из типов наночастиц, которые используют для транспортировки нуклеиновых кислот внутрь клетки. Взято из [44].

Большинство наносистем, которые эффективно переносят ДНК, способны также транспортировать молекулы РНК в клетки [44, 59]. Это, например, липосомы [60], катионные хитозан-полиэтиленимин- [61] или

полиэтиленгликоль- (ПЭГ) связанные наночастицы [62-64], углеродные нанотрубки [65], магнитные наночастицы [66], мезопористые кремниевые наночастицы [67], а также наноразмерные частицы фосфата кальция [68,69]. Эти наночастицы способствуют проникновению мРНК сквозь клеточную мембрану и препятствуют ее деградации [44]. Благодаря тому, что молекулы мРНК действуют именно в цитоплазме клетки, не достигая клеточного ядра, эффективность мРНК-транспортировочных наночастиц обычно очень высока.

Распространенным применением наночастиц сегодня является их *применение в фотодинамической терапии (ФДТ)* [44]. Метод ФДТ применяется при лечении онкологических или инфекционных заболеваний. Он базируется на взаимодействии фотоактивных агентов (красителей) и света, как правило, в видимом спектре при определенной длине волны. Возбуждение красителя приводит к формированию синглетного кислорода внутри клеток-приемников, который уничтожает злокачественные клетки или бактерии [70, 71]. Решением проблемы адресной доставки фотоактивных веществ к клеткам опухоли или бактерий стали наночастицы. Были созданы композитные наноструктуры, состоящие из магнитных частиц, золота, ПЭГ, фотоактивного красителя и антител [72]. Кроме того, были синтезированы биосовместимые наночастицы фосфата кальция, содержащие фотоактивный агент и полимер [73, 74].

Наночастицы как переносчики лекарств используют, прежде всего, в терапии онкологических заболеваний. В пользу применения наночастиц именно в этой области говорят многие факторы. А именно: наноразмерность, легкое проникновение внутрь клеток, возможность адресной доставки веществ и их контролируемое высвобождение, благодаря чему концентрация действующего вещества в месте опухоли увеличивается, а побочные эффекты уменьшаются, транспортировки нерастворимых и чувствительных веществ кровеносной системой и т.д. [44].

Чаще всего именно липосомы используют для транспортировки лекарственных веществ [75,76]. Препараты, в основе которых находятся липосомы, проходят клинические испытания и многие уже разрешены для использования в клинике в некоторых странах мира [75]. Разрешены для использования в качестве носителей лекарственных веществ некоторые из полимерных наночастиц, например, полиэтиленгликоль [44].

1.2.2.1. Липосомы. В настоящее время одним из наиболее популярных и эффективных методов контролируемого направленного транспорта биологически активных веществ к местам их специфического действия является использование липосом, или липидных везикулярных систем [17,77]. Липосомы представляют собой наночастицы шаровидной формы, ограниченные билипидной мембраной, в полости которой находится водная среда (рис.1.3).

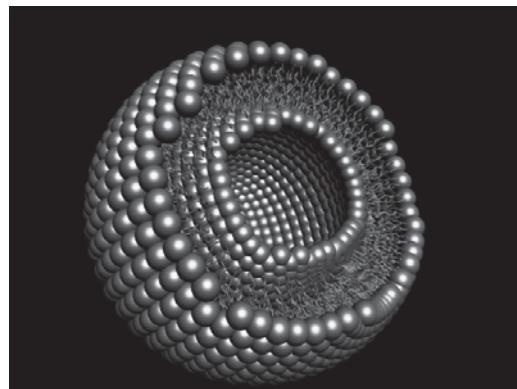


Рис. 1.3. Схематичное изображение липосомы.

Внешне липосомы не всегда выглядят как глобулярные частицы. Иногда они принимают уплощенную дискообразную форму (так называемые дискомы) или имеют вид очень длинных и тонких трубок, которые называют тубулярными липосомами. Липосомы могут быть однослойными и многослойными. Несмотря на то, что размеры липосом могут быть очень вариабельными, большинство липосом имеют диаметр менее 400 нм [78-80].

При включении в липосомы биологически активных веществ, транспортируемое вещество может располагаться в ядре липосомы (водорастворимые вещества) или в ее липидной оболочке (жирорастворимые вещества). Это позволяет заключать как гидрофильные, так и липофильные ингредиенты в везикулярные структуры, которые супензируются в водной среде.

Достоинства липосом как носителей лекарств очевидны: полученные из природных фосфолипидов, липосомы, в отличие от полимерных систем доставки лекарств, полностью биодеградируемые и биосовместимы. Важное свойство липосом – их универсальность [17,80]. Благодаря полусинтетической природе можно варьировать их размеры, физические характеристики, состав поверхности.

Благодаря сходству по химическому строению с липидными мембранами клеток, при применении липосом снижается риск развития нежелательных побочных реакций. Лекарственные вещества, заключенные в липосомы, надежно предохраняются от действия ферментов и защитных систем организма. Липосомы легко разрушаются в опухолевой ткани, высвобождая лекарственные вещества, и также они способны проникать через гистогематические барьеры [81-83]. Липосомы различного состава могут включать в себя разное количество действующего вещества, причем степень включения зависит от строения, размеров, заряда липидного состава липосом, а также от физико-химических свойств самих лекарственных субстанций [84,85].

Круг веществ, включаемых в липосомы, необычайно широк – от неорганических ионов и низкомолекулярных органических соединений, крупных белков и нуклеиновых кислот, до широкого круга фармакологически активных веществ. Липосомы могут быть заполнены антибиотиками, гормонами, ферментами, иммуномодуляторами, цитостатиками, противовирусными и противогрибковыми препаратами,

витаминами, вакцинами, веществами метаболического действия и даже генетическим материалом [86].

Главное преимущество липосом в качестве переносчиков лекарственного вещества – увеличение их накопления в опухоли. Неоангиогенез в опухоли имеет особенность – поры в эндотелии кровеносных сосудов размером от 100 до 700 нм. Через эти поры липосомы проникают в опухоли и там остаются. Нормальные кровеносные сосуды таких пор не имеют и липосомы не проникают в нормальные ткани [87].

1.2.2.2. Диэлектрические нанокристаллы-люминофоры. Особый интерес представляют собой нанокристаллы-люминофоры на основе оксидов, силикатов, фосфатов и других матриц, активированных редкоземельными (РЗ) элементами [21,22,88-93]. Благодаря своим неоспоримым качественным преимуществам, таким как неограниченная доступность методов синтеза и модификации наночастиц, фотостабильность, отсутствие эффекта мерцания, специфичность узких спектральных линий с большим стоксовским сдвигом и малая токсичность, диэлектрические нанокристаллы, полученные в виде устойчивых коллоидных систем представляют интерес для биологических исследований. Однако недостаточная яркость люминесценции материала ограничивает их применение. К наиболее эффективным люминофорам, используемым в технике, относятся ортованадаты иттрия, активированные РЗ элементами. Эффективный перенос энергии от ванадат-ионов к иону активатора приводит к интенсивному свечению люминофоров в разных областях видимого диапазона [94-96]. Для регистрации люминесценции используют лазерное возбуждение и высокочувствительные CCD камеры. В настоящее время неорганические нанолюминофоры, активированные редкоземельными элементами, пока интенсивно не используются в качестве меток и зондов в биологических исследованиях.

Нанокристаллы различного химического состава, обладающие люминесцентными свойствами, в том числе и нанокристаллы ионов лантаноидов, активированные РЗ ионами, являются очень перспективными

для использования в медицинской диагностике и биологических исследованиях для решения различных задач: осуществление доставки активных веществ (лекарственных средств) внутрь живой клетки, а также визуализировать процесс доставки и накопления вещества в том или ином месте организма при помощи люминесцентных методов. В работе [97] было показано, что нанокристаллы $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ сферической формы, диаметром 2 нм имеют тенденцию накапливаться непосредственно в ядре живой клетки, что очень актуально в такой области как фотодинамическая терапия злокачественных новообразований. Совместно с Харьковским национальным медицинским университетом было показано, что введение таких НЧ в кровеносное русло стимулирует иммунную систему подопытных животных. Кроме того, совместно с Институтом проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины показано, что НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ селективно накапливаются в раковых клетках и ингибируют рост злокачественных опухолей [98,99], что делает нанокристаллы ортованадатов РЗ элементов очень привлекательным объектом исследования.

1.2.2.3. Диоксид церия. Диоксид церия широко применяется в различных областях промышленности, в том числе в катализе, при производстве сенсоров, электрохромных покрытий и т.п. [100,101]. В последнее десятилетие наблюдается значительный интерес к исследованию свойств нанокристаллического CeO_2 , обладающего антиоксидантными и радиопротекторными свойствами, противовирусной активностью, биосовместимостью и нетоксичностью, которые обуславливают перспективность данного соединения для целого ряда применений в области биологии и медицины [102,103]. Биологическую активность нанокристаллического диоксида церия связывают с существованием на поверхности наночастиц ионов с переменной валентностью. Благодаря низкому значению окислительно-восстановительного потенциала пары $\text{Ce}^{4+}/\text{Ce}^{3+}$ (1,61 эВ), приповерхностные ионы церия легко взаимодействуют с кислородом, изменяют свою валентность на 4+, а затем восстанавливаются

обратно до 3+ [104,105]. Данное свойство и определяет привлекательность нанокристаллов CeO₂ для биомедицины – их способность участвовать в окислительно-восстановительных процессах, проходящих в организме [106,107]. Перспективы использования нанокристаллического диоксида церия для воздействия на биологические системы определяются двумя основными факторами: присущей данному материалу высокой кислородной нестехиометрией и его низкой токсичностью [106,107]. Первый фактор обуславливает активность нанокристаллического CeO₂ в биохимических окислительно-восстановительных процессах, особенно в инактивировании активных форм кислорода (АФК), в том числе свободных радикалов, в живой клетке. Второй фактор обеспечивает сравнительную безопасность применения наночастиц CeO₂ в экспериментах *in vivo*. К специфическим свойствам CeO₂ следует отнести способность к регенерации, которая выражается в том, что наночастицы диоксида церия, принимавшие участие в окислительно-восстановительном процессе, за сравнительно небольшой промежуток времени способны возвращаться к исходному состоянию. В [108] установлено, что механизм инактивирования свободных радикалов наночастицами диоксида церия аналогичен действию супeroxиддисмутазы (СОД). Исследования взаимодействия наночастиц диоксида церия с пероксидом водорода методами РФЭС и УФ-спектроскопии показали, что увеличение соотношения Ce³⁺:Ce⁴⁺ в наночастице напрямую коррелирует с повышением ее способности выполнять функции СОД. Эти результаты убедительно подтверждают, что размеры и состояние поверхности частиц CeO₂ играют ключевую роль в инактивировании супeroxидных свободных радикалов и наиболее значимым фактором является именно присутствие Ce³⁺ в поверхностном слое [105].

1.3. Основные стратегии направленной доставки

Направленная доставка лекарств (targeted drug delivery, drug targeting) – стратегия целевой доставки активных форм лекарственных молекул в те места тела (клетки, ткани или органы), где они необходимы, вместо неконтролируемой их диффузии в организме при обычных способах приема [109]. Для направленной доставки лекарств используют антитела, аптамеры, различные виды наночастиц и др.

Впервые о возможности адресной доставки лекарств заговорил еще в конце XIX в. Великий немецкий бактериолог П. Эрлих, предложив термин «волшебная пуля», подразумевающий препарат, который избирательно находит в организме и убивает опухолевые клетки, не повреждая при этом здоровые ткани [110]. С тех пор селективное воздействие фармакологических агентов на определенные клетки и ткани *in situ* остается предметом многочисленных исследований. Сегодня наука уже вплотную подошла к решению данной проблемы. Это удалось осуществить благодаря разработке и внедрению в клиническую практику методов направленного транспорта лекарств, которые в настоящее время достаточно разнообразны.

Направленный транспорт лекарств в очаг развития патологического процесса позволяет добиться повышения эффективности уже существующей лекарственной терапии. Такая адресная доставка обеспечивает более эффективное действие лекарства и сохраняет окружающие ткани. У таких наночастиц несколько последовательных задач. Им надо найти в организме клетки-мишени, пройти через все барьеры, доставить к ним субстанцию для лечения или диагностики, затем проникнуть внутрь клетки и выгрузить содержимое. После выполнения своей задачи наночастицы распадаются на части и/или выводятся из организма. Для того чтобы обеспечить выполнение всех этих этапов действий, им надо обладать некоторыми вполне определенными свойствами: иметь рецепторы для направленного движения к цели, обладать способностью проходить через клеточные мембранны,

высвобождать содержимое точно в нужное время и в нужном месте, быть нетоксичными. Мишени, на которые направлены наночастицы, это, к примеру, раковые клетки, клетки, зараженные вирусом, атеросклеротические бляшки и поврежденные органы. Барьеры, которые встают на пути наночастиц, многообразны: стенки желудочно-кишечного тракта, стенки капилляров, гемато-энцефалический барьер (между кровью и клетками мозга), мембрана клетки и мембранные клеточных органелл. Выгрузка содержимого в нужном месте – очень важный этап. Если лекарство не освободится в мишени, оно не сработает. Если оно выйдет наружу по пути к цели, будет еще хуже: оно сработает не там, где надо, и в результате пострадают прочие ткани. Чтобы обеспечить правильное высвобождение субстанции, его надо контролировать, а для контроля служат либо факторы внешней среды: температура, pH, специфические ферменты, либо время.

На сегодняшний день по механизму обеспечения адресной доставки препаратов выделяют две основные стратегии – пассивный и активный перенос.

1.3.1. Пассивный перенос. Пассивный транспорт лекарств в организме осуществляется за счет таких характеристик, как размер НЧ и уникальные свойства кровоснабжения опухолевой ткани – повышенная проницаемость сосудистой стенки и эффект удержания наночастиц (накопления) в опухоли (Enhanced Penetration and Retention Effect) [111]. Эти свойства могут усилить эффективность действия лекарств. Пассивный перенос происходит за счет преимущественного выхода лекарственных наночастиц в воспаленную или опухолевую ткань вследствие локального повышения проницаемости микрососудов при этих патологических процессах.

Ангиогенез является важным фактором прогрессивного роста опухоли. Ангиогенные кровеносные сосуды в опухолевой ткани, в отличие от нормальных тканей, имеют щели между близлежащими эндотелиальными клетками размером 600-800 нм [112,113]. Такая дефектная сосудистая архитектоника, в совокупности со слабым лимфатическим дренажом и

создает условия для реализации эффекта задержки, обеспечивая экстравазацию НЧ через межклеточные щели в опухолевую ткань. Эффект усиленной проницаемости и задержки в 10 и более раз увеличивает накопление лекарственного препарата в составе НЧ в опухоли по сравнению с традиционной формой того же препарата [114]. Однако локализация НЧ в опухолевой ткани неравномерная. По-видимому, здесь играют роль размер НЧ, их поверхностные характеристики, время циркуляции НЧ в кровотоке, уровень ангиогенеза в опухоли. Обычно, слабое накопление НЧ происходит в преангиогенных или некротизированных опухолях [112]. Длительно циркулирующие НЧ пассивно накапливаются в ткани опухоли за счет процессов увеличенной проницаемости и задержки.

Для дополнительного повышения проницаемости микрососудов в ткани-мишени могут применяться такие физические факторы, как ультразвук [115] и гипертермия [116]. Для обеспечения эффективного пассивного переноса требуется продолжительная циркуляция лекарственных наночастиц в кровотоке. В то же время, немодифицированные наночастицы достаточно быстро подвергаются опсонизации и захвату клетками ретикуло-эндотелиальной системы (РЭС). «Маскирование» наночастиц наиболее часто достигается за счет их покрытия слоем полиэтиленгликоля, который обладает химической инертностью и низкой иммуногенностью. Показано, что время полужизни в кровотоке покрытых полиэтиленгликолем липосом составляет от 15 до 24 часов у грызунов и до 45 часов у человека [117], в то время как непокрытые липосомы имеют время полужизни, не превышающее 2 часов [118]. Пассивный перенос препаратов в центральную нервную систему может иметь место при ее заболеваниях, сопровождающихся повышением проницаемости гемато-энцефалического барьера. Показано, что повышение проницаемости последнего происходит при ишемическом инсульте, болезни Альцгеймера, некоторых энцефалопатиях и рассеянном склерозе.

1.3.2. Активный перенос. Активная доставка лекарственных препаратов в поврежденные ткани предполагает маркирование поверхности наночастиц антителами или иными распознающими элементами, которые обеспечивают высокоизбирательное связывание наночастиц с антигенами, экспрессирующимиися на поверхности поврежденных клеток.

Морфо-функциональные особенности опухолевой ткани, создающие условия для реализации пассивного накопления лекарств в ней, не решают всех проблем селективной доставки лекарства и его накопления в опухоли. Существенно большей селективности удается добиться при конъюгации НЧ с мишениевым лигандом или с антителами против опухолевых антигенов [119]. Покрытая опухоле-специфическими лигандами или антителами НЧ с лекарством внутри связывается с поверхностными рецепторами и поглощается опухолевыми клетками. Попадая в кислую среду клеточных эндосом, лекарство высвобождается из НЧ в цитоплазму. Было показано, что на 1-2 стадиях предклинических испытаний подобные НЧ в 12-50 раз больше накапливались в ткани гепатоцеллюлярного рака печени, чем, например, свободный доксорубицин. При этом у пациентов отмечался явный противоопухолевый эффект [119,120].

Важнейшей задачей является поиск транспортных молекул для направленного транспорта / доставки лекарств к тканям-мишеням. Выбор лиганда зависит от антигена/рецептора, экспрессированного на поверхности клетки, куда необходимо доставить НЧ. При этом весьма желательно, чтобы такая молекула индуцировала бы опосредованный рецепторами эндоцитоз. Сейчас уже имеется целый спектр таких молекул – это прежде всего антитела, ростовые факторы, цитокины [121-123]. Недавние достижения в молекулярной биологии и генетической инженерии позволили создать модифицированные антитела для еще большей селективности доставки лекарств к мишениевым тканям. Моноклональные антитела или Fab'-фрагменты моноклональных антител в последние годы активно исследуются на предмет селективных носителей для направленного транспорта лекарств и

достижения значительного терапевтического эффекта. Несмотря на то что первоначальные исследования были направлены на применение целых молекул антител в качестве направляющего вектора, в последнее время все большее внимание уделяется Fab'-фрагментам как векторам, обладающим пониженной иммуногенностью и улучшенными фармако-кинетическими параметрами. Важным преимуществом использования этого класса лигандов является возможность выбора фрагмента антитела, обладающего наиболее высокой аффинностью к клетке-мишени. Это значительно улучшает фармакокинетику конъюгированных с ними НЧ с лекарством [124,125].

Для улучшения направленной доставки противоопухолевых препаратов было разработано новое поколение лекарственных препаратов — иммунолипосомы. Иммунолипосомы представляют собой липосомы с прикрепленными моноклональными антителами. Моноклональные антитела обеспечивают специфическое связывание липосом с антигенами клеток, а липосомы несут соответствующий химиотерапевтический препарат (рис.1.4).

В настоящее время различают три типа иммунолипосом: А, В и С [126]. Иммунолипосомы типа А — моноклональные антитела ковалентно связаны с обычными липосомами посредством короткого якоря; иммунолипосомы типа В — моноклональные антитела ковалентно связаны с пегилизованными липосомами посредством короткого якоря; иммунолипосомы типа С (Pendant-type PEG-immunoliposomes) — моноклональные антитела прикреплены к дистальному терминальному концу полиэтиленгликоля (ПЭГ).

Было показано, что иммунолипосомы типа А более эффективно, чем обычные липосомы, доставляют лекарства в клетки-мишени как в экспериментах *in vitro*, так и в *in vivo* [127]. Однако связывание иммунолипосом с клетками-мишениями *in vivo* было более сложным: прикрепление к липосомам антител усиливало их захват клетками РЭС, а эффективность их связывания с клетками-мишениями зависела от плотности антител на поверхности липосом. Явление захвата иммунолипосом клетками РЭС и функционирование эндотелиального барьера, разделяющего

сосудистое русло от опухолевой ткани, позволило создать липосомы типа В, которые были стерически стабилизированы и имели удлиненные периоды циркуляции в крови. Прикрепление антител к модифицированным липосомам через короткий якорь не привело к желаемому результату, увеличив лишь только время циркуляции иммунолипосом в крови [128], при этом взаимодействие с клетками-мишениями было недостаточным [129]. Прикрепление моноклональных антител к дистальным концам цепей ПЭГ, связанным с липосомами (тип С), привело к сохранению способности стерически стабилизированных липосом специфически связываться с поверхностью клеток-мишеней и быть защищенными от захвата клетками РЭС [130].



Рис.1.4. Схематическое изображение процессов связывания на поверхности и проникновения в клетку иммунолипосом. Взято из [131].

В то же время представленные в литературе данные о применении наноразмерных структур в качестве контейнеров для направленного транспорта фармакологических препаратов в клетки-мишени пока являются

немногочисленными (за исключением липосом), а вопросы биологической безопасности наноматериалов остаются недостаточно изученными.

1.4. Основные механизмы взаимодействия наночастиц с живой клеткой

Механизмы взаимодействия наночастиц с клетками являются предметом интенсивных исследований последних лет. Установлено, что специфика подобных взаимодействий определяется химическим составом, размером, формой, свойствами поверхности, агрегирующей способностью наночастиц и др. [132].

Одной из основных функций биологических мембран является обеспечение избирательной проницаемости для веществ как из клетки в среду, так и из среды во внутреннее пространство клетки, которые транспортируются в процессе жизнедеятельности клетки [133]. Механизмы транспорта различных веществ через клеточную мембрану довольно интенсивно изучались в конце прошлого столетия.

Контакт наночастиц с биологическими мембранами нередко заканчивается захватыванием первых внутрь клетки с помощью ряда механизмов — рецептор-опосредованных или не связанных с рецепторами. Захват («обволакивание» мембраной) требует образования как специфических, так и неспецифических контактов с мембраной, и является результатом динамического противостояния механизмов захвата частицы и процессов, препятствующим этому. Для осуществления захвата должны образоваться специфические (лиганд–рецептор) и неспецифические (гидрофобные, кулоновы) контакты. Высвобождающаяся при этом свободная энергия служит для «противоборства» силам, препятствующим захвату частицы (табл.1.1) [133].

Таблица 1.1

Силы, обеспечивающие и препятствующие захвату частиц

Обеспечивают «захват»	Препятствуют «захвату»
<ul style="list-style-type: none"> ✓ специфическое связывание рецептор–лиганд; ✓ неспецифические взаимодействия с мембраной; ✓ высвобождение свободной энергии в месте контакта; ✓ оптимальные размер и форма частицы; ✓ энергозависимые механизмы мембранны и цитоскелета (например, формирование клатриновой «сетки»). 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ текучесть мембраны; ✓ температурные флуктуации мембранны; ✓ скорость диффузии рецепторов; ✓ прочность взаимосвязи рецептор–лиганд.

Частицы и макромолекулы обычно проникают в клетки по пути эндоцитоза, который является энергозатратным процессом (рис.1.5). Существуют различные пути эндоцитоза [134,135]. Клатрин-опосредованный эндоцитоз является наиболее изученным видом эндоцитоза, а также одним из самых главных маршрутов захвата макромолекул клетками, рис.1.5 [136]. Кавеолин-опосредованный эндоцитоз наиболее изученный клатрин-независимый механизм, играющий важную роль в различных заболеваниях, включая рак, диабет и различные вирусные инфекции [136]. Кавеолы имеют размер 50-80 нм, их главная роль заключается в поглощении патогенов, мертвых клеток, и остатков клеток. Все эти процессы проникновения в клетки высоко регулируются для того, чтобы точно контролировать клеточные ответы на воздействия окружающей среды.

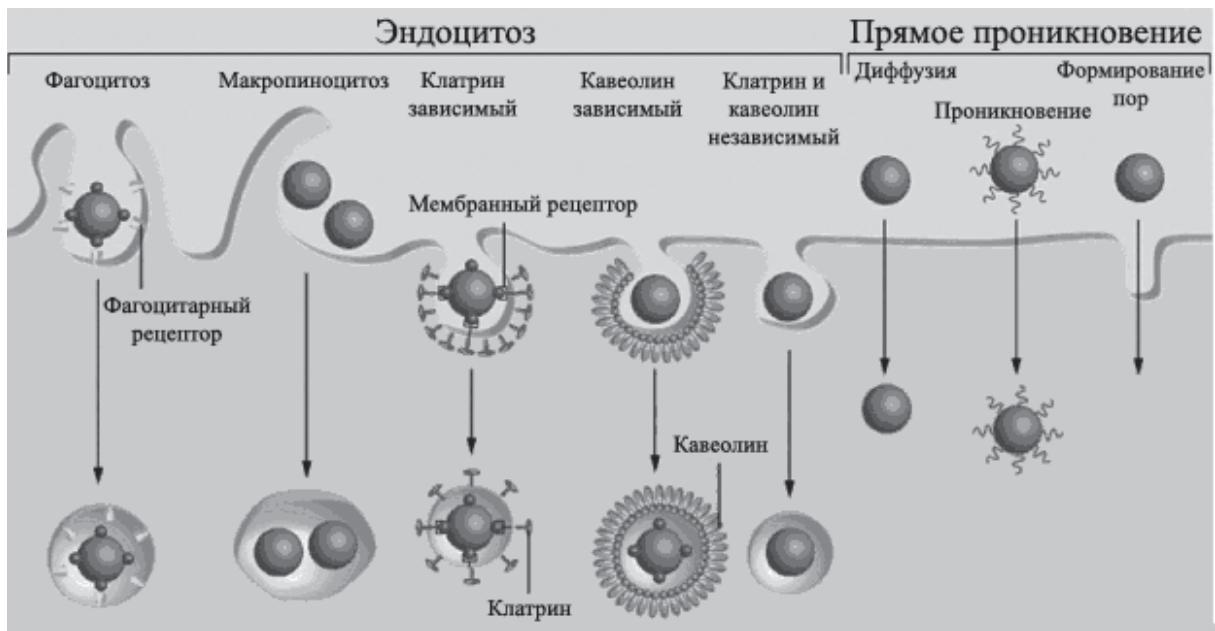


Рис.1.5. Схематическое изображение различных путей проникновения наночастиц через клеточные мембранные. Пути обычно включают эндоцитоз и прямое проникновение. Взято из [137].

Помимо эндоцитоза, существуют также некоторые другие пути, где мелкие частицы (или молекулы) могут пассивно пересекать клеточные мембранны (рис.1.5). С одной стороны, они могут диффундировать через мембранны посредствам специализированных мембрано-транспортных белковых каналов; [138], с другой стороны, они могут непосредственно проникать через клеточную мембрану [139,140]. В некоторых случаях, наночастицы (особенно заряженные наночастицы, такие как дендримеры или пептиды) могут создавать наноразмерные поры на мембране и перемещаться через нее [141,142]. Следует отметить, что хотя прямое проникновение не распространенный способ (по сравнению с эндоцитозом), однако существуют некоторые преимущества по сравнению с эндоцитозом. Например, наночастицы проникшие по пути эндоцитоза, заключены в эндосоме, и не в состоянии выйти из эндосом и достичь цитоплазму.

Существует минимальный радиус частицы, при котором она может быть захвачена внутрь клетки, и «оптимальный» радиус, при котором захват

происходит с максимальной эффективностью. Для сферических и цилиндрических частиц такие оптимальные размеры равны 15 и 30 нм, соответственно. С точки зрения чистой термодинамики среди частиц одного объёма легче всего должны захватываться сферы, т.к. макрофаги, старающиеся «проглотить» все чужеродные частицы при помощи фагоцитоза часто упускают длинные цилиндрические образования из виду: наверное, поскольку такая форма не встречалась до эры искусственных наночастиц, «тканевые стражи» оказываются сбитыми с толку.

1.5. Использование флуоресцентных методов для исследования взаимодействия наночастиц с живыми клетками

1.5.1. Флуоресцентные методы исследования. Исследовать стабильность наноконтейнеров в водных растворах или экспериментах *in vivo* и *in vitro* с использованием биологических объектов (клеток, тканей, и тому подобное) можно с помощью флуоресцентных методов, которые являются очень информативными и эффективно используются в биологических исследованиях и медицинской диагностике [143-145]. Использование флуоресцентных методов, в частности флуоресцентной микроскопии и микроспектроскопии, нуждаются в применении флуоресцентных зондов [143-145].

Общий подход к маркировке разных объектов, в том числе, наноконтейнеров (липосом, полимерных мицелл, наночастиц) основан на использовании органических молекул красителя инкорпорированных или адсорбированных на наноразмерных носителях [145]. Такой подход, так называемый, метод одноканальной регистрации позволяет визуализировать наноконтейнеры и отслеживать их взаимодействие с разными биологическими объектами, контролируя изменение сигнала флуоресценции зонда (интенсивность флуоресценции, анизотропии затухания флуоресценции, времени жизни флуоресценции) [145,146]. Например,

эффект усиления флуоресценции за счет подавлении процессов, приводящих к тушению флуоресценции зондов путем разбавления в соответствующих средах был использован для отслеживания процесса разрушения липосом [146,147]. Для этого красители (флуоресцеин или родамин) были предварительно загружены в липосому в высокой концентрации, что приводило к концентрационному тушению флуоресценции. При разрушении липосомы в кровотоке или в другой среде наблюдался выход красителя, уменьшение его общей концентрации и, как следствие, возникновение флуоресценции [146,147].

Однако методы маркировки, которые базируются на детекции флуоресценции в одном канале, то есть на одной длине волны, имеют существенные недостатки, с точки зрения их использования для исследования взаимодействия наноконтейнера с биообъектами в динамике. Методы, основанные на анализе изменения интенсивности флуоресценции, требуют предварительной калибровки, поскольку этот параметр существенно зависит от микроокружения флуорофора. Анализ анизотропии флуоресценции и методы, основанные на измерении времен жизни флуоресценции, требуют сложных приборов и математического аппарата, а потому в данных целях широко не применяются [145,146]. Кроме того, высокая концентрация флуорофоров в методах, которые основаны на тушении флуоресценции, не является желательной в биологических экспериментах.

1.5.2. Метод ратиометрической детекции флуоресценции. Метод ратиометрической детекции (запись интенсивности флуоресценции на двух или больше длинах волн) позволяет проводить анализ изменения сигнала флуоресценции одновременно в нескольких каналах и основан на разных механизмах, которые приводят к спектроскопическим изменениям, включая безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения (Förster Resonance Energy Transfer, FRET) [143,144]. Ратиометрическое детектирование интенсивности на фиксированных длинах волн является

простым методом, который может использовать обычное спектроскопическое и микроскопическое оборудование и обеспечивает самоотносительные ратиометрические измерения, которые являются невозможными при использовании одноканальной регистрации [146].

FRET происходит с помощью передачи энергии электронного возбуждения от одной молекулы (донора) к другой молекуле (акцептору) без эмиссии промежуточных фотонов [143,144]. Эффективность FRET очень зависит от расстояния между молекулами донора и акцептора, потому широко используется для изучения разных биологических процессов, связанных с изменением межмолекулярного расстояния [143,144]. В молекулярной биологии FRET очень часто используется для анализа пространственных структур макромолекул (свертывание белка, ДНК упаковки, и тому подобное) [143,144], неоднородности плазматической мембранны [148], исследования слияния вирусных мембран [149], исследования структуры мембранны [150,151], взаимодействия молекулярных компонентов мембранны [143,144].

При выполнении диссертационной работы для маркировки наночастиц оксидов РЗ элементов и диоксида церия с целью получения кинетических и термодинамических характеристик образующихся комплексов, а также изучения их взаимодействия с модельными системами биологических мембран и живыми клетками разных типов в динамике был применен метод ратиометрической детекции с применением нескольких флуоресцентных зондов и явления FRET.

1.6. Постановка задачи диссертационной работы

Таким образом, проведенный анализ литературных данных показал, что несмотря на огромный прогресс в сфере наномедицины и разработке наноразмерных носителей для внутриклеточной доставки активных веществ в органы и ткани, в этой области существует ряд нерешенных проблем.

Прежде всего, для более эффективного использования НК необходимо глубокое понимание механизмов взаимодействия наноносителей разных типов с живыми клетками и другими системами организма, нужны эффективные методы мониторинга наноразмерных носителей. В литературе нет сведений об использовании наночастиц на основе нанокристаллов ванадатов РЗ элементов и диоксида церия в качестве наноплатформы для доставки активных веществ внутрь живой клетки. Однако имеющие экспериментальные данные, в том числе полученные и в нашей группе, позволяют сделать вывод, о том, что подобное использование данных наночастиц может быть весьма перспективным. Кроме того, разработка новых НК на основе биологически активных НЧ позволит надеяться на получение синергетического эффекта как от самой НЧ, так и от транспортируемого вещества (лекарственного средства).

В связи с выше изложенным, целью диссертационной работы является установление механизмов взаимодействия комплексов на основе неорганических наночастиц $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ и CeO_2 и органических молекул (красителей семейства полиметинов) с модельными мембранами и живыми клетками.

Для достижения поставленной цели были поставлены и решены такие основные задачи:

- с помощью методов спектрофотометрии и флуоресцентной спектроскопии установить особенности взаимодействия между неорганическими наночастицами (НЧ) и гидрофильными и гидрофобными органическими молекулами (красителями); получить кинетические и термодинамические параметры стабильности комплексов неорганические НЧ/органические молекулы;
- используя методику ратиометрической детекции флуоресценции, изучить взаимодействие комплексов на основе неорганических (НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ и CeO_2) и органических (мицелл додецилсульфата натрия

(ДСН) и липосом фосфатидилхолина (ФХ)) наноносителей с модельными мембранами;

- оценить эффективность и кинетические параметры аккумулирования наноносителей разных типов живыми клетками (гепатоциты крыс) с помощью метода флуоресцентной микроскопии;
- с помощью методов флуоресцентной микроспектроскопии и рatiометрической детекции флуоресценции установить кинетические параметры высвобождения липофильного содержимого из наноносителей разных типов (неорганические НЧ, мицелл ДСН и липосом ФХ) при взаимодействии с модельными мембранами;
- установить возможные механизмы влияния на кинетические параметры высвобождения активного вещества (органической молекулы) из комплекса неорганические НЧ/органические молекулы при взаимодействии с живой клеткой.

РАЗДЕЛ 2

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТЕХНИКА И МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Техника оптической спектроскопии

2.1.1. Измерение спектров поглощения. Измерение спектров поглощения растворов, содержащих органические и неорганические наноконтейнеры с инкорпорированными или адсорбированными на поверхности молекулами красителей, проводилось с помощью двухлучевого сканирующего UV-Vis спектрофотометра SPECORD 200 (Analytik Jena, Германия, рис. 2.1).

