

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Гвоздев Даниил Александрович

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

Специальность 03.01.02 – Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научные руководители:

доктор физико-математических наук, профессор
Пащенко Владимир Захарович

кандидат биологических наук
Максимов Евгений Георгиевич

Москва – 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	8
1.1 Полупроводниковые нанокристаллы (квантовые точки)	8
1.1.1 Структурные и спектральные свойства квантовых точек	8
1.1.2 Цитотоксичность квантовых точек.....	14
1.2 Апконверсионные наночастицы	19
1.3 Фталоцианины как фотосенсибилизаторы для фотодинамической терапии и инактивации микроорганизмов	22
1.3.1 Структурные и спектральные свойства фталоцианинов	22
1.3.2 Фотодинамическое действие фталоцианинов на биологические объекты.....	24
1.4 Гибридный комплекс наночастица - фотосенсибилизатор	27
1.4.1 Перенос энергии в гибридных комплексах.....	27
1.4.2 Архитектура гибридного комплекса и эффекты комплексообразования	32
1.4.3 Фотодинамические свойства гибридных комплексов	38
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	40
2.1 Материалы.....	40
2.1.1 Флуоресцентные наночастицы.....	40
2.1.2 Фталоцианины	41
2.2 Методы	43
2.2.1 Ковалентное связывание трансферрина и квантовых точек	43
2.2.2 Абсорбционная спектроскопия	44
2.2.3 Флуоресцентная спектроскопия.....	45
2.2.4 Флуоресцентная спектроскопия высокого временного разрешения.....	47
2.2.5 Анизотропия флуоресценции.....	51
2.2.6 Методы регистрации синглетного кислорода	53
2.2.7 Методы определения размеров и структуры наночастиц	54

2.2.8 Методы исследования влияния гибридных комплексов на бактериальные и животные раковые клетки.....	55
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	58
3.1 Гибридные комплексы апконверсионных наночастиц и фталоцианинов	58
3.1.1 Особенности переноса энергии в гибридном комплексе	58
3.1.2 Влияние переноса энергии на фотофизические свойства фталоцианинов.....	61
3.2 Гибридные комплексы квантовых точек и фталоцианинов	69
3.2.1 Влияние переноса энергии на фотофизические свойства фталоцианинов	69
3.2.2 Изменение спектральных свойств фталоцианина при образовании гибридного комплекса	89
3.2.3 Исследование структурных свойств квантовых точек	95
3.2.4 Общие представления об архитектуре гибридного комплекса квантовых точек и металлофталоцианинов	100
3.2.5 Влияние ионной силы раствора на перенос энергии в гибридных комплексах.....	102
3.2.6 Взаимодействие электростатически стабилизированных гибридных комплексов с бактериальными клетками.....	110
3.2.7 Фотодинамическое действие гибридных комплексов на раковые клетки	117
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	124
ВЫВОДЫ.....	126
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	127
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	128

ВВЕДЕНИЕ

Одним из наиболее интересных направлений современной биофизики является изучение фотодинамического действия некоторых соединений на живые организмы. Фотодинамическое действие – термин, впервые предложенный Г. Таппейнером для описания эффекта, оказываемого фотосенсибилизатором (ФС) на биологические объекты в присутствии света и кислорода [1]. 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) [2, 3]. 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 [4].

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 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. В таком комплексе наночастица выступает в качестве донора энергии возбуждения для ФС за счет безызлучательного переноса энергии по индуктивно-резонансному механизму (Forster resonance energy transfer (FRET) [5]). При этом наночастица может поглощать свет 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 [6 – 14]. 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 процессы преобразования энергии электронного возбуждения в ГК наночастица – фталоцианин, и способность фталоцианина генерировать активные формы кислорода в составе ГК;
3. изучить взаимодействие ГК с раковыми клетками в культуре.

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 A431, где за счет переноса энергии возбуждения от КТ 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:

1. XXV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2018», Москва, Россия, 2018
2. 5th International School and Conference «Saint-Petersburg OPEN 2018», Санкт-Петербург, Россия, 2018
3. Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability – 2017, Хайдарабад, Индия, 2017
4. 17th Congress of the European Society for Photobiology, Пиза, Италия, 2017
5. XXIV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2017», Москва, Россия, 2017

6. 7th International Conference Photosynthesis Research for Sustainability – 2016, Пушино, Россия, 2016
7. 1st B3 International Conference for Young Scientists, Москва, Россия, 2016
8. XXI Пушкинские чтения по фотосинтезу, Пушино, Россия, 2015
9. XXI Международная конференция студентов и аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2014», Москва, Россия, 2014
10. 15th Congress of the European Society for Photobiology, Льеж, Бельгия, 2013
11. Photosynthesis Research for Sustainability – 2013, Баку, Азербайджан, 2013

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 [15 – 17], а также 3 тезисах в сборниках докладов научных конференций.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения. Полный объем диссертации составляет 148 страниц с 52 рисунками и 12 таблицами. Список литературы содержит 209 наименований.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Полупроводниковые нанокристаллы (квантовые точки)

1.1.1 Структурные и спектральные свойства квантовых точек

Квантовые точки объединяют физические и химические свойства молекул с оптоэлектронными свойствами полупроводников. Квантовая точка представляет собой люминесцирующий полупроводниковый нанокристалл, характерные размеры которого находятся в диапазоне 3 – 10 нм (рисунок 1А). Известно, что вследствие квантово-размерных эффектов свойства наноматериалов качественно отличаются от свойств объемного аналога [18]. Если размер объекта не превышает Борковский радиус экситона, характерный для данного материала, носитель заряда внутри объекта оказывается в трехмерной потенциальной яме [19]. Это приводит к модификации энергетического спектра (рисунок 1Б). Классический спектр полупроводника с валентной зоной, запрещенной зоной и зоной проводимости преобразуется в набор дискретных энергетических уровней с характерным зазором $h^2/8\pi^2mr^2$, где h – постоянная Планка, m – эффективная масса носителя заряда, а r – радиус КТ. Между этими уровнями возможны переходы электрона, сопровождающиеся поглощением или излучением кванта света в видимом диапазоне длин волн. Таким образом, квантовая точка выступает в качестве «искусственного атома» и обладает уникальными оптическими характеристиками.

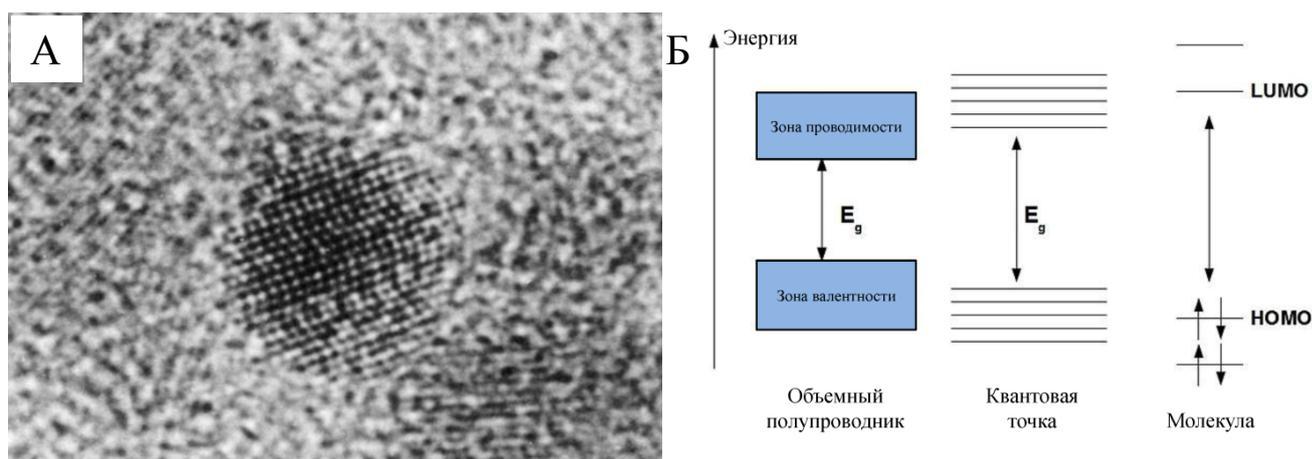


Рисунок 1. Электронная микрофотография одной из первых наночастиц CdSe [20] (А). Энергетические спектры объемного и наноразмерного полупроводника в сравнении с энергетическим спектром молекулы (Б). НОМО – высшая занятая молекулярная орбиталь, LUMO – нижняя вакантная молекулярная орбиталь

При поглощении кванта света в КТ образуется экситон – электрон-«дырочная» пара, которая является носителем заряда. Электрон за счет поглощенной энергии переходит на высокоэнергетический уровень. Поскольку с физической точки зрения КТ представляет собой нульмерную электронную систему, то через некоторое время происходит рекомбинация экситона с излучением кванта света. Имеется информация о существовании более долгоживущих «триплетных» энергетических уровней в КТ [21]. В литературе фотолюминесценцию квантовых точек обычно называют флуоресценцией; мы также будем далее употреблять термин «флуоресценция» для обозначения фотолюминесценции КТ.

Монодисперсный коллоидный раствор КТ обладает единственным и очень узким пиком флуоресценции, положение которого зависит от размера КТ: чем больше радиус кристалла, тем больше в нем атомов и тем более он приближается по свойствам к объемному полупроводнику. Это приводит к батохромному смещению спектра флуоресценции КТ (т. е. сдвигу в более длинноволновую область). Таким образом, варьируя размер кристалла, можно подобрать КТ с необходимыми спектральными свойствами для конкретных исследовательских задач.

