

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Гвоздев Даниил Александрович

**Фотосенсибилизирующие свойства гибридных комплексов
фталоцианинов и флуоресцентных наночастиц**

03.01.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

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

- Научный руководитель** – *Пащенко Владимир Захарович, доктор физико-математических наук, профессор*
- Научный руководитель** – *Максимов Евгений Георгиевич, кандидат биологических наук*
- Официальные оппоненты** – *Разживин Андрей Павлович, доктор физико-математических наук, профессор, заведующий отделом фотосинтеза и флуоресцентных методов исследований НИИ физико-химической биологии*
Лощенов Виктор Борисович, доктор физико-математических наук, профессор, заведующий лабораторией лазерной биоспектроскопии института общей физики РАН
Сластникова Татьяна Александровна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики внутриклеточного транспорта института биологии гена РАН

Защита диссертации состоится «___» _____ 2019 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.02 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.24, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики, аудитория «Новая».

E-mail: maristra@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/154448305/>

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

М.Г. Страховская

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Фотодинамическое действие – термин, впервые предложенный Г. Таппейнером для описания эффекта, оказываемого некоторыми соединениями (фотосенсибилизаторами, ФС) на биологические объекты под действием света в присутствии кислорода [Tappeiner et al., 1907]. В результате взаимодействия кислорода с триплетным возбужденным состоянием ФС образуются активные формы кислорода (АФК), которые оказывают деструктивное воздействие на различные компоненты клетки. Данное явление лежит в основе фотодинамической терапии опухолей (ФДТ) и фотодинамической инактивации микроорганизмов (ФДИ) [Henderson et al., 1992; Hamblin et al., 2004]. Неспецифичность молекул-мишеней воздействия АФК препятствует выработке резистентности у микроорганизмов, а при локальном облучении поврежденных тканей в процедуре ФДТ наблюдаются лишь минимальные побочные эффекты, оказываемые ФС на здоровые ткани [Macdonald et al., 2001].

В настоящее время наиболее часто в качестве ФС применяются соединения тетрапиррольного ряда, например, металлокомплексы фталоцианинов. Данные соединения обладают значительным поглощением в красной области спектра, что позволяет добиться большей эффективности фотодинамического действия за счет увеличения глубины проникновения красного света в биологические ткани. Однако небольшие значения сечения поглощения фталоцианинов в районе 400 – 600 и 700 – 1100 нм препятствуют использованию всей видимой и инфракрасной (ИК) областей спектра для осуществления фотодинамического эффекта.

Перспективным способом повысить эффективное сечение поглощения молекул ФС является создание гибридных комплексов (ГК) ФС с флуоресцентными наночастицами [Samia et al., 2003]. В таком комплексе наночастица выступает в качестве донора энергии электронного возбуждения для ФС за счет безызлучательного переноса энергии по индуктивно-резонансному механизму (Forster resonance energy transfer, FRET [Lakowicz 2006]). Для этого можно осуществлять облучение наночастиц в составе ГК как в видимой области спектра (полупроводниковые нанокристаллы), так и в ИК-области (апконверсионные наночастицы).

За последнее десятилетие было опубликовано большое количество работ, посвященных изучению переноса энергии от наночастиц к ФС в гибридном комплексе [Borissevich et al., 2013; Martynenko et al., 2014; Nyokong et al., 2016; Yaghini et al., 2014; Zenkevich et al., 2015]. Однако, до конца невыясненным является вопрос о механизмах связывания компонентов в ГК – за счет электростатических, гидрофобных, ковалентных и

др. взаимодействий – что может определять поведение комплекса в биологических средах. Кроме того, недостаточно данных об изменениях спектральных свойств ФС при образовании ГК; открытым остается вопрос оптимальной стехиометрии гибридных комплексов. Все эти факторы могут оказывать влияние на эффективность переноса энергии от наночастицы на ФС и, следовательно, на эффективность фотодинамического действия с использованием ГК.

Целью данной работы является создание и изучение фотофизических характеристик ГК флуоресцентных наночастиц и замещенных металлофталоцианинов (Фц) для их использования в фотодинамической инактивации биологических объектов.

Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие **задачи**:

1. изучить характер электростатических и гидрофобных взаимодействий при образовании ГК в растворе заряженных металлофталоцианинов и флуоресцентных наночастиц, установить локализацию молекул фталоцианина в гибридном комплексе;
2. исследовать эффективность преобразования энергии электронного возбуждения в образованных ГК наночастица – фталоцианин и способность фталоцианина генерировать активные формы кислорода в составе ГК;
3. изучить взаимодействие ГК с раковыми клетками.

Основные положения, выносимые на защиту:

Созданы водорастворимые гибридные комплексы полупроводниковых нанокристаллов и замещенных фталоцианинов алюминия или цинка, в которых наблюдается значительное увеличение эффективного сечения поглощения фотосенсибилизатора в сине-зеленой области спектра.

При формировании ГК важную роль играют электростатические силы; молекулы фталоцианина локализуются внутри полимерной оболочки наночастиц.

При облучении ГК инфракрасным или зеленым светом в результате безызлучательного переноса энергии возбуждения от флуоресцентных наночастиц фталоцианины генерируют синглетный кислород; максимальный эффект наблюдается при низких значениях стехиометрии ГК (менее 10 молекул фталоцианина в комплексе с полупроводниковым нанокристаллом).

ГК, ковалентно сшитые с трансферрином, эффективно проникают внутрь клеток линии А431, где за счет переноса энергии возбуждения от наночастицы к Фц вызывается фотодинамический эффект.

Научная новизна работы. Детально изучено взаимодействие ФС с наночастицами, покрытыми полимерной оболочкой. Обнаружены изменения спектральных свойств ФС при образовании ГК с наночастицей и их влияние на эффективность донорно-акцепторных взаимодействий. Обнаружено и исследовано влияние ионной силы раствора на эффективность переноса энергии в ГК. Функциональная модификация поверхности наночастицы в составе ГК позволила осуществить направленный транспорт ГК в клетки при сохранении фотодинамических свойств комплекса.

Научная и практическая значимость. Установлены закономерности взаимодействия компонентов ГК, что может быть использовано для создания и оптимизации высокоэффективных фотосенсибилизаторов т. н. третьего поколения. Определена оптимальная стехиометрия комплекса, обеспечивающая наибольшее усиление фотодинамических свойств ФС в составе ГК. Показано, что ФЦ сохраняют локализацию в составе ГК при проникновении в раковые клетки, что подтверждает возможность применения нековалентных ГК для задач ФДТ. Результаты исследования имеют практическое значение в области фотодинамической инактивации микроорганизмов и терапии рака.

Апробация работы. Основные результаты работы докладывались на семинарах кафедры биофизики биологического факультета МГУ, Российских и международных конференциях (Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», International School and Conference «Saint-Petersburg OPEN», International Conference Photosynthesis Research for Sustainability, Congress of the European Society for Photobiology и др.).

Публикации. Основные результаты по теме диссертации опубликованы в 5 статьях, 3 из которых в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, а также 3 тезисах в сборниках докладов научных конференций.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, трёх глав и заключения. Полный объём диссертации составляет 148 страниц с 52 рисунками и 12 таблицами. Список литературы содержит 209 наименований.

Содержание работы

Во **введении** и первой главе («Обзор литературы») обоснована актуальность исследований, проводимых в рамках данной диссертационной работы, формулируется цель, ставятся задачи работы. Обзор литературы систематизирует современные данные о флуоресцентных наночастицах, фотосенсибилизаторах на основе фталоцианинов и особенностях их гибридных комплексов.

В **обзоре литературы** описаны особенности использования фталоцианинов в качестве фотосенсибилизаторов. Представлены современные данные о таких флуоресцентных частицах, как полупроводниковые нанокристаллы (квантовые точки, КТ) и апконверсионные наночастицы (АКНЧ). Проведен анализ структурных и люминесцентных свойств этих частиц, важных в перспективе использования КТ и АКНЧ как светособирающих структур и наноплатформ для доставки молекул ФС к клеткам-мишеням. Анализируются данные о фотодинамических свойствах и архитектуре ГК флуоресцентных наночастиц и ФС.

Вторая глава содержит описание объектов и методов, а также используемых реактивов, процедуры приготовления препаратов и обработки полученных данных.

Для работы были выбраны водорастворимые наночастицы, состоящие из неорганического кристаллического ядра и полимерной оболочки. Мы использовали положительно заряженные (оболочка «polyT-APS» с аминогруппами) CdSeCdTe/ZnS квантовые точки (далее КТ600(+)), отрицательно заряженные (оболочка с карбоксигруппами) CdTe квантовые точки (далее КТ600(-)) и CdSe/ZnS квантовые точки (далее КТ580, КТ600, КТ620 и КТ640) производства ООО НТИЦ «Нанотех-Дубна», Россия. АКНЧ были представлены нанокристаллами NaYF₄(Er/Tm,Yb)/NaYF₄ с оболочкой из ПЭГ, модифицированного аминогруппами (Mesolight, США). В качестве ФС использовали фталоцианины цинка – октакис(пиридиниометил)фталоцианин ZnФц(+8) и октакарбоксифталоцианин ZnФц(-8), а также фталоцианины алюминия – холинилзамещенные фталоцианины со средней степенью замещения 4, 4.5 и 6.5 (AlФц(+4), AlФц(+4.5) и AlФц(+6.5)), и октакарбоксифталоцианин AlФц(-8). Все фталоцианины были предоставлены ФГУП ГНЦ «НИОПИК».