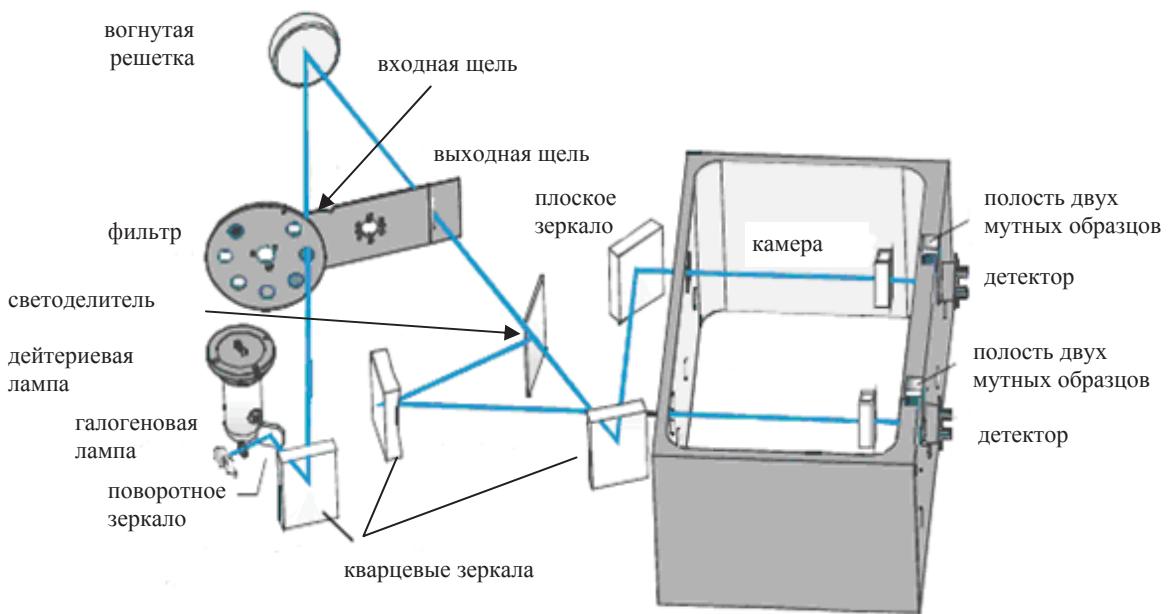


Рис.2.1. Оптическая схема SPECORD 200 [152].

При проведении измерений, в зависимости от концентрации красителей, использовались кюветы с длиной оптического пути 0,2, 0,5 и 1 см. Управление прибором и обработка спектров осуществлялось программным

обеспечением в среде Windows. Основные характеристики спектрофотометра [153]:

- оптика: монохроматор с голографической решеткой и асферической оптикой кварцевого напыления;
- диапазон волн: 190–1100 нм;
- точность длины волны: $\leq \pm 0.5$ нм;
- воспроизводимость длины волны: $\leq \pm 0.05$ нм;
- ширина спектральной полосы: варьируется 1; 2; 4 нм.

2.1.2. Измерение спектров флуоресценции. Для измерения спектрально-флуоресцентных характеристик наноконтейнеров, содержащих полиметиновые красители, а также водных растворов красителей, использовался спектрофлуориметр Lumina (ThermoScientific, США), который позволял измерять стационарные спектры флуоресценции и возбуждения флуоресценции (рис. 2.2).

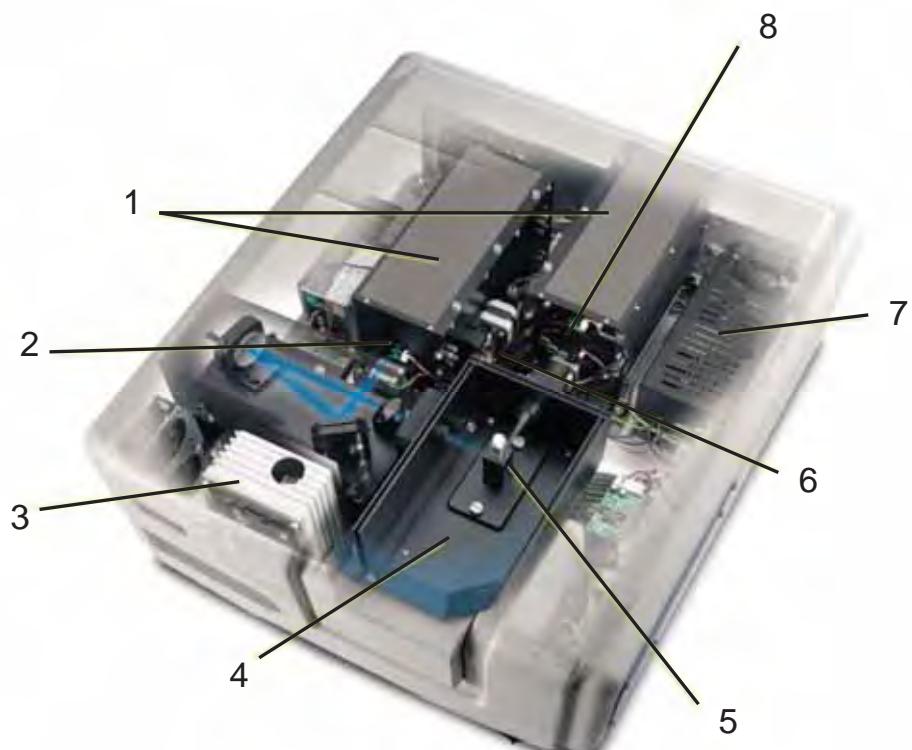


Рис.2.2. Общий вид флуоресцентного спектрометра Lumina [154].

На рис.2.2. показано:

1 – *Монохроматоры высокого разрешения.* Lumina использует монохроматоры с фокусным расстоянием 20 см и щелью 0.5 нм. Вогнутые решетки оптимизированы для получения максимального светопропускания; 2 – *Щели переключаемой ширины.* Возможно переключение ширины щели 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10 и 20 нм для обеспечения наиболее полного соответствия аналитической задаче; 3 – *Ксеноновая лампа 150 Вт.* Ксеноновая лампа обеспечивает исключительно стабильный световой поток во всем спектральном диапазоне. Исключаются выбросы и шумы, генерируемые импульсными лампами; 4 – *Кюветное отделение;* 5 – *Горизонтальная геометрия луча.* Горизонтальная форма луча в кюветном отделении обеспечивает оптимальные условия возбуждения флуоресценции и позволяет проводить точные измерения с пробами объемами 500 мкл; 6 – *Быстрый привод сканирования.* Скорость сканирования спектра для Lumina составляет 6000 нм/мин, а скорость установки монохроматоров – 20000 нм/мин, что ускоряет измерения и минимизирует экспозицию; 7 – *Чувствительный детектор.* Высокоэффективный ФЭУ R-928 (Hamamatsu, Япония) обеспечивает отличную чувствительность в диапазоне 190-900 нм; 8 – *Переключаемые фильтры.* Фильтры для обеспечения высокого качества спектра путем отсечения возбуждающей линии и рассеяния.

Для проведения измерений при разных температурах использовалась терmostатируемая ячейка для кювет, температура контролировалась с помощью водного термостата. Перемешивание раствора осуществлялось с помощью магнитной мешалки.

2.2. Флуоресцентная микроскопия и микроспектроскопия

Для получения флуоресцентных изображений наноконтейнеров, содержащих флуоресцентные зонды, и живых клеток, инкубированных вместе с меченными НК, использовали инвертированный флуоресцентный

микроскоп Olympus IX71 (Olympus, Япония), оснащенный цифровой камерой Olympus C-5060 и работающий в конфокальной оптической схеме (рис.2.3). Использовали объектив 100×, при этом на покровное стекло наносилось нелюминесцирующее иммерсионное масло. Для возбуждения флуоресценции красителей использовали фильтровые кубики BP460–490 (фильтр возбуждения 460-490 нм, дихроичное зеркало DM500, отрезающий светофильтр BA520IF) и BP510–550 (фильтр возбуждения 510-550 нм, дихроичное зеркало DM570, отрезающий светофильтр BA590) [155].



Рис. 2.3. Флуоресцентный микроскоп Olympus IX71 и цифровая камера Olympus C-5060 (Olympus, Tokyo, Japan). Взято из [155].

Измерение флуоресценции проходило в условиях минимальной интенсивности возбуждающего излучения с помощью высокочувствительной детектирующей системы. Эти условия помогли

избежать повреждения клеток и фоторазрушения проб возбуждающим светом.

Для регистрации спектров флуоресценции с отдельных клеток (метод микроспектроскопии), флуоресцентный микроскоп был оснащен волоконно-оптическим спектральным детектором USB 4000 (OceanOptics, США), который, в свою очередь, сопрягался с компьютером (рис.2.4).



Рис.2.4. Спектрометр USB4000 (Ocean Optics, USA). Взято из [156].

В качестве источника возбуждения флуоресценции объекта использовалась ртутная лампа 100 Вт. Возбуждающее излучение через возбуждающий светофильтр направлялось в объектив микроскопа с помощью дихроичного зеркала, установленного под углом 45°. Дихроичное зеркало служило для передачи флуоресценции объекта на цифровую камеру или спектральный детектор и выполняло роль светофильтра, отрезая возбуждающее излучение от полезного сигнала. Дополнительно, полезный сигнал отделялся от возбуждающего излучения с помощью отрезающего светофильтра. Для достижения максимального отношения сигнал/шум для слабо люминесцирующих объектов, использовалась диафрагма (pinhole), с

помощью которой выделялся отдельный объект. Полученные флуоресцентные изображения и спектры флуоресценции обрабатывались с помощью программных пакетов DP-soft 5.0 software (Olympus, Япония) и SpectraSuite (OceanOptics, США), соответственно.

2.3. Оценка эффективности накопления НК разных типов в клетках гепатоцитов крыс

При исследовании эффективности накопления НК различных типов, содержащих красители, клетками гепатоцитов крыс использовали метод, основанный на bitmap анализе, т.е. анализе битовых (растровых) изображений клеток, полученных с помощью флуоресцентного микроскопа в разные интервалы времени их инкубации с НК. С помощью гистограммы анализировали средневзвешенный уровень яркости изображения в двух каналах (зеленом и красном) относительно собственной флуоресценции клетки (т.е. автофлуоресценции), которую принимали за нулевую точку.

Анализ изображений осуществлялся с помощью программного обеспечения для анализа растровых изображений (например, Adobe Photoshop). Для анализа отбирались снимки, сделанные при одинаковом увеличении, с одинаковой выдержкой при одинаковой интенсивности возбуждающего света. При анализе флуоресцентных изображений клеток, полученных в каждый интервал времени, использовали не менее 50 снимков.

2.4. Методики приготовления образцов для исследований.

В диссертационной работе в качестве наноразмерных носителей использовались НЧ $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Y}, \text{Gd}, \text{La}$) и CeO_2 , мицеллы анионного поверхностно-активного вещества додецилсульфат натрия (ДСН), образующиеся в воде благодаря эффекту самоорганизации при превышении его критической концентрации мицеллообразования (ККМ), и

униламеллярные липосомные везикулы, полученные методом экструзии водной суспензии фосфатидилхолина яичного желтка (рис.2.5, рис.2.6).

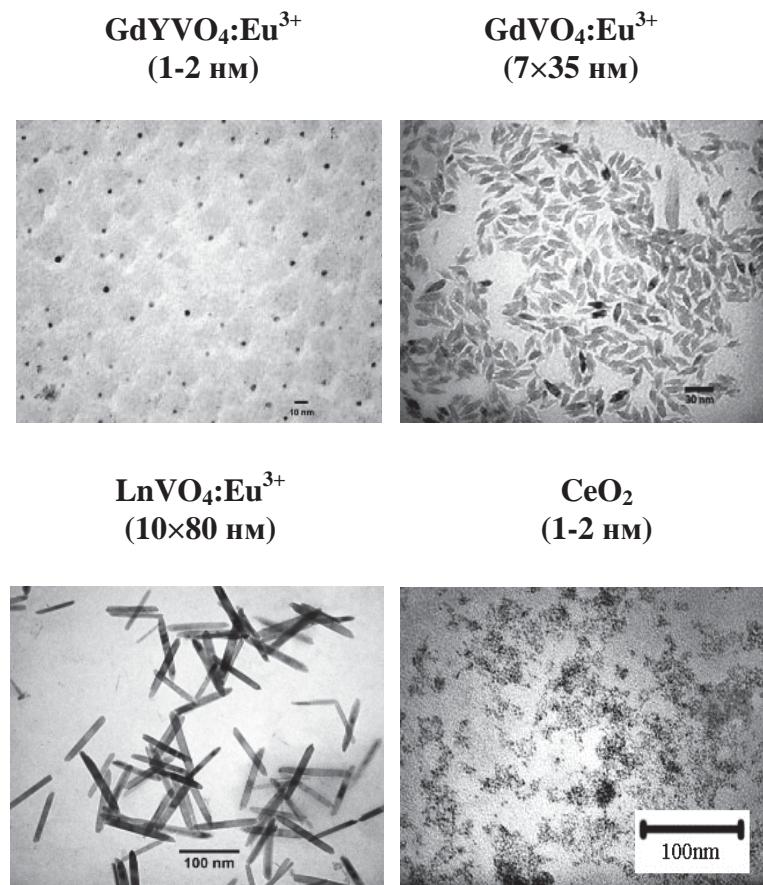


Рис.2.5. ПЭМ-изображения исследуемых НЧ.

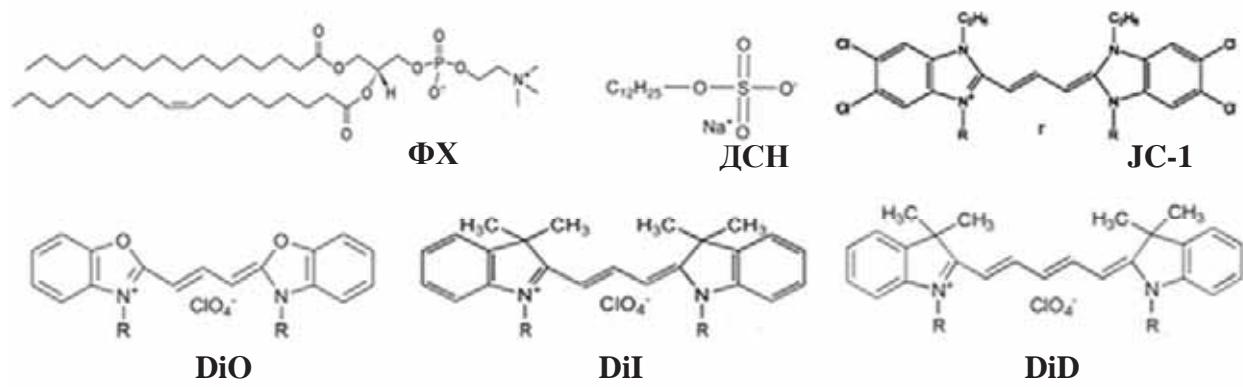


Рис.2.6. Структурные формулы фосфатидилхолина яичного желтка, додецилсульфата натрия и полиметиновых красителей (DiOC_2 ($\text{R}=\text{C}_2\text{H}_5$), DiIC_1 и DiDC_1 ($\text{R}=\text{CH}_3$), JC-1 ($\text{R}=\text{C}_2\text{H}_5$), JC-1/C4 ($\text{R}=\text{C}_4\text{H}_9$), JC-1/C18 ($\text{R}=\text{C}_{18}\text{H}_{37}$), JC-1/C3S ($\text{R}=\text{C}_3\text{H}_6\text{-SO}_3$), DiOC_{18} ($\text{R}=\text{C}_{18}\text{H}_{37}$), DiIC_{18} ($\text{R}=\text{C}_{18}\text{H}_{37}$)).

В качестве органических транспортируемых веществ использовали гидрофильные (DiOC_2 , DiIC_1 , DiDC_1) и гидрофобные (JC-1 , JC-1/C4 , JC-1/C18 , JC-1/C3S , DiOC_{18} , DiIC_{18}) молекулы красителей семейства полиметинов, структурные формулы которых приведены на рис.2.6.

2.4.1. Синтез наночастиц $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Y}, \text{Gd}, \text{La}$) и CeO_2 . Водные коллоидные растворы ортованадатов $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$, $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ и $\text{LaVO}_4:\text{Eu}^{3+}$, а также диоксида церия CeO_2 получены методом коллоидного синтеза с применением в качестве стабилизатора натриевой соли ЭДТА или цитрата натрия [157,158]. Размеры и морфологию твердой фазы наночастиц оценивали с помощью просвечивающей электронной микроскопии на электронном микроскопе ПЭМ 125К (Selmi, Украина). Распределение нанокристаллов по размерам определяли по методу динамического светорассеяния на анализаторе ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corp., США) при угле рассеивания 90° . В диссертационной работе для приготовления комплексов НЧ/органические молекулы использовали водные растворы наночастиц на основе ортованадатов $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Y}, \text{La}, \text{Gd}$) сферической ($d=2$ нм), зернообразной (7×35 нм) и стержнеобразной формы (10×80 нм) и сферических нанокристаллов CeO_2 ($d=2$ нм). В спектре поглощения синтезированных коллоидных растворов неорганических наночастиц на основе ортованадата редкоземельных элементов ReVO_4 наблюдается широкая полоса с максимумом в диапазоне 271-287 нм, причем при увеличении размеров наночастиц наблюдается батохромный сдвиг максимума поглощения (рис.2.7).

Полученным коллоидным растворам неорганических наночастиц на основе ортованадатов редкоземельных элементов присущи люминесцентные свойства, которые определяются типом иона-активатора, в нашем случае Eu^{3+} . На рис.2.8. представлены характерные спектры люминесценции и возбуждения люминесценции исследуемых наночастиц.

Спектры поглощения синтезированных водных коллоидных растворов на основе диоксида церия характеризуются наличием полосы поглощения

оксида церия с максимумом поглощения в области 285 нм, рис.2.9. В отличие от НЧ на основе ортovanадатов РЗ элементов, диоксид церия не обладает люминесцентными свойствами.

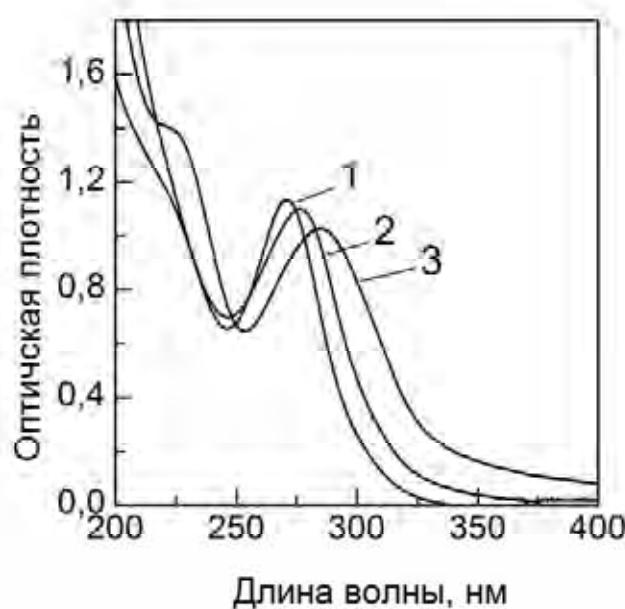


Рис.2.7. Спектры поглощения коллоидных растворов сферических (1), зернообразных (2) и стержнеобразных (3) НЧ.

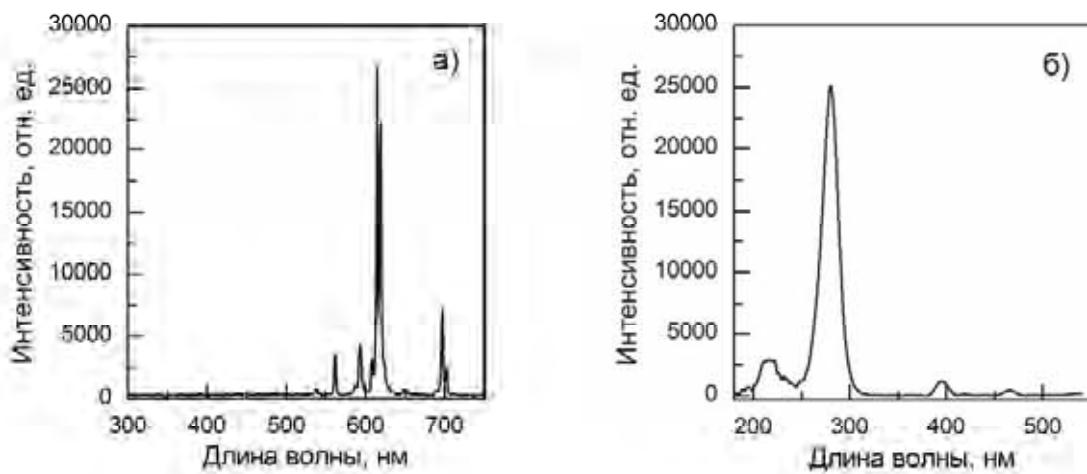


Рис. 2.8. Спектры а) люминесценции $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\lambda_{\text{возб}} = 280$ нм) и б) возбуждение люминесценции ($\lambda_{\text{пер}} = 612$ нм).

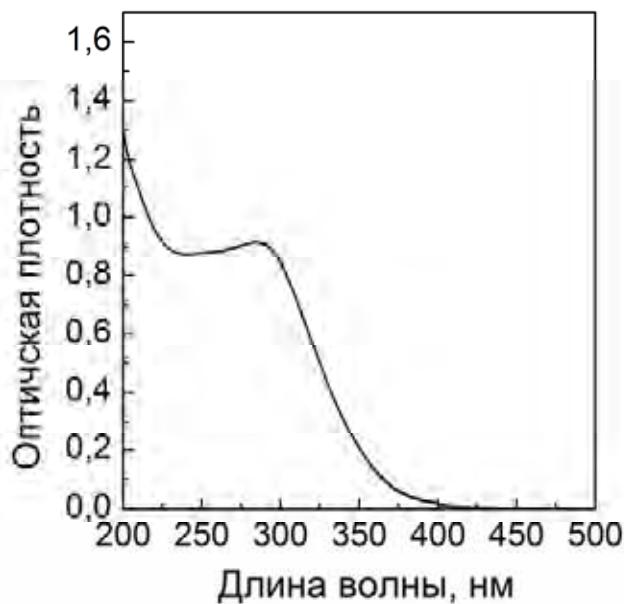


Рис. 2.9. Спектры поглощения CeO_2 ($d=2$ нм).

2.4.2. Приготовление водных растворов, содержащих наночастицы и молекулы красителей. Для приготовления комплексов НЧ и гидрофильных и гидрофобных молекул красителей были разработаны оригинальные методики.

2.4.2.1. Водные растворы, содержащие наночастицы и гидрофильные красители DiOC_2 , DiIC_1 и DiDC_1 . Для приготовления водных растворов красителей с наночастицами использовалась дистиллированная вода двойной перегонки. Концентрация красителей варьировалась в диапазоне от 1×10^{-6} до 2×10^{-4} М. Концентрация наночастиц оставалась постоянной и составляла 0,01 г/л в случае с DiOC_2 , и 0,005 г/л в случае с DiIC_1 и DiDC_1 .

Растворы готовили по следующей схеме. Сначала готовили исходные растворы красителей в воде концентрацией 1×10^{-2} и 1×10^{-3} М, и исходные водные растворы наночастиц $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Y}, \text{La}, \text{Gd}$) концентрацией 0,02 г/л и 0,01 г/л. При проведении исследований адсорбции гидрофильных красителей на поверхности наночастиц готовили две параллельные серии растворов: первая серия – водные растворы красителей в диапазоне заданных

концентраций, вторая серия – такие же растворы, но содержащие наночастицы.

2.4.2.2. Водные растворы, содержащие наночастицы и гидрофобные красители JC-1, JC-1/C4, JC-1/C18 и JC-1/C3S. Сначала готовили растворы красителей в полярном растворителе ДМСО в необходимых концентрациях. Затем к рассчитанному количеству исходного раствора красителя в ДМСО добавляли необходимое количество водного раствора НЧ $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Y}, \text{La}, \text{Gd}$) с различным форм-фактором и водного буфера HEPES ($\text{pH}=7,4$) таким образом, чтобы в конечных растворах доля водного буфера составляла 70%, полярного растворителя ДМСО – 10%, раствора НЧ – 20%. Концентрация НЧ в растворах варьировалась в диапазоне 0,01-0,5 г/л.

2.4.2.3. Водные растворы, содержащие наночастицы и красители DiOC_{18} и DiIC_{18} . 5 мл водных коллоидных растворов НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ или CeO_2 (0,83 г/л) и 5 мл растворов красителей DiOC_{18} и/или DiIC_{18} ($3,3 \times 10^{-5}$ М) в изопропиловом спирте смешивали в колбе используя магнитную мешалку, после чего добавляли 10 мл дистиллированной воды двойной перегонки. Затем смесь аккуратно перемешивали, используя роторный испаритель в течение 1 часа до полного испарения изопропилового спирта. Конечная концентрация каждого красителя в растворах составляла 2×10^{-5} М, концентрация НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ или CeO_2 составляла 0,5 г/л.

2.4.2.4. Водные растворы, содержащие наночастицы, красители DiOC_{18} и DiIC_{18} и холестерин. Методика приготовления комплексов НЧ/красители, содержащих холестерин была следующей. В химический стакан емкостью 50 мл наливают 10 мл 0,1 М раствора холестерина в 96% этаноле, добавляли 0,2 мл 0,001М раствора каждого красителя в этаноле, добавляли 5 мл водного коллоидного раствора наночастиц $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ с размерами частиц 2 нм и концентрацией 0,5 г/л, перемешивали на магнитной мешалке в течение 10 минут. К полученному раствору добавляли 15 мл дистиллированной воды двойной перегонки и снова перемешивали в течение 5 минут. Потом полученный раствор переливали в круглодонную колбу и упаривали на

роторном испарителе до объема 5 мл. Конечная концентрация холестерина составляла 0,25 г/л.

2.4.3. Водные растворы, содержащие мицеллы ДСН с красителями.

Водно-мицеллярные растворы, содержащие различные красители, готовились по следующей схеме. В стеклянный флакон добавляли необходимое количество исходного раствора красителя в хлороформе (1×10^{-3} М) и навеску ДСН, рассчитанную таким образом, чтобы концентрация ДСН была выше ККМ (ККМ = 8×10^{-3} М для ДСН), что гарантировало образование в растворе сферических мицелл ДСН [159]. После полного испарения хлороформа добавляли дистиллированную воду двойной перегонки. Раствор нагревали до $\sim 80^{\circ}\text{C}$, тщательно перемешивали до полного растворения компонентов и оставляли остывать до комнатной температуры. Концентрация мицелл ДСН (C_m), рассчитанная как

$$C_m = \frac{C_{\text{ДСН}} - KKM}{N_{\text{агр}}}, \text{ где } N_{\text{агр}} - \text{число агрегации (для ДСН } N_{\text{агр}} = 64 \text{ [159])}$$

составляет 2×10^{-5} М. Концентрация каждого красителя 2×10^{-5} М.

2.4.4. Водные растворы, содержащие липосомы ФХ с красителями.

Однослойные липосомы с инкорпорированными молекулами красителей готовились методом экструзии [160]. Сначала готовили липидную пленку, содержащую необходимый краситель. Для этого, необходимое количество исходных растворов ФХ (40 мг/мл) и красителей (1×10^{-3} М) в хлороформе помещали в круглодонную колбу, смесь высушивали до полного удаления хлороформа с помощью роторного испарителя. Затем полученная липидная пленка гидратировалась необходимым количеством дистиллированной воды двойной перегонки. Полученная таким образом суспензия липидов, которые содержат красители, пропускалась через мембрану (размер пор 100 нм) с помощью мини-экструдера (Avanti Polar Lipids, Inc.). Концентрация ФХ в полученной суспензии липосом составляла 1×10^{-3} моль/л, концентрация красителей была 2×10^{-5} моль/л. Полученные липосомы выдерживались 12 часов при 22°C для установления термодинамического равновесия.

В липосомы ФХ, содержащие ДСН, добавляли 10% ДСН (по отношению к общей массе ФХ) на стадии приготовления липидной пленки.

2.4.5. Методика инкубирования клеток с наноконтейнерами разных типов. Для изучения эффективности аккумуляции НК разных типов (на основе НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ и CeO_2 , липосом ФХ) с клетками гепатоцитов крыс, выделенные клетки гепатоцитов (50 мкл, 10^7 клеток/мл) инкубировали с суспензией комплексов НК/краситель (50 мкл) в 1 мл среды Игла с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки при 37°C в течение желаемого промежутка времени. После чего не связавшиеся с клетками комплексы НК/красители удалялись центрифугированием при 500 g, клетки отмывались добавлением буферного раствора НЕРЕС pH=7,4 с добавлением 0,1 % бычьего сывороточного альбумина.

Для изучения кинетики высвобождения органического содержимого (красителей) из НК в клеточные мембранны, полученные клетки гепатоцитов (50 мкл, 10^7 клеток/мл) инкубировались с суспензией комплексов НК/краситель (450 мкл) при комнатной температуре в течение 15 минут. После чего не связавшиеся с клетками комплексы НК/красители удалялись центрифугированием при 500 g, клетки отмывались добавлением буферного раствора НЕРЕС pH=7,4 с добавлением 0,1 % бычьего сывороточного альбумина. Затем 500 мкл буферного раствора НЕРЕС с 0,1 % бычьего сывороточного альбумина добавляли во все комплексы и инкубировали при 37°C в течение желаемого промежутка времени.

2.5. Характеристика объектов исследования

2.5.1. Характеристика комплексов НК/красители DiOC_{18} и DiIC_{18} . В работе, говоря о комплексах НК/красители, в качестве НК будем подразумевать мицеллы ДСН, липосомы ФХ и неорганические НЧ на основе $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ и CeO_2 .

При изучении взаимодействия НК разных типов с модельными мембранами и живыми клетками использовали НК «загруженные» одновременно двумя красителями DiOC₁₈ и DiIC₁₈. Выбранные красители являются гидрофобными, мембранотропными зондами и характеризуются низкой растворимостью в воде. Флуоресценция красителей в водных растворах потушена за счет образования нефлуоресцирующих агрегатов[161]. Однако в водных растворах, содержащих мицеллы ПАВ или липидные везикулы красители DiOC₁₈ и DiIC₁₈ демонстрируют яркую флуоресценцию за счет солюбилизации молекул красителей мицеллами ПАВ или их инкорпорирования в липидные бислои, и являются достаточно фотостабильными. Они достаточно широко используются в биологических исследованиях в качестве FRET-пары. Красители имеют высокие коэффициенты молярной экстинкции ($154000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ и $148000\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для DiOC₁₈ и DiIC₁₈, соответственно) и достаточные квантовые выходы [161].

Спектры поглощения комплексов липосома ФХ/красители DiOC₁₈ и DiIC₁₈ в водных растворах представлены максимумами на 492 нм (DiOC₁₈) и 552 нм (DiIC₁₈) и плечами на 462 нм и 519 нм, соответственно (рис.2.10а, кривая 1).

Инкорпорирование катионных полиметиновых красителей в липосомы ФХ не вызывает значительные изменения гидродинамического диаметра липосом (рис.2.11, кривые 1 и 2). Красители DiOC₁₈ и DiIC₁₈ обладают длинными углеводородными радикалами C₁₈H₃₇ и в липидных бислоях липосом красители локализованы таким образом, что их заряженные хромофорные группы находятся в контакте с водой, в то время как длинные хвосты встроены в липидные бислои (рис.2.12а). Повышение локальной концентрации красителей DiOC₁₈ и DiIC₁₈ в липидных бислоях липосом обеспечивает необходимое расстояние между донором и акцептором для эффективного FRET между ними при возбуждении в полосе поглощения донора, что подтверждено в спектре флуоресценции (рис.2.10б, кривая 1). Как показывает рис.2.10б, при возбуждении на длине волны 440 нм,

эффективность FRET составляет порядка 100%, флуоресценция донора DiOC₁₈ с $\lambda_{\text{max}} = 505$ нм не наблюдается.

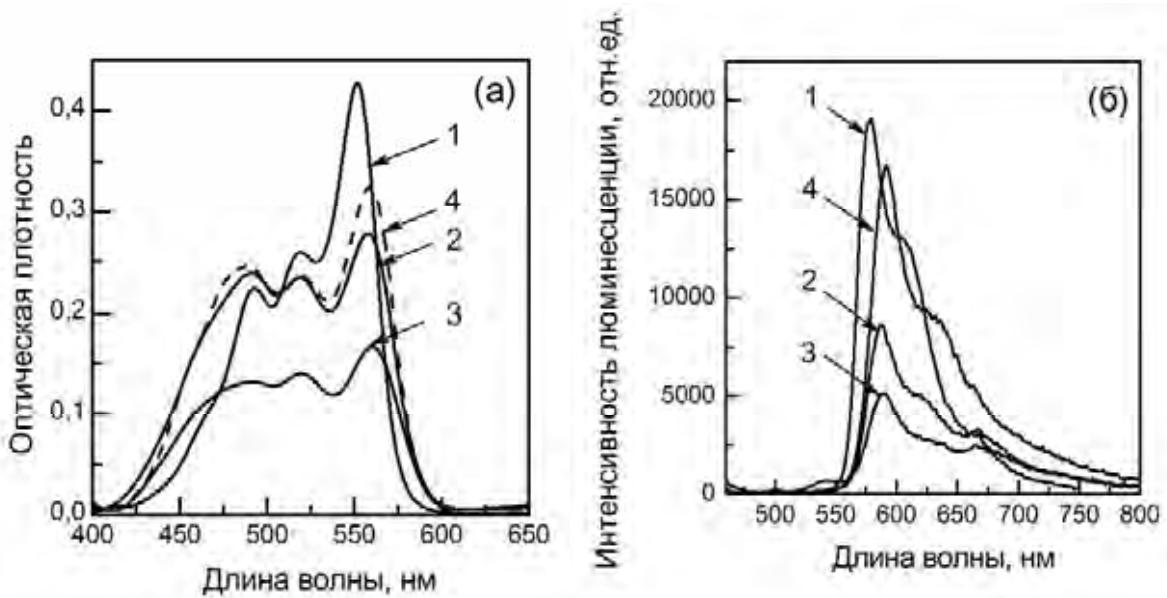


Рис.2.10. Спектры поглощения (а) и люминесценции (б) комплексов: 1 – липосомы ФХ/красители; 2 – GdYVO₄:Eu³⁺/красители; 3 – CeO₂/красители; 4 – GdYVO₄:Eu³⁺/красители/холестерин. $\lambda_{\text{exc}} = 440$ нм.