Полупроводниковые нанокристаллы практически не подвержены фотовыцветанию, которое существенно ограничивает возможности использования органических флуорофоров. Квантовые точки поглощают свет в широком диапазоне длин волн с коэффициентами молярной экстинкции порядка $10^5 - 10^6 \text{ л*моль}^{-1}\text{см}^{-1}$. Это обусловило большой интерес к КТ как перспективным флуоресцентным меткам для исследований биологической направленности. Однако, для успешного применения в биологии было необходимо преодолеть два существенных недостатка КТ: низкий квантовый выход флуоресценции и гидрофобность полупроводникового материала.

Первые коллоидные квантовые точки были синтезированы в середине 1980-х в воде при комнатной температуре и имели квантовый выход флуоресценции порядка 1%. Несмотря на дальнейшее развитие (с увеличением квантового выхода флуоресценции КТ до 50% [22]), метод не получил широкого распространения. Более перспективным оказался высокотемпературный метод синтеза (1993 г.) в гидрофобных средах, удобный с точки зрения контроля размера кристаллов и получения монодисперсных частиц [20]. Тем не менее, квантовый выход флуоресценции КТ не превышал 10%. Основная причина низких значений квантового выхода флуоресценции заключается в наличии дефектов кристаллической решетки на поверхности нанокристалла, которые играют роль «ловушек» (англ. trap states) для носителя заряда [19]. Локализация носителя заряда в такой «ловушке» препятствует излучательной рекомбинации экситона. Говорят, что КТ переходит в т. н. «выключенное» состояние, которое для отдельного

кристалла может длиться до 100 с [23]. Помимо снижения квантового выхода флуоресценции, «мерцание» флуоресценции КТ (спонтанные переходы из активного в «выключенное» состояние и обратно) вызывает ряд трудностей при исследовании поведения отдельных частиц в растворе и внутри клеток вследствие невозможности проследить непрерывную траекторию движения молекулы флуорофора.

Существует несколько моделей для описания механизмов «мерцания» квантовых точек (рисунок 2). Они делятся на две группы.

Модели первого типа основаны на фотоиндуцированной локализации носителя заряда (например, «дырки») на дефектах кристалла. Разделение зарядов не препятствует образованию новых экситонов внутри КТ. Однако, вследствие наличия лишнего электрона в нанокристалле (заряженный экситон называют трионом) излучательная рекомбинация экситона невозможна. Вместо этого происходит безызлучательная Оже-рекомбинация. Переход КТ из «выключенного» в активное состояние возможен только при нейтрализации зарядового состояния кристалла. При этом энергетические уровни в «ловушках» могут иметь статическое или динамическое распределение; переход носителя заряда в trap states может быть энергетически выгодным или сопровождаться туннелированием через энергетический барьер.

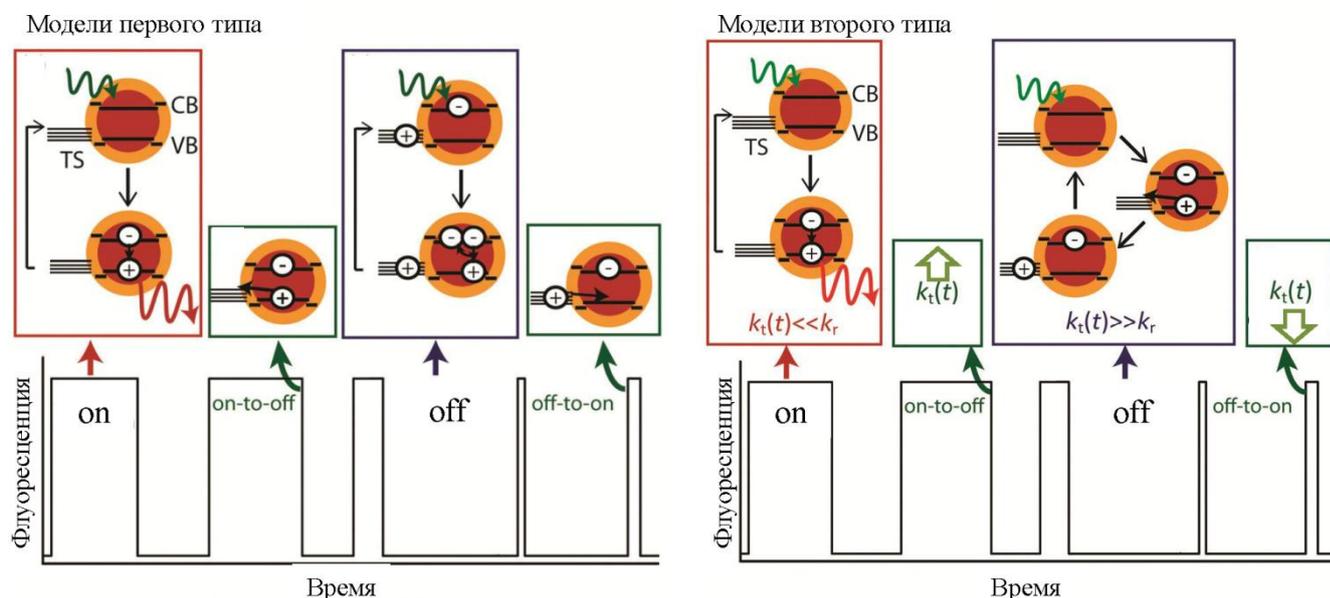


Рисунок 2. Модели, предложенные для описания явления «мерцания» квантовых точек. Пояснения в тексте. TS – trap states, VB и CB – нижний заполненный и верхний вакантный энергетический уровень соответственно. on и off – активное и «выключенное» состояния КТ. Взято с изменениями из [24]

Очевидно, Оже-рекомбинация не является единственным механизмом «мерцания» КТ, поскольку теоретически предсказанная зависимость вероятности этого процесса от размера кристалла так и не была обнаружена [24]. Поэтому была предложена вторая группа моделей, основанная на флуктуации скорости переноса носителя заряда в «ловушку». Локализация носителя заряда на дефекте кристалла возможна, только если константа скорости переноса в «ловушку» $k_t(t)$ окажется больше константы скорости процесса излучательной рекомбинации k_r . Рекомбинация такого разделенного экситона происходит безызлучательно, а время «выключенного» состояния определяется временем доминирования $k_t(t)$ над константой скорости рекомбинации.

Уменьшение количества дефектов на поверхности нанокристалла КТ стало первоочередной задачей на пути получения квантовых точек с высокими выходами флуоресценции [19]. Впервые это было реализовано в 1990 году с помощью покрытия CdSe нанокристалла защитной оболочкой из ZnS [25]. Далее мы будем называть флуоресцирующую центральную часть многослойной КТ ее ядром. Сульфид цинка также является полупроводником, но более широкозонным, что способствует локализации экситона в ядре КТ. Кроме того, защитная оболочка представляет собой физический барьер между ядром КТ и окружающей средой, что делает оптические свойства КТ менее чувствительными к фотоокислению или процедурам с органической оболочкой. К 1996 году развитие методов покрытия ядра КТ защитной оболочкой обеспечило появление образцов монодисперсных нанокристаллов (без дополнительной очистки) с квантовым выходом флуоресценции до 50% [26]. Нужно отметить, что величина квантового выхода флуоресценции КТ нелинейно зависит от толщины защитной оболочки: показано, что защитная оболочка, состоящая из более чем трех слоев ZnS, вызывает тушение флуоресценции КТ из CdSe [27]. Вероятно, с увеличением количества атомных слоев в оболочке увеличивается вероятность образования собственных дефектов [28].

При использовании любого метода синтеза КТ, вообще говоря, существует вероятность появления дефектных нанокристаллов. Эта фракция КТ обладает слабой флуоресценцией в более длинноволновой области спектра и большими значениями длительности флуоресценции (до 300 нс [26]). Образование этой фракции может быть связано с наличием дефектов внутри ядра нанокристалла или на границе ядро/оболочка, а также с неполным покрытием ядра КТ защитной оболочкой [25]. Последний факт можно продемонстрировать, инкубируя образец КТ с молекулами-акцепторами электрона: если эти молекулы имеют доступ к ядру КТ, то флуоресценция КТ тушится вследствие переноса электрона на акцептор при образовании экситона [27]. Неравномерное формирование защитной оболочки может быть связано как с

недостаточным количеством образующих ее элементов, так и с неравномерным ростом самой оболочки на поверхности ядра КТ. В работе [29] показано, что оболочка, формируемая из CdS, растет преимущественно на обогащенных селеном или химически нейтральных гранях кристаллической решетки ядра CdSe. При этом обогащенные кадмием грани покрываются оболочкой в последнюю очередь или не покрываются вовсе. В этой же работе обнаружена корреляция между неравномерностью толщины защитной оболочки и временем нахождения КТ в «выключенном» состоянии.

Иным способом борьбы с дефектами кристаллической решетки нанокристалла является создание градиентных КТ. В работе [23] синтезировали КТ, состоящие из кристалла CdSe/Cd_{1-x}Zn_xSe/ZnSe, где значение x увеличивали с номером слоя. Квантовый выход флуоресценции таких квантовых точек составил 50%; вероятность перехода в «выключенное» состояние оказалась незначительной.

Применение квантовых точек в биологических исследованиях предполагает перевод гидрофобных нанокристаллов в водную фазу. Обычно для этого используют методы заместительной химии, когда молекулы-прекурсоры, покрывающие КТ в процессе их синтеза, заменяют на амфифильные лиганды с необходимыми свойствами.