Кинетики затухания флуоресценции с пикосекундным временным разрешением регистрировали с помощью измерительного комплекса на основе системы однофотонного счета SimpleTau-140 (Becker & Hickl, Германия). Для возбуждения флуоресценции КТ и Фц использовали светодиодные лазеры LDH-405 и PLS-445/660 (InTop, Россия): длительность

импульса 25 пс, частота следования импульсов 10 МГц, энергия одиночного импульса 13 пДж, длина волны возбуждения флуоресценции 405, 445 и 655 нм, соответственно. Сигнал флуоресценции по световоду, расположенному под углом 90° к направлению возбуждающего света, поступал на полихроматор MS 125 (Becker & Hickl, Германия). Далее флуоресценцию регистрировали в режиме счета фотонов с помощью 16-канального детектора PML-16-1-C (Becker & Hickl, Германия) в диапазоне 530 – 730 нм при использовании дифракционной решетки с разрешением 12.5 нм/канал. Среднюю длительность флуоресценции рассчитывали по формуле:

$$\tau = \sum_i a_i \tau_i , \quad (1)$$

где τ_i – время i-й компоненты, a_i – нормированный вклад i-й компоненты ($\sum a_i = 1$). Кинетики затухания флуоресценции аппроксимировали суммой трех экспонент для КТ и одной экспонентой для ФЦ.

Спектры люминесценции и длительность люминесценции АКНЧ были измерены с помощью флуориметра Fluorolog-3 (Horiba-Jobin-Yvon, Франция) с кинетической приставкой Fluoro-Hub. При регистрации спектров и кинетик затухания люминесценции для возбуждения был использован светодиодный лазер с длиной волны излучения 980 нм (1.6 Вт, 12 VDC, Laserlands, Китай).

Для изучения скорости вращения молекул регистрировали кинетики затухания анизотропии флуоресценции. Для этого кинетику затухания флуоресценции фотосенсибилизатора в наносекундном диапазоне регистрировали при двух положениях широкополосных поляризационных фильтров WP25M-UB (Thorlabs, США), расположенных соответственно на пути возбуждающего света перед кюветой с образцом и в канале регистрации сигнала флуоресценции от образца. Кинетику затухания анизотропии флуоресценции $r(t)$ вычисляли по формуле

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)} , \quad (2)$$

где $I_{\parallel}(t)$ и $I_{\perp}(t)$ – кинетики затухания флуоресценции при параллельных и скрещенных поляризаторах, соответственно. Для неподвижно фиксированной в пространстве молекулы фталоцианина значение анизотропии флуоресценции максимально и составляет 1/7 [Феофилов 1956]; при вращении молекулы значение анизотропии флуоресценции уменьшается. Кинетику затухания анизотропии флуоресценции аппроксимировали суммой экспонент $r(t) = \sum_i^n r_{0i} e^{-t/\theta_i}$, где r_{0i} – максимальная (фундаментальная) анизотропия i-ой компоненты, θ_i – корреляционное время вращения i-ой компоненты, n = 1, 2. Измерения проводили в термостатируемой ячейке Qpod 2e (Quantum Northwest, США) при температуре +25°C.

Спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометра USB2000 (Ocean Optics, США) с многоканальным детектором ILX511A (Sony, Япония). Для регистрации стационарных спектров флуоресценции использовали CCD спектрометр USB4000 (Ocean Optics, США) с детектором TCD1304AP (Toshiba, Япония).

Скорость генерации синглетного кислорода молекулами Фц в составе ГК оценивали при помощи химической ловушки дифенилизобензофурана (ДФБФ) [Krieg 1993]. Для селективного возбуждения Фц в составе ГК использовали светодиод с максимумом излучения на длине волны 625 нм (ограничение фильтром, пропускающим свет с длинами волн более 600 нм; мощность 230 мВт). Скорость генерации синглетного кислорода молекулами Фц в комплексе с АКНЧ оценивали при помощи п-нитрозодиметиланилина (RNO) в присутствии имидазола [Kraljic et al., 1978].

Измерение ζ -потенциала и гидродинамического радиуса наночастиц проводили с помощью метода динамического светорассеяния на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Англия). Исследование кристаллической структуры ядра наночастиц проводили на аналитическом просвечивающем электронном микроскопе JEOL JEM-2100. Анализ размера частиц по выборке проводили с помощью программы ImageJ. Расчет параметров переноса энергии в ГК производили с помощью программы PhotochemCAD.

В экспериментах по изучению проникновения ГК внутрь животных клеток использовали культуру клеток эпидермоидной карциномы человека линии A431. Клетки выращивали на покровных стеклах в 2 мл полной среды DMEM + 10% эмбриональной телячьей сыворотки в течение 48 часов до достижения 60% конфлюентности монослоя. Далее клетки инкубировали в течение 60 минут в присутствии 0.5 мкМ ГК КТ и Фц. По истечении инкубации проводили отмывку теплой средой DMEM. Для исследования активности анализируемых веществ стекла помещали в камеру для приживленного наблюдения клеток. Ядра клеток выявляли витальным флуоресцентным красителем Hoechst 33342. Изображения клеток получали на микроскопе Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 (Nikon Corporation, Япония) с объективом Apo TIRF 60 \times /1.49 Oil при +37°C и 5% CO₂.

Для осуществления ковалентной сшивки трансферрина и КТ к 104 мкл 20 мкМ раствора КТ в 30 мМ ПБС добавили 200 мМ EDC и 500 мМ NHS до конечных концентраций EDC и NHS, равных соответственно 2 и 5 мМ (соотношение КТ:EDC:NHS равно 1:100:250). Образец инкубировали при +25°C в течение 15 мин и инактивировали реакцию добавлением избытка меркаптоэтанола (конечная концентрация 130 мМ). Далее проводили смену буфера для активированных КТ методом гель-фильтрации на колонке NAP-5 (GE Healthcare, США), уравновешенной 30 мМ ПБС. К 500 мкл полученного раствора активированных КТ в 30 мМ

ПБС добавляли 100 мкл 253 мкМ холотрансферрина (10-ти кратный избыток холотрансферрина над квантовыми точками) в том же буфере и инкубировали при +25°C в течение 2.5 ч для их сшивки. Инактивировали реакцию добавлением к реакционной смеси 1 М Tris-HCl (рН 7.6) до конечной концентрации 20 мМ и инкубировали полученный препарат в течение 30 мин. Смену буфера для конъюгатов КТ и холотрансферрина (КТ-Тф) проводили методом гель-фильтрации на колонке NAP-10 (GE Healthcare, США), уравновешенной 30 мМ ПБС.

Конъюгат КТ-Тф и оставшийся избыток холотрансферрина существенно отличаются по своим молекулярным массам, что позволяет эффективно разделить их методом гель-фильтрации. Гель-фильтрацию проводили на колонке Superdex 200 Increase 10/300 (GE Healthcare, США), уравновешенной буфером Tris-HCl (рН 7.6), содержащем 150 мМ NaCl, 0.1 мМ ЭДТА, и 3 мМ β-меркаптоэтанол, при скорости элюции 1.2 мл/мин. Окрашенные фракции исключенного объема колонки, содержащие целевой конъюгат КТ-Тф объединяли как препарат конъюгатов. Полученный образец использовали для дальнейшей работы.

Оценку цитотоксического эффекта исследуемых веществ производили с использованием МТТ-теста. Клетки линии A431 вносили в лунки 96-луночного планшета в количестве по 3000 клеток в 100 мкл среды DMEM, содержащей 10% ЭТС, и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 3 дней до достижения 70% конфлюентности монослоя. МТТ-тест проводили на 4й день культивирования. Клетки инкубировали с исследуемыми веществами в течение 1 часа при 37°C и 5% CO₂. Для облучения использовали синий светодиод SOLIS-445C (Thorlabs, США) с максимумом излучения на длине волны 445 нм. Средняя доза, полученная клетками в каждой лунке, составила 42.9 ± 2.7 Дж. Для достижения цитотоксического эффекта исследуемых веществ образцы после облучения инкубировали 4 часа при 37°C и 5% CO₂. После инкубации в лунки вносили по 10 мкл раствора МТТ-реагента в фосфатно-солевом буфере (5 мг/мл) и инкубировали открытую плашку в течение 4 часов при 37°C и 5% CO₂. После этого отбирали из лунок среду и растворяли образовавшиеся в ходе реакции фиолетовые кристаллы формазана в ДМСО. Последующее измерение оптической плотности элюата проводили на длине волны 540 нм на микропланшетном ридере Infinite® 200 PRO (Tecan).

Все вычисления проводили с помощью пакетов программ OriginPro 9.1 (OriginLab Corporation, США) и SPCImage (Becker & Hickl, Германия).

Третья глава посвящена описанию результатов и их обсуждению.