В водных растворах НЧ GdYVO₄:Eu³⁺ и CeO₂ стабилизируют цитратом натрия, который придает отрицательный заряд поверхности частиц [159]. Катионные молекулы красителей притягиваются к поверхности НЧ из-за кулоновского взаимодействия. Это приводит к формированию плотной упаковки молекул красителя вблизи заряженной поверхности НЧ, увеличению локальной концентрации красителей с последующей частичной агрегацией красителей (рис.2.10а, кривые 2 и 3). Кроме того, вследствие адсорбции красителей в приповерхностном слое НЧ и частичной нейтрализации поверхностного заряда НЧ происходит агломерация НЧ с адсорбированными молекулами красителей в более крупные комплексы (рис.2.12) [10,158]. Процесс образования подобных комплексов и влияние свойств красителей на структуру комплексов будут подробно изучены в

разделе 3. Это утверждение подтверждается данными, полученными при измерении гидродинамического диаметра комплексов, которые явно показывают резкое увеличение гидродинамических диаметров объектов в растворах с красителями с 17 нм до 66 нм для $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ НЧ и с 7 нм до 125 нм для CeO_2 НЧ, рис.2.11. Концентрирование красителей вблизи поверхности НЧ в образованных комплексах вызывает очень эффективный FRET между красителями DiOC_{18} и DiIC_{18} (рис.2.10б, кривые 2 и 3).

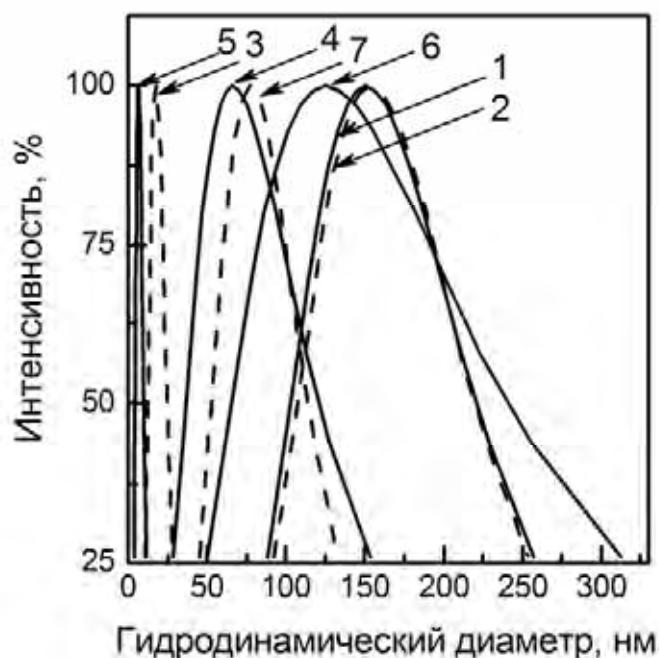


Рис.2.11. Гидродинамический диаметр: 1 – липосомы ФХ; 2 – комплексов липосомы ФХ/красители; 3 – НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$; 4 – комплексов НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ /красители; 5 – НЧ CeO_2 ; 6 – комплексов НЧ CeO_2 /красители; 7 – комплексов НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ /красители/холестерин.

В комплексах НЧ/красители/холестерин, гидрофобные красители DiOC_{18} и DiIC_{18} сосредоточены в наноразмерных каплях холестерина, которые в свою очередь стабилизируются НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$, как показано схематично на рис.2.12 [10]. Концентрирование молекул красителей в холестерине подтверждается смещением спектров поглощения и флуоресценции в

длинноволновую область (рис.2.10а,б), что согласуется с полученными данными о смешении спектров флуоресценции и поглощения для красителей семейства полиметинов при изменении полярности среды [15]. Полученные комплексы НЧ/красители/холестерин около 70 нм в диаметре (рис.2.11, кривая 7).

Полученные растворы являются прозрачными колloidными растворами, цвет которых обусловлен цветом вводимых красителей. В использованных соотношениях НЧ/молекулы красителей, все комплексы являются стабильными, по крайней мере две недели без каких-либо изменений их оптических свойств.



Рис.2.12. Схематическое представление исследуемых комплексов.

2.5.2. Живые клетки: гепатоциты печени крыс. Все эксперименты, в которых были задействованы животные, проводили в соответствии с положениями «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург,

Франция, 1986). В работе использовали гепатоциты, изолированные из печени крыс-самцов 3-месячного возраста линии Вистар. Все манипуляции с животными проходили под поверхностным эфирным наркозом. Изолированные гепатоциты получали неферментативным методом, подробно описанным в [162] с последующей промывкой в среде Игла, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки. Жизнеспособность полученной суспензии определяли по окрашиванию клеток 0,4% красителем трипановым синим. В эксперименте использовались суспензии, содержащие не менее 90-93% неокрашиваемых клеток.

Выводы к разделу 2

1. Разработаны оригинальные методики получения комплексов неорганических НЧ $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Y}, \text{La}, \text{Gd}$) с различным форм-фактором и CeO_2 с одним или несколькими гидрофильными/гидрофобными красителями заданной концентрации.
2. Разработана оригинальная методика введения холестерина в комплексы НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ /красители.
3. Получены и охарактеризованы разными методами комплексы НЧ/красители, НЧ/красители/холестерин, липосомыФХ/красители.
4. Отработана методика ратиометрической детекции флуоресценции, позволяющая наблюдать в динамике взаимодействие между НЧ разного типа с модельными мембранами и живыми клетками в экспериментах *in vitro*.
5. Отработана методика инкубирования комплексов НЧ/красители с клетками гепатоцитов крыс.

Разработанные методики использованы в публикациях [1-15].

РАЗДЕЛ 3

СПЕКТРОСКОПИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ НЕОРГАНИЧЕСКИХ НАНОКОНТЕЙНЕРОВ НА ОСНОВЕ НЧ ReVO₄:Eu³⁺ (Re =Y, La, Gd) С ПОЛИМЕТИНОВЫМИ КРАСИТЕЛЯМИ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ

На первом этапе выполнения диссертационной работы было важно исследовать взаимодействие синтезированных наночастиц на основе редкоземельных элементов с разным форм-фактором и гидрофобными и гидрофильными красителями семейства полиметинов (рис.2.5 и рис.2.6).

НЧ на основе ортованадатов РЗ элементов в водных растворах, как было описано в разделе 2, стабилизируют цитратом натрия или динатриевой солью ЭДТА. Наночастицы имеют отрицательный заряд поверхности, гидрозоль коагулирует в присутствии электролитов, катионных поверхностно-активных веществ и катионных красителей [158,163]. При взаимодействии с катионными органическими соединениями происходит нейтрализация заряда поверхности наночастиц и адсорбция органических катионов на поверхности частиц и, при достижении пороговых концентраций, агрегация с дальнейшим осаждением твердой фазы из раствора (процесс агломерации) [158,163]. Нами были исследованы эффекты, которые проявляются при взаимодействии отрицательно заряженных НЧ с катионными органическими соединениями и, в первую очередь, с красителями, которые позволяют наблюдать эффекты взаимодействия доступными спектрофотометрическими методами. Основной причиной адсорбции являются межмолекулярные, в частности, электростатические и гидрофобные взаимодействия органических соединений на поверхности неорганических частиц. Поэтому способность органических соединений к образованию межмолекулярных ансамблей с наночастицами во многом зависит от природы взаимодействующих молекул, их заряда и растворимости в воде. Эти характеристики нами были учтены при выборе органических соединений для исследований.

3.1. Исследование эффективности взаимодействия гидрофильных полиметиновых красителей с неорганическими наночастицами $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ в водных растворах.

При изучении процесса взаимодействия между неорганическими НЧ $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Y}, \text{La}, \text{Gd}$) с различным форм-фактором и гидрофильными органическими молекулами использовали красители DiOC_2 , DiIC_1 и DiDC_1 . Выбранные нами красители относятся к семейству полиметинов и, помимо одинаковой гидрофильности, имеют также практически одинаковую хромофорную часть, отличающиеся только длиной полиметиновой цепочки (рис.2.6), что приводит к смещению максимума поглощения красителей в длинноволновую область спектра: $\lambda_{\text{макс}} = 480 \text{ нм}$ (DiOC_2), $\lambda_{\text{макс}} = 540 \text{ нм}$ (DiIC_1) и $\lambda_{\text{макс}} = 636 \text{ нм}$ (DiDC_1), соответственно (рис. 3.1а, сплошные линии).

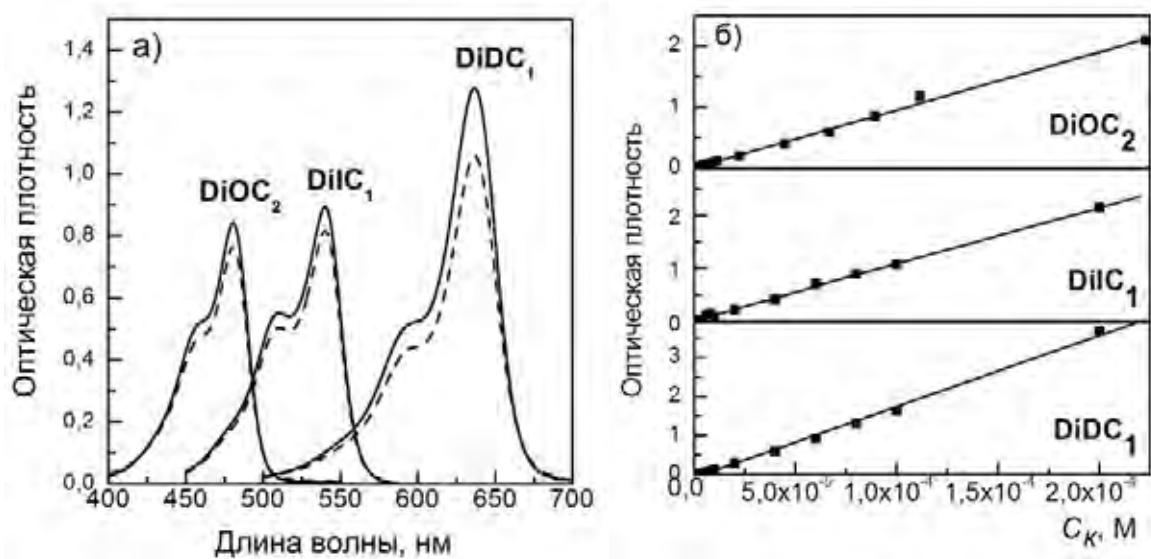


Рис.3.1. а) Спектры поглощения красителей в водных растворах без наночастиц (сплошные линии) и с наночастицами $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ (пунктирные линии); б) Изменение оптической плотности красителей, измеренной в максимуме полосы поглощения, при изменении их концентрации в растворе в интервале $1 \times 10^{-6} - 2 \times 10^{-4} \text{ М}$.

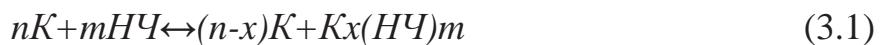
Адсорбция красителей на поверхности твердых тел, в том числе, на поверхности кристаллических порошков и коллоидных частиц, хорошо изученное явление [164]. Известно, что катионы основных красителей адсорбируются преимущественно «кислыми» адсорбентами с поверхностными отрицательно заряженными группами. Анионы кислотных красителей, наоборот, адсорбируются, главным образом, «основными» адсорбентами, поверхность которых несет избыточный положительный заряд. Для больших ионов красителей, для которых сильные ван-дер-ваальсовые взаимодействия и другие типы взаимодействия превалируют над электростатическим отталкиванием, адсорбция может происходить и на одноименно заряженной поверхности, при этом, при адсорбции, ионы красителей имеют склонность к агрегации [164].

Влияние адсорбции красителей на их спектры поглощения является важным параметром. Установлено, что вид и положение полос поглощения красителя претерпевают значительные изменения только в том случае, если при адсорбции происходит изменение структуры красителя за счет приема или отдачи протона (кислотно-основной тип взаимодействия), электрона (окислительно-восстановительный тип взаимодействий) или за счет изменения состояния дисперсности красителя, в частности, образование упорядоченной агрегированной формы красителя. Подобные изменения оптических характеристик, включая и люминесцентные свойства, характерны для взаимодействия красителей с наночастицами металлов (золота, серебра), оксидов металлов (оксид титана) [164-166]. В большинстве случаев наблюдается сравнительно небольшое смещение главного максимума полосы поглощения с некоторым изменением величины коэффициента поглощения, вызванное действием сильного электростатического поля на поверхности кристаллической решетки [164]. Взаимодействие коллоидных частиц с красителями может быть затруднено из-за наличия плотной гидратной или стабилизирующей оболочки, окружающей коллоидную частицу.

Как видно из структурных формул (рис.2.6), исследуемые красители являются солевыми и в полярных растворителях диссоциируют с образованием катиона и аниона, а имеющиеся углеводородные радикалы – $C_2H_5(DiOC_2)$, $-CH_3 (DiIC_1$ и $DiDC_1)$ не достаточно длинны, чтобы сообщить молекуле гидрофобные свойства. Благодаря такой структуре, все красители хорошо растворимы в воде. Более того, анализ спектров поглощения красителей в диапазоне концентраций от 1×10^{-6} до 2×10^{-4} М показывает, что закон Бугера–Ламберта–Берра выполняется, т.е. в этом диапазоне концентраций красители находятся в водных растворах в мономерной форме (рис.3.1б).

Отрицательный заряд на поверхности наночастиц $ReVO_4:Eu^{3+}$ ($Re = Y, La, Gd$) обусловлен потенциал-образующим слоем цитрат-иона (в случае НЧ $GdYVO_4:Eu^{3+}$) или ЭДТА (в случае НЧ $GdVO_4:Eu^{3+}$ и $LaVO_4:Eu^{3+}$). Поэтому силы кулоновского взаимодействия между катионами красителей и анионами на поверхности наночастицы должны способствовать адсорбции красителя из водных растворов. Действительно, при добавлении к водным растворам красителей $DiOC_2$, $DiIC_1$ или $DiDC_1$ наночастиц происходит уменьшение оптической плотности раствора, что говорит о взаимодействии красителя и наночастиц (рис.3.1а, пунктирные линии).

Процесс взаимодействия молекул красителя с НЧ в водном растворе может быть описан следующей равновесной реакцией:



где n и m – число молекул красителя (K) и наночастиц ($H\bar{C}$) в растворе, соответственно; x – количество красителя, связавшегося в комплексы с НЧ; $Kx(H\bar{C})m$ – комплекс НЧ/краситель.

Важным является определение состава образующегося комплекса $Kx(H\bar{C})m$, т.е. количества молекул красителя, взаимодействующих/сорбирующихся, на одной наночастице. Существуют методы, позволяющие определить адсорбционную способность наночастиц и параметры равновесия в уравнении (3.1). Эти методы основаны на построении сорбционной изотермы по изменению концентрации красителя в

жидкой фазе при варьировании его общей концентрации в растворе и постоянной концентрации адсорбента (наночастиц) [167,168]. Однако для расчета адсорбционной способности, которая измеряется в моль/г или мг/г, после установления равновесия в растворах, наночастицы, сорбировавшие определенное количество красителя, удаляются из раствора, и рассчитывается равновесная концентрация красителя в жидкой фазе (растворителе) [167,168]. Наночастицы, используемые в данной работе, имеют малые размеры (см. главу 2), и поэтому при центрифугировании растворов, невозможно добиться полного их отделения без существенных потерь.

Для определения сорбционной способности наночастиц $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Y}, \text{La}, \text{Gd}$) мы анализировали изменение оптической плотности растворов красителей DiOC_2 , DiIC_1 и DiDC_1 при изменении их концентрации от 1×10^{-6} до 2×10^{-4} М и постоянной концентрации наночастиц. Для этого снимали спектры поглощения двух параллельных серий растворов без наночастиц и с наночастицами. Во всем диапазоне концентраций красителей форма спектров поглощения красителей не претерпевала изменений (рис.3.1а, пунктирные линии), что свидетельствует о том, что красители не агрегируют на поверхности наночастиц. Кроме того, выбранная нами концентрация наночастиц не приводит к их коагуляции даже при больших концентрациях красителя в растворе.

На рис.3.2 представлена разница оптических плотностей водных растворов красителей без наночастиц (D_0) и с наночастицами (D_1) $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ сферической формы как функция изменения общей концентрации красителя. На полученных кривых можно выделить две области, особенно хорошо заметные для красителей DiOC_2 и DiIC_1 . В первой области, соответствующей концентрациям красителей $\sim 0 - 8 \times 10^{-5}$ М, наблюдается постепенное увеличение разницы оптических плотностей ($D_0 - D_1$), что свидетельствует об увеличении количества красителя, взаимодействующего/сорбирующегося на наночастицах. При дальнейшем

повышении концентрации красителя ($\sim 1 \times 10^{-4} - 2 \times 10^{-4}$ М) кривая изменения оптической плотности выходит на насыщение, увеличение общей концентрации красителя в растворе не приводит к изменению оптической плотности.

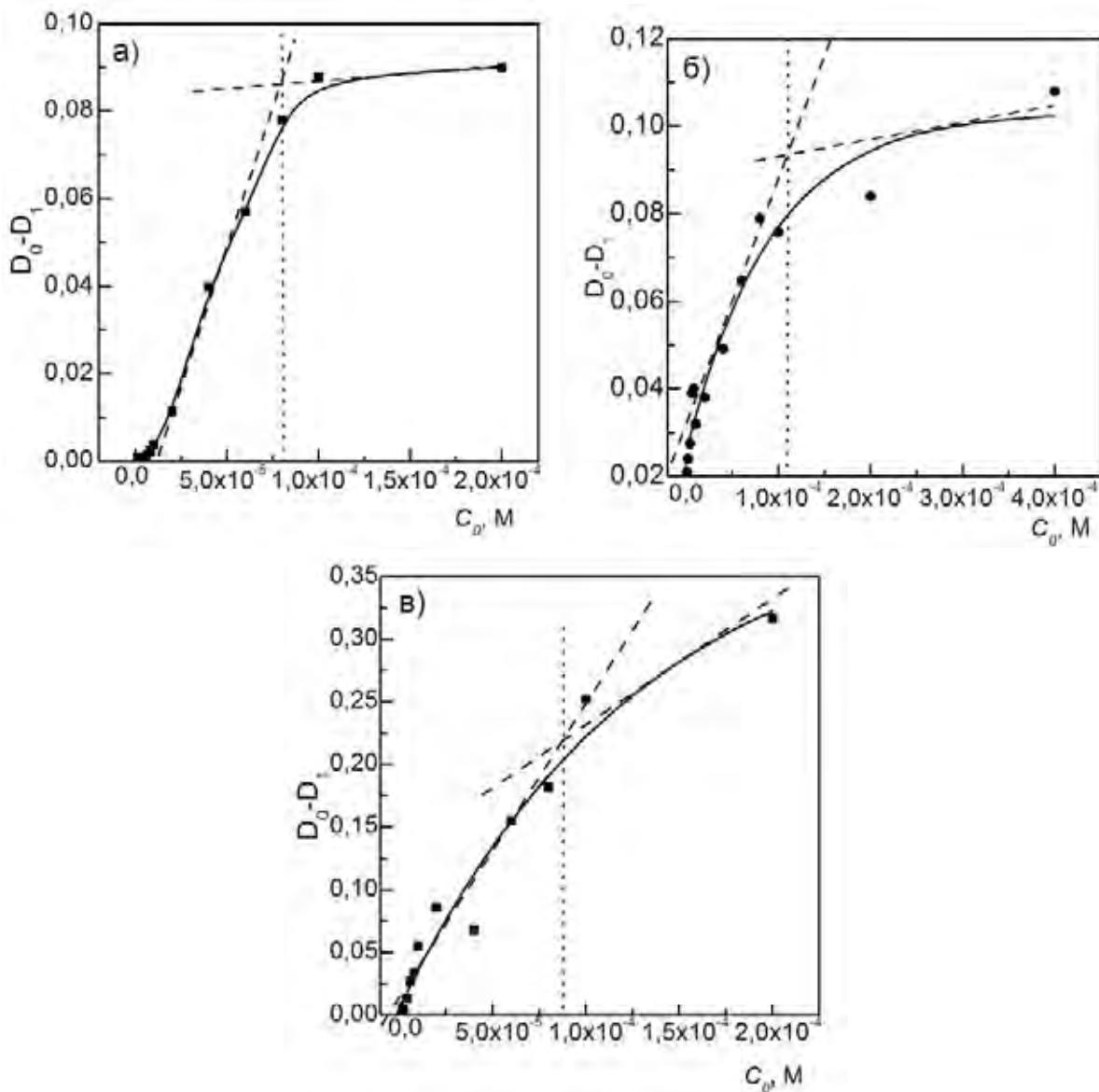


Рис.3.2. Разница оптических плотностей водных растворов красителей без наночастиц (D_0) и со сферическими наночастицами (D_1) $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ как функция изменения общей концентрации красителя C_0 для DiOC₂ (а); DiIC₁ (б) и DiDC₁ (в).

Такой вид кривой обусловлен постепенным насыщением поверхности наночастиц. С момента полного насыщения увеличение концентрации красителя в растворе уже не влияет на количество адсорбированного красителя и достигается, так называемая, адсорбция при полном насыщении поверхности. На рис.3.3 представлено схематическое изображение наночастицы с адсорбированными молекулами красителя.

Точка пересечения двух касательных, как показано на рис.3.2, даст общую концентрацию красителя в растворе C_0 , при которой связывание красителя с наночастицами максимально. Эти концентрации составляют порядка 8×10^{-5} М для DiOC₂, $1,1 \times 10^{-4}$ М для DiIC₁ и 9×10^{-5} М для DiDC₁. По разнице оптических плотностей растворов при найденных общих концентрациях красителей находим, что доля красителя, адсорбированного на наночастицах составляет, соответственно, 10, 8 и 14 %, что соответствует концентрациям связанных красителей $7,4 \times 10^{-6}$ М (DiOC₂), 1×10^{-5} М (DiIC₁) и $1,2 \times 10^{-5}$ М (DiDC₁), рис.3.2 [1-3].

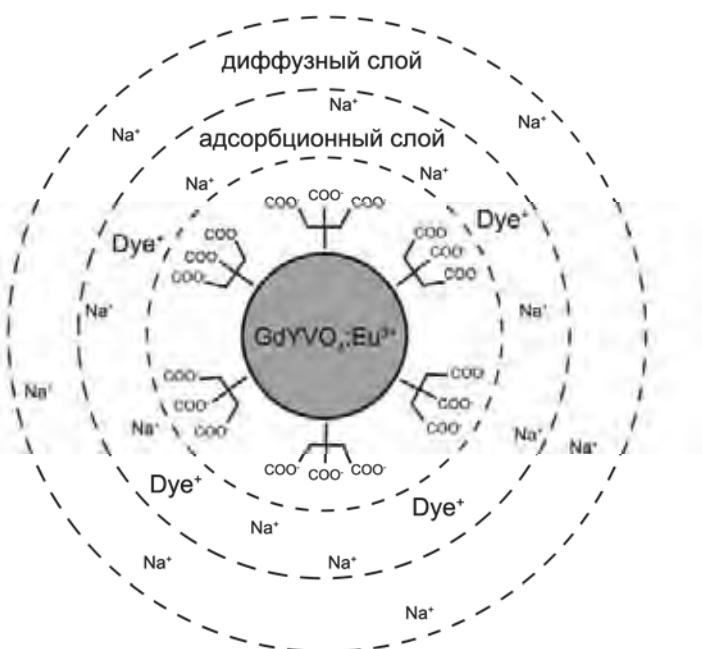


Рис.3.3. Схематическое представление адсорбции красителей на наночастицах GdYVO₄:Eu³⁺.

Характер взаимодействия красителей с зернообразными и стержнеобразными НЧ был таким же как и в случае сферических НЧ (рис.3.4 и 3.5).

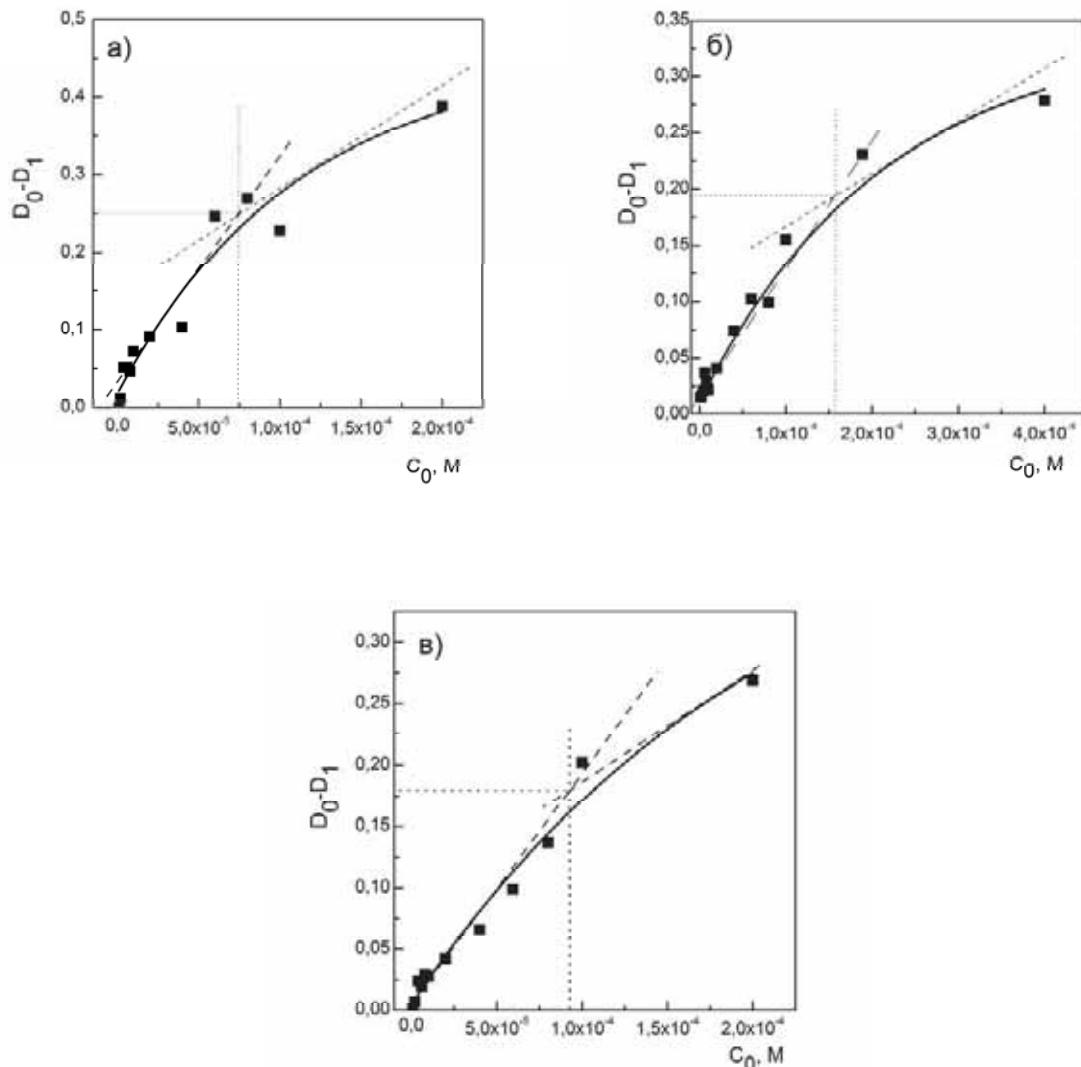


Рис.3.4. Разница оптических плотностей водных растворов красителей без наночастиц (D_0) и с зернообразными наночастицами (D_1) $GdVO_4:Eu^{3+}$ как функция изменения общей концентрации красителя C_0 для $DiOC_2$ (а); $DiIC_1$ (б) и $DiDC_1$ (в).

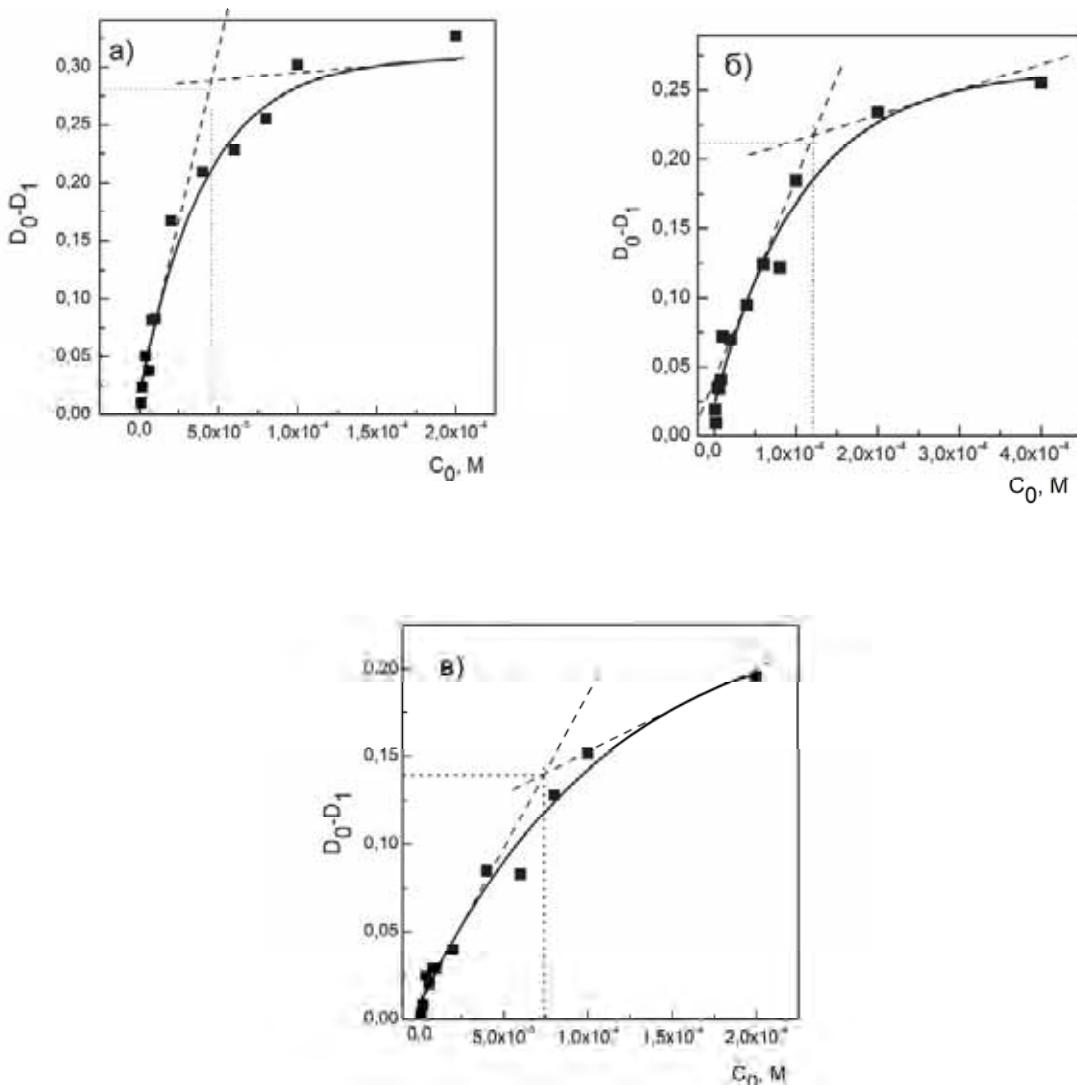


Рис.3.5. Разница оптических плотностей водных растворов красителей без наночастиц (D_0) и со стержнеобразными наночастицами (D_1) $\text{LnVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ как функция изменения общей концентрации красителя C_0 для DiOC_2 (а); DiIC_1 (б) и DiDC_1 (в).

Точки пересечения двух касательных, как показано на рис.3.4 и рис.3.5 дадут общую концентрацию красителя в растворе C_0 , при которой связывание красителей с зернообразными и стержнеобразными НЧ максимально. Эти концентрации составляют порядка $7,5 \times 10^{-5}$ М для DiOC_2 , $1,6 \times 10^{-4}$ М для DiIC_1 и $9,3 \times 10^{-5}$ М для DiDC_1 в случае зернообразных НЧ, и

$4,5 \times 10^{-5}$ М для DiOC₂, $1,2 \times 10^{-4}$ М для DiIC₁ и $7,4 \times 10^{-5}$ М для DiDC₁ в случае стержнеобразных НЧ. При этом доля красителя, адсорбированного на наночастицах составляет, соответственно, 5, 5 и 10%, что соответствует концентрациям связанных красителей 4×10^{-6} М (DiOC₂), 8×10^{-6} М (DiIC₁) и 1×10^{-5} М (DiDC₁) в случае зернообразных НЧ, и 10, 8 и 10%, что соответствует концентрациям связанных красителей $4,5 \times 10^{-6}$ М (DiOC₂), 1×10^{-5} М (DiIC₁) и $7,7 \times 10^{-6}$ М (DiDC₁) в случае стержнеобразных НЧ (рис.3.4 и 3.5).

Зная общую массу наночастиц, вводимых в растворы, 0,01 г (DiOC₂) и 0,005 г (DiIC₁ и (DiDC₁) и рассчитанные концентрации связанного красителя в растворе с разными НЧ, по соотношению (3.2) находим массу красителя, связанного/адсорбированного на НЧ (сорбционная способность НЧ):

$$C = \frac{m}{MV}, \quad (3.2)$$

где C – концентрации связанного красителя в растворе с НЧ, M – молярная масса красителя.

Полученные значения составили 0,61, 1,83, 2,4 мг/г DiOC₂, DiIC₁ и DiDC₁, соответственно (для сферических НЧ GdYVO₄:Eu³⁺); 0,33, 0,73, 0,97 мг/г (для зернообразных НЧ GdVO₄:Eu³⁺); 0,37, 0,92, 0,74 мг/г (для стержнеобразных НЧ LaVO₄:Eu³⁺), что коррелирует с рассчитанными площадями поверхности НЧ $S_{\text{пов}} = 1304 \text{ м}^2/\text{г}$ (GdYVO₄:Eu³⁺), $208 \text{ м}^2/\text{г}$ (GdVO₄:Eu³⁺) и $182 \text{ м}^2/\text{г}$ (LaVO₄:Eu³⁺). В соответствии с предполагаемой моделью (рис.3.3), адсорбция красителя происходит в стабилизирующем слое цитрат иона за счет электростатического притяжения между катионом красителя и цитрат-анионом.

3.2. Исследование формирования упорядоченных гибридных комплексов между агрегатами красителя JC-1 и его производных с наночастицами $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Y}, \text{Gd}, \text{La}$)

3.2.1. Спектральные проявления взаимодействия между красителем JC-1 и наночастицами в растворах. Спектральные свойства катионного карбоцианинового красителя JC-1 являются чувствительными к изменению параметров микроокружения (изменение pH раствора, добавления электролитов, и тому подобное) [169]. Поэтому нековалентное связывание JC-1 за счет сил электростатического и ван-дер-ваальсового взаимодействия с отрицательно заряженными (за счет модификации поверхности цитрат-ионами) НЧ приведет к изменению спектральных свойств красителя, прежде всего, его спектров поглощения.