Координироваться на поверхность нанокристалла могут любые молекулы с нуклеофильными группами. Это могут быть первичные/вторичные амины (алифатические предпочтительнее ароматических), тиолы, карбоновые кислоты, а также фосфины и их оксиды (например, триоктилфосфиноксид, ТОФО). Органическая оболочка может быть многослойной: обычно на слой низкомолекулярных гидрофобных лигандов адсорбируют амфифильный полимер, который и определяет поверхностные свойства КТ. Нужно отметить, что помимо водорастворимости, органическая оболочка в значительной степени обеспечивает пассивацию дефектов кристаллической решетки [30]. Однако, органические лиганды покрывают не всю поверхность КТ, поэтому некоторые дефекты кристаллической решетки сохраняются [19]. Кроме того, лиганды могут служить причиной образования новых энергетических уровней: известно, что тиолы тушат флуоресценцию КТ из CdSe вследствие появления энергетического уровня, лежащего ниже первого возбужденного уровня КТ. У КТ из CdTe ширина запрещенной зоны меньше, поэтому уровень, образующийся в присутствии тиола, оказывается выше первого возбужденного уровня и не снижает квантовый выход флуоресценции КТ [19].

Современные методы синтеза квантовых точек позволяют получить образцы нанокристаллов с квантовым выходом флуоресценции до 80 – 90% [31]. Наряду с квантовым выходом флуоресценции большое значение имеет длительность флуоресценции КТ. Обычно в

кинетике флуоресценции КТ содержится 2 – 3 временные компоненты, что связывают с эмиссией из разных энергетических состояний. Об этом свидетельствует комплексная структура экситонного пика поглощения КТ [32]. В простейшем случае (биэкспоненциальная зависимость) быстрая компонента соответствует излучательной рекомбинации экситона, а медленная (порядка мкс) – излучению, опосредованному дефектами кристаллической решетки [33, 34]. Интересно, что в этой модели спектр флуоресценции КТ состоит из двух взаимно перекрывающихся пиков, которые не всегда могут быть разделены. Вклад медленной компоненты падает с уменьшением температуры [33], уменьшением квантового выхода флуоресценции и увеличением интенсивности процессов фотоокисления [31]. В таком случае, кинетика флуоресценции идеальных КТ без дефектов представляла бы собой затухающую моноэкспоненту; действительно, в некоторых работах была обнаружена всего одна временная компонента [23, 35]. Аналогично, чем больше различных дефектов в кристаллах (особенно структуры ядро/оболочка), тем больше временных компонент в кинетике затухания флуоресценции [26]. Интересно, что в некоторых случаях кинетики затухания флуоресценции КТ не аппроксимируются экспоненциальными функциями [32, 36]. В целом, на данный момент отсутствует ясное понимание причин полиэкспоненциальности кинетики флуоресценции КТ [18].

Альтернативной причиной появления нескольких временных компонент в кинетике флуоресценции КТ может быть полидисперсность размеров частиц. Для установления корреляции между количеством компонент в кинетике затухания флуоресценции КТ и размерами кристалла необходимо знать размер ядра КТ, толщину защитных оболочек, а также дисперсию по размерам частиц. Нужно отметить, что в настоящее время разработаны методы синтеза КТ разной формы, но наиболее просто синтезируемыми являются сферические кристаллы. Именно такие КТ наиболее часто применяются в биологических исследованиях. Оценка общего размера кристалла производится с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Альтернативным методом является рентгеновская дифракция, однако недостаток метода заключается в невозможности определения дисперсии размеров частиц. Размер ядра в многослойной КТ определяется косвенным методом, предложенным Ю с соавт. [37]. Метод основан на связи между размером кристалла и положением низкоэнергетического экситонного пика поглощения КТ (рисунок 3). Кроме того, по положению пика поглощения на основе эмпирически установленных соотношений вычисляется величина коэффициента молярной экстинкции КТ, и, следовательно, молярная концентрация КТ. До этого для оценки количества частиц в растворе использовали величину мг/мл, которая крайне неудобна с точки зрения контроля стехиометрии гибридных структур с участием КТ.

Разнообразие подходов к синтезу наночастиц, к выбору материалов для ядра и оболочек кристалла определяет возможность использования квантовых точек в качестве селективных детекторов различных ионов в растворе [38 – 40]. Кроме того, квантовые точки находят применение в оптоэлектрических системах, таких как светоизлучающие диоды и плоские светоизлучающие панели [41], лазеры [42], ячейки солнечных батарей и фотоэлектрических преобразователей [43 – 46], а также в биологии качестве маркеров [47, 48], т. е. везде, где требуются элементы с перестраиваемыми по длине волны оптическими свойствами.

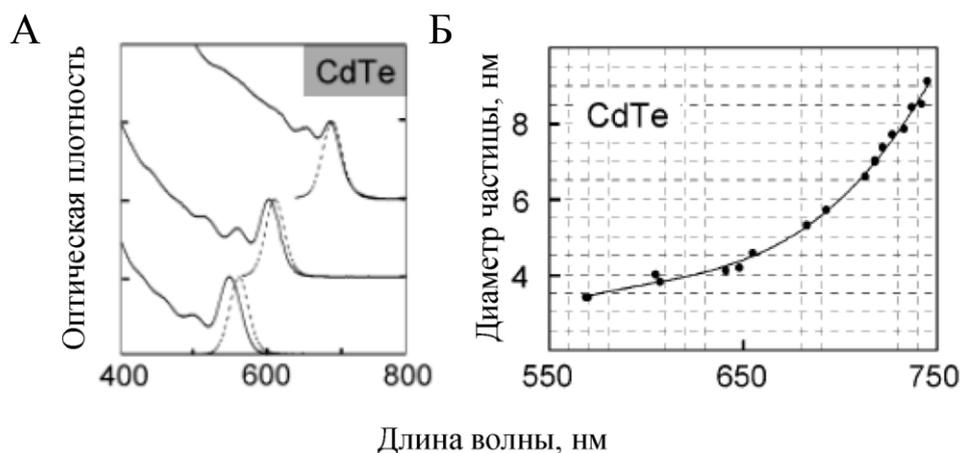


Рисунок 3. Спектры поглощения (сплошная линия) и флуоресценции (пунктирная линия) CdTe КТ различного размера (А). Зависимость диаметра кристалла CdTe от положения экситонного пика поглощения (Б). Взято с изменениями из [37]

1.1.2 Цитотоксичность квантовых точек

Биологическое применение квантовых точек в качестве меток и сенсоров различных молекул имеет огромные перспективы [49]. Тем не менее, реальное использование КТ в экспериментах *in vivo* ограничивается вследствие потенциальной неспецифической токсичности полупроводниковых нанокристаллов. Существует несколько механизмов цитотоксичности квантовых точек. Часть из них не требует участия света и определяет «темновую» токсичность КТ, другие относятся к категории светозависимых процессов.

«Темновая» токсичность КТ может быть вызвана атомами или молекулами, входящими в состав нанокристалла. Известно, что большинство прекурсоров, используемых в синтезе КТ, являются токсичными по отношению к биологическим объектам [50]. Несмотря на то, что на следующем этапе синтеза в состав органической оболочки КТ вводят более биосовместимые лиганды, молекулы прекурсоров продолжают присутствовать в растворе в динамическом

равновесии с поверхностью КТ. Квантовые точки, покрытые низкомолекулярными лигандами, оказывают более выраженное цитотоксическое действие [51].

Кроме того, известно, что сами по себе тяжелые металлы обладают значительной цитотоксичностью. Так, теллур в составе солей (TeO_3^{2-} и TeO_4^{2-}) вызывает оксидативный стресс, сопровождаемый образованием гидроксильных радикалов [52]. Ионы кадмия также вызывают оксидативный стресс, нарушения работы митохондрий и Ca^{2+} -сигнальной системы, а также инициируют апоптоз клеток [53]. Смесь солей кадмия и теллура оказывает токсические эффекты, превышающие сумму отдельных эффектов солей этих металлов [54].

Есть факты, указывающие на способность квантовых точек генерировать свободные радикалы при облучении ультрафиолетовым (УФ) или видимым светом [8, 13, 21, 55, 56]. В 2003 году было показано, что КТ из CdSe могут генерировать синглетный кислород в толуоле с выходом менее 5% [57], а в 2011 году также в толуоле удалось зарегистрировать образование АФК квантовыми точками из CdSe/ZnS (выход 1.5%) [58]. Разница энергий основного и возбужденного состояния большинства КТ достаточна для реакции образования супероксидного или гидроксильного радикала, и наличие этих реакций доказано для КТ состава CdS [59]. В то же время показано, что квантовые точки из CdSe в водном растворе не способны к генерации супероксидного аниона, а покрытие ядра КТ защитной оболочкой дополнительно уменьшает вероятность образования АФК. Для большинства исследованных в литературе КТ светоиндуцированного образования АФК в водных растворах не зарегистрировано [11, 55, 60 – 62].

Как световая, так и «темновая» цитотоксичность КТ зависят от структуры частицы и снижаются в ряду ядро-низкомолекулярный лиганд – ядро/оболочка-низкомолекулярный лиганд – ядро/оболочка-полимер. Это происходит вследствие уменьшения вероятности окислительно-восстановительных реакций и выхода ионов тяжелых металлов из нанокристалла при увеличении количества оболочек и их толщины.