1. Локализация молекулы фталоцианина в комплексе с наночастицами

При смешивании водных растворов наночастиц и фталоцианинов наблюдали тушение люминесценции наночастиц, что свидетельствует о переносе энергии в ГК, образующемся самопроизвольно, вероятно за счет взаимодействия заряженных групп оболочки КТ и боковых заместителей в молекуле Фц. Чтобы выявить влияние электростатических сил на процесс образования комплекса, исследовали эффективность тушения люминесценции наночастиц в смеси положительно или отрицательно заряженных КТ и поликатионных Фц (рис. 1А). Показано, что уменьшение величины квантового выхода люминесценции отрицательно заряженных КТ в присутствии Фц более выражено, чем у положительно заряженных КТ. Таким образом, взаимодействие между разноименно заряженными КТ и Фц оказывается более эффективным вследствие электростатического притяжения. Наблюданное незначительное тушение люминесценции КТ в смеси одноименно заряженных компонентов при использованных концентрациях веществ (~ 50 нМ), по-видимому, обусловлено менее эффективным связыванием Фц с наночастицей.

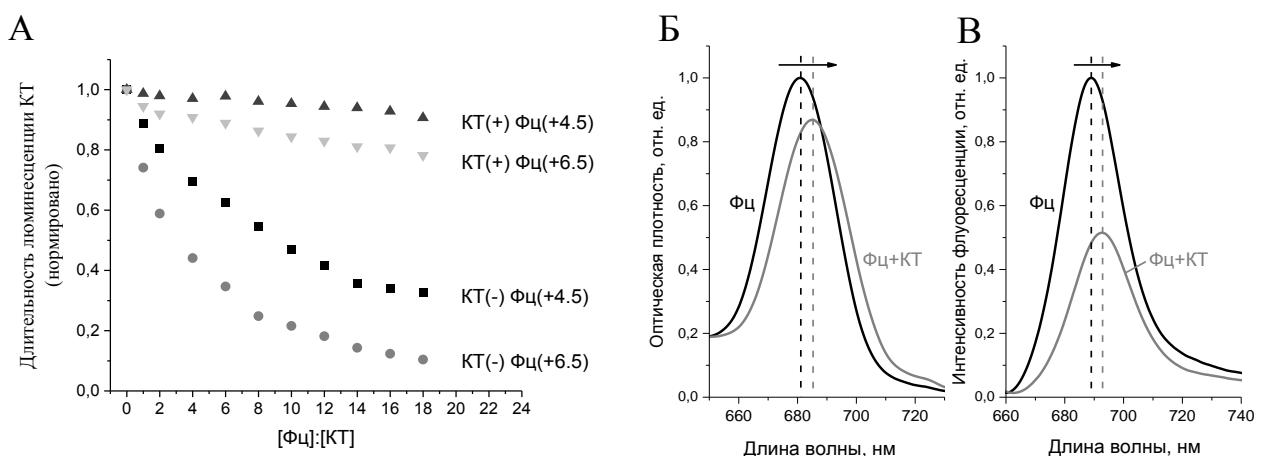


Рисунок 1. А. Тушение люминесценции положительно и отрицательно заряженных КТ поликатионными Фц. Длительность люминесценции КТ нормирована на ее значение в растворе КТ без Фц. Длина волны возбуждения люминесценции КТ 455 нм. **Б-В.** Изменения длинноволнового пика поглощения (Б) и спектра флуоресценции (В) AlФц(+6.5) при добавлении КТ580. Длина волны селективного возбуждения флуоресценции Фц 655 нм. Интенсивность флуоресценции и поглощение нормированы на соответствующие значения в растворе Фц без КТ

Анализ спектральных и фотофизических свойств поликатионных Фц в присутствии отрицательно заряженных CdSe/ZnS КТ (рис. 1Б) показывает, что при добавлении эквимолярного количества КТ к буферному раствору Фц происходит батохромный сдвиг спектров поглощения и флуоресценции Фц, изменяется величина Стоксова сдвига. Кроме

того, уменьшается коэффициент молярной экстинкции ε Фц в области длинноволнового пика поглощения, а также уменьшается интенсивность флуоресценции Фц вследствие уменьшения величины ε и квантового выхода флуоресценции. Поскольку батохромный сдвиг спектров тетрапиррольных соединений наблюдается при переходе из полярной в более гидрофобную среду [Гуринович 1963], можно заключить, что молекулы Фц проникают в полимерную оболочку КТ.

Так как при взаимодействии с наночастицами происходит изменение спектральных свойств Фц, адсорбционную способность КТ разного размера оценивали по величине батохромного смещения спектра флуоресценции $\Delta\lambda_{\text{Фц}}(+4.5)$ в растворе при титровании его раствором КТ (рис. 2). Поскольку кривая изменения величины батохромного сдвига выходит на плато при увеличении концентрации КТ, можно считать, что все молекулы Фц оказываются в составе ГК. Из кривых на рисунке 2 можно рассчитать максимальное количество молекул Фц, способных связаться с одной наночастицей. Количество сайтов связывания Фц на каждой КТ представлено в таблице 1, откуда следует, что разные КТ отличаются по способности связывать Фц. Поскольку различия в размерах кристаллического ядра составляет для использованных КТ малую величину (~ 1 нм), количество сайтов связывания Фц определяется в первую очередь размером полимерной оболочки наночастиц (табл. 1).

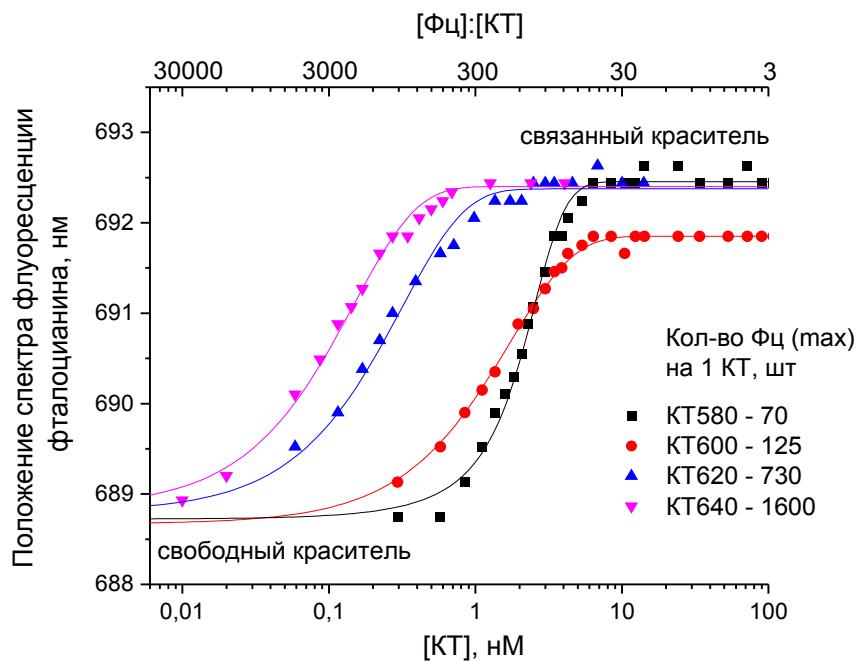


Рисунок 2. Батохромное смещение спектра флуоресценции $\Delta\lambda_{\text{Фц}}(+4.5)$ в зависимости от концентрации и типа КТ с ядром CdSe/ZnS. Длина волны возбуждения флуоресценции Фц 655 нм

Таблица 1. Структурные характеристики КТ с ядром CdSe/ZnS. Количество монослоев ZnS в защитной оболочке оценивали, исходя из характерной толщины монослоя 0.31 нм [Grabolle et al., 2008]. ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

	Измерение поглощения	ПЭМ		Толщина слоя ZnS, нм (в скобках количество монослоев ZnS)	Максимальное количество адсорбированных молекул Фц	Радиус наночастиц, нм
	Радиус CdSe, нм	Радиус ядра, нм	Полидисперсность, %			
KT580	1.7	5±0.4	13.2	3.3 (10)	70	21.6±1.5
KT600	1.8	3.6±0.5	22.2	1.8 (6)	125	5.5±0.6
KT620	2.45	5.25±0.4	23.5	2.8 (9)	730	26.3±4.1
KT640	3.1	5.2±0.4	11	2.1 (7)	1600	42.5±0.4

Чтобы установить локализацию молекул красителя в ГК, необходимо определить три линейных параметра системы:

1. радиус наночастицы (метод динамического светорассеяния)
2. радиус ядра наночастицы (метод просвечивающей электронной микроскопии)
3. расстояние между донором (КТ) и акцептором (Фц) энергии.

Расстояние между КТ и Фц в комплексе рассчитывали согласно теории FRET, используя данные об эффективности переноса энергии в ГК (табл. 2-1). Локализация молекулы Фц (на примере AlФц(+6.5)) в полимерной оболочке отрицательно заряженных КТ с ядром CdSe/ZnS показана на рисунке 3А. Расстояние от молекулы Фц внутри полимерной оболочки всех КТ до ядра частицы составляет $\sim 0.5 \pm 1$ нм. Таким образом, полимерная оболочка данных КТ позволяет молекулам Фц с достаточно большим зарядом проникать практически до кристаллического ядра частицы.