В зависимости от концентрации красителя JC-1 в растворе можно наблюдать две полосы флуоресценции. При низких концентрациях или низких значениях pH раствора наблюдается флуоресценция мономерной формы красителя с максимумом порядка 530 нм. При повышении концентрации красителя в растворе, или повышении pH раствора до pH=7,5-8 наблюдается образование упорядоченных флуоресцирующих агрегатов красителя, так называемых, J-агрегатов, что сопровождается появлением новых полос в спектрах поглощения и флуоресценции, которые сдвинуты в длинноволновую часть спектра [4,5,169-172]. Именно благодаря этим свойствам (наличие двух хорошо разнесенных полос флуоресценции в зависимости от концентрации красителя) краситель JC-1 является очень эффективным зондом для определения мембранныго потенциала митохондрий, причем не только в биологических экспериментах, но уже и в медицинской диагностике [169-171].

На первом этапе исследования было важно изучить агрегационную способность красителя без наночастиц в растворе и определить концентрацию, при которой агрегация в растворе отсутствующая или

минимальная. Для этого исследовали спектры поглощения JC-1 в бинарном растворе ДМСО/водный буфер (1:9) при разных концентрациях красителя (рис. 3.6).

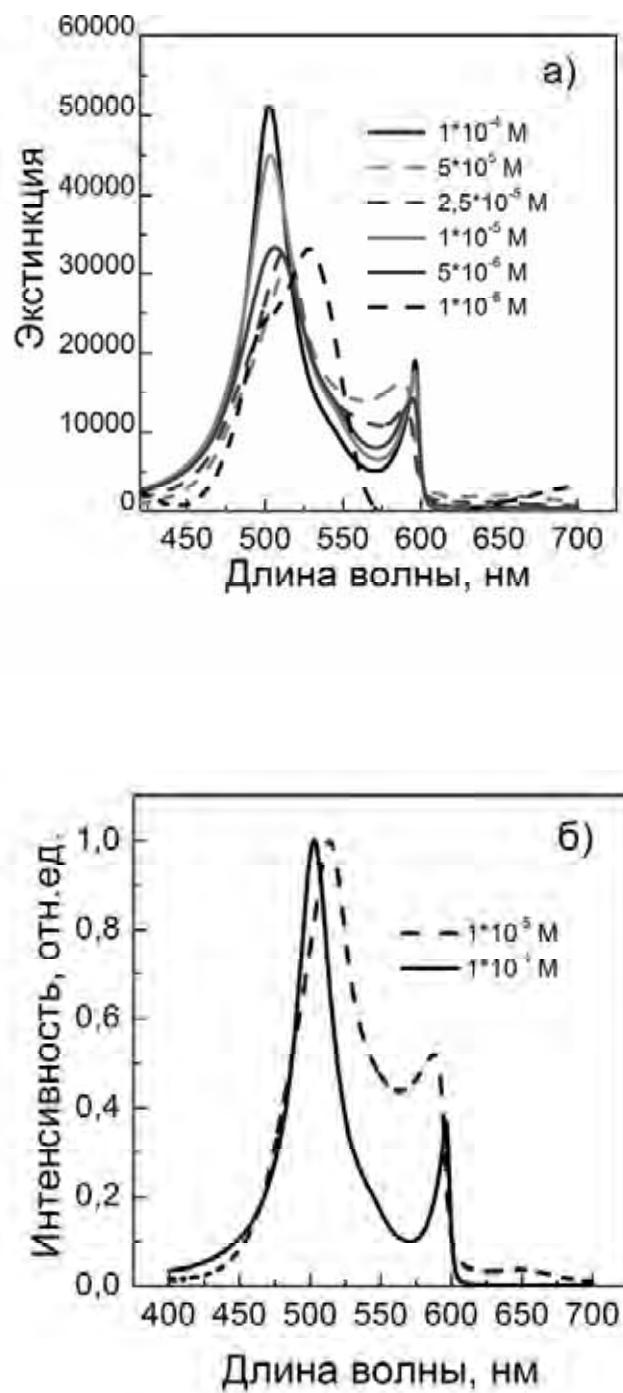


Рис. 3.6. Спектры поглощения JC-1 в бинарном растворе ДМСО/водный буфер (1:9) при разных концентрациях красителя.

Как видно из рис.3.6, уже при концентрации JC-1 5×10^{-6} М спектр поглощения красителя существенно трансформируется: появляется новая интенсивная и достаточно широкая полоса с $\lambda_{\max} = 585$ нм (так называемая J-полоса), смещенная в длинноволновую область относительно полосы мономеров $\lambda_{\max} = 528$ нм) (рис. 3.6а). Одновременно, в спектре поглощения появляется коротковолновая, так называемая, H-полоса ($\lambda_{\max} = 505$ нм), а полосы мономеров не наблюдается даже в форме перегиба в спектре (рис.3.6а). При увеличении концентрации красителя, J-полоса в спектре поглощения постепенно смещается в длинноволновую область до $\lambda_{\max} = 595$ нм и сужается (рис.3.6а). Интенсивность H-полосы также растет по мере увеличения концентрации.

Для наглядного представления наблюдаемых изменений, на рис.3.6б приведены нормированные спектры поглощения красителя JC-1 при минимальной (для образования агрегатов) и максимальной его концентрациях.

Возникновение H- или J- полос в спектрах поглощения, которое сопровождает агрегацию красителя в растворе, зависит от упаковки молекул в агрегате, их взаимной ориентации. Спектральное проявление взаимодействия молекул в агрегатах, что приводит к появлению H-, J- или обеих полос, объясняется в рамках модели молекулярных экситонов МакРея-Каши и, в более общем, Давыдовской модели на примере самого простого случая агрегата – димера [173-177].

Рассмотрим два предельных случая упаковки молекул в димере в зависимости от ориентации дипольных моментов их оптических переходов (рис.3.7). В случае образования димера «сэндвич» типа с дипольными моментами ориентированными параллельно («plane-to-plane» stacking, «head-to-head» transition moment arrangement) мы будем иметь диаграмму электронных уровней, приведенную на рис.3.7а. Для такого димера переход из состояния E(-) запрещен, поскольку разрешенными являются переходы, для которых дипольный момент перехода не равняется нулю [173,174].

Электронный переход $E(+)$ допускается, что отвечает гипсохромному сдвигу полосы поглощения димера относительно полосы поглощения мономера (H -полоса), рис.3.7а. H -агрегаты не выявляют флуоресценцию из-за быстрого перехода из $E(+)$ к нефлуоресцентному состоянию $E(-)$ [175].

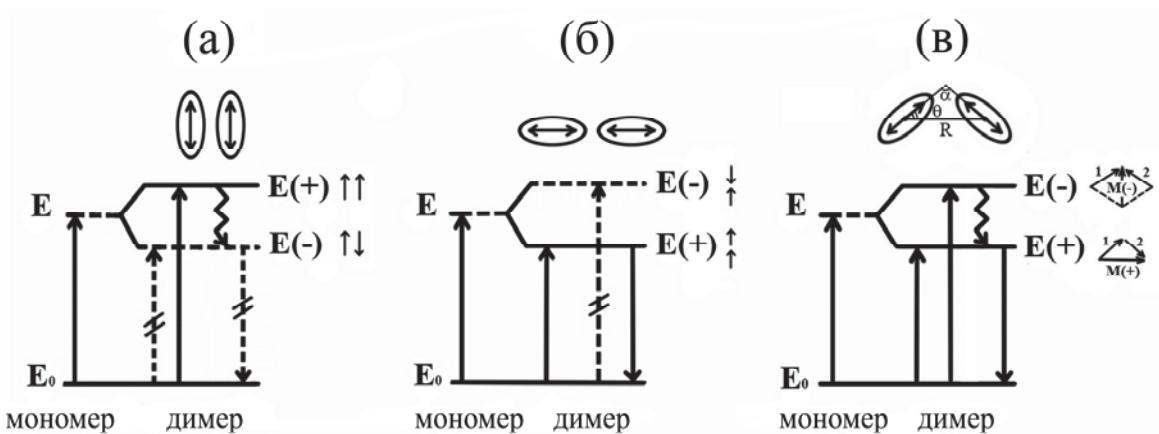


Рис. 3.7. Диаграмма энергетических уровней мономера и димера при разной относительной ориентации дипольных моментов оптических переходов в молекулах: а) параллельная ориентация, б) линейная ориентация («голова к хвосту»), в) дипольные моменты оптических переходов мономеров расположены под углом α друг к другу. Диполь-запрещенные переходы обозначены пунктирными линиями, и дипольных-разрешенные переходы сплошными линиями.

В случае линейного расположения молекулярных диполей электронных переходов по типу «голова к хвосту» («head-to-tail» transition dipole arrangement) состояние $E(+)$ имеет меньшую энергию, чем мономер, что приводит к образованию красной смещенной J -полосы (рис.3.7б). Рис.3.7а,б представляет два предельных случая расположения молекул в димере. В общем случае, для димера появление в спектрах поглощения H - или J -полос будет зависеть от угла θ , образованного осью молекулы и осью, которая

связывает центры молекул в димере. Когда $\theta = [54,7^\circ...90^\circ]$, формируются H-агрегаты, в то время как для $\theta = [0^\circ...54,7^\circ]$, образуются J-агрегаты [175,176].

Рассмотрим случай, когда дипольные моменты перехода M1 и M2 расположены под углом α друг к другу (рис.3.7в), то есть димер состоит из двух неэквивалентных молекул. Для такого расположения дипольных моментов разрешенными будут оба состояния E(-) и E(+). В этом случае в спектре поглощения появляются две полосы: коротковолновая H-полоса и длинноволновая J-полоса. Такая ситуация отвечает давыдовскому расщеплению уровней в кристаллах в случае двух неэквивалентных молекул в элементарной ячейки, так называемая геометрия «рыбья кость» («herringborn» structure) [173]. При образовании сложных агрегатов с двумя неэквивалентными молекулами в элементарной ячейке, основным структурным элементом будет многократно транслируемый димер. Соотношение интенсивности H- и J-полос определяется углом α (рис.3.7в).

В нашем исследовании было проанализировано влияние наночастиц с разным форм-фактором на агрегацию красителя в растворе. Концентрация JC-1 в экспериментах составляла 1×10^{-5} М. Это оптимальная концентрация для проведения измерений и одновременно обеспечивает минимальную агрегацию красителя в растворах. На рис.3.8 приведены спектры поглощения JC-1 в бинарном растворе ДМСО/водный буфер (1:9) при разных концентрациях сферических наночастиц GdYVO₄:Eu³⁺ диаметром 2 нм.

Как видно из рис.3.8, добавление сферических наночастиц в бинарный раствор красителя повышает его агрегацию. Увеличение концентрации наночастиц вызывает увеличение интенсивности как H- так и J- полосы. Отметим еще раз, что присутствие в спектре поглощения одновременно H- и J-полос свидетельствует о давыдовском расщеплении энергетических уровней молекулы за счет присутствия в элементарной ячейки агрегата двух неэквивалентных молекул, рис.3.7в [173-175].

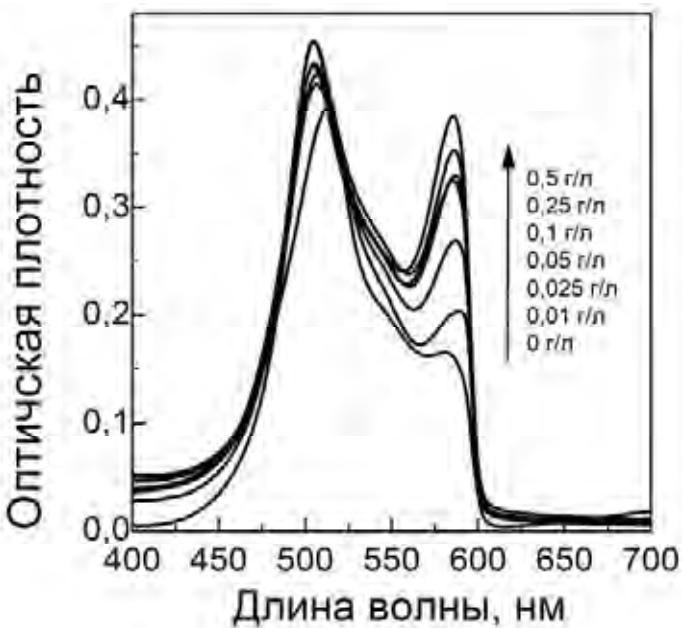


Рис. 3.8. Спектры поглощения JC-1 в бинарном растворе ДМСО/водный буфер (1:9) при разных концентрациях сферических наночастиц $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ диаметром 2 нм. $[\text{JC-1}] = 1 \times 10^{-5} \text{ М}$.

Такой же эффект наблюдается и для зернообразных и стержнеобразных типов НЧ. Однако относительная интенсивность полосы и значения полной ширины на половине максимума отличаются для наночастиц с различным форм-факторами (рис.3.9а).

Отметим, что в растворах с добавлением НЧ, в спектрах люминесценции наблюдается очень интенсивная J-полоса, интенсивность которой в растворах без НЧ низкая (рис.3.9б). Все это указывает на то, что краситель JC-1 взаимодействует с НЧ разного типа и процесс образования гибридного комплекса неорганическая НЧ/ органический краситель имеет место.

Геометрические параметры образующихся агрегатов в растворах при добавлении НЧ с разным форм-фактором, анализировали в рамках модели МакРея-Каши [173,176-178]. Для удобства, полосу мономеров (пунктирная

полоса) вычли из общего спектра поглощения (полоса из точек) красителя JC-1 (рис.3.10).

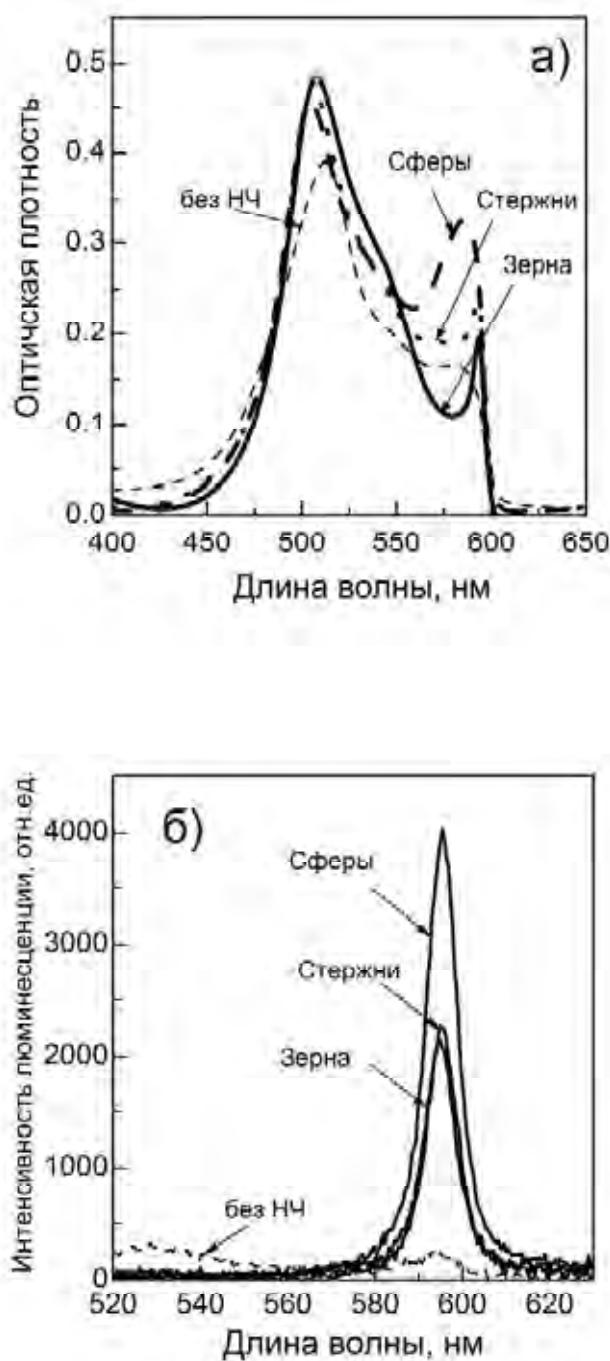


Рис.3.9. Спектры поглощения (а) и люминесценции (б) красителя JC-1 в бинарных растворах ДМСО/водный буфер (1:9), содержащие наночастицы. $[НЧ] = 0,5 \text{ г/л}$. $[JC-1] = 1 \times 10^{-5} \text{ М}$.

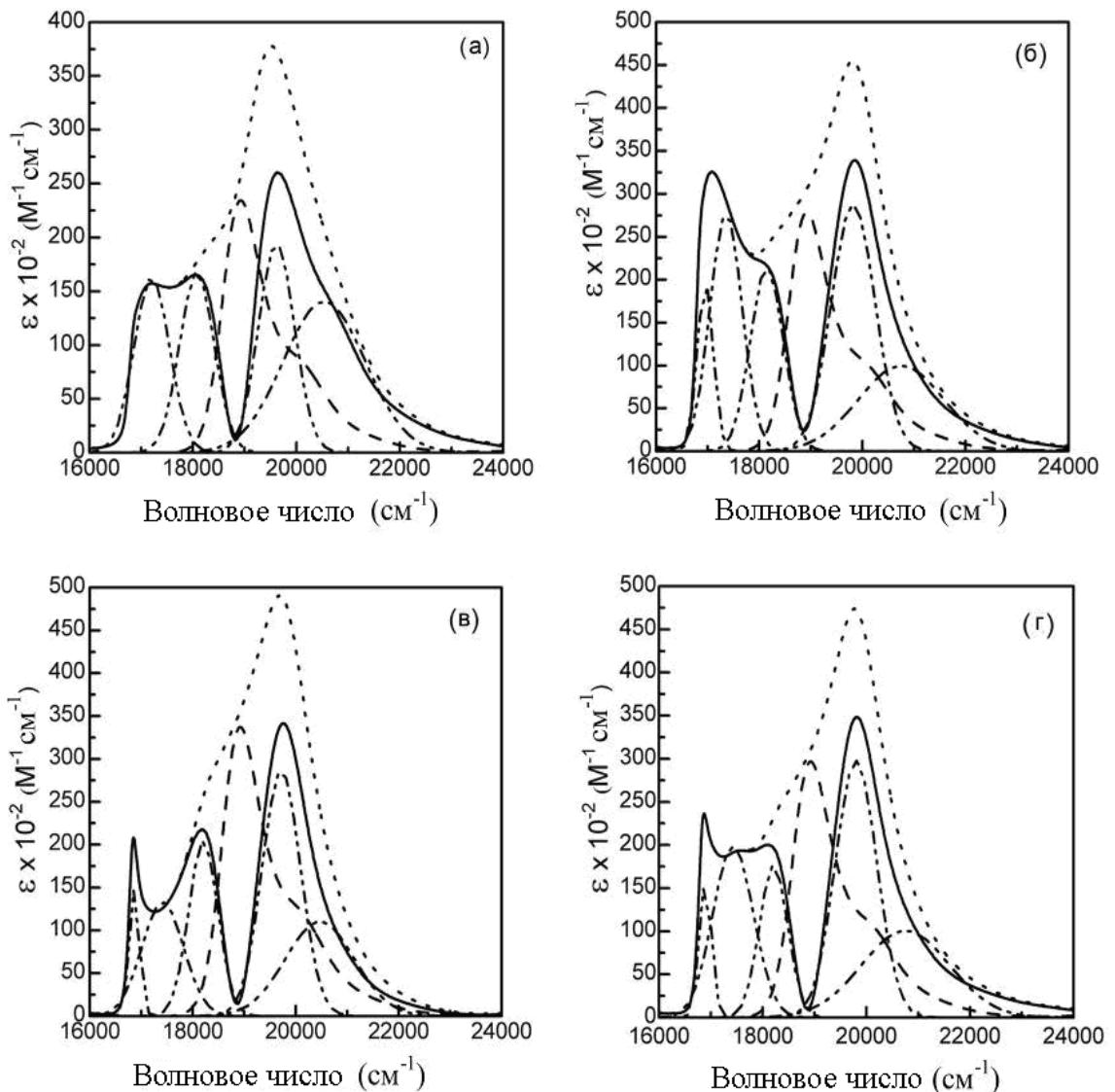


Рис.3.10. Спектры поглощения красителя JC-1 в растворах с различными ((а) – без НЧ; (б) – со сферическими НЧ; (в) – с зернообразными НЧ; (г) – со стержнеобразными НЧ;) наночастицами: суммарный спектр (полоса из точек), вписанный спектр мономеров (пунктирная полоса), полоса агрегатов (сплошная полоса), вписанные контуры Гаусса (штрих-пунктирные полосы).
 $[НЧ] = 0,5 \text{ г/л}$; $[JC-1] = 1 \times 10^{-5} \text{ М}$.

Как видно, даже в растворе без наночастиц (рис.3.10а) полученная сплошная полоса агрегата в спектре поглощения красителя состоит из четырех наложенных полос (двух коротковолновых и двух длинноволновых

штрих-пунктирных полос), что указывает на существование двух типов агрегатов структуры «рыбья кость» с разной длиной делокализации экситонов (скорее всего, димера и более протяжного агрегата).

В растворах, которые содержат НЧ (рис.3.10б,в,г) можно выделить еще одну длинноволновую полосу, которая, вероятно, отвечает образованию агрегатов J-типа. Как видно на сравнительном рисунке (рис.3.11), относительные интенсивности полос, составляющие спектр агрегата, отличаются для растворов, содержащих НЧ с разным форм-фактором. Наиболее значительные изменения в спектрах поглощения в присутствии наночастиц в растворах наблюдаются для сферических наночастиц.

Очевидно, что образующиеся в растворе комплексы наночастиц с полиметиновым красителем JC-1 являются упорядоченной системой в виде гибридных органико-неорганических комплексов.

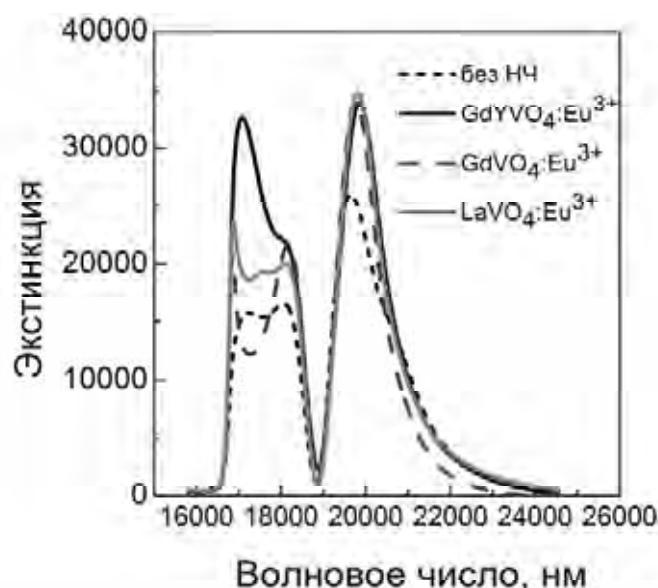


Рис.3.11. Спектры агрегатов, образующихся в бинарных растворах ДМСО/водный буфер (1:9), содержащие разные наночастицы. [НЧ] = 0,5 г/л. [JC-1]= 1×10^{-5} М.

Основываясь на данных оптической спектроскопии и применяя наклонную геометрию расположения молекул, которые образуют элементарную ячейку агрегатов (рис.3.12), можно рассчитать такие геометрические параметры агрегата как: энергия межмолекулярного взаимодействия (ΔE), угол наклона мономера к оси, которая проходит сквозь центры молекул (ϕ), угол между дипольными моментами перехода молекул (α) и расстояния между молекулами (R) (рис.3.12).

Угол между дипольными моментами перехода молекул в элементарной ячейке можно рассчитать как [179]:

$$\operatorname{tg}^2(\alpha / 2) = \frac{f_J}{f_H}, \quad (3.3)$$

где f_J та f_H – сила осциллятора перехода J- и H-полосы, соответственно, который может быть рассчитан согласно уравнению:

$$f = 1,3 \times 10^{-8} \frac{9n_0}{(n_0^2 + 2)^2} \int \varepsilon d\nu, \quad (3.4)$$

где $\int \varepsilon(\nu) d\nu$ – площадь соответствующей полосы, n_0 – коэффициент преломления среды, составляющий 1,333 для водных растворов.

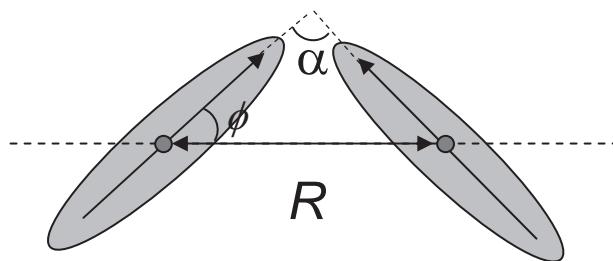


Рис.3.12. Модельное изображение расположения молекул, составляющих элементарную ячейку агрегатов.

В свою очередь, угол наклона молекулы мономера к оси, которая проходит сквозь центры молекул (ϕ) можно получить как:

$$\phi = \frac{180 - \alpha}{2} \quad (3.5)$$

Для димера наклонной геометрии корреляция между энергией межмолекулярного взаимодействия ΔE и расстоянием от центра к центру между хромофорами задается уравнением [176,177]:

$$\Delta E = \frac{2|\mu_m^2|}{R^3} (\cos \alpha + 3 \cos^2 \varphi) \quad (3.6)$$

Отсюда расстояние между центрами молекул в элементарной ячейке R (в Å) получаем как:

$$R = \sqrt[3]{\frac{2|\mu_m|^2 (\cos \alpha + 3 \sin^2 \frac{\alpha}{2})}{\Delta E \hbar c}}, \quad (3.7)$$

где \hbar – постоянная Планка, c – скорость света, μ_m – дипольный момент синглет-синглетного перехода в возбужденное состояние мономера, который может быть рассчитан как [176,177]:

$$|\mu| = \frac{f}{v} \cdot 2,12 \times 10^{-30}, \quad (3.8)$$

где v – максимум полосы поглощения (см^{-1}), f – сила осциллятора перехода.

Энергия межмолекулярного взаимодействия ΔE (см^{-1}) может быть получена из спектров поглощения JC-1 в бинарных растворах ДМСО/водный буфер (1:9) как разница между максимумами Н- и J-полос.

Также используя спектральные данные была оценена доля мономеров и агрегатов JC-1, которые образуются в растворах. Все рассчитанные параметры приведены в табл.3.1 и 3.2.

Как видно из табл.3.1, количественное соотношение мономерной и агрегированной формы красителя JC-1 при добавлении в раствор наночастиц разной формы и размера почти не изменяется. Но рассчитанные параметры агрегатов (табл.3.2) свидетельствуют о том, что в растворах с добавлением наночастиц происходит реорганизация структуры агрегатов обоих типов

(димеров и агрегатов), а именно, изменение углов α и φ и образование нового типа агрегатов – J-агрегатов. Эти изменения не значительно зависят от форм-фактора наночастиц и объясняются образованием сложных комплексов между наночастицами и красителем в растворах.

Таблица 3.1

Процентное соотношение доли мономеров, димеров и агрегатов JC-1 в растворах

	мономер	димер	агрегат	J-агрегат
Без НЧ	0,3	0,3	0,4	-
GdYVO ₄ :Eu ³⁺ , сферические	0,3	0,35	0,3	0,05
GdVO ₄ :Eu ³⁺ , Зернообразные	0,4	0,32	0,25	0,03
LaVO ₄ :Eu ³⁺ , стержнеобразные	0,33	0,32	0,31	0,04

Таблица 3.2

Параметры геометрии агрегатов JC-1 в растворах, которые содержат наночастицы разных типов

	димеры				агрегаты			
	ΔE , см ⁻¹	α	φ	R , Å	ΔE , см ⁻¹	α	φ	R , Å
Без НЧ	1539	85	48	5,35	3334	71	55	4,02
GdYVO ₄ :Eu ³⁺ , сферические	1675	74	53	5,1	3398	91	44	4,2
GdVO ₄ :Eu ³⁺ , зернообразные	1515	78	51	5,3	3054	81	49	4,25
LaVO ₄ :Eu ³⁺ , стержнеобразные	1539	65	58	5,1	3863	90	45	2,88

3.2.2. Особенности образования комплексов неорганическая НЧ/краситель JC-1/C4.

Краситель JC-1/C4 (рис.2.6) является производным красителя JC-1, и как и JC-1 склонен к агрегации в водных растворах. Поэтому сначала изучали агрегационную способность этого красителя в отсутствие НЧ (рис.3.13 а).

Для этого снимали спектры поглощения красителя в бинарном растворе ДМСО/водный буфер (1:9) при разных его концентрациях (рис. 3.13а).

Как видно из рис.3.13а, даже при незначительном увеличении концентрации JC-1/C4 в спектре поглощения появляется интенсивная и достаточно широкая J-полоса ($\lambda_{\max} = 585$ нм), смещенная в длинноволновую область относительно полосы мономеров ($\lambda_{\max} = 515$ нм). При увеличении концентрации красителя, J-полоса в спектре поглощения постепенно смещается в длинноволновую область до $\lambda_{\max} = 595$ нм и сужается. Возникновения же H-полосы в спектрах поглощения не наблюдается. То есть в растворах при увеличении концентрации красителя JC-1/C4 наблюдается его агрегация, при этом наличие в спектрах именно J-полосы указывает на упаковку молекул в агрегате по J-типу «голова к хвосту», рис.3.7б [173,174].

Для изучения взаимодействия красителя с НЧ, характеризующимися разным форм-фактором, использовали концентрацию красителя, при которой его агрегация минимальна ($[JC-1/C4]=1\times10^{-5}$ М). На рис.3.13б приведены спектры поглощения красителя JC-1/C4 в бинарных растворах ДМСО/водный буфер (1:9), содержащих стержнеобразные наночастицы в заданном диапазоне концентраций (0-0,5 г/л). Как видно на рис.3.13б, добавление наночастиц в бинарный раствор красителя усиливает его агрегацию. Увеличение концентрации наночастиц вызывает увеличение относительной интенсивности J-полосы. Такие же изменения спектра поглощения наблюдаются и при добавлении в бинарный раствор ДМСО/водный буфер (1:9) наночастиц сферической и зернообразной формы (рис.3.14).

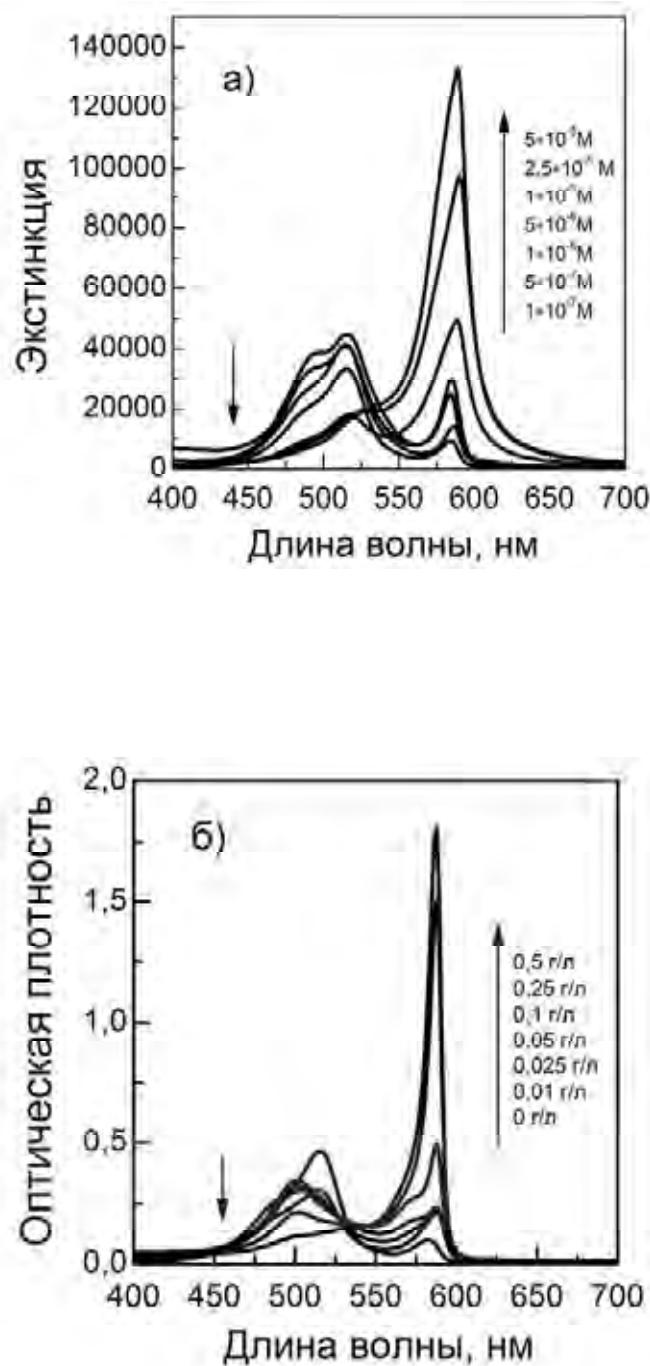


Рис.3.13. Спектры поглощения красителя JC-1/C4 в бинарных растворах ДМСО/водный буфер (1:9): (а) без НЧ с концентрацией красителя 1×10^{-7} – 5×10^{-5} М; (б) в растворах, содержащих стержнеобразные наночастицы, [НЧ] = 0–0,5 г/л; [JC-1/C4]= 1×10^{-5} М.

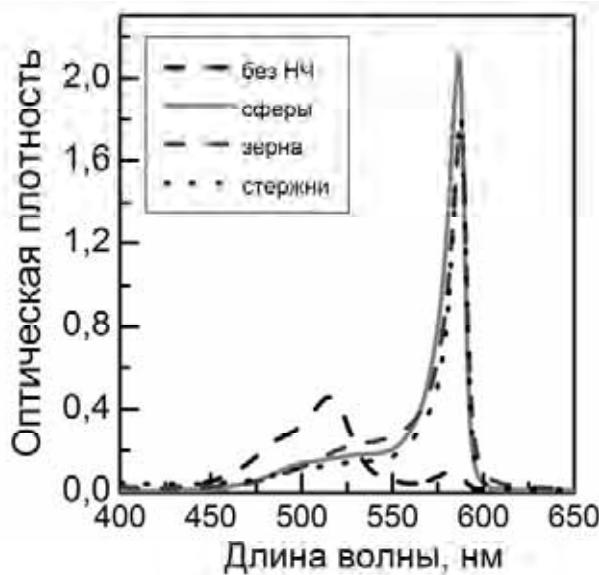


Рис.3.14. Спектры поглощения красителя JC-1/C4 в бинарных растворах ДМСО/водный буфер (1:9), содержащие разные наночастицы. [НЧ] = 0,5 г/л; [JC-1/C4]= 1×10^{-5} М.