Эффекты, оказываемые квантовыми точками на биологические объекты, как правило, видоспецифичны. Известно, что КТ могут подавлять рост бактерий [51, 63 – 67]. При этом наблюдаются такие явления, как филаментация (изменение формы клеток; генотоксический эффект) [51], образование блеб (шаровидных выростов) [63] и пор в мембране [64, 65]. Вероятно, имеют место отличные от описанных выше механизмы токсичности КТ; в работе [51] показано, что токсичность КТ является «темновой» (т. е. не связана с образованием АФК), не связана с влиянием токсичных прекурсоров (образец подвергали очистке) или кадмия (хотя спектр флуоресценции КТ сместился на 2 нм в синюю область спектра, что свидетельствует об

уменьшении размера КТ, соль CdCl_2 оказывала аналогичное ингибирующее действие при гораздо более высоких концентрациях). В работе [63] сравнивали цитотоксическое действие КТ из CdSe , покрытых цитратом, с действием отдельных компонентов КТ. Установлено, что цитрат и селен не являются токсичными для клеток *Pseudomonas aeruginosa* PG201. При низких концентрациях КТ и ацетат кадмия обладали сопоставимой цитотоксичностью (за счет высвобождения ионов кадмия из нанокристалла), однако при увеличении концентрации квантовые точки были более токсичны и вызывали более разнообразные деструктивные эффекты. Авторам [63] удалось зарегистрировать образование АФК внутри клеток в присутствии КТ. На данный момент доказано, что КТ изменяют окислительный баланс в клетке [65, 68], что сопровождается изменением активности антиоксидантных ферментов [69] или генов антиоксидантной системы [64]; тем не менее, фотоиндуцированная генерация АФК квантовыми точками *in vivo* остается предметом дискуссий.

Животные клетки гибнут в присутствии квантовых точек на свету [10, 13], причем имеет место и апоптоз, и некроз [68]. Выраженность эффекта, оказываемого КТ, может быть больше, меньше или сопоставима с эффектом, оказываемым отдельными ее компонентами, в зависимости от вида организма [54]. Показано, что интернализация КТ более эффективна при меньших размерах наночастиц; положительно заряженные КТ лучше связывались и быстрее проникали в клетки гепатокарциномы человека, чем отрицательно заряженные [53].

In vivo квантовые точки могут накапливаться в печени, почках и селезенке [70, 71]. Аккумуляция КТ, несущих положительный заряд, происходит медленнее, чем отрицательно заряженных частиц; покрытие КТ некоторыми полимерами способствует увеличению времени циркуляции наночастиц в крови [72]. КТ, состоящие из CdSe/ZnS и покрытые оболочкой с карбоксильными группами (но не с аминок группами), вызывают тромбоз легочных сосудов у мышей; запускается иммунный ответ [70]. С такой же зависимостью от заряда КТ наблюдали образование тромбов в человеческой крови *in vitro*. В то же время, КТ не обнаружили цитотоксичности в течение трех месяцев после внутривенного введения образца мышам другой линии и приматам (макаки резус) [71].

Цитотоксическое действие КТ не всегда сопряжено с проникновением наночастиц внутрь клетки. Так, выживаемость клеток диатомовых водорослей снижается при инкубации с КТ, хотя нанокристаллы остаются связанными с поверхностью клетки [69]. Некоторые бактериальные штаммы [51, 66], зеленые водоросли [69], грибки [13] и животные клетки в культуре [12, 48, 53, 73] вообще оказались устойчивы к КТ в широком диапазоне концентраций.

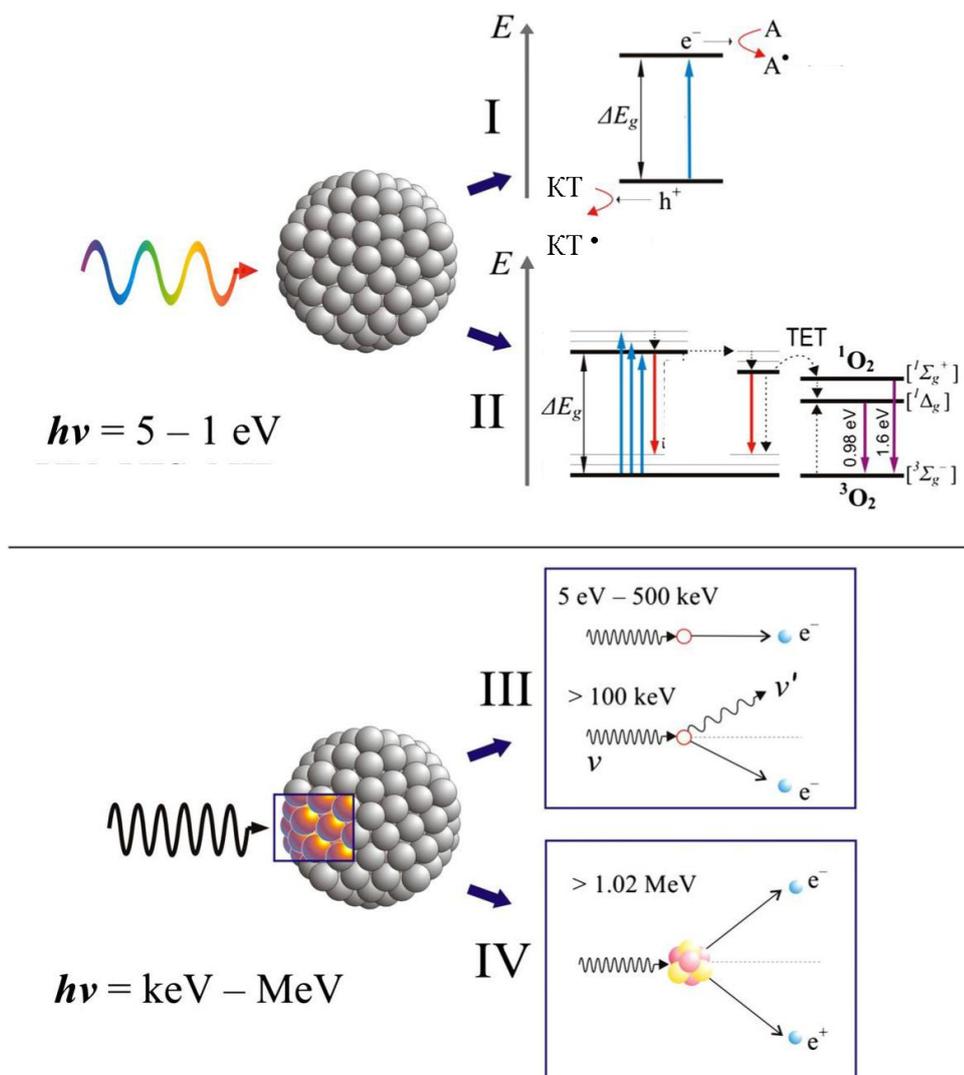


Рисунок 4. Механизмы фотоиндуцированной токсичности квантовых точек. I) Перенос заряда от нанокристалла на молекулу акцептора А, ΔE_g – разница энергий основного и первого возбужденного состояния КТ. II) Образование синглетного кислорода вследствие реакции молекулярного кислорода с КТ в «триплетном» состоянии (ТЕТ). Синие стрелки обозначают акт поглощения, красные – излучательную рекомбинацию экситона, пунктирные – безызлучательную рекомбинацию экситона. Механизмы I и II справедливы при использовании УФ- или света в видимой области спектра. III) Фотоэлектрическая ионизация – образование свободного высокоэнергетического электрона вследствие соударения фотона с атомами КТ. IV) Образование электрон-позитронной пары вследствие соударения фотона с ядром атомов КТ. Позитрон аннигилирует с высвобождением двух фотонов с энергией 0.51 МэВ, которые могут повторно взаимодействовать с КТ согласно механизму III. Свободные электроны также взаимодействуют с молекулами в растворе, что приводит к образованию АФК и свободных радикалов. Механизмы III и IV справедливы при использовании гамма- или Рентгеновского излучения. Взято с изменениями из [21]

Наблюдаемая в отдельных случаях токсичность квантовых точек позволила рассматривать их не только как биометки или удобные наноплатформы для доставки различных соединений к клеткам-мишеням [74], но и в качестве действующего агента в терапии рака (рисунок 4) [50, 75 – 78]. Квантовые точки обладают рядом характеристик, присущих «идеальному» фотосенсибилизатору (см. раздел 1.3); однако, низкие выходы АФК ограничивают перспективность использования КТ в данных целях. Более глубокое развитие получила идея применения КТ в дополнение к имеющимся в настоящее время фотосенсибилизаторам для усиления фотодинамического действия последних (см. раздел 1.4).