Рассмотрим ГК Фц с КТ620 (рис. 3Б). При локализации Фц в ГК на расстоянии ~ 5.4 нм до центра наночастицы можно расположить порядка 250 молекул красителя; однако, количество сайтов связывания Фц на данной КТ составляет 730. Это означает, что молекулы Фц расположены также и в объеме полимерной оболочки КТ, оценить который можно, вычитая объем кристаллического ядра из общего объема наночастицы. Учитывая количество сайтов связывания (730) Фц на КТ620, максимальную концентрацию Фц в ГК с данной КТ можно оценить в 17 мМ. Это говорит о том, что полимерная оболочка наночастиц обладает значительными адсорбционными свойствами.

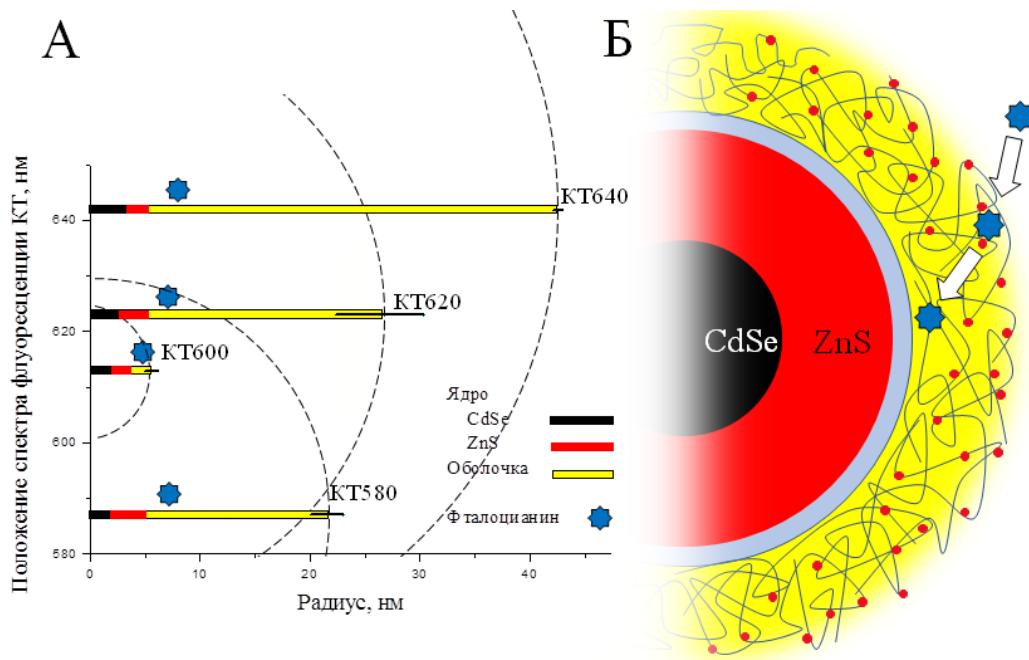


Рисунок 3. **А** Линейные размеры квантовых точек состава CdSe/ZnS, а также положение молекул AlФц(+6.5) в гибридном комплексе, вычисленное на основе экспериментальных данных по тушению флуоресценции КТ. **Б** Схема взаимодействия AlФц(+6.5) с KT620. Голубым цветом выделен слой триоктилфосфиноксида (прекурсора в синтезе КТ)

2. Перенос энергии возбуждения в комплексе наночастица - фталоцианин

При возбуждении в спектральной области поглощения наночастиц мы наблюдали тушение люминесценции наночастиц в присутствии Фц, причем снижается и интенсивность люминесценции, и ее длительность, что говорит о динамическом характере тушения. Флуоресценция акцептора энергии (Фц), наоборот, разгорается (рис. 4). Обнаруженные изменения спектральных свойств флуорофоров характеризуют безызлучательный перенос энергии в ГК по механизму FRET.

Эффективность переноса энергии W в теории FRET определяется как доля поглощенных донором фотонов, энергия которых аккумулировалась акцептором:

$$W = \frac{k_{et}}{k_{et} + k_f} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}, \quad (3)$$

$$R_0 = \varphi_d \chi^2 \frac{9000 \ln 10}{128 \pi^5 N_A n^4} J, \quad (4)$$

где φ_d – квантовый выход флуоресценции донора в отсутствие акцептора, χ^2 – фактор, описывающий взаимную ориентацию в пространстве дипольных моментов переходов в молекулах донора и акцептора, τ_d – время жизни возбужденного состояния донора в отсутствие акцептора, R – расстояние между центрами молекул донора и акцептора, N_A – число Авогадро, n – показатель преломления среды, J – интеграл перекрывания спектра флуоресценции донора энергии и спектра поглощения акцептора энергии, k_{et} и k_f – константы

скоростей переноса энергии и флуоресценции, соответственно. Расстояние R_0 (радиус Ферстера) между донором и акцептором энергии соответствует значению $W = 50\%$. В эксперименте эффективность переноса энергии определяется по тушению флуоресценции донора энергии:

$$W = 1 - \frac{\varphi_{da}}{\varphi_d}, \quad (5)$$

где φ_{da} – квантовый выход флуоресценции донора в присутствии акцептора.

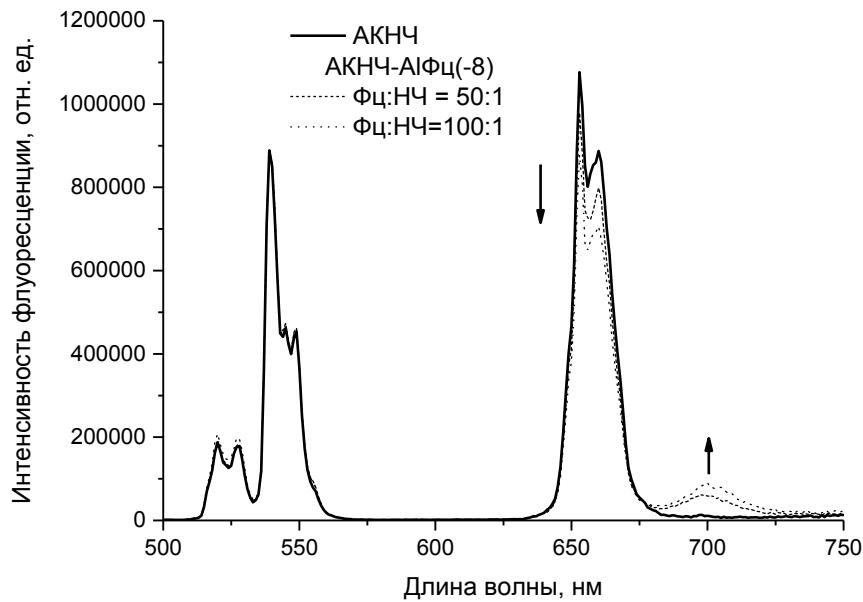


Рисунок 4. Спектр люминесценции АКНЧ в контроле в водном растворе и в присутствии возрастающих концентраций АlФц(-8). Стрелка вниз обозначает тушение длинноволновой полосы люминесценции АКНЧ, стрелка вверх – увеличение интенсивности сенсибилизированной флуоресценции Фц. Длина волны возбуждения люминесценции АКНЧ 980 нм

Способность Фц глубоко проникать в полимерную оболочку КТ может зависеть от количества заряженных боковых заместителей молекулы Фц. Для изучения локализации Фц в ГК в зависимости от заряда молекулы Фц мы использовали поликатионные фталоцианины алюминия с различным числом периферических заместителей и отрицательно заряженные КТ, отличающиеся положением максимума люминесценции.

В программе PhotoChemCad по кривым тушения люминесценции КТ были рассчитаны параметры модели FRET, сведенные в табл. 2. Из таблицы 2-5 видно, что расстояние между КТ и Фц слабо зависит от количества боковых заместителей молекулы Фц, что свидетельствует об отсутствии влияния заряда на локализацию поликатионных Фц в ГК. Эффективность переноса энергии (табл. 2-1) от КТ к Фц в ГК возрастает в ряду КТ580 < КТ620 < КТ640 как следствие увеличения величины интеграла перекрывания J спектра

люминесценции КТ со спектром поглощения Фц. Эффективность переноса энергии, а также константа скорости переноса энергии (табл. 2-3) в ГК увеличиваются в ряду $\text{AlФц}(+4) < \text{AlФц}(+4.5) < \text{AlФц}(+6.5)$, что обусловлено увеличением величины параметра J в той же последовательности. Кроме того, $\text{AlФц}(+6.5)$ обладает большим коэффициентом молярной экстинкции, чем $\text{AlФц}(+4)$ и $\text{AlФц}(+4.5)$, что дополнительно увеличивает эффективность переноса энергии. С увеличением концентрации Фц эффективность тушения люминесценции наночастиц увеличивалась.