То есть, можно сделать вывод, что в бинарных растворах ДМСО/водный буфер (1:9) при добавлении НЧ наблюдается образование сложных гибридных комплексов неорганические НЧ/молекулы красителя JC-1/4C, которое приводит к усилению агрегации красителя (увеличение доли агрегатов по отношению к раствору без НЧ, 80 и 10% соответственно) и упорядочения его структуры (сужение J-полосы).

Были рассчитаны такие геометрические параметры J-агрегатов как угол наклона к оси агрегата φ и расстояние между молекулами в агрегате R (рис.3.15).

В случае, когда переход в нижнее или верхнее расщепленное возбужденное состояние является запрещенным (рис.3.7), то есть в случае, если наблюдается только только H- или J-полоса, угол наклона молекул к

оси, которая проходит через центр масс молекул в агрегате может быть рассчитан по следующей формуле [176,177]:

$$\mu^* = \sqrt{N} \mu_m \cos \varphi \quad (3.9)$$

где μ_m и μ^* – дипольные моменты синглет-синглетного перехода в возбужденное состояние мономера из нижнего или высшего экситонного состояния, соответственно; N – число молекул мономера в агрегате.

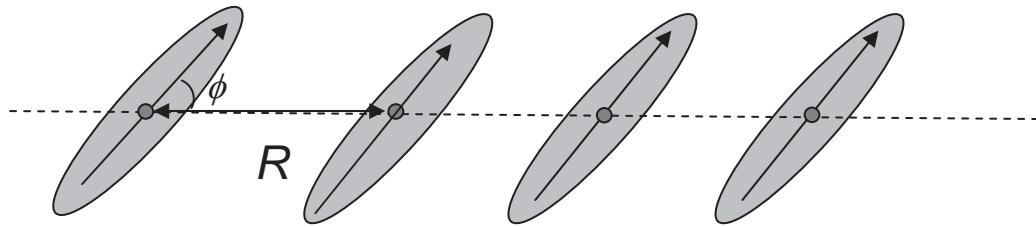


Рис.3.15. Схематическое изображение структуры J-агрегата.

Дипольные моменты μ_m и μ^* могут быть рассчитаны, используя спектроскопические данные и уравнения (3.4) и (3.8). В расчетах приняли $N=2$, то есть рассмотрели случай димера.

Для того, чтобы рассчитать расстояние между молекулами R в агрегате, уравнение (3.6), записывается для данной геометрии как [176,177]:

$$E = \frac{|\mu_m^2|}{R^3} (1 - 3 \cos^2 \varphi), \quad (3.10)$$

где E – энергия межмолекулярного взаимодействия (см^{-1}), в данном случае разница между максимумом поглощения полосы мономеров и J-полосой.

Таким образом, рассчитан угол наклона молекулы $\varphi = 37^\circ$, расстояние между молекулами в агрегате $R=2 \text{ \AA}$ для всех типов наночастиц.

3.2.3. Особенности взаимодействия НЧ с красителем JC-1/C18.
Краситель JC-1/C18 (рис.2.6) является производным красителя JC-1,

обладающим длинными углеводородными радикалами, не склонным к агрегации в бинарном растворе ДМСО/водный буфер (рис.3.16, сплошная полоса) в исследуемом концентрационном ряду, в отличие от водного раствора, где он образует агрегаты Н-типа (рис.3.16, пунктирная полоса).

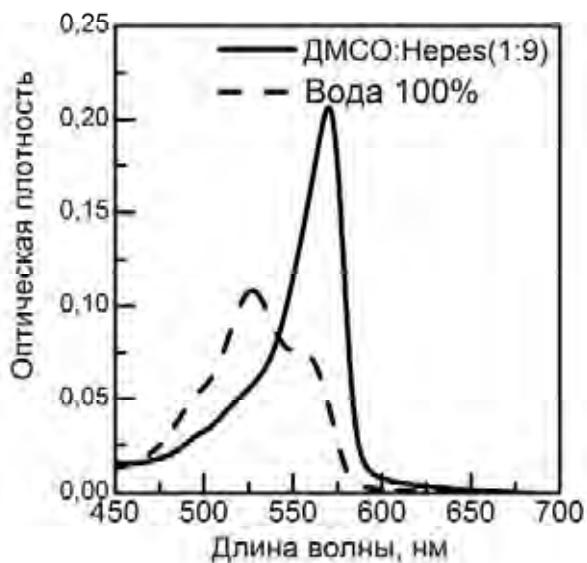


Рис.3.16. Спектры поглощения JC-1/C18 в бинарном растворе ДМСО/водный буфер (1:9) (сплошная полоса) и в водном растворе (пунктирная полоса).

Добавление в бинарный раствор наночастиц с разным форм-фактором и разной концентрацией (0,01-0,5 г/л) не приводило к существенному изменению формы спектра поглощения красителя JC-1/C18, или появлению в спектрах новых полос, то есть к агрегации красителя (рис.3.17а,б). Наблюдалось лишь уменьшение оптической плотности раствора и коротковолновый сдвиг максимума полосы поглощения (приблизительно на 3 нм), подобно катионным красителям семейства полиметинов, которые исследовались раньше (см. п.3.1), и объясняется образованием комплексов между неорганическими наночастицами и молекулами органического

красителя за счет адсорбции мономеров молекул в приповерхностном слое НЧ [1].

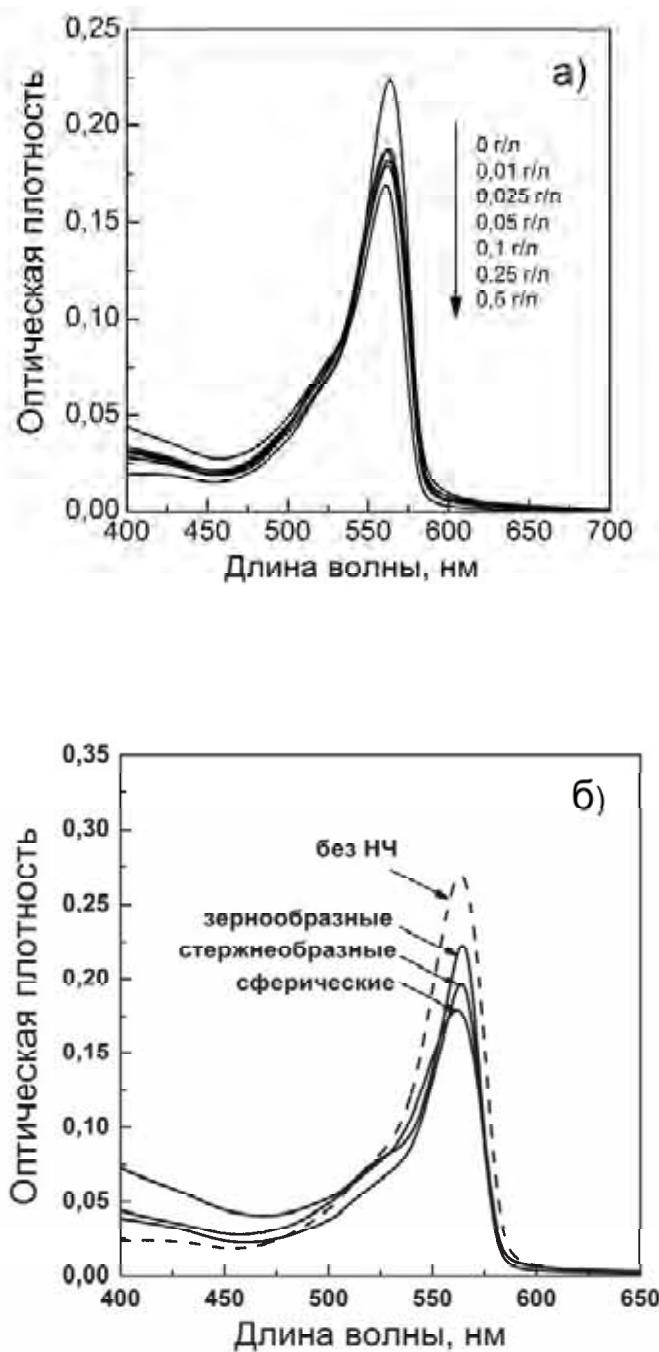


Рис.3.17. Спектры поглощения JC-1/C18 в бинарном растворе ДМСО/водный буфер (1:9): (а) при разных концентрациях сферических наночастиц GdYVO₄:Eu³⁺ диаметром 2 нм; (б) в растворах, содержащие разные наночастицы, [НЧ] = 0,5 г/л, [JC-1]= 1×10^{-5} М.

3.2.4. Исследование взаимодействия НЧ с молекулами красителя JC-1/C3S. Краситель JC-1/C3S (рис.2.6) является анионным производным красителя JC-1, потому можно допустить, что электростатические силы отталкивания не будут способствовать взаимодействию между анионной (за счет стабилизации цитрат-ионом) неорганической наночастицей и органическим красителем. Прежде всего, изучали влияние концентрации красителя в бинарном растворе ДМСО/водный буфер (1:9) на спектры поглощения, для того, чтобы установить агрегационную способность этого производного в исследуемых растворах. Как видно из рис.3.18а, при низких концентрациях JC-1/C3S в бинарном растворе ДМСО/водный буфер (1:9) в спектре поглощения присутствует только полоса мономеров ($\lambda_{\max} = 515$ нм). При увеличении концентрации красителя появляется интенсивная и достаточно широкая J-полоса ($\lambda_{\max} = 595$ нм), смещенная в длинноволновую область относительно полосы мономеров. Возникновение Н-полосы в спектрах поглощения, как и в случае красителя JC-1/C4, не наблюдается, то есть молекулярные диполи электронных переходов ориентированы по типу «голова к хвосту» («head-to-tail» transition dipole arrangement), рис.3.7б [173,174].

Для изучения взаимодействия красителя с НЧ разного типа брали наибольшую концентрацию красителя, при которой его агрегации еще не наблюдается. На рис.3.18 б приведены спектры поглощения красителя JC-1/C3S в бинарных растворах ДМСО/водный буфер (1:9) содержащие сферические наночастицы в заданном диапазоне концентраций (0-0,5 г/л). Как видно из рис.3.18 б, добавление наночастиц в бинарный раствор красителя не приводит к возникновению новых полос. Кроме того, не происходит и падение интенсивности полос поглощения красителя при увеличении концентрации НЧ, независимо от их форм-фактора. Даже при максимальной концентрации НЧ никаких изменений в спектрах поглощения не наблюдается (рис.3.18 б).

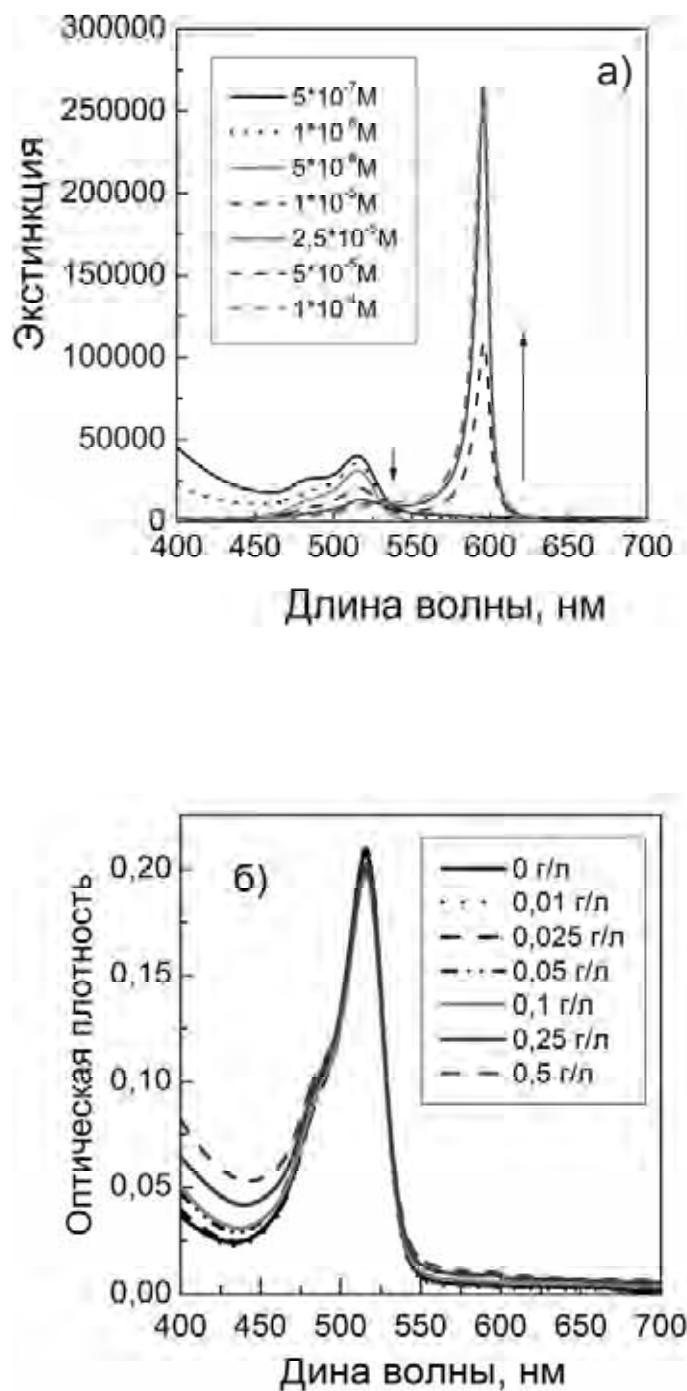


Рис.3.18. Спектры поглощения JC-1/C3S в бинарном растворе ДМСО/водный буфер (1:9): (а) при разных концентрациях красителя без НЧ; (б) при разных концентрациях сферических наночастиц $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$.

Все это свидетельствует о том, что краситель JC-1/C3S не взаимодействует с НЧ не зависимо от их формы и размера, что подтверждает ключевую роль электростатических взаимодействий в образовании гибридных комплексов неорганическая НЧ/органические молекулы [5].

Таким образом, основываясь на анализе полученного экспериментального материала, можно сделать вывод, что в бинарном растворе ДМСО/водный буфер (1:9) между молекулами катионных красителей JC-1 и JC-1/C4 и НЧ ортованадатов РЗ элементов сферической, зернообразной и стержнеобразной формы наблюдается образование сложных гибридных комплексов, в которых агрегаты красителей (Н- или J-типа, в зависимости от красителя) и наночастицы формируют сложные комплексы, что подтверждается полученным ПЭМ-изображением комплексов (рис.3.19). Размер и форма наночастиц существенно не влияет на формирование гибридных комплексов, поскольку формируются ансамбли между несколькими наночастицами и агрегатами красителей.

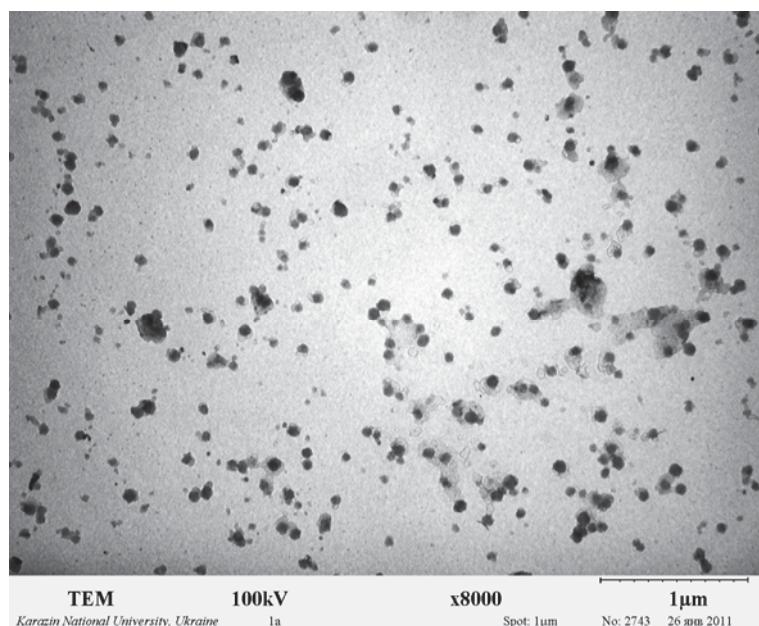


Рис.3.19. ПЭМ-изображение гибридных комплексов неорганическая НЧ/органические молекулы.

Краситель JC-1/C18 и НЧ также образуют в бинарном растворе ДМСО/водный буфер (1:9) сложные гибридные комплексы, но молекулы красителя сорбируются на поверхности НЧ в мономерной форме, аналогично к красителям семейства полиметинов [1-3].

3.2.5. Взаимодействие комплексов сферические НЧ/агрегаты JC-1 с клетками гепатоцитов. В работе [180], выполненной в нашем отделе, было показано, что сферические НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$, могут избирательно накапливаться в ядрах гепатоцитов крыс (рис.3.20а), что является перспективным для их использования в качестве наноплатформы для доставки различных органических молекул в ядро клетки, например молекул фотосенсибилизаторов в такой области как ФДТ. В диссертационной работе была проанализирована такая возможность на примере комплексов сферические НЧ/агрегаты красителя JC-1 [4].

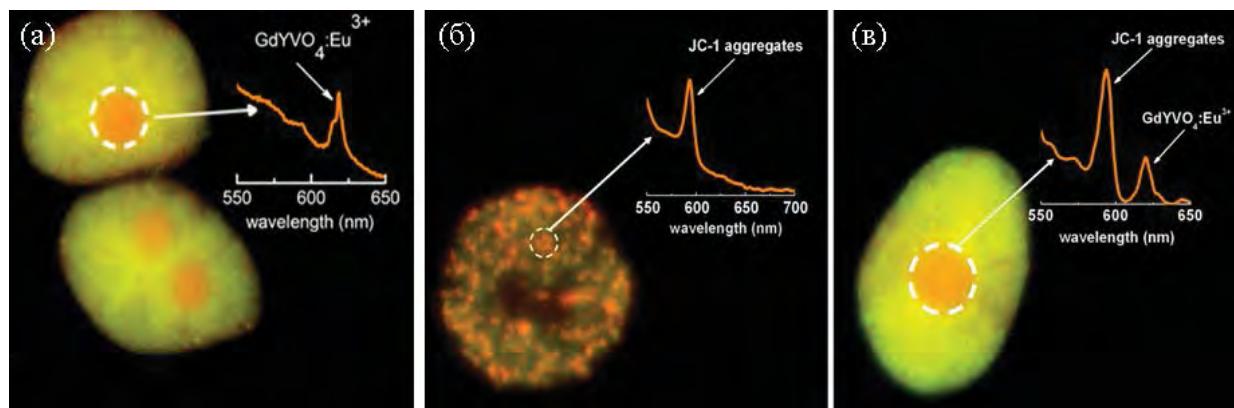


Рис.3.20. Флуоресцентные изображения клеток гепатоцитов крыс: (а) при инкубации с НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$, (б) инкубации с красителем JC-1, (в) при совместном инкубировании клеток с комплексами НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ /JC-1.

Известно, что краситель JC-1 обладает способностью накапливаться в митохондриях клеток с образованием флуоресцирующих агрегатов, что можно детектировать по появлению характерной полосы флуоресценции в спектрах, снятых с области митохондрий, рис.3.20б. Однако совместное

инкубирование клеток с комплексами НЧ/JC-1 показывает, что в данном случае, аккумуляция красителя наблюдается преимущественно в ядре клетки (рис.3.20в), что видно по спектрам флуоресценции, снятым с области ядра, что подтверждает эффективность этих НЧ как наноносителей для транспортировки липофильных органических молекул в живую клетку.

Выводы к разделу 3

Таким образом, суммируя весь представленный в данном разделе экспериментальный материал, можно сделать следующие выводы:

1. Показано, 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 также, в зависимости от свойств красителей, их упорядоченная агрегация и образование сложных комплексов неорганические НЧ/органические молекулы. Предложена модель образующихся комплексов.
2. По разработанной методике рассчитана сорбционная способность НЧ по отношению к гидрофильным красителям, которая составляет в среднем 1,6 мг/г для сферических НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$, 0,7 мг/г для зернообразных НЧ $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ и стержнеобразных НЧ $\text{LaVO}_4:\text{Eu}^{3+}$, что коррелирует с рассчитанной удельной площадью поверхности наночастиц с разным форм-фактором.
3. Неорганические наночастицы выступают в роли своеобразных «шаблонов» для образования агрегатов красителя, а степень упорядоченности молекул в агрегате может управляться форм-фактором НЧ.
4. Показано, что анионные красители с НЧ не взаимодействуют, что подтверждает ключевую роль электростатических взаимодействий при формировании комплексов НЧ/краситель.

5. Продемонстрирован транспорт агрегатов красителя JC-1 в ядра гепатоцитов крыс с помощью сферических НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$, вместо характерного аккумулирования красителя в митохондриях клеток, что подтверждает эффективность этих НЧ как наноносителей для транспортировки липофильных органических молекул в живую клетку.

Основные научные результаты, приведенные в разделе 3, опубликованы в [1-8].

РАЗДЕЛ 4

ИССЛЕДОВАНИЕ КИНЕТИЧЕСКОЙ И ТЕРМОДИНАМИЧЕСКОЙ СТАБИЛЬНОСТИ КОМПЛЕКСОВ НК/КРАСИТЕЛЬ НА ОСНОВЕ ОРГАНИЧЕСКИХ И НЕОРГАНИЧЕСКИХ НАНОКОНТЕЙНЕРОВ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА РАТИОМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ

При анализе возможности использования неорганических наночастиц на основе нанокристаллов ванадатов РЗ элементов и диоксида церия в качестве наноразмерной платформы, на которой сорбируется активное вещество для создания нового типа «нанолекарств», важным вопросом является выяснение стабильности комплексов НЧ/активное вещество (в нашем случае, краситель) в сравнении с такими, уже используемыми, наноконтейнерами, как липосомы и мицеллы. Ниже, говоря для единообразия о неорганических наноконтейнерах, будем иметь ввиду комплексы – агломераты НЧ и молекул органических красителей (рис.2.12), механизмы образования которых детально рассмотрены выше (см. раздел 3).

При исследовании комплексов НК/краситель, их стабильность принято рассматривать в терминах термодинамической и кинетической стабильности [181,182]. Термодинамическая стабильность описывает энергетические параметры системы, с помощью таких параметров как константа комплексообразования, свободная энергия Гиббса (ΔG^0), энталпия (ΔH^0) и энтропия (ΔS^0) процесса комплексообразования. Кинетическая стабильность описывает поведение системы во времени и под действием различных факторов, которые могут привести к разрушению комплекса. Определяемым параметром является скорость процесса разрушения комплекса и энергия, которую необходимо затратить для того чтобы процесс разрушения имел место (так называемая энергия активации, E_a) [181,182].

Кинетическая стабильность комплексов НК/краситель оценивалась по динамике обмена гидрофобными молекулами красителей между

наноконтейнерами, используя явление безызлучательного переноса энергии электронного возбуждения [143].

В работе использовали FRET-пару гидрофобных красителей DiOC_{18} (донор энергии электронного возбуждения) и DiIC_{18} (акцептор энергии электронного возбуждения) (рис.4.1).

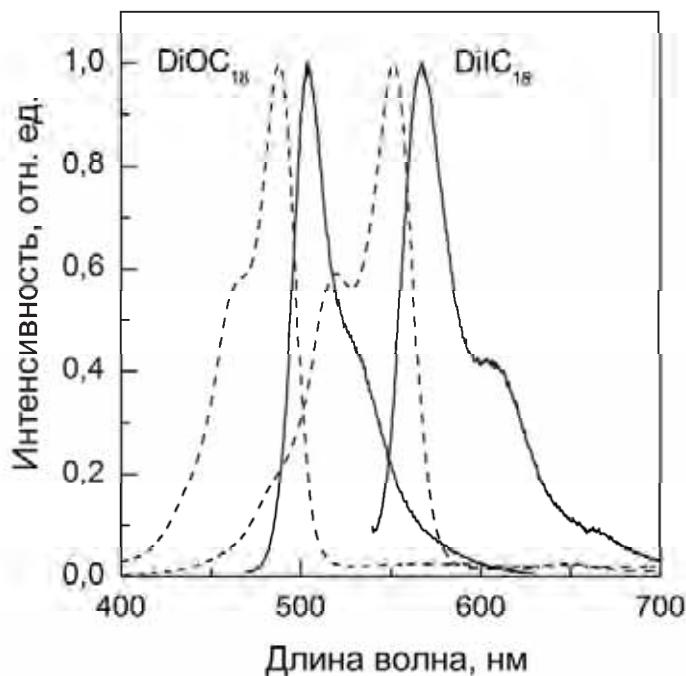


Рис.4.1. Спектры поглощения (пунктирные линии) и флуоресценции (сплошные линии) красителей DiOC_{18} и DiIC_{18} в этаноле.

Схема эксперимента была следующей. Донор и акцептор «загружались» независимо в определенный тип наноконтейнера (мицеллы ДСН, липосомы ФХ или НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$). Затем растворы, содержащие комплексы НК/ DiOC_{18} и НК/ DiIC_{18} , смешивались и термостатировались при постоянной температуре (293 К, 303 К, 313 К, 323 К или 333 К) в течение длительного времени. Через определенные промежутки времени снимались спектры флуоресценции анализируемого раствора. Были возможны два предельных случая (рис.4.2). Если в течение анализируемого интервала времени наноконтейнеры не разрушаются, оба красителя продолжают находиться в

двух разных наноконтейнерах. В таком случае, при возбуждении в полосу поглощения донора флуоресценция акцептора за счет FRET не наблюдается, так как расстояние между двумя молекулами донора и акцептора значительно больше, чем фёрстеровский радиус переноса для этой пары (порядка 50 Å) [143,183] (метод ратиометрической детекции).

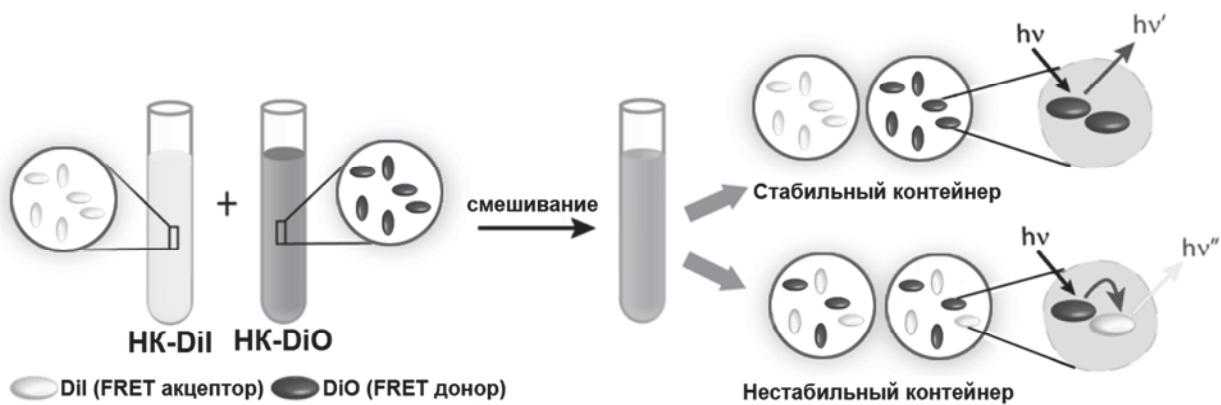


Рис.4.2. Схематическое представление эксперимента [9].

Отметим, что вероятность обмена красителя с окружающей средой без нарушения целостности наноконтейнера в случае мицелл и липосом пренебрежимо мала вследствие гидрофобности молекул – наличия у них жирных углеводородных радикалов $C_{18}H_{37}$ (рис.2.6), надежно фиксирующих их в гидрофобной среде [161,183]. В случае комплексов, где в качестве НК выступают неорганические наночастицы, поскольку их оптические свойства остаются неизменными в течение долгого периода времени (месяц и более), также можно предположить надежное связывание гидрофобного красителя в комплексе. Отметим также, что липосомы и мицеллы являются молекулярными ансамблями, образованными по принципу самосборки. Известно, что мицеллы ПАВ характеризуются определенным временем жизни, для мицелл ДСН это время составляет порядка 1 мкс, после чего мицелла может разбираться и собираться заново [184]. Липосомы обладают подвижным (лабильным) бислоем и для них характерно такое явление, как

переход молекул липида из слоя в слой (флип-флоп), а также слияние бислоев [185]. Все описанные явления должны приводить к перераспределению с разной эффективностью молекул красителей между наноконтейнерами, что будет приводить к трансформации спектров флуоресценции (возникновение FRET сигнала) вследствие образования новых комплексов состава наноконтейнер/(DiOC₁₈+DiIC₁₈) (рис.4.2).

Таким образом, отслеживая перераспределение во времени относительной интенсивности флуоресценции донора и акцептора в таких системах, можно получить представление о динамике перераспределения инкорпорированных молекул и о стабильности наноносителей в целом.

В эксперименте анализировали долю флуоресценции донора DiOC₁₈ в общем сигнале флуоресценции $I_{DiO} / (I_{DiO} + I_{DiI})$, где I_{DiO} и I_{DiI} – интенсивность флуоресценции, измеренная в максимуме флуоресценции DiOC₁₈ и DiIC₁₈, соответственно, при возбуждении в полосе поглощения донора DiOC₁₈ (метод ратиометрической детекции) [145,181,182,186,187].

4.1. Кинетическая стабильность комплексов НК/краситель

Согласно определению кинетической стабильности, стабильным является вещество (в нашем случае комплекс НК/краситель), энергия активации распада которого достаточно велика [188]. На рис.4.3 приведено изменение во времени доли флуоресценции донора DiOC₁₈ в общем сигнале флуоресценции $I_{DiO} / (I_{DiO} + I_{DiI})$ для всех исследуемых комплексов, что отображает динамику распада комплексов типа НК/DiOC₁₈ и НК/DiIC₁₈ с образованием новых комплексов типа НК/(DiOC₁₈+DiIC₁₈).

Как видно из рис.4.3, при комнатной температуре (293 K), для всех исследованных комплексов изменение величины $I_{DiO} / (I_{DiO} + I_{DiI})$ крайне незначительно вплоть до 100 часов наблюдения.

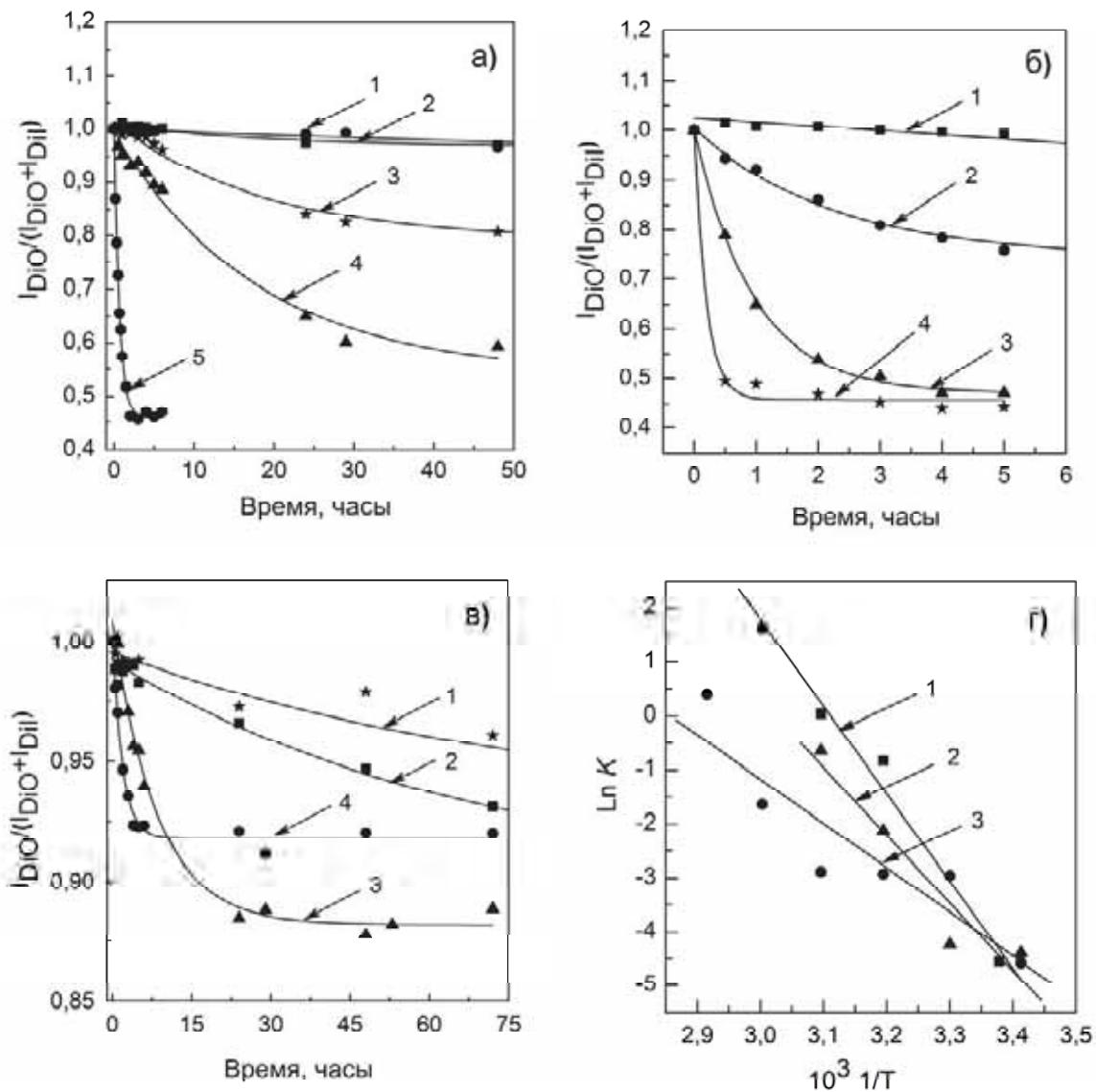


Рис.4.3. Изменение во времени доли флуоресценции донора $I_{Dio} / (I_{Dio} + I_{Dil})$ в общем сигнале флуоресценции при различных температурах для: а) мицелл ДСН (1 – 293°К; 2 – 303°К; 3 – 313°К; 4 – 323°К; 5 – 343°К), б) липосом ФХ (1 – 293°К; 2 – 313°К; 3 – 323°К; 4 – 333°К), в) НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ (1 – 293°К; 2 – 303°К; 3 – 313°К; 4 – 323°К); г) температурная зависимость константы скорости реакции в аррениусовских координатах: 1 – ФХ липосомы, 2 – НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$, 3 – мицеллы ДСН.