Эффективная доставка наночастиц к клеткам-мишеням является необходимым условием применения КТ в биологических исследованиях. Это позволяет снизить дозу вводимых препаратов на основе КТ, что способствует уменьшению побочных эффектов. Существует два основных способа доставки: пассивная (эндоцитоз) и активная (электропорация и др.). Эндоцитоз является основным механизмом проникновения КТ в клетки-мишени [79]; он может быть как неспецифическим (электростатические взаимодействия или адсорбция), так и специфическим. В последнем случае органическую оболочку КТ модифицируют при помощи различных молекул, способствующих проникновению внутрь клетки [48, 50]. Так, в работе [80] показано, что КТ, покрытые Tat-пептидом (RRRQRRKKRGY), проникают в клетки культуры HeLa с помощью макропиноцитоза, причем далее наблюдается транспорт везикул в область клеточного центра. Перспективными агентами для увеличения эффективности интернализации НЧ в клетки являются белковые лиганды для мембранных рецепторов, в частности, трансферрины. Трансферрины являются белками плазмы крови и участвуют в транспорте ионов Fe^{3+} . Человеческий Tf представляет собой глобулярный мономерный белок массой 76 кДа, который состоит из 679 аминокислот и имеет два сайта связывания ионов железа. Холо-форма Tf (связавшая два иона Fe^{3+}) является лигандом для трансферриновых рецепторов на поверхности клеток организма [81]. Связывание Tf с рецептором инициирует эндоцитоз, преимущественно клатрин-опосредованный [82]. После высвобождения ионов железа апо-форма Tf покидает клетку в составе рециркулирующих эндосом [83]. Показано, что квантовые точки из CdSe/ZnS, покрытые меркаптоуксусной кислотой [48] или ПЭГ [84] и модифицированные трансферрином, проникают в клетки культуры HeLa в отличие от не содержащего Tf аналога. Также доказано, что эффективность проникновения конъюгата НЧ-Tf в клетки зависит от способа связывания компонентов в конъюгате, причем образование ковалентной сшивки оказывается предпочтительнее электростатического взаимодействия [85].

Интересно, что КТ не высвобождаются в цитоплазму и остаются связанными с мембраной везикулы, что может стать проблемой при доставке КТ в определенные клеточные

компарменты. Кроме того, КТ крайне медленно выводятся клетками во внешнюю среду [53]. Нужно отметить, что адсорбция квантовых точек на мембрану клетки может вызывать тушение флуоресценции КТ [65, 67, 69], а также агрегацию наночастиц [64, 66, 67, 69].

1.2 Апконверсионные наночастицы

Поскольку органические ткани обладают наибольшей прозрачностью в дальней красной и ближней инфракрасной области спектра, использование наночастиц, люминесцирующих при возбуждении ИК-светом, представляется крайне перспективным в биологических и медицинских исследованиях. Такие наночастицы впервые были синтезированы в 2003 году и получили наименование апконверсионных наночастиц (АКНЧ) [86].

Люминесценция АКНЧ основана на механизме апконверсии (англ. upconversion) [87]. Явление заключается в суммировании нескольких поглощенных низкоэнергетических квантов света с высвечиванием более высокоэнергетического кванта. АКНЧ представляет собой неорганический кристалл (матрицу), легированный атомами лантаноидов. Лантаноиды имеют две различные функции (рисунок 5Б) [88]. Так называемые сенсibiliзирующие (донорные) ионы лантаноидов обладают значительным эффективным сечением поглощения в ИК области спектра. Обычно в качестве донора используют ионы иттербия Yb^{3+} . Люминесценция наночастицы связана с дезактивацией возбужденного состояния ионов других лантаноидов (акцепторных), называемых активаторами (эрбий Er^{3+} , тулий Tm^{3+} , гольмий Ho^{3+}). Переходы в активаторах имеют характер $4f-4f$ и, вообще говоря, запрещены правилом четности [89]. Тем не менее, в матрице АКНЧ запрет частично снимается, что приводит к люминесценции с большой длительностью (порядка сотен мкс). Значительная концентрация ионов лантаноидов в наночастице обеспечивает высокую вероятность безызлучательного переноса энергии от донорных ионов лантаноидов к акцепторным. Активатор при этом оказывается в возбужденном метастабильном состоянии. Если акт поглощения следующего кванта света произойдет ранее дезактивации метастабильного состояния, активатор испытывает переход в более высокоэнергетическое состояние, с которого осуществляется излучательная релаксация; если за время жизни возбужденного метастабильного состояния не произошло поглощения новых квантов света, излучательная релаксация в основное состояние происходит с него. Таким образом, типичный спектр люминесценции АКНЧ состоит из двух основных и ряда минорных узких линий (рисунок 5А) и расположен в видимой области спектра, что формально нарушает закон Стокса (т. н. антистоксов сдвиг). Последовательное поглощение нескольких фотонов и реализация механизма апконверсии почти в 10^6 раз эффективнее, чем при использовании

мультифотонного возбуждения люминесценции через виртуальные состояния [90]. Нужно отметить, что механизмы заселения некоторых энергетических уровней и интерпретация некоторых полос в спектре люминесценции АКНЧ остаются предметом дискуссий [91].

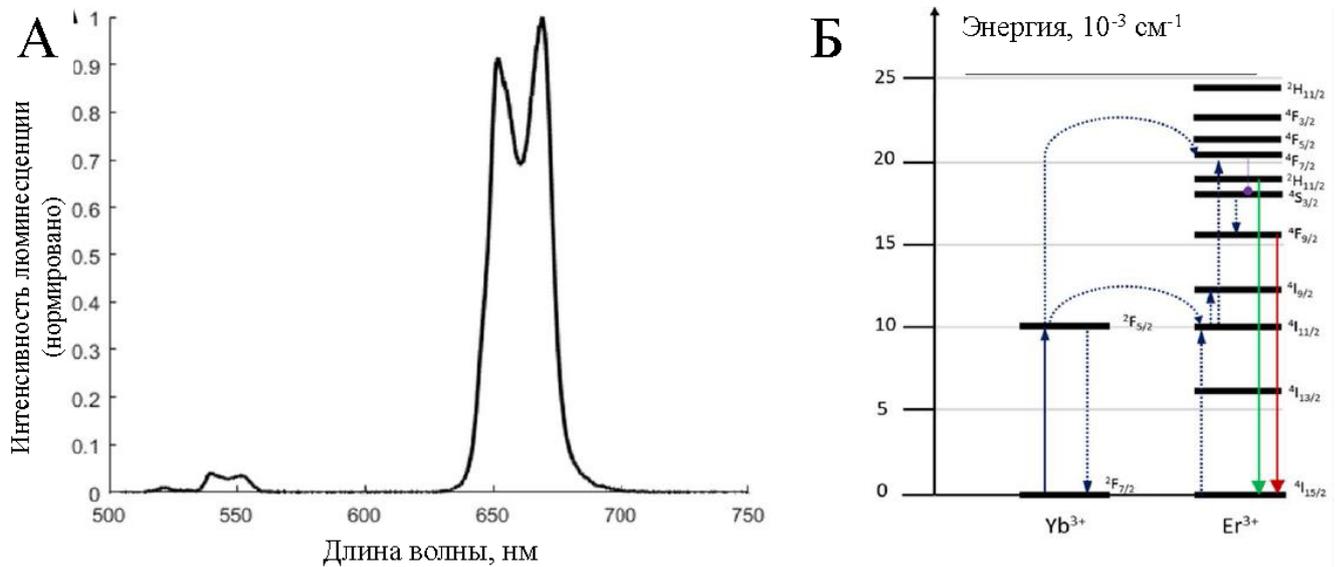


Рисунок 5. Спектр люминесценции АКНЧ $\text{NaYF}_4:\text{Yb,Er}$ (20% Yb, 2% Er) в водном растворе (А). Диаграмма Яблонского соответствующего процесса апконверсии (Б). Взято с изменениями из [92]

Обычно матрицей для ионов лантаноидов выступает неорганический кристалл $\beta\text{-NaYF}_4$, хотя могут использоваться также хлориды, оксиды и другие соединения различных редкоземельных элементов [93, 94]. Матрица должна соответствовать ряду критериев [88], таких как оптическая прозрачность для длин волн возбуждения люминесценции и самой люминесценции, низкие значения энергии фонона и др. Для более эффективной накачки ионов активаторов концентрация донорных ионов в кристалле должна на порядок превышать концентрацию акцепторных.

Молекулы растворителя (особенно воды) и органические лиганды способны тушить возбужденные состояния ионов лантаноидов, находящихся близко к поверхности НЧ [95]. Кроме того, дефекты поверхности нанокристалла также способствуют безызлучательной дезактивации. Для усиления люминесцентных свойств АКНЧ нанокристалл покрывают оболочкой, представляющей собой матрицу без легирования лантаноидами (пассивная защита) или с примесью ионов-сенсбилизаторов (активная защита) [91]. Однако, и в этих случаях квантовые выходы люминесценции АКНЧ в видимой области спектра обычно не превышают нескольких процентов; процедура определения величины ϕ сильно затруднена в силу нелинейности оптических свойств АКНЧ [96].

Размеры апконверсионных наночастиц составляют от 10 до 100 нм [97]. Покрытие защитными оболочками дополнительно увеличивает размер частицы. Хотя частицы меньшего размера более востребованы в исследованиях *in vitro* и *in vivo*, их создание сопряжено с определенными трудностями; кроме того, при уменьшении размера растет отношение поверхности к объему частицы. В результате большая часть излучающих центров оказывается близко к поверхности НЧ и тушится растворителем или лигандами органической оболочки [96]. Таким образом, эффекты, вызванные наноразмерностью, оказывают негативное влияние на оптические свойства АКНЧ, что прямо противоположно их влиянию на спектральные характеристики КТ.

Как и полупроводниковые квантовые точки, АКНЧ синтезируются в гидрофобной среде с использованием органических прекурсоров [98]. Перевод АКНЧ в водную фазу и дальнейшие модификации органической оболочки осуществляются обширным набором методов, равно применяющихся и для подготовки КТ в биологических приложениях [88, 99].