Таблица 2. Параметры FRET для различных ГК отрицательно заряженных CdSe/ZnS КТ и поликатионных фталоцианинов алюминия ($[\text{КТ}] = 20 \text{ нМ}$, $[\text{Фц}] = 2 \text{ мкМ}$, $\Phi_{\text{ц}}:\text{КТ} = 100:1$). 1 – эффективность переноса энергии (%), 2 – интеграл перекрывания спектра люминесценции КТ и спектра поглощения Фц ($*10^{-13} \text{ см}^6$), 3 – константа скорости переноса энергии ($*10^8 \text{ с}^{-1}$), 4 – ферстеровский радиус (\AA), 5 – расстояние между донором и акцептором энергии в комплексе (\AA)

		KT580	KT600	KT620	KT640
1	AlФц(+4)	20.9±0.4	80.0±0.5	47.2±2.7	87.1±2.4
	AlФц(+4.5)	44.5±3.0	80.6±0.1	64.0±2.5	84.5±3.0
	AlФц(+6.5)	80.1±1.0	76.8±0.5	94.6±1.1	92.3±0.3
2	AlФц(+4)	1.621	4.052	4.139	6.981
	AlФц(+4.5)	1.426	2.956	3.759	6.485
	AlФц(+6.5)	2.903	5.678	7.139	11.762
3	AlФц(+4)	0.33	6.55	1.48	5.44
	AlФц(+4.5)	1.41	7.97	2.37	3.73
	AlФц(+6.5)	6.85	7.41	33.11	10.00
4	AlФц(+4)	47.9	38.7	55.6	51.2
	AlФц(+4.5)	46.8	36.7	54.7	50.6
	AlФц(+6.5)	52.7	41.0	60.9	55.9
5	AlФц(+4)	59.7	30.7	56.7	37.3
	AlФц(+4.5)	48.6	29.0	49.7	38.2
	AlФц(+6.5)	41.8	33.6	37.8	37.0

Если производить облучение раствора ГК в области длин волн, где высокая поглощательная способность наночастиц сочетается с низкой поглощательной способностью Фц, то вследствие переноса энергии в ГК увеличится концентрация молекул Фц в возбужденном состоянии. Это должно приводить к увеличению общей интенсивности флуоресценции Фц и генерации синглетного кислорода. Можно рассчитать коэффициент усиления флуоресценции Фц по формуле

$$A = \frac{I_{AD}}{I_A} - 1 , \quad (6)$$

где I_{AD} и I_A – интенсивность флуоресценции акцептора энергии (Фц) в присутствии и в отсутствие донора энергии (КТ), соответственно. Величина A увеличивается в рядах $\text{AlФц}(+4) < \text{AlФц}(+4.5) < \text{AlФц}(+6.5)$ и $\text{KT580} < \text{KT600} < \text{KT620} < \text{KT640}$, что совпадает с таковой последовательностью для интеграла перекрывания спектров J в данных парах КТ и Фц. В эксперименте мы наблюдали максимальное значение параметра A при $[\text{Фц}]:[\text{КТ}] = 1:1$; с увеличением концентрации Фц величина A уменьшается (рис. 5А). При увеличении соотношения $[\text{Фц}]:[\text{КТ}]$ до величин $\sim 10^2$ быстро увеличивается концентрация Фц в полимерной оболочке наночастицы, что приводит к самотушению флуоресценции Фц. Концентрационные эффекты для Фц в составе ГК имеют место при более низких концентрациях Фц по сравнению с однокомпонентным раствором Фц (рис. 5Б).

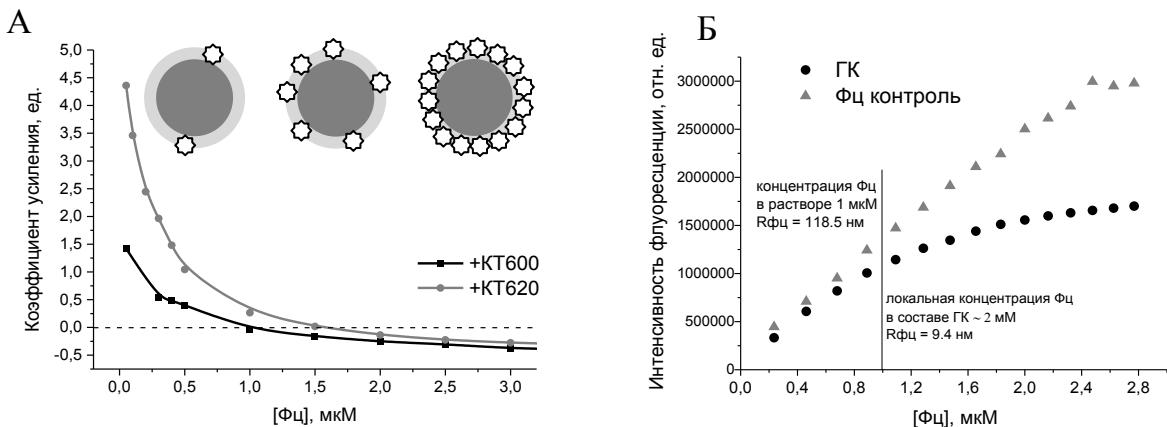


Рисунок 5. А. Концентрационная зависимость коэффициента усиления флуоресценции $\text{AlФц}(+4.5)$ в парах с различными КТ в водном растворе. Длина волны возбуждения флуоресценции 405 нм. Инкубация в течение получаса **Б.** Изменение интенсивности флуоресценции $\text{AlФц}(+6.5)$ в ГК с KT580 и в контроле без КТ в зависимости от концентрации Фц. $R_{\text{Фц}}$ – среднее расстояние между двумя молекулами Фц в среде (вода в случае однокомпонентного раствора Фц и полимерная оболочка КТ в случае раствора ГК). Длина волны возбуждения флуоресценции Фц 655 нм

Наибольшие значения коэффициент усиления флуоресценции Фц принимает в сине-зеленой области спектра (рис. 6А), что согласуется с наибольшей разницей значений коэффициентов молярной экстинкции КТ и Фц в этой области спектра. Таким образом, КТ

действительно способны увеличивать эффективное сечение поглощения ФС в видимой области спектра и могут успешно применяться как дополнительные светособирающие антенны для фотосенсибилизаторов.

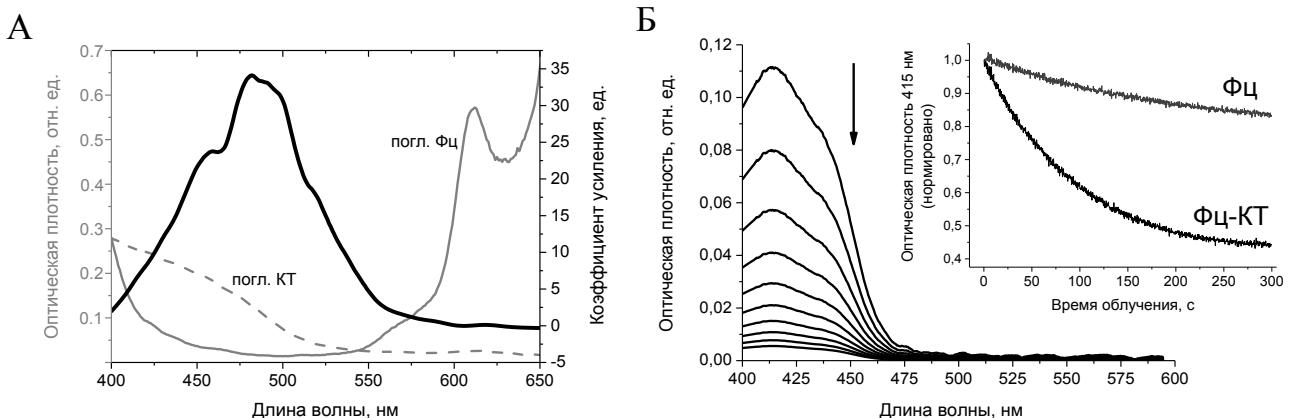


Рисунок 6. А. Зависимость коэффициента усиления флуоресценции АlФц(+6.5) в ГК с КТ620 ($[\text{Фц}]:[\text{КТ}] = 3:1$) от длины волны облучения. Длина волны регистрации флуоресценции Фц 695 нм. Серым цветом показаны спектры поглощения Фц и КТ в данном образце. **Б.** Изменение спектра поглощения ДФБФ в растворе ГК при облучении светом с длиной волны 460 нм. На вставке – снижение оптической плотности ДФБФ на длине волны 415 нм при тех же условиях

Далее мы исследовали способность полученных ГК к генерации синглетного кислорода. Количественную оценку данных осуществляли путем аппроксимации кривых снижения оптической плотности ДФБФ (рис. 6Б) затухающей экспонентой $F(x) = A_0 + Ae^{(-x/\tau)}$, откуда определяли константу скорости фотоокисления ДФБФ $1/\tau$, пропорциональную скорости генерации синглетного кислорода фталоцианином. Установлено, что за счет переноса энергии возбуждения от КТ значительно увеличивается выход синглетного кислорода фталоцианинами алюминия в сине-зеленой области спектра (рис. 7), константа скорости фотоокисления ДФБФ возросла в 3.5 – 3.6 раза. Отметим, что свободные КТ при тех же экспериментальных условиях не генерируют синглетный кислород.