В случае мицелл ДСН доля флуоресценции донора в общем сигнале флуоресценции $I_{Dio} / (I_{Dio} + I_{Dil})$ за 100 часов наблюдения изменилось от 1

до 0,95 (рис.4.3а), т.е. перераспределение красителей между мицеллами практически не происходит. Подобное наблюдение является довольно неожиданным, поскольку согласно общепринятым представлениям [184], время жизни мицелл ДСН при комнатной температуре лежит в диапазоне микросекунд, т.е. мы должны были наблюдать мгновенное перераспределение молекул красителей между мицеллами и возникновение FRET сигнала. Очевидно, встраивание катионного красителя DiOC₁₈ или DiIC₁₈ в анионную мицеллу ДСН и образование смешанной мицеллы приводит к существенному увеличению времени жизни такой мицеллы, т.е. увеличению кинетической стабильности, за счет гидрофобных и кулоновских взаимодействий. Наше наблюдение подтверждается также выводами авторов [184], показавших, что введение в анионную мицеллу катионных молекул приводит к увеличению времени жизни в несколько тысяч раз.

Кривые изменения величины $I_{DiO}/(I_{DiO} + I_{Dil})$ от времени, которые характеризуют процесс распада комплексов и перераспределения красителей между наноконтейнерами, могут быть описаны кинетическим уравнением первого порядка [182]:

$$\left(\frac{I_{DiO}}{(I_{DiO} + I_{Dil})} \right)_{(t)} = \left(\frac{I_{DiO}}{(I_{DiO} + I_{Dil})} \right)_{(0)} e^{-K \cdot t} \quad (4.1)$$

где K (ч^{-1}) – константа скорости распада комплекса, или коэффициент перераспределения красителей между наноконтейнерами.

Соответственно, время жизни комплекса $\tau_{1/2}$, которое является мерой его кинетической стабильности, может быть определено как [182]:

$$\tau_{1/2} = \frac{\ln 2}{K} \quad (4.2)$$

Аппроксимация экспериментальных точек рис.4.3а уравнением (4.1) по методу наименьших квадратов (площные линии), позволяет получить константы скорости (K) и рассчитать время жизни комплекса мицелла/краситель ($\tau_{1/2}$) при разных температурах (табл.4.1).

Таблица 4.1

Кинетические параметры процесса разрушения комплекса НК/краситель

Наноконтейнер	T , К	K , ч ⁻¹	$\tau_{1/2}$, ч	E_a , кДж/моль
Мицеллы 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	
Липосомы ФХ	293	0,011	63	134,5
	313	0,437	1,59	
	323	1,04	0,67	
	333	5,18	0,13	
НЧ $GdYVO_4:Eu^{3+}$	293	0,012	57,8	104,2
	303	0,014	49,5	
	313	0,119	5,82	
	323	0,524	1,32	

Рис.4.3а и табл.4.1 показывают, что увеличение температуры приводит к более заметным изменениям во времени значения $I_{Dio}/(I_{Dio} + I_{Dil})$, что указывает на более эффективное перераспределение красителей между мицеллами ДСН. Кроме того, наблюдается уменьшение времени жизни комплексов.

ФХ липосомы оказались более чувствительными к изменению температуры раствора (рис.4.3б). Рост температуры приводит к более резкому, по сравнению с мицеллами ДСН, уменьшению доли флуоресценции донора $I_{Dio}/(I_{Dio} + I_{Dil})$ и падению значений $\tau_{1/2}$ (табл.4.1). Вероятно, достаточно быстрое разрушение липосом при температурах нашего

эксперимента, т.е. их меньшую кинетическую стабильность по сравнению с мицеллами ДСН, можно связать с процессами окисления липидов, поскольку известно, что оптимальной температурой для хранения липидных везикул является температура 3-4 °C.

Как видно из рис.4.3 и табл.4.1, наибольшую кинетическую стабильность выявили комплексы НК/краситель с наноконтейнерами на основе НЧ GdYVO₄:Eu³⁺. Видно, что даже при высоких температурах соотношение $I_{Dio}/(I_{Dio} + I_{Dil})$ меняется незначительно, от 1 до 0,88 (рис.4.3в, кривая 4).

В зависимости от значений времен жизни комплекса $\tau_{1/2}$ принято различать лабильные комплексы, для которых $\tau_{1/2} < 1$ с, и инертные комплексы, для которых $\tau_{1/2} < 10000$ с [188]. Исходя из данных табл.4.1, все исследованные комплексы НК/краситель можно отнести к инертным комплексам [9].

Имея значения констант скорости распада комплексов НК/краситель при разных температурах, можно рассчитать энергию активации распада, используя линеаризованную форму уравнения Аррениуса [189]:

$$\ln K = \ln K_0 - \frac{E_a}{RT}, \quad (4.3)$$

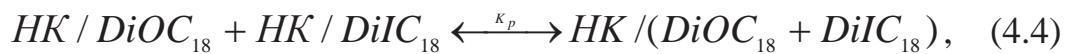
где K – константа скорости процесса распада комплексов, T – температура в К, R – универсальная газовая постоянная.

Построив график в координатах $\ln K$ от $1/T$, по тангенсу угла наклона найдем энергию активации E_a (рис.4.3г). Рассчитанные энергии активации для всех типов наноконтейнеров приведены в табл.4.1. Видно, что все исследованные в работе комплексы НК/краситель характеризуются довольно большими энергиями активации распада, что подтверждает их высокую кинетическую стабильность. Из уравнения Аррениуса следует, что чем больше энергия активации E_a , тем сильнее возрастает скорость реакции при

увеличении температуры, что согласуется с полученными нами результатами (табл.4.1).

4.2. Термодинамическая стабильность комплексов НК/краситель

Процесс перераспределения красителей DiOC_{18} и DiIC_{18} между наноконтейнерами, связанный с разрушением комплексов состава $\text{HK}/\text{DiOC}_{18}$ и $\text{HK}/\text{DiIC}_{18}$ и образованием новых комплексов состава $\text{HK}/(\text{DiOC}_{18} + \text{DiIC}_{18})$, может быть описан как:



характеризующийся константой равновесия:

$$K_p = \frac{[\text{HK} / (\text{DiOC}_{18} + \text{DiIC}_{18})]}{[\text{HK} / \text{DiOC}_{18}][\text{HK} / \text{DiIC}_{18}]} \quad (4.5)$$

Об установлении равновесия свидетельствует выход на плато кривых зависимости соотношения $I_{\text{DiO}} / (I_{\text{DiO}} + I_{\text{DiI}})$ от времени (рис.4.3а,б,в). Пользуясь данными о соотношении интенсивностей флуоресценции донора и сигнала FRET в состоянии равновесия (рис.4.3а,б,в), можно определить равновесные концентрации всех участвующих в реакции комплексов. Концентрацию комплексов оценим по концентрации красителей DiOC_{18} и DiIC_{18} . Так, равновесная концентрация комплекса $\text{HK}/\text{DiOC}_{18}$ будет равна исходной концентрации красителя DiOC_{18} (2×10^{-5} М) умноженной на долю красителя (X), не вошедшего в смешанный комплекс $\text{HK}/(\text{DiOC}_{18} + \text{DiIC}_{18})$ к моменту установления равновесия (рис.4.3а,б,в). Еще раз отметим, что падение относительной интенсивности флуоресценции донора связано с безызлучательным переносом энергии электронного возбуждения на акцептор, т.е. образованием смешанных комплексов, где расстояние между донором DiOC_{18} и акцептором DiIC_{18} сопоставимо с ферстеровским радиусом. Соответственно, ($1-X$) это доля красителя DiOC_{18} в смешанных комплексах $\text{HK}/(\text{DiOC}_{18} + \text{DiIC}_{18})$. Поскольку FRET происходит между парой

красителей донор – акцептор, примем доли донора DiOC_{18} и акцептора DiIC_{18} равными, тогда концентрация новых комплексов состава $\text{HK}/(\text{DiOC}_{18}+\text{DiIC}_{18})$ в состоянии равновесия будет выражаться как:

$$[\text{HK}/(\text{DiOC}_{18} + \text{DiIC}_{18})] = (1 - X)[\text{HK}/\text{DiOC}_{18}] + (1 - X)[\text{HK}/\text{DiIC}_{18}] \quad (4.6)$$

Подставив ур. (4.6) в ур. (4.5), константу равновесия реакции (4.4), связанной с разрушением комплексов состава $\text{HK}/\text{DiOC}_{18}$ и $\text{HK}/\text{DiIC}_{18}$ и образованием новых комплексов состава $\text{HK}/(\text{DiOC}_{18}+\text{DiIC}_{18})$ для нашего случая можно переписать в следующем виде:

$$K_p = \frac{(1 - X) \cdot 4 \times 10^{-5}}{X^2 \cdot 4 \times 10^{-10}} \quad (4.7)$$

Константы равновесия для всех типов наноконтейнеров при разных температурах, полученные с использованием данных рис.4.3а,б,в приведены в табл.4.2.

В общем случае, взаимодействие между катионными гидрофобными молекулами красителей и наноконтейнерами будет определяться силами гидрофобного, ван-дер-ваальсового и электростатического взаимодействий, вклад которых определяется знаком и величиной термодинамических параметров [190]. Используя значения констант равновесия K_p , полученные для разных температур, можно рассчитать изменение свободной энергии Гиббса (ΔG^0), энталпию (ΔH^0) и энтропию (ΔS^0) процесса разрушения комплексов состава $\text{HK}/\text{краситель}$, используя выражения [190]:

$$\Delta G^0 = -RT \ln K_p \quad (4.8)$$

$$\Delta H^0 = \left[\frac{\partial(\Delta G^0 / T)}{\partial(1/T)} \right]_p \quad (4.9)$$

$$\Delta S^0 = \frac{\Delta H^0 - \Delta G^0}{T} \quad (4.10)$$

Из уравнения (4.9) видно, что величина ΔH^0 может быть получена графически, используя зависимость $\Delta G^0 / T$ от $1/T$, которая должна быть прямой линией с наклоном равным ΔH^0 .

Таблица 4.2

Константы равновесия и термодинамические параметры процесса разрушением комплексов состава НК/краситель

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

Полученные значения термодинамических параметров для всех типов наноконтейнеров приведены в табл.4.2. Рассчитанные константы равновесия (K_p) для всех НК имеют довольно большие значения, что говорит о смещении равновесия в ур. (4.4) в сторону образования комплекса НК/(DiOC₁₈+DiIC₁₈). Увеличение температуры существенно влияет на этот процесс, для мицелл ДСН и липосом ФХ K_p увеличивается на 2 порядка, для НК на основе НЧ GdYVO₄:Eu³⁺ на порядок, что еще раз подтверждает большую устойчивость комплексов на основе наночастиц и сильную зависимость процесса разрушением комплексов состава НК/DiOC₁₈ и

HK/DiIC₁₈ и образованием смешанных комплексов состава HK/(DiOC₁₈+DiIC₁₈) от температуры в целом.

Отрицательные значения изменения свободной энергии Гиббса свидетельствуют о том, что процесс разрушения комплексов HK/DiOC₁₈ и HK/DiIC₁₈ и образованием смешанных комплексов состава HK/(DiOC₁₈+DiIC₁₈) является энергетически выгодным процессом [190]. Как видно из рис.4.4, зависимости $\Delta G^0 / T$ от $1/T$ для всех красителей линейны, а полученные значения ΔH^0 – положительные величины, что указывает на то, что изучаемый процесс (ур. (4.4)) является эндотермическим, т.е. идет с поглощением тепла. Возможность самопроизвольного протекания реакции при низких температурах определяется изменением энталпии (ΔH^0), при низких температурах самопроизвольно могут протекать только экзотермические реакции [190]. Полученные положительные значения ΔH^0 подтверждают малую эффективность процесса перераспределения красителей между НК всех типов, наблюдаемую при комнатных температурах.

Изменения энтропии (ΔS^0), рассчитанное по уравнению (4.10), для всех наноконтейнеров тоже оказались положительными, довольно большими значениями, что является критерием принципиальной осуществимости процесса при достаточно высоких температурах (табл.4.2).

Таким образом, полученные термодинамические параметры процесса перераспределения красителей DiOC₁₈ и DiIC₁₈ между наноконтейнерами, связанного с разрушением комплексов состава HK/DiOC₁₈ и HK/DiIC₁₈ и образованием комплексов состава HK/(DiOC₁₈+DiIC₁₈), однозначно указывают на то, что данный процесс возможен только при высоких температурах эксперимента ($\Delta G^0 < 0$, $\Delta H^0 > 0$, $\Delta S^0 > 0$) [9,190].

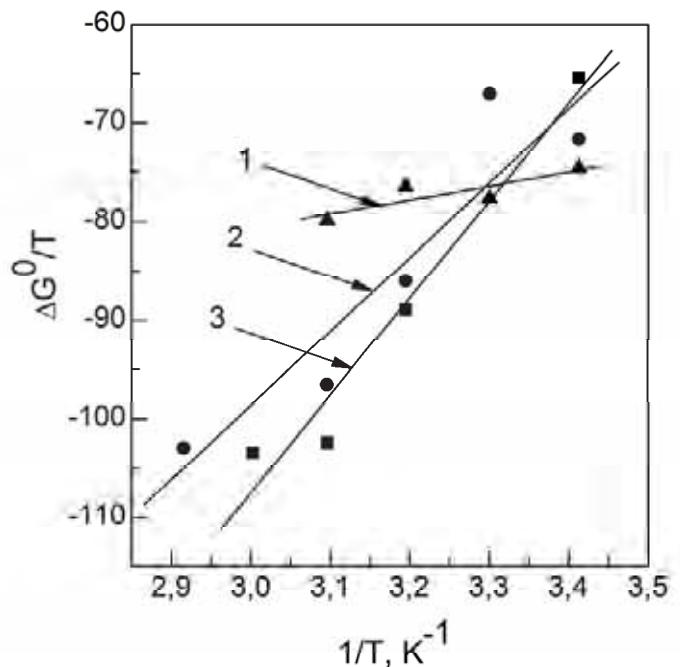


Рис.4.4. График зависимости $\Delta G^0/T$ от $1/T$ для всех исследуемых наноконтейнеров: 1 – НЧ $GdYVO_4:Eu^{3+}$, 2 – мицеллы ДСН, 3 – ФХ липосомы.

Выводы к разделу 4

Таким образом, приведенный в данном разделе экспериментальный материал позволяет сделать следующие выводы:

1. Разработана методика оценки термодинамической и кинетической стабильности комплексов НК/краситель на основе органических (мицеллы ДСН и липосом ФХ) и неорганических (на основе наночастиц $GdYVO_4:Eu^{3+}$) наноконтейнеров в водных растворах при помощи метода ратиометрической детекции флуоресценции.
2. Проведен сравнительный анализ кинетической и термодинамической стабильности комплексов НК/краситель на основе разных типов наноконтейнеров.

3. Рассчитаны константы скорости распада комплексов (K), времена жизни комплексов ($\tau_{1/2}$), энергии активации процесса распада комплексов (E_a), константы равновесия процесса (K_p), изменения свободной энергии Гиббса (ΔG^0), энталпии (ΔH^0) и энтропии (ΔS^0) процесса распада комплексов НК/краситель.
4. Полученные кинетические и термодинамические параметры разрушения комплексов состава НК/DiOC₁₈ и НК/DiIC₁₈ и образования смешанных комплексов состава НК/(DiOC₁₈+DiIC₁₈) позволяют сделать вывод о высокой стабильности исследуемых контейнеров при комнатных и физиологических температурах.
5. Полученные термодинамические параметры однозначно указывают на то, что процесс перераспределения красителей возможен только при высоких температурах эксперимента. Следует, однако, отметить, что наибольшую кинетическую и термодинамическую стабильность выявили комплексы НК/краситель с наноконтейнерами на основе НЧ GdYVO₄:Eu³⁺.

Основные научные результаты, приведенные в разделе 4, опубликованы в [9].

РАЗДЕЛ 5

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА РАТИОМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИИ И FRET-МЕЧЕНИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ И НЕОРГАНИЧЕСКИХ НАНОКОНТЕЙНЕРОВ ДЛЯ ВИЗУАЛИЗАЦИИ И ИССЛЕДОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАНОКОНТЕЙНЕРОВ С МОДЕЛЬНЫМИ СИСТЕМАМИ И ЖИВЫМИ КЛЕТКАМИ В ДИНАМИКЕ

Другим, не менее важным вопросом в разработке контейнерных форм лекарственных средств, тесно связанным со стабильностью, является вопрос скорости высвобождения активного вещества из наноконтейнера и контроль этого процесса. Невзирая на значительное количество публикаций последнего времени, которые посвящены созданию различных наноконтейнеров [16-23,25,181,185,192-196], вопросы их стабильности и контролируемого высвобождения активного вещества являются предметом постоянного интереса исследователей, поскольку обусловлены, в первую очередь, особенностями строения и химического состава самого наноконтейнера. Контролируемое высвобождение активного вещества является главным элементом дизайна наноконтейнеров [16-23,25,185,192-196].

Данный раздел диссертационной работы посвящен изучению эффективности аккумуляции комплексов НК/краситель в живых клетках, кинетики высвобождения красителя из комплексов при взаимодействии с модельными системами клеточной мембранны и живыми клетками в экспериментах *in vitro* и выяснению возможности контролировать этот процесс.

Для правильной трактовки наблюдаемых спектральных изменений было проанализировано влияние полярности растворителя на спектры флуоресценции полиметиновых красителей, в частности проанализировано изменение положения максимума спектра флуоресценции при переходе из полярной среды (вода) в липидный бислой клеточной мембранны (рис.5.1).

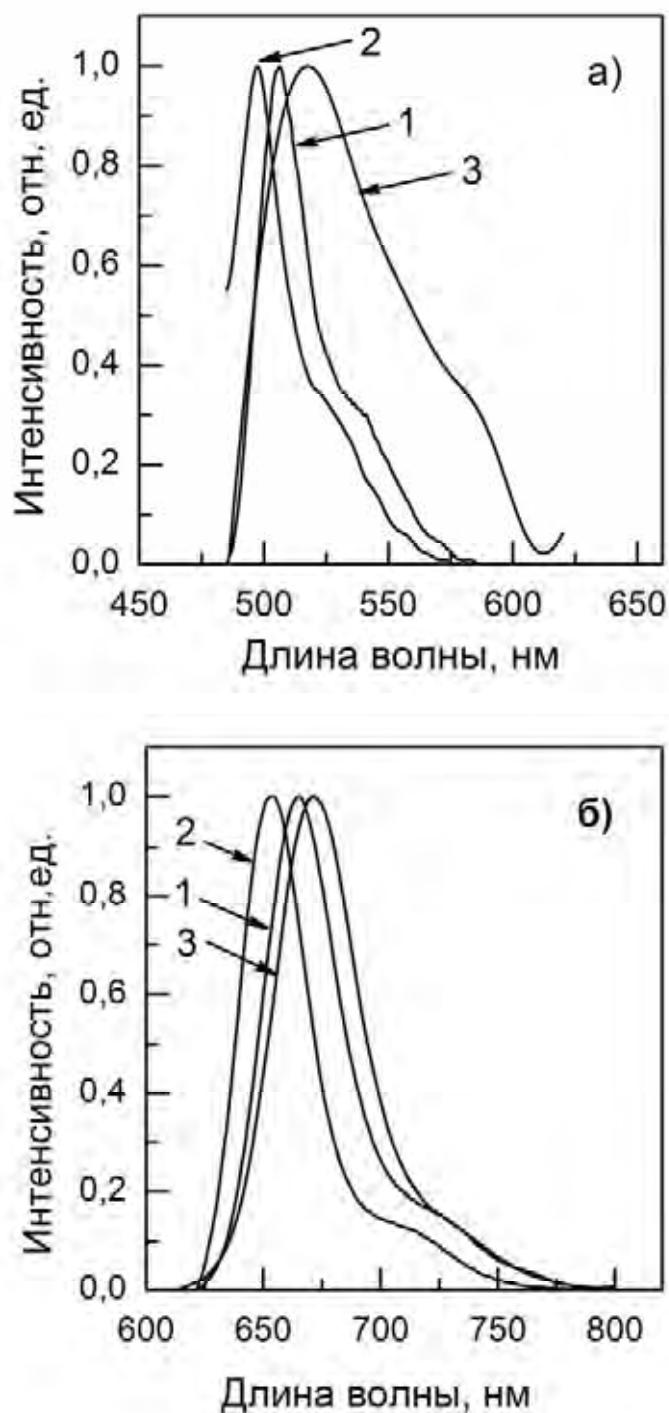


Рис. 5.1. Спектры флуоресценции красителей в различном микроокружении:
 а) – DiOC_2 (1 – ДМСО (506 нм); 2 – вода (498 нм); 3 – изолированный гепатоцит (516 нм)); б – DiDC_2 (1 – ДМСО (665 нм); 2 – вода (655 нм); 3 – изолированный гепатоцит (673 нм)).

При исследовании спектральных свойств DiOC₂ (рис.2.6) был установлен сдвиг максимума люминесценции в коротковолновую область с возрастанием полярности растворителя (рис.5.1а). Положение максимума люминесценции при связывании зондов с изолированными гепатоцитами дает представление о микроокружении зонда в клеточных структурах. При этом следует учитывать, что существует возможность локализации хромофора на разной глубине биомембран (выделяют 4 зоны локализации – область полярных головок, область глицериновых остатков, область метиленовых цепочек и центр бислоя) [197]. В изолированных клетках максимум флуоресценции зонда DiOC₂ смещается в область, соответствующую гидрофобному микроокружению.

При исследовании спектральных свойств зонда DiDC₂ (рис.2.6) как в растворах, так и в изолированных гепатоцитах (рис.5.1б) наблюдались те же закономерности в смещении максимума люминесценции, что и для зонда DiOC₂. Общие закономерности в смещении максимумов флуоресценции зондов DiDC₂ и DiOC₂ при связывании с клетками печени указывают, что особенности мембранный структуры клеток и структура хромофора оказывают определяющее влияние на характер микроокружения хромофора, что отражается в изменениях спектральных свойств зондов.

Для сравнительного анализа эффективности взаимодействия наноконтейнеров разных типов (мицелл ДСН, липосом ФХ, сферических наночастиц GdYVO₄:Eu³⁺ и CeO₂) с модельными системами мембран клеток и живыми клетками (гепатоцитами крыс) в динамике в экспериментах *in vitro* был применен подход, описанный в разделе 4 с использованием метода ратиометрической детекции и FRET-пары красителей [10-14]. Однако в данном случае оба красителя вводились сразу в тот или иной тип НК. (рис.5.2). Наблюдали за взаимодействием НК с мембраной в динамике и высвобождением красителей из контейнера в липидный бислой мембранны. В данном случае, такое взаимодействие должно приводить к увеличению

расстояния между донором и акцептором, и, как следствие, к падению FRET сигнала (рис.5.2).

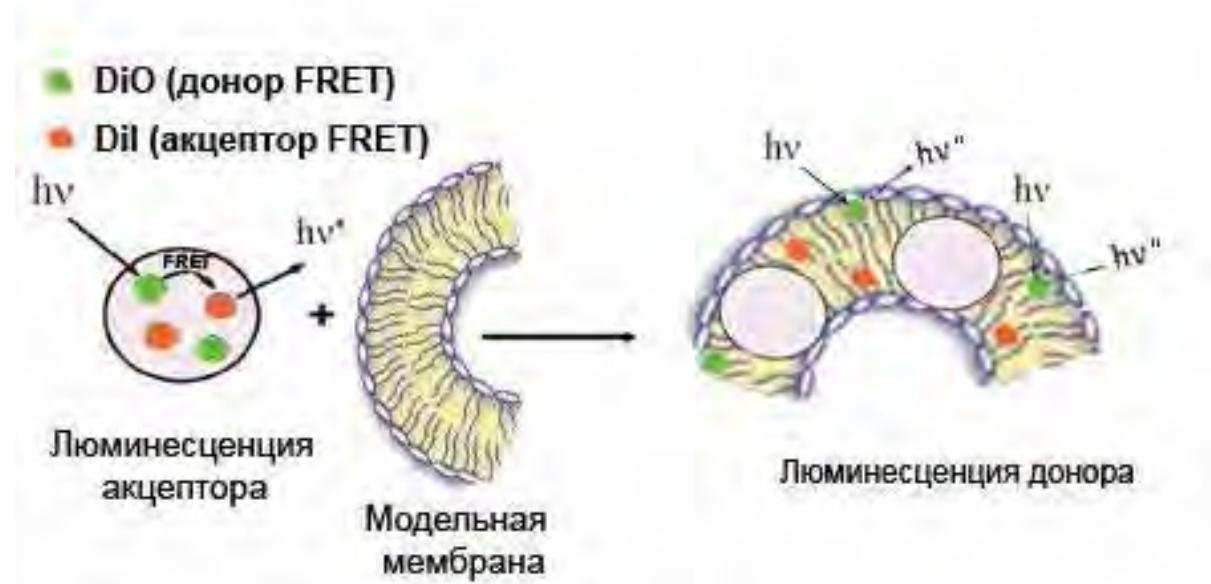


Рис. 5.2. Схематическое представление эксперимента.

5.1. Взаимодействие органических и неорганических наноконтейнеров с модельными мембранами

В качестве модельной системы мембран использовали концентрированную суспензию «пустых» липосом ФХ, как было описано в разделе 2 [11-13]. Коллоидные растворы наноконтейнеров, которые содержат FRET-пары красителей, смешивали с концентрированной суспензией ФХ липосом и выдерживали на протяжении нужного времени (от 30 минут до 170 часов). Через разные интервалы времени проводили измерение спектров флуоресценции растворов. Анализируемым в эксперименте параметром было изменение доли флуоресценции акцептора DiIC_{18} в общем сигнале флуоресценции, $I_{\text{Dil}}/(I_{\text{DiO}} + I_{\text{Dil}})$. На рис.5.3, приведены изменения этих параметров во времени для всех исследуемых наноконтейнеров.

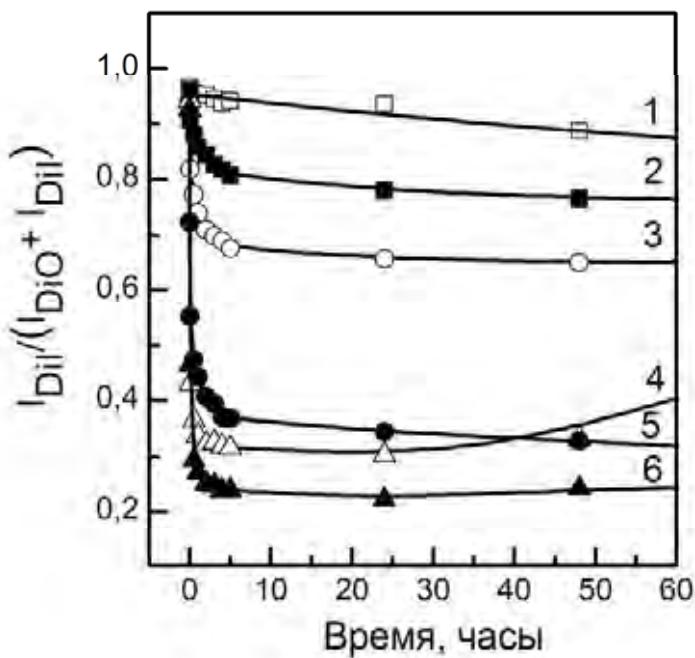


Рис.5.3. Изменение во времени относительной интенсивности флуоресценции акцептора в общем сигнале флуоресценции: 1 –мицеллы ДСН; 2 – липосомы+10% ДСН; 3 – липосомы ФХ; 4 – GdYVO₄:Eu³⁺; 5 –GdYVO₄:Eu³⁺ + холестерин; 6 –CeO₂.

Как видно из рис.5.3, с увеличением времени наблюдается уменьшение относительной интенсивности флуоресценции акцептора DiIC₁₈ для каждого наноконтейнера, которое указывает на увеличение расстояния между донором и акцептором за счет высвобождения красителей из наноконтейнеров и переход их в липидную фазу. Однако, как видно из рис.5.3, динамика этого процесса отличается для разных типов наноконтейнеров. Проанализируем динамику уменьшения во времени FRET сигнала $I_{Dil}/(I_{Dio} + I_{Dil})$ для каждого типа наноконтейнера.

Мицеллы ДСН выявили высокую стабильность в растворах при добавлении липидов [11-13]. За все время наблюдения (170 часов)

перераспределение относительных интенсивностей флуоресценции акцептора DiIC₁₈ осуществлялось очень медленно (рис.5.3, кривая 1), выход кривой 1 на плато, которое свидетельствует об окончании процесса высвобождения красителей из мицелл благодаря их слиянию с липидными слоями, наблюдалось лишь через 120 часов после начала эксперимента. При этом величина $I_{Dil}/(I_{DiO} + I_{Dil})$ изменилась незначительно от 0,97 до 0,8, что свидетельствует об очень малой эффективности выхода гидрофобных катионных красителей из анионных наноконтейнеров в липидную фазу. Мы допускаем, что это можно объяснить ролью электростатического взаимодействия, которое удерживает катионные красители в противоположно заряженной мицелле, а также наличием в молекулах красителей длинного углеводородного радикала ($R=C_{18}H_{37}$, рис.2.6), который подобно якорю удерживает молекулы в мицелле ДСН [161].

Процесс перераспределения красителей между наноконтейнером и липидной фазой может быть описан кинетической реакцией первого порядка, аналогично уравнению (4.1), но относительно доли флуоресценции акцептора [182]:

$$\left(\frac{I_{Dil}}{(I_{DiO} + I_{Dil})} \right)_{(t)} = \left(\frac{I_{Dil}}{(I_{DiO} + I_{Dil})} \right)_{(0)} e^{-Kt}, \quad (5.1)$$

где K (час⁻¹) – константа скорости процесса или коэффициент высвобождения (leakage coefficient).

Аппроксимация кривой 1 (рис.5.3) уравнением (5.1) по методу наименьших квадратов позволяет получить константу скорости $K = 0,008$ час⁻¹. Имея константу скорости можем оценить «время полувыведения» (release half-life), то есть период времени, за который наблюдается высвобождение 50% красителя по уравнению (4.2) [182].

Полученный параметр «времени полувыведения» $\tau_{1/2}$ для мицелл ДСН составил 86 часов, что являются достаточно большой величиной и свидетельствует о стабильности мицелл.

Для остальных наноконтейнеров процесс высвобождения красителей был намного быстрее. Выход красителей из наноконтейнеров занимал не больше чем 5 часов, после чего все кривые выходят на плато, как видно из рис.5.3 [11-13].

Для липосом ФХ константа скорости K , полученная с помощью аппроксимации крив.2, рис.5.3 уравнениям (5.1) составила $0,82 \text{ час}^{-1}$, $\tau_{1/2}=0,85$ часов, что является намного быстрее, чем в случае мицелл (табл.5.1).

Таблица 5.1

Константы скорости высвобождения красителей из наноконтейнеров (K) и «время полуыведения» красителей ($\tau_{1/2}$) при взаимодействии с модельными мембранными

Тип наноконтейнера	K , час $^{-1}$	$\tau_{1/2}$, час
Мицеллы ДСН	0,008	86
Липосомы ФХ	0,82	0,85
Липосомы ФХ+10%ДСН	0,29	2,4
НЧ GdYVO ₄ :Eu ³⁺	1,96	0,36
НЧ GdYVO ₄ :Eu ³⁺ + хол.	0,75	0,93
НЧ CeO ₂	2,86	0,24

Для того чтобы проверить роль электростатических взаимодействий, в липосомы ФХ добавили 10% ДСН, что обеспечило отрицательный заряд липосомам без изменения их свойств. Полученные константа скорости высвобождения красителей и время жизни этих липосом оказались больше, чем для липосом без ДСН: $0,29 \text{ час}^{-1}$ и 2,4 часов, соответственно (табл. 5.1), что подтверждает роль электростатических взаимодействий в процессе связывания красителей с липосомами (рис.5.3, кривая 1).

В случае наночастиц GdYVO₄:Eu³⁺ и CeO₂ наблюдалось более быстрое высвобождение красителей и переход их в липидную фазу (рис.5.3, кривые 3,4,5 и табл.5.1) [11-13]. Полученные константы скорости K являются

достаточно большими, а значение $\tau_{1/2}$ менее чем полчаса (табл.5.1). Такая скорость высвобождения красителей из наноконтейнеров на основе НЧ в липидные мембранные объясняется особенностью строения комплексов «неорганическая наночастица – органические красители», которые, как было описано в разделах 2 и 3, являются сложным ассоциатом нескольких НЧ и красителей, а также наличием градиента липофильности. Поскольку в таких комплексах связывания липофильных красителей с НЧ обеспечивается силами электростатического и ван-дер-ваальсового взаимодействий, добавление в раствор липидов в большой концентрации приводит к возникновению градиента липофильности и быстрому переходу гидрофобных красителей в гидрофобную среду.

Для того чтобы проверить это предположение в эксперименте использовали комплексы, содержащие холестерин (рис.2.12). И, действительно, добавление в комплексы НЧ/краситель холестерина приводила к снижению градиента липофильности, так как теперь молекулы красителей располагаются в каплях холестерина (см. рис.2.12) и, как следствие, скорость процесса высвобождения замедляется почти в три раза (табл.5.1, рис.5.3, кривая 3).

Таким образом, проведенные исследования позволяют сделать вывод, что наноконтейнеры на основе НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ и CeO_2 обеспечивают быстрое высвобождение липофильного содержимого (в нашем случае, красителей DiOC_{18} и DiIC_{18}) в липидные бислои модельной мембранны в экспериментах, $\tau_{1/2}$ составляет менее получаса. Добавление в наноконтейнер отрицательно заряженных или гидрофобных (липофильных) соединений позволяет замедлить процесс высвобождения активного компонента, то есть позволяет контролировать этот процесс.

5.2. Взаимодействие органических и неорганических наноконтейнеров с живыми клетками *in vitro*

Последним этапом в диссертационной работе было тестирование наноконтейнеров на основе наночастиц $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ и CeO_2 в экспериментах *in vitro* с использованием живых клеток. Эти эксперименты основывались на результатах, полученных с использованием модельных систем биологических мембран и описанных в разделе 5.1. Для исследования взаимодействия наноконтейнера с живой клеткой в динамике также использовали метод ратиометрической детекции с применением FRET-пары красителей DiOC_{18} и DiIC_{18} , в качестве живых клеток использовали свеже выделенные гепатоциты крыс.

Одной из особенностей гепатоцитов является их высокая функционально-метаболическая активность даже в изолированном состоянии, что делает их привлекательными для изучения процессов обмена веществ на клеточном уровне. В диссертационной работе анализировали (i) динамику и эффективность накопления комплексов НК/красители в клетках и (ii) кинетику высвобождения красителей из НК в клетки.

5.2.1. Эффективность накопления комплексов НК/красители в клетках гепатоцитов крыс. Для изучения эффективности аккумуляции различных комплексов НК/краситель клетками гепатоцитов крыс анализировали изменение общей яркости флуоресцентных изображений, полученных при разных временах инкубации клеток с НК. Чем более эффективно комплексы, содержащие флуоресцентные красители, захватывались клетками, тем ярче должны были быть изображения клеток. Мы анализируем общую яркость изображений в двух каналах: зелёном и красном с помощью программного обеспечения для анализа растровых изображений (Adobe Photoshop) как было описано в разделе 2.3.