Благодаря значительной поглощательной способности в ИК области спектра, возможности модификации поверхности и своим уникальным люминесцентным свойствам апконверсионные наночастицы нашли широкое применение в биологических исследованиях в качестве флуоресцентных сенсоров [100, 101] и маркеров [102, 103] (в частности, раковых опухолей [104]), а также как платформа для направленной доставки лекарственных соединений [97]. АКНЧ используются как компонент FRET-сенсоров авидина с золотыми НЧ [105]. Показана возможность переноса энергии согласно индуктивно-резонансному механизму от АКНЧ к КТ состава CdSe [106, 107]; осуществлено спектральное кодирование при помощи конъюгатов АКНЧ с органическими красителями [90]. Биотоксичности АКНЧ не обнаружено [104], они считаются химически инертными [103]. Тем не менее, применение апконверсионных наночастиц ограничивается тем, что вода имеет ненулевой коэффициент молярной экстинкции в области 980 нм, которая используется для наиболее эффективной накачки Yb^{3+} . Это приводит к разогреву биологических тканей. Одним из способов предотвратить побочные эффекты разогрева является дополнительное легирование АКНЧ ионами Nd^{3+} [108], которые обладают поглощением в более коротковолновой области спектра. Однако, ионы Nd^{3+} являются гораздо менее эффективными сенсбилизаторами, чем Yb^{3+} [96]. Кроме того, имеются противоречивые данные о стабильности коллоидных растворов АКНЧ [98, 109].

1.3 Фталоцианины как фотосенсибилизаторы для фотодинамической терапии и инактивации микроорганизмов

1.3.1 Структурные и спектральные свойства фталоцианинов

Фталоцианины являются тетрапиррольными соединениями, родственными молекулам порфиринового ряда (тетрабензотетраазопорфирины). От исходного порфина фталоцианины отличаются заменой атома углерода в метинных мостиках на третичный азот, а также наличием бензольных колец, связанных с пиррольными кольцами макроцикла (см. рисунок 8).

Спектры поглощения порфиринов в видимой области имеют четыре узкие слабые полосы (I-IV; нумерация начинается с длинноволновой), отстоящие друг от друга на примерно равные интервалы. Кроме того, на границе УФ- и видимой области порфирины имеют очень интенсивную полосу поглощения, называемую полосой Sore. Введение атома азота вместо метинных групп СН вызывает сильное возмущение π -электронного облака молекулы. Это приводит к увеличению интенсивности полос I и III, а также к их батохромному сдвигу. Полоса Sore при этом уширяется и смещается в коротковолновую область (гипсохромный сдвиг). Бензольные кольца макроцикла, очевидно, в значительной степени входят в систему сопряженных двойных связей и влияют на распределение электронной плотности; интенсивность полос поглощения при этом увеличивается, сами полосы испытывают батохромный сдвиг.

Из четырех центральных атомов азота только два образуют ковалентную связь с водородом (доказано их противоположное расположение). Наличие у оставшихся двух центральных атомов азота неподеленных электронных пар обуславливает возможность координирования макроциклом Фц атомов различных элементов. Центральная полость макроцикла достаточно велика, чтобы координировать большинство элементов таблицы Менделеева [110]. Аналогичная ситуация наблюдается у всех соединений порфиринового ряда, не имеющих гидрированных пиррольных колец. В настоящее время большое распространение получили комплексы Фц с металлами или кремнием. Образование металлокомплекса приводит к вырождению четырех полос поглощения в видимой области спектра в две. Металлокомплексы Фц обладают очень интенсивной полосой поглощения I, а также значительно более слабыми полосами III и Sore.

Наиболее типичными для порфиринов являются комплексы с двухвалентными металлами. При встраивании атома металла в макроцикл молекулы красителя наблюдается батохромный сдвиг полосы I поглощения Фц, причем с увеличением порядкового номера металла величина батохромного сдвига возрастает [111]. Этот эффект объясняется тем, что незаполненная *p*-орбиталь металла включается в систему сопряжения; чем больше электроотрицательность металла, тем сильнее смещение спектров Фц. В целом же, эффекты смещения оказываются незначительными. Также возможны соединения с трехвалентными металлами; за счет третьей валентности к системе присоединяется кислотный остаток.

Соединения порфиринового ряда обладают флуоресценцией и фосфоресценцией. Тяжелые и парамагнитные атомы металлов в составе Фц увеличивают вероятность синглет-триплетного перехода, поэтому такие Фц обладают крайне низкими квантовыми выходами флуоресценции [112]. Кроме того, увеличивается вероятность безызлучательной рекомбинации в основное состояние за счет вовлечения *d*-оболочек металла в систему сопряжения [113]; соотношение между константами этих процессов определяется природой металла и боковых заместителей [114]. Диамагнитные металлы (Zn, Al) не оказывают такого значительного эффекта. Комплексы Фц с диамагнитными металлами флуоресцируют и потому более удобны в диагностике (как флуоресцентные метки).

Фталоцианины являются гидрофобными молекулами. Перевод Фц в водную фазу осуществляется путем модификации бензольных колец различными заместителями. Это могут быть низкомолекулярные лиганды, придающие молекуле полярность и/или заряд [115], сахара [116] и т. д. Боковые заместители оказывают существенное влияние на полосу поглощения QI металлопорфиринов [111], а также на оптические и фотофизические свойства Фц [117]. Максимальное количество боковых заместителей, которые могут быть введены в молекулу Фц, определяется количеством мест связывания на бензольных кольцах и равно восьми для орто- и восьми для мета-замещения [118]. Кроме того, для кремниевых Фц (или комплексов Фц с трехвалентными металлами) доступна возможность введения аксиальных лигандов [119]. Широкий выбор заместителей с определенными свойствами, а также возможность варьирования степени замещения позволяют создавать замещенные Фц для различных областей промышленности и медицины [110].

Несмотря на то, что химическая модификация молекул Фц делает их более водорастворимыми, гидрофобная природа макроцикла определяет вероятность агрегации данных молекул в водных растворах. Для тетрапирролов доказано существование нескольких типов агрегатов [110]. Агрегаты Н-типа (олигомерные) и D-типа (димерные) имеют узкий пик

поглощения, смещенный в синюю область спектра по сравнению с пиком поглощения мономерной формы. Молекулы тетрапиррола в таких агрегатах образуют структуру типа «сэндвич»; агрегаты не флуоресцируют, т.к. возбужденное состояние дезактивируется безызлучательно за счет внутримолекулярной конверсии. Агрегаты J-типа (полимерные) имеют широкий пик поглощения, смещенный в красную область спектра по сравнению с пиком поглощения мономерной формы; агрегаты образованы молекулами тетрапиррола, взаимодействующими торцевыми частями. Эти агрегаты флуоресцируют и характерны для немногих типов тетрапирролов. Возможно одновременное существование молекул порфиринов в обеих формах (равновесие мономер/агрегат) и всех типах агрегатов, а также переходы между этими состояниями [120 – 122]. Агрегация может быть вызвана изменением ряда параметров внешней среды (например, температуры) [123, 124], увеличением концентрации Фц [125], а также инициироваться образованием комплекса фталоцианинов с молекулами другой природы [126]. Вероятность агрегации также зависит от наличия и природы центрального металла в макроцикле Фц. В растворах может наблюдаться динамическое тушение флуоресценции мономеров Фц димерами [127]. Таким образом, формирование агрегатов Фц крайне нежелательно вследствие потери фталоцианином его ожидаемых фотофизических свойств.

1.3.2 Фотодинамическое действие фталоцианинов на биологические объекты

Молекулы фталоцианинов обладают долгоживущим триплетным возбужденным состоянием, которое образуется с достаточно высокой вероятностью за счет синглет-триплетного перехода (isc) при поглощении кванта света. При взаимодействии с молекулярным кислородом ${}^3\Sigma_g^-O_2$ молекула Фц возвращается в основное синглетное состояние 1Фц согласно следующим реакциям:



где ${}^1Фц^*$ и ${}^3Фц^*$ – возбужденное синглетное и триплетное состояние молекулы Фц, соответственно. При этом происходит образование синглетного кислорода ${}^1\Delta_g O_2$. Синглетный кислород способен вступать в различные окислительно-восстановительные реакции с биологическими молекулами, вызывая их структурные и функциональные повреждения [128].

Следовательно, фталоцианины могут рассматриваться как потенциальные фотосенсибилизаторы в фотодинамической терапии.

«Идеальный» фотосенсибилизатор должен обладать следующими характеристиками:

- 1) стабильность молекулы (в т. ч. фотостабильность),
- 2) большие значения коэффициента молярной экстинкции в дальней красной области спектра,
- 3) высокая биодоступность (в т. ч. минимальная агрегация в биологических средах),
- 4) отсутствие «темновой» токсичности,
- 5) специфичность к мишени воздействия,
- 6) быстрое удаление препарата из организма.

Фотовыцветание является значительной проблемой органических красителей, которые используются в качестве ФС. Разрушение молекулы при высоких интенсивностях возбуждающего света приводит к падению эффективности фотодинамического действия. Поглощение в красной области спектра необходимо, поскольку максимальная глубина проникновения света в ткани приходится на т. н. область «оптического окна» (800 – 1100 нм). Требования 4 – 6 призваны минимизировать побочные эффекты, которые могут быть оказаны ФС на здоровые ткани.