Таким образом было показано, что перенос энергии возбуждения от наночастицы к Фц приводит к увеличению количества молекул Фц в возбужденном состоянии, что выражается в увеличении выхода синглетного кислорода. Наибольшей величины данные эффекты достигают в сине-зеленой области спектра при значениях $[\text{Фц}]:[\text{КТ}]$, близких к 1:1.

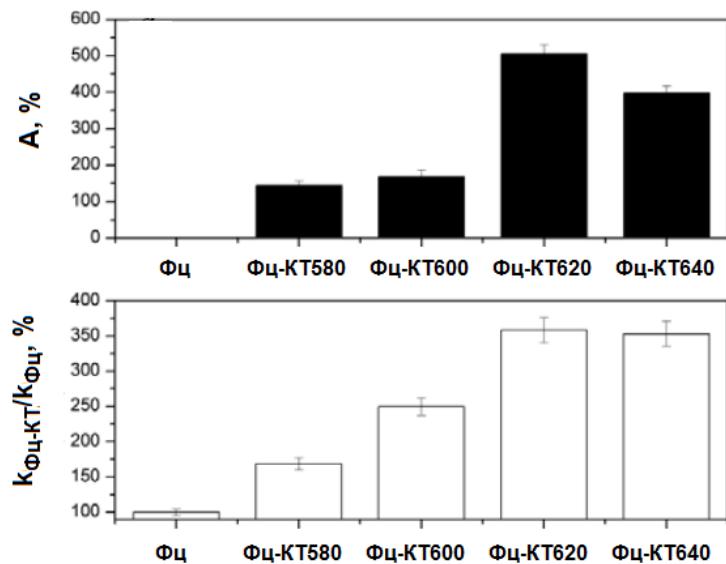


Рисунок 7. Коэффициент усиления А флуоресценции AlФц(+6.5) в ГК с отрицательно заряженными КТ состава CdSe/ZnS (верхняя панель), а также отношение констант скорости фотоокисления ДФБФ в тех же растворах ГК к соответствующим константам для индивидуального раствора AlФц(+6.5) (нижняя панель). Облучение синим светом (460 нм, 285 мкМ квантов/с \cdot м 2 ; общее время облучения 5 минут)

3. Стабильность гибридных комплексов, полученных путем самосборки в водных растворах

Ионная сила среды является важным параметром, определяющим электростатическое взаимодействие Фц и КТ и, следовательно, способна оказать значительное влияние на фотодинамические свойства и устойчивость ГК *in vitro* и *in vivo*. Мы исследовали эффективность переноса энергии в разноименно заряженных ГК в растворах со значением ионной силы 0 – 0.2 М (ионная сила плазмы крови человека и большинства других биологических жидкостей близка к 0.15). Установлено, что расстояние между КТ и Фц в комплексе не зависит от значения ионной силы раствора. Однако при увеличении значения ионной силы раствора мы наблюдали увеличение подвижности молекул фталоцианина внутри полимерной оболочки КТ; корреляционное время вращения молекул Фц, оцениваемое по скорости затухания анизотропии флуоресценции Фц, составило в комплексе с КТ в воде ~ 3 нс, а в растворе со значением ионной силы 0.2 М уменьшилось до ~ 2 нс.

Одновременно обнаружено, что эффективность переноса энергии W от КТ к Фц возрастает при увеличении значения ионной силы раствора. Можно предположить, что при увеличении подвижности молекул акцептора за время жизни возбужденного состояния донора (~ 10 нс) может увеличиваться среднее значение ориентационного фактора χ^2 , определяющего эффективность переноса энергии в ГК согласно теории FRET.

Наряду с описанными эффектами влияния ионной силы раствора мы не обнаружили

зависимости спектральных свойств ГК от значения рН среды. Величина эффективности переноса энергии, а также спектральные свойства Фц в ГК с квантовыми точками не менялись в диапазоне значений рН от 5.0 до 9.0.

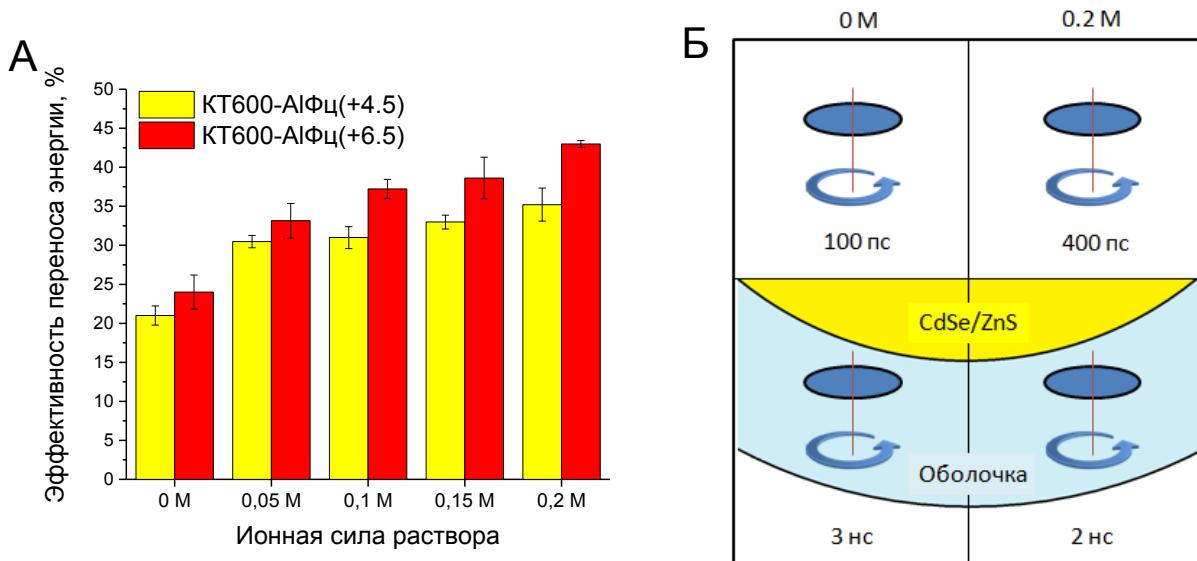


Рисунок 8. А Эффективность переноса энергии в ГК KT600 и поликатионных фталоцианинов алюминия в зависимости от величины ионной силы раствора. Длина волны возбуждения флуоресценции КТ 455 нм. **Б** Корреляционные времена вращения молекулы Фц в растворе и в ГК с квантовой точкой в зависимости от значения ионной силы раствора

4. Доставка гибридных комплексов в раковые клетки

Поскольку неспецифическая адсорбция является неэффективным механизмом проникновения ГК в клетки-мишени, мы осуществили направленную доставку ГК в животные клетки, используя трансферрин (Тф) в качестве агента, опосредующего эндоцитоз.

Активность холо-формы трансферрина оценивали по проникновению белка, меченого флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ), в клетки линии А431 (эпидермоидная карцинома человека). Конъюгат ФИТЦ-Тф инкубировали с клетками в течение 15 минут, после чего исследовали распределение конъюгата внутри клеток (рисунок 9, 4). Видно, что Тф эффективно проникает в клетки путем эндоцитоза и демонстрирует везикулярную локализацию.

Ковалентную сшивку холо-Тф и КТ580 проводили, используя карбодиимидный метод. Соотношение Тф:КТ в комплексе после очистки образца от не связавшихся компонентов оказалось близко к 1:1. Методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) было установлено, что конъюгат КТ-Тф проникает внутрь клеток и локализуется в перинуклеарном компартменте в составе везикул (рис. 9, 3). При этом КТ580 плохо проникают в клетки в отсутствие Тф (рис. 9, 2), по-видимому, вследствие низкого сродства отрицательно заряженных частиц к цитоплазматической мембране клеток.