На рис.5.4 приведены флуоресцентные изображения гепатоцитов крыс полученные после 24 часов инкубации с НК, содержащие FRET-красители.

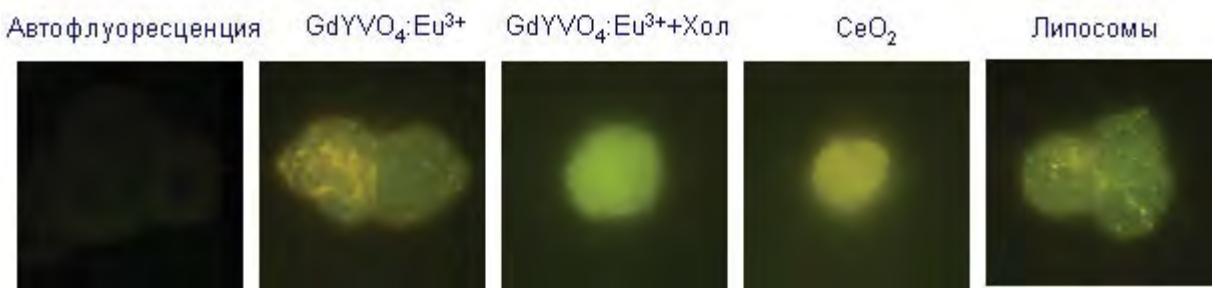


Рис.5.4. Флуоресцентные изображения гепатоцитов крыс после 24 часов инкубации с НК, содержащие FRET-красители.

Рис.5.5 показывает различную эффективность накопления комплексов НК/красители в зависимости от типа НК. Как уже было отмечено ранее, известно, что кинетика и механизм захвата НК клетками сильно зависит от множества факторов, таких как тип НК, размер и поверхностные свойства НК, условия инкубации, типа клеток и т.п. [137,198,199]. Известно, что нейтральные и отрицательно заряженные наночастицы гораздо меньше адсорбируются на отрицательно заряженной поверхности клеточной мембранны и, следовательно, показывают более низкий уровень интернализации по сравнению с положительно заряженными частицами [137,198,199]. Как видно на рис.5.5, комплексы НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ /красители выявляют наиболее эффективное накопление в гепатоцитах. После 24 часов инкубации яркость клеток, инкубированных с комплексами НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ /красители, высокая. В то же время, характерное время насыщения клеток с комплексами НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ /красители (τ_{sat}), которое оценивалось с помощью экспоненциального закона изменения яркости (I) в зависимости от времени инкубации (t) $I = I_0 \cdot e^{t/\tau_{sat}}$, оказалось равным 9 часам (рис.5.5, кривая 1). Наблюдаемый эффект коррелирует с данными, представленными в работах [137,198,199]. Как неоднократно упоминалось выше, адсорбция катионного красителя на поверхности наночастиц приводит к частичной нейтрализации отрицательного заряда НЧ, в то время как формирование крупных комплексов НЧ/красители приводит к созданию

локальных областей с положительным зарядом, который облегчает адсорбцию комплексов на клеточной мемbrane (см. раздел 2.5, рис.2.12) [10].

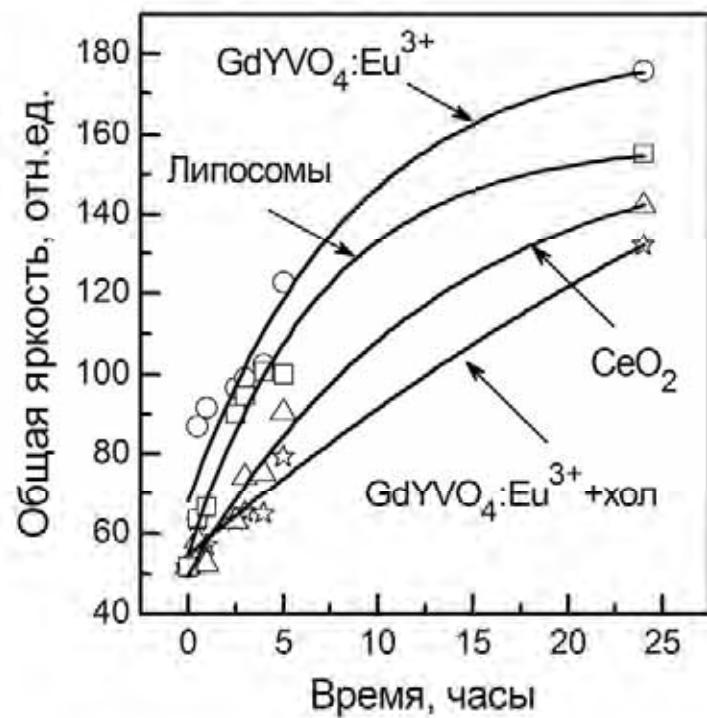


Рис. 5.5. Изменение во времени общей яркости изображения клеток в зависимости от времени инкубации с НК.

Добавление в комплекс липофильного компонента (холестерина) в значительной степени уменьшает эффективность накопления комплексов НЧ/красители/холестерин на мемbrane клетки, при этом время насыщения увеличивается почти в 6 раз ($\tau_{sat} = 50$ часов). Это можно объяснить тем, повторимся, что, согласно нашим представлениям, в подобных комплексах красители сосредоточены в наноразмерных каплях холестерина, которые в свою очередь стабилизированы наночастицами (см. раздел 2.5, рис.2.12). Поверхностные свойства такого комплекса обусловлены отрицательным зарядом НЧ, что должно препятствовать эффективному взаимодействию с мемраной клетки [10]. Кроме того, известно, что интернализация холестерина клетками требует специфических рецептор-опосредованных

путей [200], что тоже в значительной степени может повлиять на кинетику этого процесса.

Комплексы на основе НЧ CeO_2 выявили более низкую эффективность взаимодействия с клетками, нежели комплексы на основе НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$. После 24 часов инкубации, общая яркость клеток значительно меньше, а время насыщения больше ($\tau_{sat} = 13$ часов), рис.5.5, кривая 3. Мы приписываем наблюдаемые эффекты большому размеру комплексов $\text{CeO}_2/\text{красители}$ (см. раздел 2.5, рис.2.11, кривые 5,6), что вероятно требует другого механизма интернализации, например клатрин-опосредованного эндоцитоза [198].

Липосомы ФХ как НК имеют большой сродство с клеточной мембраной, что может облегчить процесс взаимодействия. Общая яркость клеток после 24 часов инкубации немного меньше, чем для комплексов НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}/\text{красители}$, в то время как кинетика взаимодействия липосом ФХ/красителей оказалась схожей с комплексами НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}/\text{красители}$ с временем насыщения $\tau_{sat} = 7$ часов [10].

5.2.2. Кинетика высвобождения красителей из НК в клетки гепатоцитов крыс. В ходе выполнения диссертационной работы оценивались также кинетические параметры высвобождения красителей из НК в клетки, по перераспределению сигнала флуоресценции донор/акцептор в общем сигнале флуоресценции. Использовался тот же подход, что и в случае модельных мембран (см. раздел 5.1), анализировали изменение во времени FRET соотношения $I_{Dil}/(I_{DiO} + I_{Dil})$.

На рис.5.6 приведены флуоресцентные изображения гепатоцитов крыс полученные при разных временах инкубации с различными наноконтейнерами, содержащие FRET-красители. Из рисунка видно постепенное увеличение интенсивности окрашивания клеток, то есть накопление красителей, для всех исследуемых НК. Рис.5.7 показывает динамику перераспределения относительных интенсивностей флуоресценции

донора DiOC₁₈ и акцептора DiIC₁₈ в общем сигнале флуоресценции для разных типов НК.

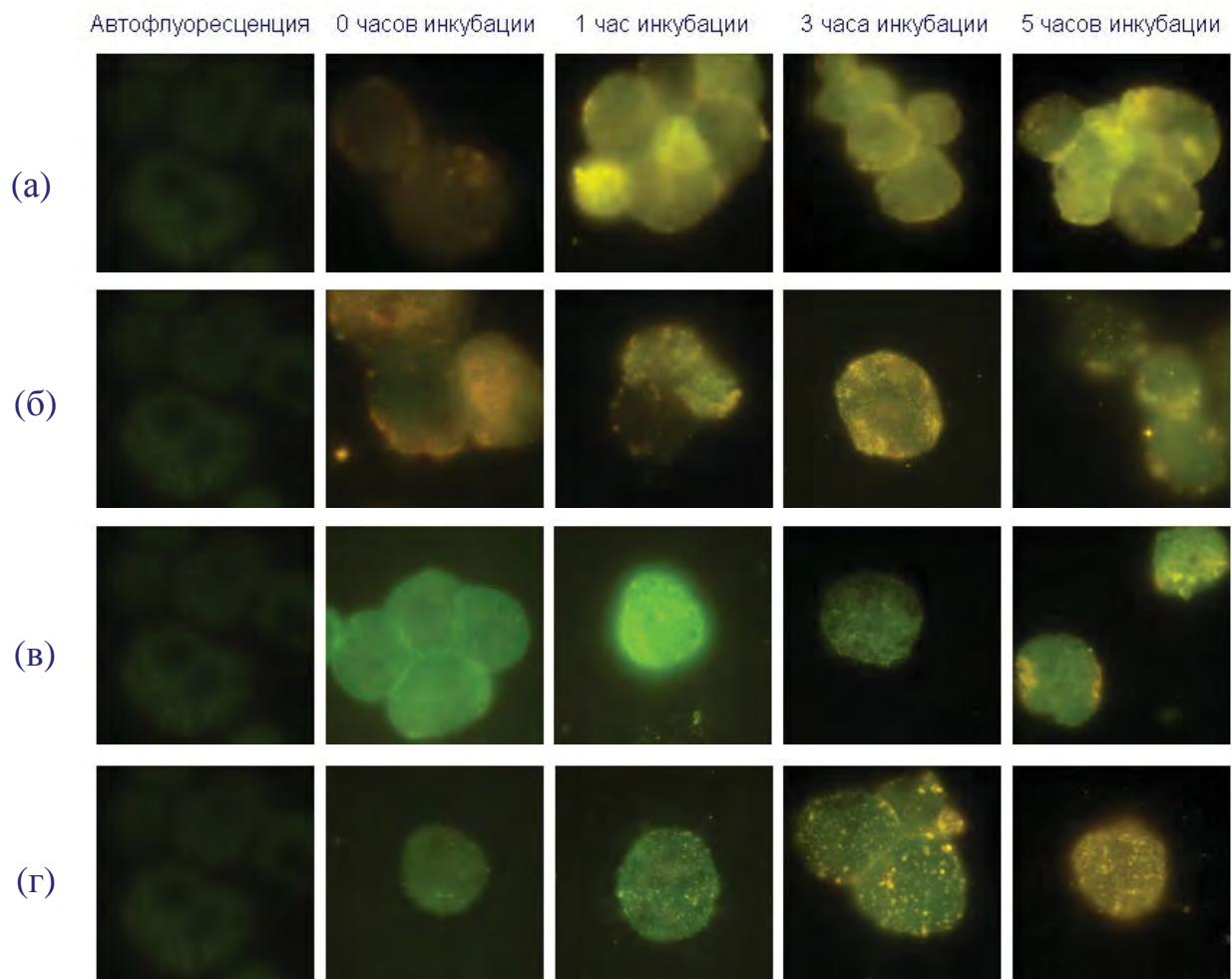


Рис. 5.6. Флуоресцентные изображения клеток гепатоцитов полученные при разных временах инкубации с нанонентейнерами: (а) НЧ GdYVO₄:Eu³⁺/красители, (б) НЧ GdYVO₄:Eu³⁺/красители/холестерин, (в) НЧ CeO₂/красители, (г) липосомы ФХ/красители. Возбуждение ВР 460-490 нм.

Видно, что при увеличении времени инкубации имеет место постепенное увеличение доли флуоресценции донора DiOC₁₈ в общем сигнале флуоресценции и, как следствие, потеря FRET-сигнала, что указывает на выход красителей из наноконтейнеров за счет их взаимодействия с мембраной клетки (рис.5.7).

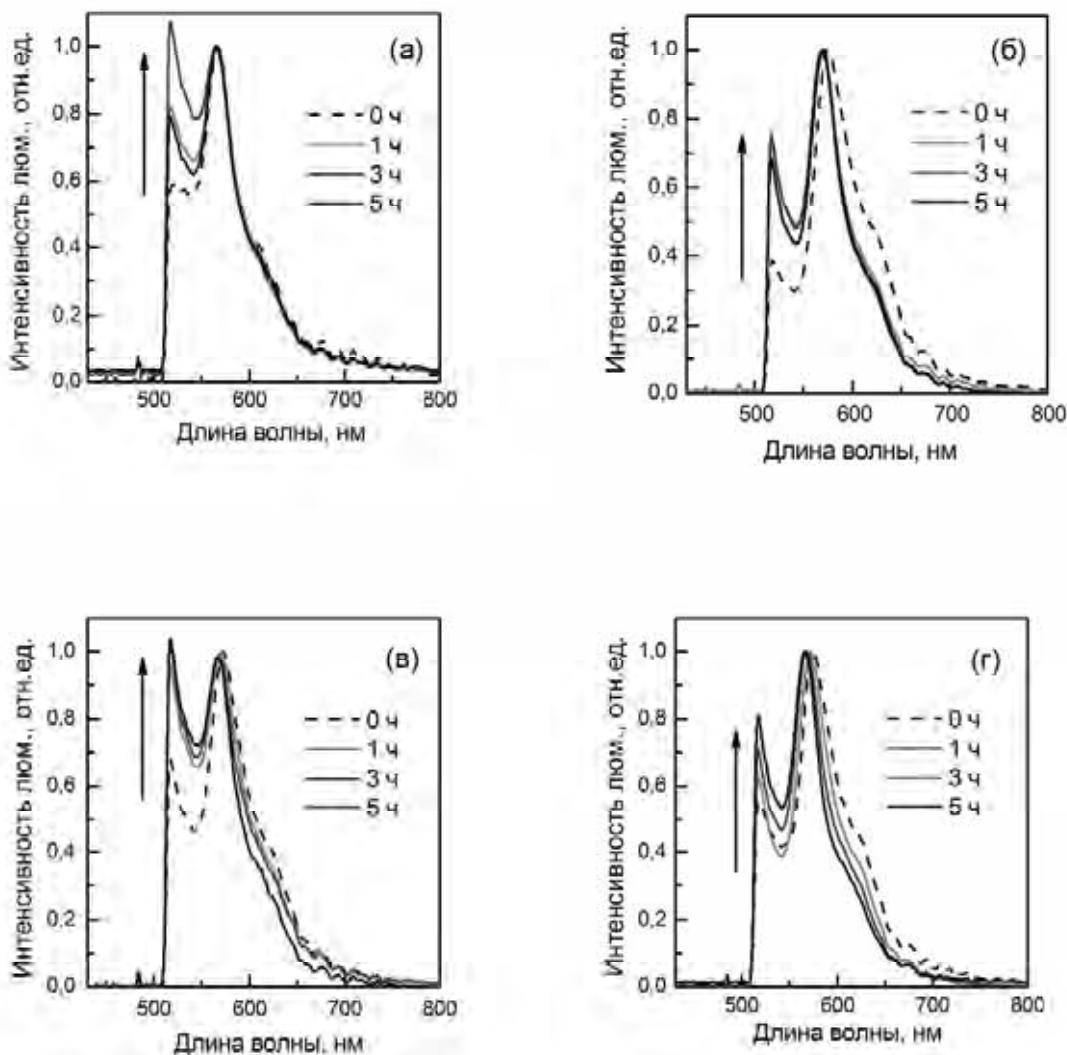


Рис.5.7. Спектры флуоресценции снятые через разное время инкубации клеток гепатоцитов крыс с комплексами: (а) НЧ GdYVO₄:Eu³⁺/красители, (б) НЧ GdYVO₄:Eu³⁺/красители/холестерин, (в) НЧ CeO₂/красители, (г) липосомы ФХ/красители. Возбуждение ВР 460-490 нм.

Для всех исследуемых комплексов, значительное уменьшение соотношения $I_{Dil}/(I_{Dio} + I_{Dil})$ сопровождается смещением максимумов флуоресценции в синюю область (рис.5.7). Это свидетельствует о выходе красителей из НК и перехода в другую среду [15], скорее всего, в клеточную мембрану, как показано в разделе 5.1.

Рассчитанные кинетические параметры (константы скорости высвобождения красителей из наноконтейнеров (K) и «время полувыведения» красителей ($\tau_{1/2}$)) приведены в табл.5.2. Полученные данные коррелируют с экспериментальными данными для модельных мембран [11-13].

Таблица 5.2

Константы скорости высвобождения красителей из наноконтейнеров (K) и «время полувыведения» красителей ($\tau_{1/2}$) при взаимодействии с клетками гепатоцитов крыс

Тип наноконтейнера	K , час ⁻¹	$\tau_{1/2}$, час
Липосомы ФХ	1,5	0,46
НЧ GdYVO ₄ :Eu ³⁺	3,73	0,19
НЧ CeO ₂	4,33	0,16
НЧ GdYVO ₄ :Eu ³⁺ + хол.	0,27	2,56

Как показывают табл. 5.2 и рис.5.8, НК на основе НЧ GdYVO₄:Eu³⁺ и CeO₂ обеспечивают быстрое высвобождение гидрофобного красителя в клетки по сравнению с липосомами ФХ. «Времена полувыведения» красителей ($\tau_{1/2}$) для комплексов НЧ GdYVO₄:Eu³⁺/красители и НЧ CeO₂/красители оказались в 2,4 и 3 раза меньше, по сравнению с липосомами ФХ, соответственно (табл.5.2). Такое быстрое высвобождение красителей, как и в случае с модельными мембранными, связано с наличием градиента липофильности в системе, который провоцирует быстрое высвобождение липофильных красителей DiOC₁₈ и DiIC₁₈ в липидный бислой клеточной мембраны [10-14]. Ранее, в работе [201], было показано мембрано-опосредованное проникновение молекул красителя DiIC₁₈ загруженных в полимерные мицеллы.

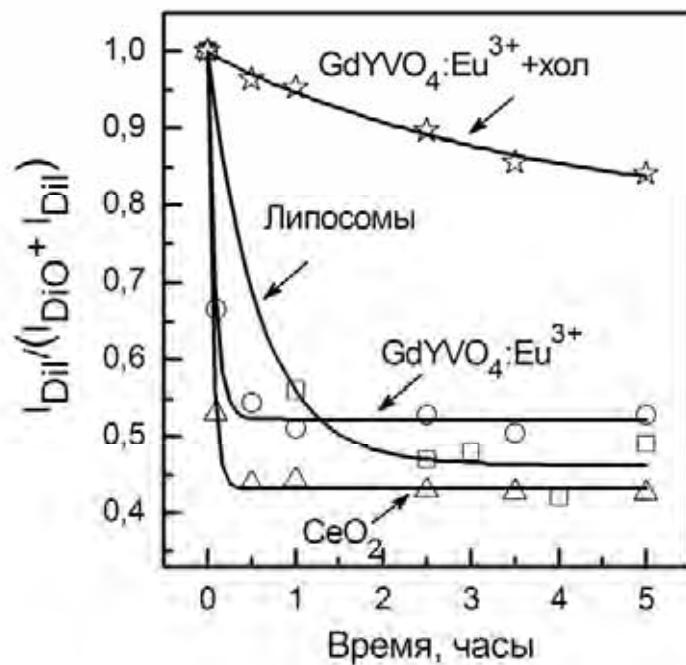


Рис.5.8. Изменение во времени относительной интенсивности флуоресценции акцептора DiIC_{18} в общем сигнале флуоресценции.

В комплексах $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ /красители/холестерин, добавление холестерина, как и в случае модельных мембран, существенно снижает градиент липофильности и заметно замедляет процесс высвобождения красителей (рис.5.8). Значение $\tau_{1/2}$ увеличивается более чем в 10 раз (табл.5.2). Низкая скорость высвобождения красителей из комплексов $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ /красители/холестерин может быть также связана с другим способом взаимодействия комплексов с клетками (описано выше) и коррелирует с низкой эффективностью накопления таких комплексов клеточными мембранами (см. п.5.2.1) [10].

Комpleксы НЧ/красители на основе НЧ CeO_2 , как и в случае с НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$, обеспечивают быстрое высвобождение липофильного компонента, рис.5.8.

Кинетические параметры взаимодействия липосом ФХ с гепатоцитами крыс оказались подобными к описанной ранее модельной системе мембран с

«временем полувыведения» приблизительно в 2,5 раза большим чем для комплексов с НЧ.

Таким образом, можно сделать вывод, что НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ и CeO_2 могут быть использованы в качестве наноплатформы для внутриклеточной доставки гидрофобных компонентов. В свою очередь, они имеют ряд преимуществ, по-сравнению, например, с липидными везикулами, в частности они обладают:

- ✓ высокой стабильностью при комнатных и физиологических температурах;
- ✓ лабильностью параметров высвобождения органических молекул при взаимодействии с живой клеткой;
- ✓ эффективной аккумуляцией комплексов мембранами живых клеток;
- ✓ возможностью получения синергетического эффекта как от активного вещества, так и от самой наночастицы за счет ее биологической активности.

Выводы к разделу 5

Таким образом, суммируя весь представленный в данном разделе экспериментальный материал, можно сделать следующие выводы:

1. Используя метод флуоресцентной микроспектроскопии и FRET-мечение разных типов наноконтейнеров (НК) изучена эффективность и кинетика аккумуляции комплексов НК/молекулы красителей живыми клетками гепатоцитов крыс, а также кинетика высвобождения красителей в модельные мембранны и живые клетки в экспериментах *in vitro*.
2. Отработан метод ратиометрической детекции для исследования взаимодействия наноконтейнеров с модельными системами клеточных мембран и живыми клетками в динамике.
3. Рассчитаны константы скорости высвобождения и «время полувыведения» красителей из наноконтейнеров разных типов при их взаимодействии с модельными мембранны и живыми клетками в

экспериментах *in vitro*. Установлено, что в случае модельных систем, наноконтейнеры на основе НЧ GdYVO₄:Eu³⁺ и CeO₂ обеспечивают более быстрое высвобождение липофильного содержимого (красителей) по сравнению с другими носителями (мицеллы, липосомы).

4. Показано, что добавление в наноконтейнер отрицательно заряженных или гидрофобных (липофильных) соединений позволяет замедлить процесс высвобождения активного компонента, то есть позволяет управлять этим процессом.
5. Показано, что НК на основе НЧ GdYVO₄:Eu³⁺ обеспечивают наиболее эффективную аккумуляцию в клетках с временем насыщения $\tau_{sat} = 9$ часов. Однако добавление в систему дополнительного липофильного компонента (холестерина), приводит к снижению эффективности накопления комплексов в гепатоцитах крыс ($\tau_{sat} = 50$ часов).
6. Показано, что НЧ GdYVO₄:Eu³⁺ и CeO₂ могут быть использованы в качестве наноразмерной платформы для контролируемой внутриклеточной доставки гидрофобных соединений.

Основные научные результаты, приведенные в разделе 5, опубликованы в [10-14].

ВЫВОДЫ

В диссертационной работе была решена поставленная научная задача по установлению механизмов взаимодействия комплексов на основе неорганических наночастиц $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ и CeO_2 и органических молекул (красителей семейства полиметинов) с модельными мембранными и живыми клетками.

1. Показано, что в водных растворах неорганических НЧ $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Y}, \text{La}, \text{Gd}$) стабилизированных цитрат-анионом при добавлении катионных красителей благодаря электростатическому взаимодействию происходит адсорбция молекул красителей в приповерхностном слое НЧ, а также, в зависимости от свойств красителей, их упорядоченная агрегация и образование сложных комплексов неорганические НЧ/органические молекулы. Неорганические наночастицы выступают в роли своеобразных «шаблонов» для образования агрегатов красителя. Предложена модель образующихся комплексов.
2. По разработанной методике рассчитана сорбционная способность неорганических НЧ $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re} = \text{Y}, \text{La}, \text{Gd}$) по отношению к гидрофильным красителям, которая составляет в среднем 1,6 мг/г для сферических НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$, 0,7 мг/г для зернообразных НЧ $\text{GdVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ и стержнеобразных НЧ $\text{LaVO}_4:\text{Eu}^{3+}$, что коррелирует с рассчитанной удельной площадью поверхности наночастиц с разным форм-фактором.
3. Разработана методика и с ее использованием исследована кинетическая и термодинамическая стабильность комплексов НК/органическая молекула на основе неорганических (НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ и CeO_2) и органических (мицеллы ДСН и липосомы ФХ) наноконтейнеров и красителей семейства полиметинов. Рассчитаны константы скорости распада комплексов, (K) времена жизни комплексов ($\tau_{1/2}$), энергии активации процесса распада комплексов (E_a), константы равновесия процесса (K_p),

изменения свободной энергии Гиббса (ΔG^0), энталпии (ΔH^0) и энтропии (ΔS^0) процесса и установлено, что комплексы на основе НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ и CeO_2 являются инертными высокостабильными системами при комнатных и физиологических температурах.

4. Установлено, что комплексы НЧ/органические молекулы на основе НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ эффективно накапливаются в клеточных мембранах при их совместном инкубировании с клетками гепатоцитов крыс с временем насыщения $\tau_{sat} \sim 9$ часов. Добавление в состав комплекса липофильного компонента (холестерина) замедляет процесс аккумуляции ($\tau_{sat} \sim 50$ часов).
5. Рассчитаны константы скорости высвобождения и «времена полувыведения» красителей из НК разных типов при их взаимодействии с модельными мембранными системами и живыми клетками в экспериментах *in vitro*. Установлено, что НК на основе НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ и CeO_2 обеспечивают быстрое высвобождение липофильного содержимого (липофильные красители) по сравнению с другими носителями (мицеллы ДСН, липосомы ФХ).
6. Показано, что добавление в наноконтейнер негативно заряженных или липофильных соединений позволяет замедлить процесс высвобождения активного компонента, то есть позволяет управлять этим процессом.
7. Продемонстрирована транспортировка агрегатов красителя JC-1 в ядра гепатоцитов крыс с помощью сферических НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$, вместо характерного аккумулирования красителя в митохондриях клеток, что подтверждает эффективность этих НЧ как наноносителей для транспортировки липофильных органических молекул в ядро живой клетки.
8. Показано, что НЧ $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ и CeO_2 могут быть использованы в качестве наноплатформы для внутриклеточной доставки гидрофобных компонентов.

ПРИМЕЧАНИЯ

Работа выполнена при действенной поддержке сотрудников отдела нанокристаллических материалов Института сцинтилляционных материалов НАН Украины кандидата химических наук **В.К. Клочкова**, кандидата биологических наук **Н.С. Кавок**, кандидата химических наук **И.А. Борового**, младшего научного сотрудника **Е.А. Аверченко**.

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю доктору физико-математических наук, зав. отделом нанокристаллических материалов Института сцинтилляционных материалов НАН Украины **Светлане Леонидовне Ефимовой** за постановку задачи, постоянную поддержку и помошь при выполнении исследований по теме диссертационной работы.

Особая благодарность члену-корреспонденту НАН Украины, профессору **Юрию Викторовичу Малюкину** за действенную поддержку, за ценные замечания, способствовавшие повышению качества данной работы.

Автор выражает искреннюю признательность всем сотрудникам отдела нанокристаллических материалов за поддержку, проявленное внимание и оказанную помошь при выполнении данной работы.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

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 [и др.] // Біофізичний вісник. – 2012. – Вып. 28, № 1. – С. 12–19.
2. 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 др.] // Міжнародна школа-семінар молодих учених «ФМНТ-2012». – Харків (Україна), 2012. – С. 46.
3. Spectroscopic study of cationic carbocyanine dye binding to $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}$ nanoparticles / T.N. Tkacheva, S.L. Yefimova, V.K. Klochkov [et al.] // 2nd International conference “Nanomaterials: Application & Properties”. – Alushta, 2012. – P. 02NNBM20-1–02NNBM20-2.
4. Spectroscopic study of ordered hybrid complexes formation between dye aggregates and $\text{ReVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ ($\text{Re}=\text{Y, Gd, La}$) nanoparticles / Tatyana N. Tkacheva, Svetlana L. Yefimova, Vladimir K. Klochkov [et al.] // Journal of Molecular Liquids. – 2014. – V. 199. – P. 244–250.
5. Впорядкована адсорбція органічних молекул на неорганічних наночастинках / Ю.В. Малюкін, С.Л. Єфімова, Т.М. Ткачова [та ін.] // Вісник НАНУ. – 2015. – № 6. – С. 34–42.
6. Interaction of cationic dyes with lanthanide vanadate nanoparticles with different size and form: spectroscopic study / T.N. Tkacheva, S.L. Yefimova, V.K. Klochkov [et al.] // Book of abstracts of 9-th International Conference “Electronic Processes in Organic Materials (ICEPOM-9)”. – Lviv (Ukraine), 2013. – P. 99–100.
7. JC-1 derivatives ordered aggregation in colloidal solution of Re vanadate nanoparticles / T.N. Tkacheva, S.L. Yefimova, V.K. Klochkov [et al.] // Book

- of abstracts of the Fourth “International Workshop on Advanced Spectroscopy and Optical Materials (IWASOM-2013)”. – Gdańsk (Poland), 2013. – P. 86.
8. 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 [et al.] // Book of abstracts of Third International Conference “NBP-2013”. – Kharkiv (Ukraine), 2013. – P. 78.
9. Кинетическая и термодинамическая стабильность органических и неорганических наноконтейнеров / С.Л. Ефимова, Т.Н. Ткачева, В.К. Клочков [и др.] // Журнал прикладной спектроскопии. – 2015. Т.82, №2. – С. 206–213.
10. In vitro study of NCs/dyes complexes accumulation and dyes release kinetics in rat hepatocytes / Svetlana L. Yefimova, Tatyana N. Tkacheva, Nataliya S. Kavok [et al.] // Functional Materials. – 2015. – V. 22, №2. – P. 199–206.
11. 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 [et al.] // Biopolymers and Cell. – 2014. – V. 30, № 4. – P. 314–320.
12. 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 [et al.] // Book of Abstracts of XXI Galyna Puchkovska International School-Seminar “Spectroscopy of Molecules and Crystals”. – Beregove (Crimea), 2013. – P. 182.
13. Comparative study of dye release from nanocarriers of different types / T.N. Tkacheva, S.L. Yefimova, V.K. Klochkov [et al.] // 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.
14. 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.
15. Спектрально-люминесцентные свойства производных скварилиевых зондов при взаимодействии с изолированными клетками печени крыс / Т.Н. Ткачева, Н.С. Кавок, И.А. Боровой [и др.] // Биополимеры и клетка. – 2012. – 28. №3. – С. 229–233.
16. Freitas A. Nanotechnology, nanomedicine and nanosurgery / A. Freitas // International Journal of Surgery. – 2005. – V.3, № 4. – P. 242–246.
17. Torchilin V.P. Targeted pharmaceutical nanocarriers for cancer therapy and imaging / V.P. Torchilin // The AAPS Journal. – 2007. – V.9, № 2. – P. E128–E147.
18. Hunziker P. Nanomedicine: shaping the future of medicine / P. Hunziker // Eur J Nanomed. – 2009. – V.2, № 1. – P. 4–53.
19. Review on nano-drugs / Y. Liu, T-S. Niu, L. Zhang [et al.] // Nat Sci. – 2010. – V.2. – P. 41–48.
20. Torchilin V.P. Nanoparticles as drug carriers / V.P.Torchilin. – London: Imperial College Press, 2006. – 724 p.
21. Grossman J.H. Nanotechnology in Cancer medicine / J.H. Grossman, S.E. McNeil // Physics Today. – 2012. – V.65. – P. 38–42.
22. Petros R. Strategies in design of nanoparticles for therapeutic applications / R. Petros, J.M. DeSimone // Nat Rev Drug Disc. – 2010. – V.9. – P. 615–627.
23. Parveen S. Nanoparticles: a boon to drug delivery, therapeutics, diagnostics and imaging / S. Parveen, R. Mishra, S.K. Sahoo // Nanomed: Nanotech, Biol, and Med. – 2012. – V.8. – P. 147–166.
24. Feynman R.P. There's Plenty of Room at the Bottom / R.P. Feynman // Engineering and Science. – 1960. – V.23, № 5. – P. 22–36.
25. Brayden D.J. Controlled release technologies for drug delivery / D.J. Brayden // Drug Discov Today. – 2003. – V.8. – P. 976–978.
26. Nichols J.W. Odyssey of cancer nanoparticles: from injection site to site of action / J.W. Nichols, Y.H. Bae // Nano Today. – 2012. – V.7. – P. 606–618.

27. Nanotechnology in therapeutics: focus on nanoparticles as drug delivery system / S. Bamrungsap, Z. Zhao, T. Chen [et al.] // *Nanomedicine*. – 2012. – V.7, № 8. – P. 1253–1271.
28. <http://www.portalnano.ru>
29. Salata O.V. Applications of nanoparticles in biology and medicine / O.V. Salata // *Journal of Nanobiotechnology*. – 2004. – 2:3.
30. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels / M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin [et al.] // *Science*. – 1998. – V. 281. – P. 2013–2016.
31. Chan W.C.W. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection / W.C.W. Chan, S.M. Nie // *Science*. – 1998. – V. 281. – P. 2016–2018.
32. Antigen/antibody immunocomplex from CdTe nanoparticle bioconjugates / S. Wang, N. Mamedova, N.A. Kotov [et al.] // *Nano Letters*. – 2002. – V. 2. – P. 817–822.
33. Microsphere-mediated delivery of recombinant AAV vectors in vitro and in vivo / C. Mah, I. Zolotukhin, T.J. Fraites [et al.] // *Mol. Therapy*. – 2000. – V. 1. – P. S239.
34. Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses / D. Panatarotto, C.D. Prtidos, J. Hoebeke [et al.] // *Chemistry&Biology*. – 2003. – V. 10. – P. 961–966.
35. The BARC biosensor applied to the detection of biological warfare agents / R.L. Edelstein, C.R. Tamanaha, P.E. Sheehan [et al.] // *Biosensors Bioelectron*. – 2000. – V. 14. – P. 805–813.
36. Nam J.M. Nanoparticles-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins / J.M. Nam, C.C. Thaxton, C.A. Mirkin // *Science*. – 2003. – V. 301. – P. 1884–1886.
37. Mahtab R. Protein-sized quantum dot luminescence can distinguish between "straight", "bent", and "kinked" oligonucleotides / R. Mahtab, J.P. Rogers, C.J. Murphy // *J. Am. Chem. Soc.* – 1995. – V. 117. – P. 9099–9100.