Фотосенсибилизаторы на основе замещенных фталоцианинов различных металлов удовлетворяют большинству этих требований. Фц хорошо поглощают свет в красной области спектра (коэффициенты молярной экстинкции $\sim 10^5 \text{ л*моль}^{-1}\text{см}^{-1}$) и эффективно генерируют АФК при облучении красным светом с выходом порядка 40 – 50%. Нужно отметить, что фталоцианинами генерируется не только синглетный кислород, но и другие его формы (через супероксид-анион), хотя и с более низкой вероятностью. Фц также могут вступать в реакции непосредственно с другими молекулами, вызывая образование свободных радикалов без участия кислорода. Кроме того, Фц легко подвергаются различным модификациям [129]; создание специальных конструкций для направленной доставки молекул ФС к клеткам-мишеням значительно увеличивает эффективность ФДТ [130]. Таким образом, фталоцианины являются высокоэффективными фотосенсибилизаторами, что обусловило их успешное применение в фотодинамической терапии опухолевых заболеваний [131, 132], стоматологии и инактивации патогенных микроорганизмов [133].

В биологических средах синглетный кислород обладает временем жизни порядка 100 нс – 1 мкс, эффективный радиус его действия составляет несколько десятков нм [134].

Таким образом, молекула ФС должна локализоваться в непосредственной близости к мишени фотодинамического действия. Известно, что тетрапирролы могут связываться с различными биологическими молекулами [118, 126, 135, 136]. Подробно изучено взаимодействие Фц с белками плазмы крови. Так, октакарбокситаллоцианины различных металлов адсорбируются на бычий сывороточный альбумин (БСА) [112]. При этом возрастает скорость генерации ими АФК, по-видимому, вследствие увеличения времени жизни триплетного состояния. Скорость фотовыцветания также увеличивается, что подтверждает участие АФК в этом процессе. Связывание гидрофобных тетрапирролов сывороточными альбуминами повышает вероятность доставки молекул ФС к клеткам-мишеням и эффективность ФДТ [137]. Считается, что молекулы сывороточных альбуминов имеют один сайт связывания Фц [114], однако, инициирование агрегации может увеличивать реальное соотношение тетрапиррол:БСА в комплексе [138]. Увеличение степени сульфирования алюминиевых Фц приводит к уменьшению константы взаимодействия с человеческим сывороточным альбумином [136].

Основной мишенью фотосенсибилизаторов в ФДТ и ФДИ являются клеточные мембраны. Механизм гибели клеток может отличаться в зависимости от интенсивности возбуждающего света: обычно при низких интенсивностях запускается апоптоз, а при высоких – некроз [131]. Считается, что основными мишенями действия ФС при высоких интенсивностях света являются белки [4]; повреждения белков в области мембраны нарушают ее целостность, что приводит к некрозу. При низких интенсивностях облучения ФС вызывают переокисление липидов биологических мембран; продукты окисления липидов являются сигнальными молекулами апоптоза.

Показано, что катионные фталлоцианины (в отличие от анионных) хорошо связываются с искусственными фосфолипидными мембранами, а также с мембраной выделенных митохондрий [139]. Ингибирование адсорбции ионами фтора в случае алюминиевых Фц может свидетельствовать о координировании центрального атома металла на фосфор в составе липидов. Аналогичная зависимость эффективности связывания Фц от заряда молекулы наблюдается и для бактериальных клеток. В состоянии равновесия на одну клетку *E. coli* адсорбируется порядка 1 млн молекул октакатионного фталлоцианина цинка [140]. Предполагаемые сайты связывания находятся на молекулах липополисахаридов (ЛПС). Наличие в среде ионов магния или кальция, имеющих те же сайты связывания на ЛПС, препятствует взаимодействию Фц с бактериальными клетками. В той же работе обнаружено тушение флуоресценции Фц при связывании с клеточной стенкой.

В культурах животных клеток водорастворимые молекулы Фц проникают в клетку с помощью эндоцитоза [141]; гидрофобные или амфифильные ассиметричные молекулы Фц способны проникать через мембрану самостоятельно [142]. Показано, что Фц, имеющие третичный азот на периферии макроцикла, лучше проникают в клетки по сравнению с Фц, имеющими четвертичный азот [119]. Увеличение степени сульфирования алюминиевых Фц приводит к уменьшению скорости проникновения [136]. Несмотря на значительный прогресс в понимании влияния структурных свойств Фц на эффективность специфического связывания и захвата клеткой, требования к «идеальному» ФС для однокомпонентного препарата Фц недостижимы. Будущее фотодинамической терапии связывают с многокомпонентными ФС, где Фц будет доставляться к клеткам с помощью комплексов белков и наночастиц, усиливающих эффективность его действия.

1.4 Гибридный комплекс наночастица – фотосенсибилизатор

1.4.1 Перенос энергии в гибридных комплексах

В большинстве работ, посвященных созданию гибридных комплексов на основе фотосенсибилизаторов и флуоресцентных наночастиц, основной целью является увеличение (за счет наночастицы) поглощательной способности молекул ФС в тех областях спектра, где фотосенсибилизатор сам по себе обладает крайне низкими коэффициентами молярной экстинкции. Обычно для переноса энергии предполагается механизм, описанный Ферстером (индуктивно-резонансный перенос энергии, FRET) [143]. Согласно этой теории, перенос энергии возможен между молекулой-донором энергии в возбужденном состоянии и молекулой-акцептором энергии в основном состоянии, и основан на диполь-дипольных взаимодействиях двух молекул. Для переноса энергии необходимо выполнение нескольких условий:

1. Перекрывание спектра флуоресценции донора энергии и спектра поглощения акцептора энергии должно быть ненулевым.
2. Колебательная релаксация в молекуле акцептора должна быть быстрой для обеспечения необратимости переноса. При ненулевой вероятности обратного процесса его необходимо рассматривать как независимый от прямого.
3. Относительная ориентация дипольных моментов флуоресценции донора и поглощения акцептора не должна быть перпендикулярной.

4. Между молекулами донора и акцептора энергии должно быть небольшое расстояние, поскольку константа скорости переноса энергии быстро уменьшается с увеличением расстояния.

Константа скорости переноса энергии определяется выражением

$$k_{et} = \frac{\varphi_d \chi^2}{\tau_d R^6} \left(\frac{9000 \ln 10}{128 \pi^5 N_A n^4} \right) \int_0^\infty F_d(\lambda) \varepsilon_a(\lambda) \lambda^4 d\lambda, \quad (4)$$

где φ_d – квантовый выход донора в отсутствие акцептора, χ^2 – фактор, описывающий взаимную ориентацию в пространстве дипольных моментов переходов 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, $F_d(\lambda)$ – нормированный спектр флуоресценции донора (суммарная интенсивность принимается равной единице), $\varepsilon_a(\lambda)$ – коэффициент экстинкции акцептора на длине волны λ . Величина $J = \int_0^\infty F_d(\lambda) \varepsilon_a(\lambda) \lambda^4 d\lambda$ называется интегралом перекрытия спектра флуоресценции донора энергии и спектра поглощения акцептора энергии. Значения ориентационного фактора χ^2 могут колебаться от 0 (моменты переходов перпендикулярны, $k_{et} = 0$, переноса энергии нет) до 4 (моменты переходов параллельны и ориентированы по соединяющей молекулы оси, константа скорости переноса энергии максимальна).

В водных растворах χ^2 принимают равным $2/3$ вследствие вращательной диффузии молекул донора и акцептора энергии, что означает случайную ориентацию моментов переходов. Несмотря на то, что при установлении тесного взаимодействия между наночастицей и ФС в гибридном комплексе ориентация моментов переходов может отличаться от случайной, для расчетов в теории FRET для ГК всегда используют значение $\chi^2 = 2/3$. Отчасти это оправдано тем, что большая часть используемых в ГК квантовых точек не обладает анизотропией флуоресценции. Исследование анизотропии флуоресценции флуорофоров может помочь оценить возможные взаимные ориентации дипольных моментов переходов и тем самым уточнить значение χ^2 [5]. Нужно отметить, что теория Ферстера основана на предположении о точности взаимодействующих диполей, что не соответствует линейному масштабу КТ и ФС. Формулы (6)–(10) получены в предположении симметричности волновой функции нанокристалла КТ, которое, вообще говоря, не справедливо. Тем не менее, экспериментальные данные хорошо согласуются с выводами этой теории [144].

В реальных экспериментах главным искомым параметром теории является расстояние между донором и акцептором энергии. При этом громоздкое выражение для константы

скорости переноса энергии (4) заменяется на ее простую зависимость от R путем введения параметра Ферстеровского расстояния (радиуса)

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

$$k_{et} = \frac{1}{\tau_d} \left(\frac{R_0}{R} \right)^6 = k_f \left(\frac{R_0}{R} \right)^6. \quad (6)$$

Если константа скорости переноса энергии превышает константу скорости флуоресценции донора энергии k_f , то эффективность переноса энергии будет высокой. Эффективность переноса энергии определяется как доля поглощенных донором фотонов, энергия которых аккумулировалась акцептором

$$W = \frac{k_{et}}{k_{et} + k_f}. \quad (7)$$

Подставляя выражение (6) в (7), получаем

$$W = \frac{R_0^6}{R_0^6 + R^6}. \quad (8)$$

Таким образом, физический смысл радиуса Ферстера заключается в том, что на таком расстоянии между донором и акцептором энергии эффективность ее переноса составляет 50%. Радиус Ферстера обычно составляет 30 – 60 Å, что прекрасно сочетается с размером наиболее распространенных наночастиц, использующихся в биологических приложениях.

Для гибридного комплекса, состоящего только из одной молекулы донора и одной молекулы акцептора энергии, расстояние между донором и акцептором можно оценить, зная эффективность переноса энергии. При этом важным условием является постоянство дистанции донор – акцептор за время жизни возбужденного состояния донора энергии. В гибридных комплексах НЧ-ФС это условие, очевидно, выполняется. Если в комплексе на одну молекулу донора энергии приходится более чем одна молекула акцептора, уравнение (8) модифицируется в

$$W = \frac{n R_0^6}{n R_0^6 + R^6}, \quad (9)$$

где n – число молекул акцептора в пересчете на одну молекулу донора.