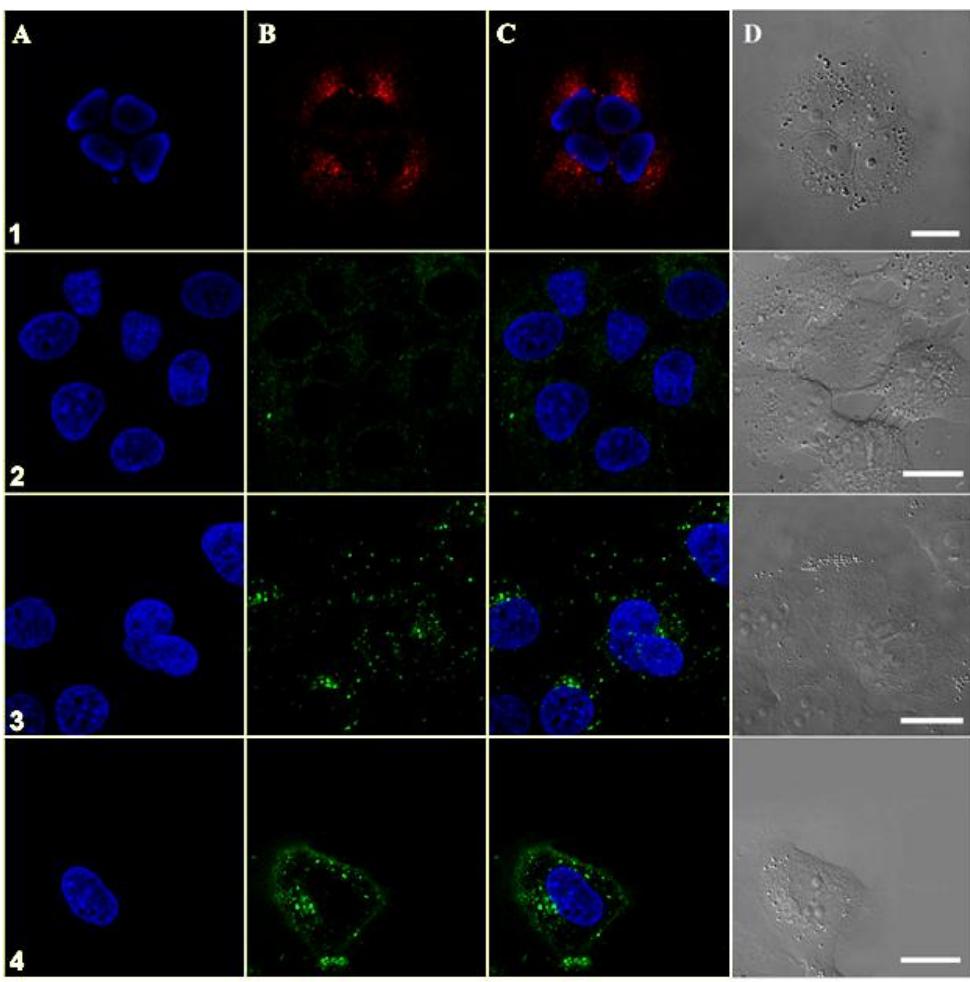


Рисунок 9. Локализация АlФц(+4.5) **1**, KT580 **2**, KT580-Тф **3** и ФИТЦ-Тф **4** в клетках линии А431. Инкубация в течение 1 часа для КТ, Фц, КТ-Тф и 15 минут для ФИТЦ-Тф. А – Hoechst 33342, В – действующее вещество, С – наложение каналов А и В, Д – изображение в проходящем свете. Длина волны возбуждения флуоресценции: Hoechst – 408 нм, ФИТЦ – 488 нм, КТ – 532 нм, Фц – 643 нм. Масштаб 20 мкм

Мы показали, что использованные в данной работе Фц не взаимодействуют с холо-Тф. Полный коньюгат ГК-Тф получали путем смешивания в растворе Тф-КТ и АlФц(+4.5) в соотношении 1:15; молекулы фталоцианина локализовались в глубине полимерной оболочки наночастиц. Введение холо-Тф в состав гибридной структуры не оказало влияния на фотофизические свойства ГК.

Мы провели исследование проникновения полного коньюгата Тф-ГК в клетки линии А431. Согласно данным, полученным с помощью метода КЛСМ (рис. 10, **3**), ГК эффективно проникают внутрь клеток и локализуются в перинуклеарной области. Та же локализация показана для коньюгата Тф-КТ в отсутствие Фц. Кроме того, мы наблюдаем сенсибилизированную флуоресценцию Фц при возбуждении флуоресценции КТ на длине волны 532 нм (рис. 10, **4**). Таким образом, КТ и Фц остаются в составе ГК в процессе взаимодействия с плазматической мембраной клеток и последующего эндоцитоза. Нужно

отметить, что ГК, не связанный с Тф, проникает внутрь клеток гораздо менее эффективно (рис. 10, 1), при этом сенсибилизированной флуоресценции Фц не наблюдается (рис. 10, 2). АlФц(+4.5) в контроле без КТ и Тф не взаимодействовал с цитоплазматической мембраной клеток и был локализован преимущественно в везикулах внутри клетки (рис. 9, 1).

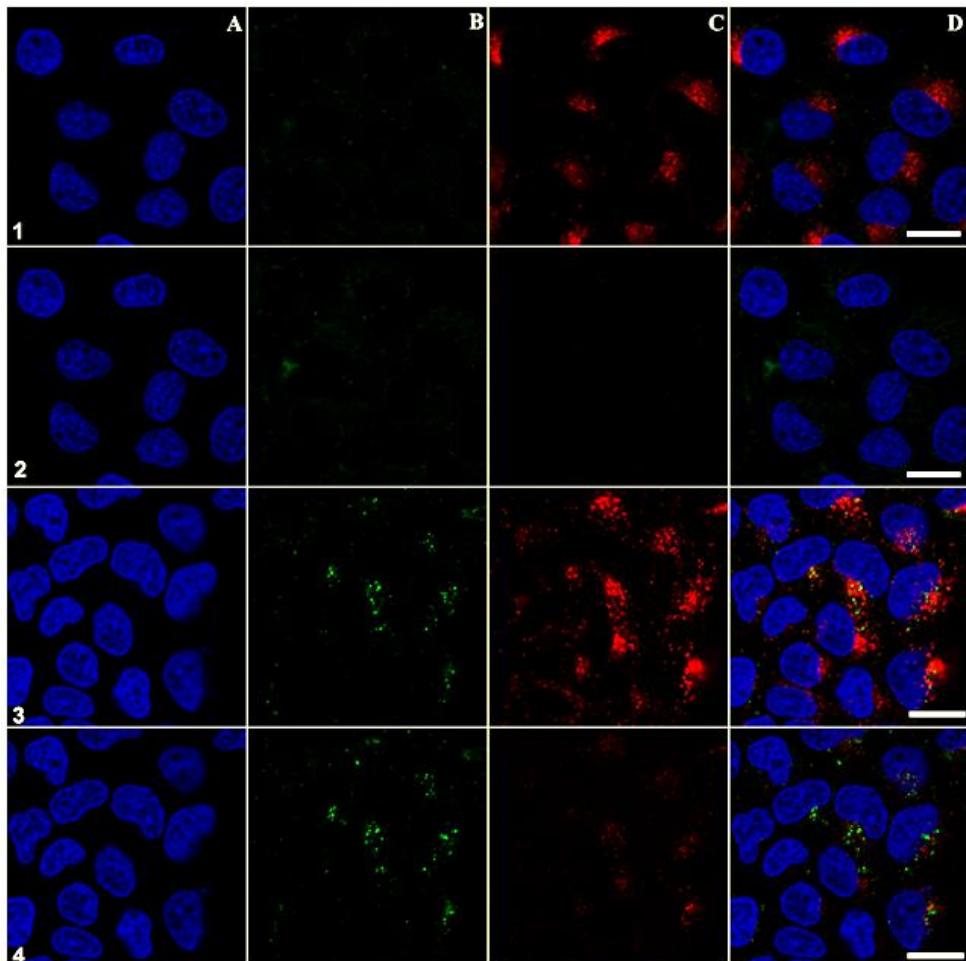


Рисунок 10. Локализация ГК АlФц(+4.5)-КТ580 (1, 2) и конъюгата ГК-Тф (3, 4) в клетках линии А431. А – Hoechst, В – КТ, С – Фц, Д – наложение каналов А, В и С. Длина волны возбуждения флуоресценции: Hoechst – 408 нм, КТ – 532 нм, Фц – 643 нм. В вариантах 2 и 4 прямое возбуждение флуоресценции Фц не осуществлялось. Масштаб 20 мкм

Для оценки эффективности фотодинамического действия конъюгатов на раковые клетки использовали тест МТТ. Для облучения использовали синий светодиод высокой мощности, имеющий узкий спектр излучения в области 400 – 500 нм, т. е. в области, где поглощательная способность квантовых точек значительно превышает таковую фталоцианинов. Результаты представлены на рисунке 11.

Выживаемость клеток в темновом и световом контроле (т. е. в облученных лунках и в лунках, не подвергшихся действию света; без внесения действующих веществ) достоверно не отличалась. АlФц(+4.5) вызывает гибель ~ 25 % клеток, поскольку полоса Соре

AlФц(+4.5) перекрываеться со спектром излучения светодиода в области 400 – 420 нм. В комплексе с КТ580 AlФц(+4.5) генерирует АФК более эффективно вследствие переноса энергии электронного возбуждения от КТ, что приводит к гибели ~ 75 % клеток. Наибольший фотодинамический эффект оказывают конъюгаты КТ-Тф-Фц, вызывая гибель ~ 85 % клеток. Таким образом, увеличение фотодинамической активности в ряду Фц – КТ-Фц – КТ-Тф-Фц коррелирует с увеличением эффективности проникновения внутрь клеток действующего вещества в этой же последовательности.