38. Biomimetic processing of nanocrystallite bioactive apatite coating on titanium / J. Ma, H. Wong, L.B. Kong [et al.] // Nanotechnology. – 2003. – V. 14. – P. 619–623.
39. Nano hybrid scratch resistant coating for teeth and bone viscoelasticity manifested in tribology / A. de la Isla, W. Brostow, B. Bujard [et al.] // Mat. Resr. Innovat. – 2003. – V. 7. – P. 110–114.
40. Yoshida J. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes / J. Yoshida, T. Kobayashi // J. Magn. Magn. Mater. – 1999. – V. 194. – P. 176–184.
41. Molday R.S. Immunospecific ferromagnetic iron dextran reagents for the labeling and magnetic separation of cells / R.S. Molday, D. MacKenzie // J. Immunol. Methods. – 1982. – V. 52. – P. 353–367.
42. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR imaging / R. Weissleder, G. Elizondo, J. Wittenburg [et al.] // Radiology. – 1990. – V. 175. – P. 489–493.
43. Cell motility and metastatic potential studies based on quantum dot imaging of phagokinetic tracks / W.J. Parak, R. Boudreau, M.L. Gros [et al.] // Adv. Mater. – 2002. – V. 14. – P. 882–885.
44. Черноусова С. Наночастинки в медицині / С. Черноусова, М. Епплє // Наносистеми, наноматеріали, нанотехнолог. – 2012. – Т. 10, № 4. – С. 667–685.
45. Bellah M.M. Nanostructures for Medical Diagnostics / M.M. Bellah, S. Christensen, S.M. Iqbal // J. Nanomater. – 2012. – V. 2012. – 21p.
46. Azzazy H.M.E. Nanodiagnostics: a new frontier for clinical laboratory medicine / H.M.E. Azzazy, M.M.H. Mansour, S.C. Kazmierczak // Clinical Chemistry. – 2006. – V. 52. – P. 1238–1246.
47. Jain K.K. Nanodiagnostics: application of nanotechnology in molecular diagnostics / K.K. Jain // Clinical Chemistry. – 2007. – V. 53. – P. 2002–2009.
48. Design considerations for tumour-targeted nanoparticles / H.S. Choi, W.H. Liu, F.B. Liu [et al.] // Nat. Nanotechnol. – 2010. – V. 5. – P. 42–47.

49. Nanopharmacy: inorganic nanoscale devices as vectors and active compounds / G.P. Rivera, D. Huhn, L.L. del Mercato [et al.] // Pharmacol. Res – 2010. – V. 62. – P. 115–125.
50. McNeil S.E. Nanotechnology for the biologist / S.E. McNeil // J. Leukoc. Biol. – 2005. – V. 78. – P. 585–594.
51. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging / C. Corot, P. Robert, J.M. Idee [et al.] // Adv. Drug Deliv. Rev. – 2006. – V. 58, № 14. – P. 1471–1504.
52. Gold Nanocages: A Novel Class of Multifunctional Nanomaterials for Theranostic Applications / J.Y. Chen, M.X. Yang, Q.A. Zhang [et al.] // Adv. Funct. Mater. – 2010. – V. 20. – P. 3684–3694.
53. Nguyen J. Nucleic acid delivery: the missing pieces of the puzzle? / J. Nguyen, F.C. Szoka // Acc. Chem. Res. – 2012. – V. 45, № 7. – P. 1153–1162.
54. Efficient intracellular delivery of nucleic acid pharmaceuticals using cell-penetrating peptides / I. Nakase, H. Akita, K. Kogure [et al.] // Acc. Chem. Res. – 2012. – V. 45, № 7. – P. 1132–1139.
55. Chernousova S. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal / S. Chernousova, M. Epple // Angew. Chem. Int. Ed. Engl. – 2013. – V. 52, № 6. – P. 1636–1653.
56. Guo X. Recent advances in nonviral vectors for gene delivery / X. Guo, L. Huang // Acc. Chem. Res. – 2012. – V. 45, № 7. – P. 971–979.
57. Transfection of VEGF(165) genes into endothelial progenitor cells and in vivo imaging using quantum dots in an ischemia hind limb model / H.N. Yang, J.S. Park, D.G. Woo [et al.] // Biomaterials. – 2012. – V. 33, № 33. – P. 8670–8684.
58. Li C. Targeting cancer gene therapy with magnetic nanoparticles / C. Li, L. Li, A.C. Keates // Oncotarget. – 2012. – V. 3, № 4. – P. 365–370.
59. Kesharwani P. A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA / P. Kesharwani, V. Gajbhiye, N.K. Jain // Biomaterials. – 2012. – V. 33, № 29. – P. 7138–7150.

60. Targeted delivery of SiRNA to CD33-positive tumor cells with liposomal carrier systems / M. Rothdiener, D. Muller, P.G. Castro [et al.] // J. Controll. Releaseю – 2010. – V. 144, № 2. – P. 251–258.
61. Tumor-homing glycol chitosan/polyethylenimine nanoparticles for the systemic delivery of siRNA in tumor-bearing mice / M.S. Huh, S.Y. Lee, S. Park [et al.] // J. Controll. Releaseю – 2010. – V. 144, № 2. – P. 134–143.
62. Lipid-based nanoparticles for siRNA delivery in cancer therapy: paradigms and challenges / L.C. Gomes-da-Silva, N.A. Fonseca, V. Moura [et al.] // Acc. Chem. Res. – 2012. – V. 45, № 7. – P. 1163–1171.
63. Smart PEGylated gold nanoparticles for the cytoplasmic delivery of siRNA to induce enhanced gene silencing / M. Oishi, J. Nakaogami, T. Ishii [et al.] // Chem. Lett. – 2006. – V. 35. – P. 1046–1047.
64. Li S.D. Efficient gene silencing in metastatic tumor by siRNA formulated in surface-modified nanoparticles / S.D. Li, S. Chono, L. Huang // J. Control. Release. – 2008. – V. 126, № 1. – P. 77–84.
65. Carbon Nanotubes: Solution for the Therapeutic Delivery of siRNA? / D.L. Kirkpatrick, M. Weiss, A. Naumov [et al.] // Materials. – 2012. – V. 5, № 2. – P. 278–301.
66. PLGA modified Fe₃O₄ nanoclusters for siRNA delivery / X. Peng, J. Chen, T. Cheng [et al.] // Mater. Lett. – 2012. – V. 81. – P. 102–104.
67. Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications / Z.X. Li, J.C. Barnes, A. Bosoy [et al.] // Chem. Soc. Rev. – 2012. – V. 41, № 7. – P. 2590–2605.
68. Functionalisation of calcium phosphate nanoparticles by oligonucleotides and their application to gene silencing / V. Sokolova, A. Kovtun, O. Prymak [et al.] // J. Mater. Chem. – 2007. – V. 17. – P. 721–727.
69. Klesing J. Freeze-dried cationic calcium phosphate nanorods as versatile carriers of nucleic acids (DNA, siRNA) / J. Klesing, S. Chernousova, M. Epple // J. Mat. Chem. – 2012. – V. 22, № 1. – P. 199–204.

70. The history of photodetection and photodynamic therapy / R. Ackroyd, C. Kelty, N. Brown [et al.] // Photochem. Photobiol. – 2001. – V. 74, № 5. – P. 656–669.
71. MacDonald I.J. Basic principles of photodynamic therapy / I.J. MacDonald, T.J. Dougherty // J. of Porphyrins and Phthalocyanines. – 2001. – V. 5, № 2. – P. 105–129.
72. Tracking of multimodal therapeutic nanocomplexes targeting breast cancer in vivo / R. Bardhan, W.X. Chen, M. Bartels [et al.] // Nano Lett. – 2010. – V. 10, № 12. – P. 4920–4928.
73. Calcium phosphate nanoparticles as efficient carriers for photodynamic therapy against cells and bacteria / J. Schwiertz, A. Wiehe, S. Graefe [et al.] // Biomaterials. – 2009. – V. 30, № 19. – P. 3324–3331.
74. Positively charged calcium phosphate/polymer nanoparticles for photodynamic therapy / J. Klesing, A. Wiehe, B. Gitter [et al.] // J. Mater. Sci. Mater. Med. – 2010. – V. 21, № 3. – P. 887–892.
75. Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments / L. Zhang, F.X. Gu, J.M. Chan [et al.] // Clin. Pharmacol. Ther. – 2008. – V. 83, № 5. – P. 761–769.
76. Jain K.K. Advances in the field of nanooncology / K.K. Jain // BMC Medicine. – 2010. – V. 8. – P. 83.
77. Liposomal drug delivery system from laboratory to clinic / N.A. Kshirsagar, S.K. Pandya, G.B. Kirodian [et al.] // J. Postgrad Med. – 2005. – V. 51. – P. 5–15.
78. Нанотехнології, наномедицина, нанофармакологія: стан, перспективи наукових досліджень, впровадження в медичну практику / В.Ф. Москаленко, Л.Г. Розенфельд, Б.О. Мовчан [та ін.] // І національний конгрес «Людина та ліки – Україна»: тези (Київ, 7-11 квітня 2008р.). – Київ, 2008. – С. 167–168.

79. Унзикер П. Возможности нанотехнологии в медицине: миф или реальность? / П. Унзикер, А. Сисакян // Новый армянский медицинский журнал. – 2007. – Т. 1, № 1. – С. 28–31.
80. Fenske D.B. Liposomal nanomedicines: an emerging field / D.B. Fenske, A. Chonn, P.R. Cullis // Toxicol Pathol. – 2008. – V. 36, № 1. – P. 21–29.
81. Polimeric micelles for drug targeting / H.M. Aliabadi, A. Lavasanifar, A. Mahmud [et al.] // Journa Drug Target. – 2007. – V. 15. – P. 553–584.
82. Allen T.M. Advantages of liposomal delivery systems for anthracyclines / T.M. Allen, F.J. Martin // Semin. Oncol. – 2004. – V. 31. – P. 5–15.
83. Joguparthi V. Determination of intraliposomal pH and its effect on membrane partitioning and passive loading of a hydrophobic camptothecin, DB-67 / V. Joguparthi, S. Feng, B.D. Anderson // International journal of pharmaceutics. – 2008. – V. 352, № 1-2. – P. 17–28.
84. Разработка лиофилизированной липосомальной лекарственной формы цифелина / Е.А. Котова, Е.В. Игнатева, О.Л. Орлова [и др.] // Химико-фармацевтический журнал. – 2012. – Т.46, № 5. – С. 39–42.
85. Липосомальные препараты для вспомогательной терапии в онкологии Ю.М. Краснопольский, А.Е. Степанов, В.И. Швец [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2012 . – Т.11, № 3. – С. 29а.
86. Lichtenberg D. Liposomes: preparation, characterisation and preservation / D. Lichtenberg, Y. Barenholz // Journal of pharmaceutical science and technology. – 1988. –V. 33. – P. 337–462.
87. Доклиническое изучение эффективности липосомальной лекарственной формы фотосенса для фотодинамической терапии / З.С. Смирнова, И.Ю. Кубасова, О.А. Макарова [и др.] // Российский биотерапевтический журнал. – 2003. – Т.2, № 4 – С. 40–45.
88. Murcia M. Biofunctionalization of fluorescent nanoparticles / M.J. Murcia, C. A. Naumann // Nanotechnologies for Life Sciences. – 2005. – V. 1. – P. 1–39.

89. Bouzigues C. Biological applications of rare-earth based nanoparticles / C. Bouzigues, Th. Gacoin, A. Alexandrou // ACS Nano. – 2011. – V.5, № 11. – P. 8488–8505.
90. Luminescent mesoporous $\text{LaVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ core-shell nanoparticles: synthesis, characterization, biocompatibility and their cytotoxicity / A. Anees, A. Manawwer, P. Joselito, [et al.] // J. Mater. Chemistry. – 2011. – V. 27. – P. 19310–19316.
91. Lewinski N. Cytotoxicity of Nanoparticles / N. Lewinski, V. Colvin, R. Drezek // Small. – 2008. – V. 1. – P.26–49.
92. Nonfunctionalized nanocrystals can exploit a cell's active transport machinery delivering them to specific nuclear and cytoplasmic compartment / I. Nabiev, S. Mitchell, A. Davies, [et al.] // Nano Letters. – 2007. – V. 7, № 11. – P. 3452–3461.
93. JianBo L. Fluorescent nanoparticles for chemical and biological sensing / L. JianBo, Y.XiaoHai, He XiaoXiao // Science China Chemistry. – 2011. – V. 54, № 8. – P.1157–1176.
94. Levine A.K. A new highly efficient red-emitting cathodoluminescent phosphor ($\text{YVO}_4:\text{Eu}$) for color television / A.K Levine, F.C. Palilla // Appl. Phys. Lett. — 1964. —V. 5. —P. 118.
95. A study of X-ray luminescence and spectral compatibility of europium-activated yttrium-vanadate ($\text{YVO}_4:$ Eu) screens for medical imaging / G. Panayiotakis, D. Cavouras, I. Kandarakis [et al.] // Applied Physics A: Materials Science and Processing. – 1996. – V. 5, № 62. – P. 483–486.
96. Fabrication, patterning and optical properties of nanocrystalline $\text{YVO}_4:\text{A}$ ($\text{A} = \text{Eu}^{3+}, \text{Dy}^{3+}, \text{Sm}^{3+}, \text{Er}^{3+}$) phosphor films via sol-gel soft lithography / M. Yu, J. Lin, Z. Wang [et al.] // Chem Mater. – 2002. – V. 14 – P. 2224–2231.
97. Эффект специфического взаимодействия нанокристаллов $\text{GdYVO}_4:\text{Eu}^{3+}$ с ядрами клеток / В.К.Клочков, Н.С.Кавок, Ю.В.Малюкин [и др.] // Доклады НАН Украины. – 2010. – Т.10, № 81. – С. 81–86.

98. Functional activity of ehrlich carcinoma cancer stem cells after treatment by orthovanadate-based nanoparticles / A.N. Goltsev, V.K. Klochkov, N.S. Kavok [et al.] // Annals of Oncology. – 2014. – V. 25, № 4. – P. 569–573.
99. Гольцов А.М., Дубрава Т.Г., Останков М. В., Бабенко Н.М., Бондарович М.О., Гаєвська Ю.О., Челомбитько О.В., Клочков В.К., Кавок Н.С., Малюкин Ю.В. Спосіб інгібування росту пухлини // Рішення про видачу деклараційного патенту № 12444/ЗА/14 від 22.05.2014.
100. Park S. Direct oxidation of hydrocarbons in a solid-oxide fuel cell / S. Park, J.M. Vohs, R.J. Gorte // Nature. – 2000. – V. 404. – P. 265–267.
101. Electron localization determines defect formation on ceria substrates / F. Esch, S. Fabris, L. Zhou [et al.] // Science. – 2005. – V. 309. – P. 752–755.
102. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy / D. Peer, J.M. Karp, S. Hong [et al.] // Na. Nanotechnol. – 2007. – V. 2. – P.751–760.
103. Sun C. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery / C. Sun, J.S.H. Lee, M. Zhang // Adv. Drug Deliver. Rev. – 2008 – V. 60, № 11. – P. 1252–1265.
104. Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles / M. Hirst, A.S. Karakoti, R.D. Tyler [et al.] // Small. – 2009. – V. 5, № 24. – P. 2848–2856.
105. Влияние кислородной нестехиометрии на формирование люминесцентных центров в нанокристаллах диоксида церита / П.О. Максимчук, О.Г. Вягин, И.И. Беспалова и др.] // Биоф. вестник. – 2012. – Вып. 28, № 1. – С. 68–74.
106. Vacancy Engineered Ceria Nanostructures for Protection from Radiation-Induced Cellular Damage / R.W. Tarnuzzer, J. Colon, S. Patil [et al.] // Nano Lett. – 2005. – V. 5, № 12. – P.2573–2577.
107. Rzagalinski B.A. Nanoparticles and Cell Longevity / B.A. Rzagalinski // Technol. Cancer Res. T. – 2005. – V. 4, № 6. – P. 583–712.

108. The role of cerium redox state in the SOD mimetic activity of nanoceria / E.G.Heckert, A.S.Karakoti, S.Seal [et al.] // Biomaterials. – 2008. – V. 29 – P. 2705–2709.
109. Таранткл В.З. Толковый биотехнологический словарь. Русско-английский / В.З. Таранткл. – М.: Языки славянских культур, 2009. – 936 с.
110. Проблема направленного транспорта лекарственных веществ в клинической практике / А.К. Бегдуллаев, А.Т. Маншарипова, А.К. Ждусипов [и др.] // Терапевтический вестник. – 2008. – Т. 17, № 1. – С. 32–36.
111. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots / X. Gao, Y. Cui, R.M. Levenson [et al.] // Nat. Biotechnol. – 2004. – V. 22. – P. 969–976.
112. Allen T.M. Drug delivery systems: entering the mainstream / T.M. Allen and P.R. Cullis // Science. – 2004. – V. 303. – P. 1818–1822.
113. Neutrophil transepithelial migration: evidence for sequential, contact-dependent signaling events and enhanced paracellular permeability independent of transjun / H.A. Edens, B.P. Levi, D.L. Jaye [et al.] // Eur. J. Cancer. – 2002. – V. 28. – P. 1124–1128.
114. Doxorubicin encapsulated in liposomes containing surface-bound polyethylene glycol: pharmacokinetics, tumor localization, and safety in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma / D.W. Northfelt, F.J. Martin, P. Working [et al.] // J. Clin. Pharmacol. – 1996. – V. 36. – P. 55–63.
115. Ultrasonically activated chemotherapeutic drug delivery in a rat model / J.L. Nelson, B.L. Roeder, J.C. Carmen [et al.] // Cancer Res. – 2002. – V. 62. – P. 7280–7283.
116. Drug targeting using thermally responsive polymers and local hyperthermia/ D.E. Meyer, B.C. Shin, G.A. Kong [et al.] // J Control Release. – 2001. – V. 74. – P. 213–224.

117. Woodle M.C. Surface-modified liposomes: assessment and characterization for increased stability and prolonged blood circulation / M.C. Woodle // Chem. Phys. Lipids. – 1993. – V. 64. – P. 249–262.
118. Allen T.M. Effect of liposome size and drug release properties on pharmacokinetics of encapsulated drug in rats / T.M. Allen, J.M. Everest // J. Pharmacol Exp Ther. – 1983. – V. 226. – P. 539–544.
119. Polymer-drug conjugates: towards a novel approach for the treatment of endocrine-related cancer / R. Duncan, M.J. Vicent, F. Greco [et al.] // Endocr. Relat. Cancer. – 2005. – V. 12. – P. S189–S199.
120. Hepatic drug targeting: phase I evaluation of polymer-bound doxorubicin / L.W. Seymour, D.R. Ferry, D. Anderson [et al.] // J. Clin. Oncol. – 2002. – V. 20. – P. 1668–1676.
121. Guillemard V. Prodrug chemotherapeutics bypass p-glycoprotein resistance and kill tumors in vivo with high efficacy and target-dependent selectivity / V. Guillemard, H.U. Saragovi // Oncogene. – 2004. – V. 23. – P. 3613–3621.
122. Guillemard V. Novel approaches for targeted cancer therapy / V. Guillemard, H.U. Saragovi // Curr. Cancer Drug Targets. – 2004. – V. 4. – P. 313–326.
123. A new approach for the treatment of malignant melanoma: enhanced antitumor efficacy of an albumin-binding doxorubicin prodrug that is cleaved by matrix metalloproteinase-2 / A.M. Mansour, J. Drebs, N. Esser [et al.] // Cancer. Res. – 2003. – V. 63. – P. 4062–4066.
124. Sapra P. Ligand-targeted liposomes for cancer treatment / P. Sapra, P. Tyagi, T.M. Allen // Curr. Drug. Deliv. – 2005. – V. 2. – P. 369–381.
125. Improved therapeutic responses in a xenograft model of human B lymphoma (Namalwa) for liposomal vincristine versus liposomal doxorubicin targeted via anti-CD19 IgG2a or Fab' fragments / P. Sapra, E.H. Moase, J. Ma [et al.] // Clin. Cancer. Res. – 2004. – V. 10. – P. 1100–1111.
126. Maruyama K. In vivo targeting by liposomes / K. Maruyama // Biol. Pharm. Bull. – 2000. – V. 23. – P. 791–799.

127. Wright S. Antibody-directed liposomes as drug-delivery vehicles/ S. Wright, L. Huang // Advanced Drug Delivery Rev. – 1989. – V. 5. – P. 343–389.
128. Targeted accumulation of polyethylene glycol-coated immunoliposomes in infarcted rabbit myocardium / V.P. Torchilin, A.L. Klibanov, L. Huang [et al.] // FASEB J. – 1992. – V. 6. – P. 2716–2719.
129. Molecular mechanissm of liposome and immunoliposome steric protection with poly(ethylene glycol) / V.P. Torchilin, M.I. Papisov, A.A. Bogdanov [et al.]. Boca Raton: CRC Press, 1995. – P. 51–62.
130. A new strategy for attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes resulting in efficient targeting to cancer cells / T.M. Alien, E. Brandeis, C.B. Hansen [et al.] // Biochim Biophys Acta. – 1995. – V. 1237. – P. 99–108.
131. Allen T.M. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy / T.M. Allen // Nature Reviews. Cancer. – 2002. – V. 2, № 10. – P. 750–763.
132. Jiang W. Size selective mechanism governs engineered nanoparticle-induced membrane receptor trafficking / W. Jiang, B.Y. Kim, J.T. Rutka [et al.] // Nature Nanotechnology. – 2008. – V. 3, № 3. – P. 145–150.
133. Болдырев А.А. Биомембранология: Учебное пособие / Болдырев А.А., Кайвяряйнен Е.И., Илюха В.А. – Петрозаводск: Изд-во Кар НЦ РАН, 2006. – 226 с.
134. Doherty G.J. Mechanisms of endocytosis / G.J. Doherty, H.T. McMahon // Annu. Rev. Biochem. – 2009. – V. 78. – P. 857–902.
135. Conner S.D. Regulated portals of entry into the cell / S.D. Conner, S.L. Schmid // Nature. – 2003. – V. 422. – P. 37–44.
136. Canton I. Endocytosis at the nanoscale / I. Canton, G. Battaglia // Chem. Soc. Rev. – 2012. – V. 41. – P. 2718–2739.
137. Ding H.M. Theoretical and Computational Investigations of Nanoparticle–Biomembrane Interactions in Cellular Delivery / H.M. Ding, Y.Q. Ma // Small. – 2015. – V. 11. – P. 1055–1071.

138. Molecular Biology of the Cell / [B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis et al.]. – [4-th edition]. – New York: Garland Science, 2002. – 278 p.
139. Structural and thermal analysis of lipid vesicles encapsulating hydrophobic gold nanoparticlesG.V. White, Y.J. Chen, J. Roder-Hanna [et al.] // ACS Nano. – 2012. – V. 6. – P. 4678–4685.
140. Nanoparticle-induced permeability of lipid membranes/ S. Pogodin, M. Werner, J. Sommer [et al. // ACS Nano. – 2012. – V. 6. – P. 10555– 10561.
141. Gurtovenko A.A. Defect-mediated trafficking across cell membranes: insights from in silico modeling / A.A. Gurtovenko, J. Anwar, L. Vattulainen // Chem. Rev. – 2010. – V. 110. – P. 6077–6103.
142. Ginzburg V.V. Modeling the thermodynamics of the interaction of nanoparticles with cell membranes / V.V. Ginzburg, S. Balijepalli // Nano Lett. – 2007. – V. 7. – P. 3716–3722.
143. Lakowicz J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy / J.R. Lakowicz. – New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999.
144. Valeur B. Molecular Fluorescence. Principles and Applications / B. Valeur. – Weinheim: Wiley, 2002.
145. Demchenko A.P. Introduction in fluorescence sensing / A.P. Demchenko. – Amsterdam: Springer Verlag, 2009. – 580 p.
146. Demchenko A.P. Nanoparticles and nanocomposites for fluorescence sensing and imaging / A.P. Demchenko // Methods Appl. Fluoresc. – 2013. – V. 1. – P. 1–28.
147. Rongen H. Liposomes and immunoassays / H. Rongen, A. Bult and W. Bennekom // J Immunol. Meth. – 1997. – V. 204. – P. 105–133.
148. Sengupta P. Fluorescence resonance energy transfer between lipid probes detects natoscopic heterogeneity in the plasma membrane in live cells / P. Sengupta, D. Holowka, B. Baird // Biophys J. – 2007. – V. 92. – P. 3564–3574.

149. Fluorescent lipid probes in the study of viral membrane fusion / R. Blumenthal, S.A. Gallo, M. Viard [et al.] // Chem Phys Lipids. – 2002. – V. 116. – P. 39–55.
150. New BODIPY lipid probes for fluorescence studies of membranes / I.A. Boldyrev, X. Zhai, M.M. Monsen [et al.] // J. Lipid Res. – 2007. – V. 48, № 7. – P. 1518–1532.
151. Jain B. Fluorescence resonance energy transfer between DPH and Nile Red in a lipid bilayers / B. Jain, K. Das // Chem Phys Lett. – 2006. – V. 433. – P. 170–174.
152. Lebedenko A.N. Pseudoisocyanine J-aggregate to optical waveguiding crystallite transition: microscopic and microspectroscopic exploration / A.N. Lebedenko, G.Ya. Gyralchuk, A.V. Sorokin [et al.] // J. Phys. Chem. B. – 2006. – V. 110. – P. 17772–17775.
153. Руководство пользователя SPECORD® PC 200/205/210/250. Analytil Jena AG. – 2005. – 43 с.
154. Kobayashi T. J-aggregates / T. Kobayashi. – Singapore: World Scientific Publishing Co, 2012. – 528 p.
155. Руководство пользователя Olympus IX71. – Olympus America Inc. – (<http://www.olympus.ua>)
156. Руководство пользователя Ocean Optics, USA. – (<http://oceanoptics.com>)
157. Klochkov V.K. Coagulation of luminescent colloid nGdVO₄:Eu solutions with inorganic electrolytes / V.K. Klochkov // Functional materials. – 2009. – V. 16. – P. 141–144.
158. The influence of agglomeration of nanoparticles on their superoxide dismutase-mimetic activity / V.K. Klochkov, A.V. Grigorova, O.O. Sedyh [et al.] // Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. – 2012. – V. 409. – P. 176–182.
159. Colloidal surfactants / K. Shinoda, T. Nakagawa, H. Tamamushi, T. Isemura. – New York and London: Academic Press, 1963. – 69 p.

160. Mui B. Extrusion technique to generate liposomes of defined size / B. Mui, L. Chow, M.J. Hope // Methods Enzymol. – 2003. – V. 367. – P. 3–14.
161. Hauglang R.P. Handbook of fluorescent probes and research products / R.P. Hauglang. – New York: Molecular probes, 2002. – 676 p.
162. Petrenko A.Yu. Deriving of rat's hepatocytes by non-enzyme method the detoxification and respiratory activity / A.Yu. Petrenko, A.N. Sukach, A.D. Roslyakov // Biokhim. – 1991. – V. 56. – P. 1647–1651.
163. Characteristics of nLnvo₄:Eu³⁺ (Ln = La, Gd, Y, Sm) sols with nanoparticles of different shapes and sizes / V.K. Klochkov, A.V. Grigorova, O.O. Sedyh [et al.] // Journal of Applied Spectroscopy. – 2012. – V. 79, № 5. – P. 726–730.
164. Теренин А.Н. Фотоника молекул красителя / А.Н. Теренин. – Л.: Наука, 1967. – 616 с.
165. The interaction between gold nanoparticles and cationic and anionic dyes: enhanced UV-visible absorption / N. Narband, M. Uppal, C.W. Dunnill, [et al.] // Phys. Chem. Chem.Phys. – 2009. – V. 11. – P. 10513–10518.
166. Mekkawi D. Interaction and photostability od some xanthenes and selected azo sensitizing dyes with TiO₂ nanoparticles / D.Mekkawi, M.S.F. Abdel-Mottaleb // International Journal of Photoenergy. – 2005. – V. 7. – P.95–101.
167. Inbaray B.S. Adsorption characteristics of magnetite nanoparticles coated with a biopolymer poly(γ -glutamic acid) / B.S. Inbaray, B.H. Chen // Bioresource Technology. – 2011. – V. 102. – P. 8868–8876.
168. Preferential and enhanced adsorption of different dyes on iron oxide nanoparticles: a comparative study / B. Saha, S. Das, J. Saika [et al.] // J. Phys. Chem. C. – 2011. – V. 115. – P. 8024–8033.
169. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1 / S.T. Smiley, M. Reers, C. Mottola-Hartshorn [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1991. – V. 88. – P. 3671–3675.

170. JC-1, but not DiOC₆(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess $\Delta\Psi$ changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis / S. Salvioli, A. Ardizzone, C. Franceschi, [et al.] // FEBS Letters. – 1997. – V. 411. – P. 77–82.
171. Building highly sensitive dye assemblies for biosensing from molecular building blocks / R.M. Jones, L. Lu, R. Helgeson [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2001. – V. 98, № 26. – P. 14769–14772.
172. JC-1: a very sensitive fluorescent probe to test Pgp activity in adult acute myeloid leukemia / O. Legrand, J.-Y. Perrot, G. Simonin [et al.] // Blood. – 2001. – V. 97, № 2. – 502–508.
173. Kasha M. Molecular excitons in small aggregates, in: Spectroscopy of the excited state / M.Kasha; [ed. by B. Di Bartolo]. – NY: Premium Press, 1976. – P. 337–363.
174. McRae E.G. Enhancement of phosphorescence ability upon aggregation of dye molecules / E.G. McRae, M. Kasha // J.Chem.Phys. – 1958. – V. 28. – P. 721–722.
175. Давыдов А.С. Теория молекулярных экситонов / А.С. Давыдов. – М.: Наука, 1968. – 296 с.
176. Kasha M. The exciton model in molecular spectroscopy / M.Kasha, H.R. Rawls, M. A. El-Bayoumi // Pure Appl.Chem. – 1965. – V. 11 – P. 371–392.
177. Kasha M. Spectroscopy of the excited state / M. Kasha [ed. By B.Di Barloto]. – New York: Premium Press, 1976. – P. 337–363.
178. Czikkely V. Extended dipole model for aggregates of dye molecules / V. Czikkely, H.D. Forsterling, H. Kuhn. //Chem. Phys. Lett. – 1970. – V. 6. – P. 207–210.
179. Hassanzader A. Molecular exciton theory calculation based on experimental results for Solophenyl red 3BL azo dye–surfactants interactions / A. Hassanzader, A. Zeini-Isfahani, M.H. Habibi // Spectrochimica Acta A. – 2006. – V. 64. – P. 464–476.

180. Size and shape influence of luminescent orthovanadate nanoparticles on their accumulation in nuclear compartments of rat hepatocytes / V. Klochkov, N. Kavok, G. Grygorova [et al.] // Material Science and Engineering C – 2013. – V. 33. – P. 2708–2712.
181. Owen S.C. Polymeric Micelle Stability / S.C. Owen, D.P.Y. Chan, M.S. Shoichet // Nano Today. – 2012. – V. 7. – P. 53–65.
182. Lu J. Stability of self-assembled polymeric micelles in serum / J. Lu, S.C. Owen, M.S. Shoichet // Macromolecules. – 2011. – V. 44. – P. 6002–6008.
183. Spectroscopic study of interactions between dye molecules in micelle and liposome nanovolumes / S.L. Yefimova, T.N. Tkacheva, I.Yu. Kurilchenko [et al.] // Journal of Applied Spectroscopy. – 2013. – V. 79, № 6. – P. 914–921.
184. Importance of micellar kinetics in relation to technological processes / A. Patist, J.R. Kanicky, P.K. Shukla [et al.] // J. Colloid and Interface Science. – 2002. – V. 245. – P. 1–15.
185. Torchilin V. Liposomes: a practical approach (Practical Approach Series 264) / V. Torchilin and V. Weissig. – Oxford: Oxford Univ Press, 2003. – 400 p.
186. Microspectroscopic study of liposome-to-cell interaction revealed by Förster resonance energy transfer / S.L. Yefimova, I.Yu. Kurilchenko, T.N. Tkacheva [et al.] // Journal of Fluorescence. – 2014. – V. 24, № 2. – P. 403–409.
187. Noncovalent Encapsulation Stabilities in Supramolecular Nanoassemblies / S. Jiwpanich, Ja-H. Ryu, S. Bickerton [et al.] // J. Am. Chem. Soc. – 2010. – V. 132. – P. 10683–10685.
188. Бартон Д.К. Общая органическая химия. Том 7 / Д.К. Бартон, У.Д. Оллис. – Москва: Химия, 1988. – 91 с.
189. Штиллер В. Уравнение Аррениуса и неравновесная кинетика / В. Штиллер. – Москва: Мир, 2000. – с. 28–29.
190. Семиохин И.А. Физическая химия: Учебник / И.А. Семиохин. – Москва: изд-во МГУ, 2001. – 72 с.

191. Block copolymer nanostructures / T. Smart, H. Lomas, M. Massignani [et al.] // *Nano Today*. – 2008. – V. 3. – P. 38–46.
192. Yang Z. Magnetic, luminescent and mesoporous core-shell structured composite material as drug carrier / P. Yang Z, Z. Quan, A. Hou // *Biomat.* – 2009. – V. 30. – P. 4780–4795.
193. Torchilin V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers / V.P. Torchilin // *Nat. Rev. Drug. Discov.* – 2005. – V. 4. – P. 145–160.
194. Liposomal drug delivery, a novel approach: PLA Rosomes / A. Kozubek, J. Gubernator, E. Przeworska [et al.] // *Acta Biochim Polon.* – 2000. – V. 47. – P. 639–649.
195. Liposomal drug delivery systems – clinical applications / P. Goval, K. Goval, S.G.V. Kumar [et al.] // *Acta Pharm.* – 2005. – V. 55. – P. 1–25.
196. Liposomes: a novel drug delivery system / T.V. Thulasiramaraju, Babu AMS Sudhakar, A.A. Arunachalam [et al.] // *Inter J Biopharm.* – 2012. – V. 3. – P. 5–16.
197. Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании клеток, мембран и липопротеинов. – М.: Наука, 1989. – 277 с.
198. Verma A. Effect of surface properties on nanoparticle-cell interactions / A. Verma, F. Stellacci // *Small*. – 2010. – V. 6. – P. 12–21.
199. Role of nanoparticle surface functionality in the disruption of model cell membranes / B.Y. Moghadam, W.-C. Hou, C. Corredor [et al.] // *Langmuir*. – 2012. – V. 28. – P. 16318–16326.
200. Goldstein J.L. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis / J.L. Goldstein, R.G.W. Anderson, M.S. Brown // *Nature*. – 1979. – V. 279. – P. 679–685.
201. Release of hydrophobic molecules from polymer micelles into cell membranes revealed by Forster resonance energy transfer imaging / H. Chen, S. Kim, L. Li [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2008. – V. 105. – P. 6596–6601.