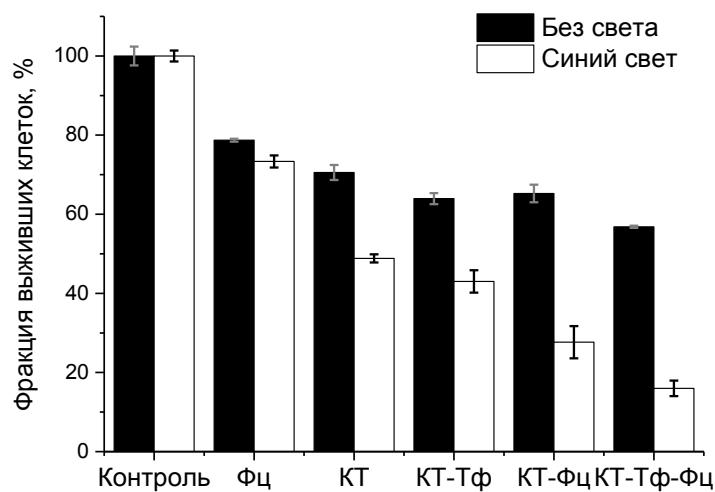


Рисунок 11. Зависимость процента выживших клеток линии А431 от типа действующего вещества в темноте и после освещения синим светом (400 – 500 нм, доза 42.9 Дж)

КТ580 обладают значительной темновой и фототоксичностью. Проникновение КТ580 внутрь клеток за счет ковалентной сшивки с Тф приводит лишь к незначительному дополнительному уменьшению выживаемости клеток линии А431, причем вклад фототоксичности не изменяется. Можно предположить, что основной мишенью цитотоксического действия КТ являются мембранные структуры клетки.

Заключение

С помощью оптических методов было показано, что в водных растворах флуоресцентные наночастицы, покрытые оболочкой из амфи菲尔ного полимера, образуют комплекс с молекулами замещенных фталоцианинов цинка или алюминия. Процесс образования комплекса состоит из двух стадий. Первая стадия (характерное время ~ 10 с) заключается в адсорбции молекул Фц из раствора на поверхность органической оболочки наночастицы за счет электростатических взаимодействий. На второй стадии (характерное время ~ 10 мин) происходит проникновение молекул красителя вглубь полимерной оболочки

наночастицы.

Установлено, что количество сайтов связывания молекул Фц в полимерной оболочке наночастиц зависит от объема этой оболочки. Максимальное количество молекул Фц, способных связаться с одной наночастицей радиусом 30 нм, можно оценить в 10^3 , что соответствует концентрации молекул Фц в полимерной оболочке наночастицы ~ 10 мМ. Таким образом, наночастицы, использованные в работе, многократно повышают локальную концентрацию Фц по сравнению с таковой в растворе и потому могут использоваться в качестве наноплатформы для доставки молекул фотосенсибилизаторов к клеткам-мишеням.

Глубокая локализация молекул Фц в полимерной оболочке наночастиц определяет эффективный безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения от ядра наночастицы к фталоцианину. Тушение люминесценции наночастиц фталоцианинами является динамическим. Перенос энергии осуществляется согласно индуктивно-резонансному механизму (FRET). Эффективность тушения люминесценции наночастиц увеличивается при увеличении концентрации молекул Фц в полимерной оболочке наночастицы (иными словами, при увеличении количества акцепторов энергии, приходящихся на одну возбужденную молекулу донора).

При облучении раствора гибридных комплексов в области поглощения наночастиц мы наблюдали сенсибилизированную флуоресценцию фталоцианинов. Следовательно, флуоресцирующие наночастицы увеличивают эффективное сечение поглощения Фц в сине-зеленой (в случае ГК с квантовыми точками) или ИК- (в случае ГК с апконверсионными наночастицами) области спектра. В этих же условиях молекулы Фц генерируют синглетный кислород. Эффект усиления флуоресценции Фц и генерации АФК сильно зависит от соотношения Фц:КТ в гибридном комплексе. При увеличении количества молекул Фц в полимерной оболочке наночастиц имеет место концентрационное самотушение флуоресценции Фц, в ряде случаев вызванное агрегацией молекул красителя. Наибольшая величина усиления выхода АФК, генерируемых Фц в составе ГК с квантовыми точками, наблюдается в диапазоне значений Фц:КТ от 1 до 3. При низких соотношениях Фц:КТ значение эффективности переноса энергии составляет менее 20%. Таким образом, люминесценция КТ тушится не полностью, что позволяет использовать ее свечение для флуоресцентной диагностики.

Обнаружено, что увеличение ионной силы раствора до физиологических значений (0.15 – 0.2 М) не нарушает взаимодействие между КТ и Фц, и одновременно способствует увеличению эффективности переноса энергии в ГК, по-видимому, вследствие увеличения подвижности молекул Фц в полимерной оболочке наночастиц и достижения благоприятной ориентации для FRET.

ГК отрицательно заряженных КТ с низкой эффективностью взаимодействуют с эукариотическими мембранами. Экспериментально показано, что модификация поверхности КТ трансферрином способствует проникновению ГК внутрь клеток эпидермоидной карциномы человека, причем Фц остается в комплексе с КТ. При освещении таких клеток в области поглощения КТ за счет переноса энергии электронного возбуждения от КТ к молекулам Фц вызывается фотодинамический эффект, что приводит к гибели клеток. Эффективность гибели клеток, инкубированных с конъюгатами ГК-Тф, оказывается выше, чем при использовании ГК, не модифицированного трансферрином.

Выводы

1. Установлено, что КТ может одновременно связывать от 10^2 до 10^3 молекул Фц в зависимости от размера наночастицы. Показано что молекулы фталоцианина адсорбируются на поверхность наночастицы за счет электростатических сил, а затем проникают внутрь полимерной оболочки.
2. Показано, что эффективное сечение возбуждения Фц и способность к генерации АФК могут быть увеличены за счет переноса энергии возбуждения от квантовых точек в 35 и 2.6 раз, соответственно. Эффективность тушения флуоресценции наночастиц (как КТ, так и АКНЧ) возрастает при увеличении соотношения Фц:НЧ в комплексе и достигает 100 % при избытке Фц, однако способность к фотосенсибилизированной генерации АФК фталоцианином при этом снижается из-за эффектов, вызванных высокой концентрацией молекул Фц в полимерной оболочке наночастицы.
3. Изучено влияние pH и ионной силы раствора на взаимодействие КТ и Фц. Показано, что спектральные свойства ГК не изменяются в диапазоне значений pH от 5 до 9 единиц при постоянном значении ионной силы раствора; эффективность переноса энергии в ГК ($\Phi_{\text{ц}}:\text{КТ} = 3:1 - 10:1$) увеличивается на 6 – 10 % при увеличении ионной силы на 50 мМ.
4. Для осуществления направленной доставки ГК в раковые клетки поверхность КТ была функционализирована трансферрином. Показано, что ГК, проникающие в клетки эпидермоидной карциномы человека, сохраняют высокую эффективность переноса энергии возбуждения от КТ к Фц и способность к фотосенсибилизированной генерации АФК. Фотодинамический эффект, оказываемый конъюгатом КТ-Тф-Фц, превышает эффекты, вызываемые Фц, КТ и их гибридным комплексом.

Основные публикации Гвоздева Даниила Александровича по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 03.01.02 - биофизика

1. Gvozdev D.A., Maksimov E.G., Strakhovskaya M.G., Moysenovich A.M., Ramonova A.A., Moisenovich M.M., Goryachev S.N., Paschenko V.Z., Rubin A.B. (2018) A CdSe/ZnS quantum dot-based platform for the delivery of aluminum phthalocyanines to bacterial cells. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* Elsevier, 187, 170–179.
2. Гвоздев Д.А., Максимов Е.Г., Страховская М.Г., Иванов М.В., Пащенко В.З., и Рубин А.Б. (2017) Влияние ионной силы на спектральные свойства комплексов квантовых точек и фталоцианинов алюминия. *Российские нанотехнологии*, 12(1-2), 7–16.
3. Максимов Е.Г., Гвоздев Д.А., Страховская М.Г., и Пащенко В.З. (2015) Гибридные структуры из поликатионных фталоцианинов алюминия и квантовых точек. *Биохимия*, 80(3), 389–398.

Иные публикации

1. Maksimov E.G., Schmitt F., Strakhovskaya M.G., Gvozdev D.A., Friedrich T., Paschenko V.Z. (2013) Zinc Phthalocyanines and Quantum Dots Conjugates: Physical Properties and Photodynamic Activity. *Signpost Open Access J. NanoPhotoBioSciences*, 1, 49–61.
2. Gvozdev D.A., Lukashev E.P., Paschenko V.Z. (2018) Energy transfer in upconversion nanoparticles – phthalocyanine hybrid complexes. *Journal of Physics: Conference Series*, 1124, 0310001.

Тезисы докладов по теме диссертации

1. Gvozdev D.A., Strakhovskaya M.G., and Paschenko V.Z. (2017) Spectral and photodynamic properties of aluminum phthalocyanines in complex with quantum dots. In Programme and Book of abstracts 17th Congress of the European Society for Photobiology, Compano snc Pisa, Italy, 126–126.
2. Гвоздев Д.А., Максимов Е.Г., Страховская М.Г., и Пащенко В.З. (2015) Гибридные структуры из поликатионных фталоцианинов алюминия и квантовых точек. XXI Пущинские чтения по фотосинтезу и Всероссийская конференция «Фотосинтез и фотобиотехнология. Фундаментальные и прикладные аспекты» г. Пущино, 32–32.
3. Maksimov E.G., Schmitt F.J., Strakhovskaya M.G., Gvozdev D.A., Friedrich T., Paschenko V.Z., and Rubin A.B. (2013) Hybrid systems based on zinc phthalocyanines and quantum dots. In 15th Congress of the European Society for Photobiology, Liège (Belgium), 134–134.