Существует несколько критериев успешного осуществления переноса энергии. В первую очередь, это тушение флуоресценции донора энергии. Кроме того, в результате переноса энергии должны измениться некоторые свойства акцептора энергии. В случае

флуоресцирующего ФС это может быть либо увеличение интенсивности его флуоресценции, либо увеличение скорости генерации им АФК. Для нефлуоресцирующих ФС только генерация АФК является критерием переноса энергии, что делает их менее удобными в спектральных исследованиях переноса энергии.

Тушение флуоресценции донора оценивается по уменьшению величины квантового выхода флуоресценции. Эффективность переноса энергии легко вычисляется по формуле

$$W = 1 - \frac{\varphi_{da}}{\varphi_d}, \quad (10)$$

где φ_{da} – квантовый выход флуоресценции донора в присутствии акцептора. Эффективность переноса энергии можно рассчитывать, используя методы стационарной флуоресцентной спектроскопии или спектроскопию высокого временного разрешения. В первом случае можно непосредственно оценить изменение квантового выхода флуоресценции донора энергии в присутствии акцептора относительно эталонного вещества. Во втором случае, изменение квантового выхода флуоресценции связывается с изменением длительности флуоресценции донора энергии в силу пропорциональности этих величин (см. раздел 2.2.3). Как правило, степень тушения флуоресценции донора, оцениваемая с использованием стационарной флуоресцентной спектроскопии, оказывается выше, чем с использованием методик измерения длительности флуоресценции (рисунок 6). Можно интерпретировать разницу между этими двумя способами измерения эффективности переноса энергии как присутствие отличных от FRET механизмов дезактивации возбужденного состояния донора. Иногда для расчетов величины W используют поправочные коэффициенты. Это обусловлено тем, что поглощение ФС на длине волны возбуждения флуоресценции КТ за счет экранирования снижает реальную интенсивность возбуждающего светового луча. Кроме того, на длинах волн флуоресценции КТ поглощение Фц снижает измеряемую интенсивность свечения КТ. Таким образом, измеряемая величина интенсивности флуоресценции КТ становится меньше истинной. Для оценки и нивелирования этих эффектов в работе [145] предлагают использовать коэффициент коррекции

$$\eta = \frac{A_{xo}A_{yo}(1-10^{-A_{xi}})(1-10^{-A_{yi}})}{A_{xi}A_{yi}(1-10^{-A_{xo}})(1-10^{-A_{yo}})}, \quad (11)$$

где A_{yo} и A_{xo} – поглощение донора энергии на длине волны максимума флуоресценции донора и возбуждения флуоресценции донора соответственно, а A_{yi} и A_{xi} – поглощение смеси донора и акцептора на тех же длинах волн. С помощью коэффициента η эффективность переноса энергии вычисляют как $W = 1 - \varphi_{da}/\eta\varphi_d$.

В некоторых работах [12, 58, 146] для расчета эффективности переноса энергии используют не тушение флуоресценции донора энергии, а факт увеличения поглощательной способности акцептора, выражающийся в виде роста интенсивности его флуоресценции [5]:

$$W = \frac{\varepsilon_A(\lambda_D^{ex})}{\varepsilon_D(\lambda_D^{ex})} \left(\frac{I_{DA}(\lambda_A^{em})}{I_A(\lambda_A^{em})} - 1 \right) \frac{1}{f}, \quad (12)$$

где $\varepsilon_A(\lambda_D^{ex})$ и $\varepsilon_D(\lambda_D^{ex})$ – коэффициенты молярной экстинкции акцептора и донора на длине волны возбуждения флуоресценции донора, $I_{DA}(\lambda_A^{em})$ и $I_A(\lambda_A^{em})$ – интенсивности флуоресценции акцептора (на длине волны измерения) в присутствии или отсутствие донора соответственно, f – доля молекул донора, связанных с молекулами акцептора энергии. Однако использование спектральных характеристик донора энергии для расчета величины W считается более корректным. Дело в том, что даже если фотосенсибилизатор и наночастица обладают необходимыми для осуществления FRET спектральными характеристиками, далеко не всегда удается получить гибридный комплекс, в котором наблюдается усиление флуоресценции ФС или скорости генерации им АФК [7, 147 – 150]. Обычно это приводит к отказу от механизма FRET в качестве модели описания взаимодействий наночастицы и ФС [61, 151 – 154]. На самом деле, причиной подобных явлений могут быть эффекты комплексообразования, а также сама архитектура гибридного комплекса.

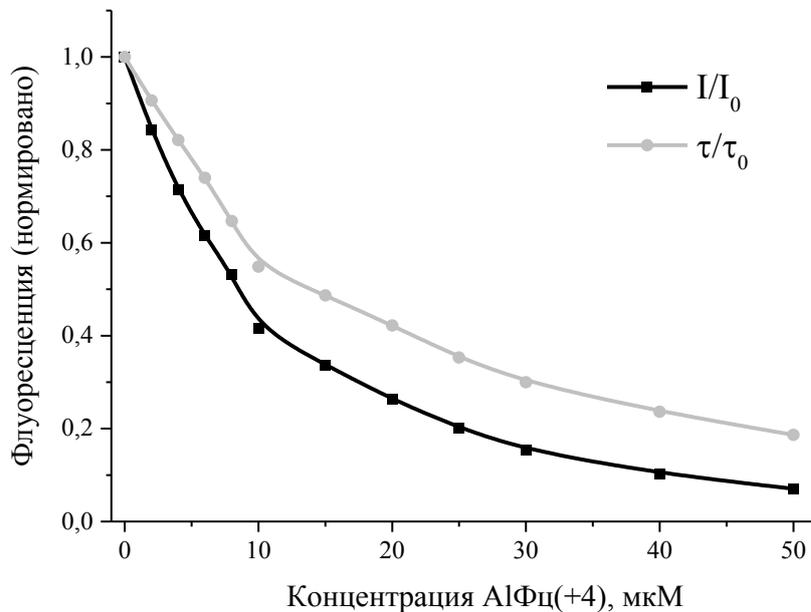


Рисунок 6. Тушение флуоресценции CdSe/ZnS квантовой точки фталоцианином алюминия с зарядом +4 различной концентрации в водном растворе. Значения интенсивности I и длительности τ флуоресценции КТ нормированы на их значения I_0 и τ_0 в отсутствие акцептора энергии (Фц)

1.4.2 Архитектура гибридного комплекса и эффекты комплексообразования

Создание гибридных комплексов наночастица-фотосенсибилизатор в водном растворе основано на нескольких основных типах взаимодействий: электростатическом, ковалентном или группе взаимодействий, объединяемых под понятием адсорбции. При использовании любого из типов установления связи между компонентами комплекса наблюдаются изменения спектральных свойств компонентов ГК. В первую очередь, это характерно для молекул фотосенсибилизатора, взаимодействующего с внешней органической оболочкой наночастицы.

Наиболее удобным способом приготовления гибридных комплексов является простое смешивание наночастиц и молекул фотосенсибилизатора в водном растворе. При этом взаимодействие обусловлено электростатическим притяжением разноименно заряженных компонентов. Наблюдаемые изменения спектральных свойств ФС в таком случае могут быть различны по своему характеру и зависят от двух основных параметров ГК: стехиометрии (соотношения ФС:НЧ в комплексе) и способа преобразования светового потока (перенос энергии или фотоиндуцированный перенос носителя заряда).

Далеко не всегда в ГК осуществляется перенос энергии от наночастицы к молекуле фотосенсибилизатора. Часто результатом взаимодействия ФС и наночастицы оказывается перенос носителя заряда, обычно электрона. При этом наблюдаются сильные изменения спектральных свойств ФС вследствие образования анион-радикалов и других производных [155, 156]. В частности, в работе [7] исследовали электростатически стабилизированные ГК на основе КТ из CdTe (оболочка из тиогликолевой кислоты) с красителем метиленовым синим (МС); показано, что с увеличением концентрации МС происходит тушение флуоресценции КТ (практически полное уже при ФС:КТ менее 10:1). Интересно, что при селективном возбуждении МС в ГК флуоресцирует, но при возбуждении ГК через КТ флуоресценция МС тушится полностью. Таким образом, механизм фотоиндуцированного переноса заряда в данном случае является наиболее вероятным.

К описанию взаимодействия между НЧ и ФС с помощью переноса электрона прибегают и в случаях, когда не наблюдаются следствия переноса энергии по механизму Ферстера, например, отсутствует усиление флуоресценции акцептора энергии. Необходимо отметить, что перенос электрона с КТ на ФС означает переход КТ в «выключенное» состояние, когда уместна модель классического статического тушения: образование ГК приводит к полному тушению флуоресценции КТ, и флуоресцируют только свободные КТ в растворе. В таком случае происходит тушение интенсивности флуоресценции КТ без изменения длительности

флуоресценции. К сожалению, этот критерий проверяется не всегда [151, 157], что может исказить интерпретацию результатов эксперимента.

На величину усиления флуоресценции акцептора энергии также влияет соотношение ФС:НЧ. Известно, что при увеличении концентрации ФС тушение флуоресценции НЧ усиливается. Это находится в соответствии с теорией FRET (уравнение 9). Однако, увеличение локальной концентрации молекул ФС на поверхности наночастицы может приводить к самотушению флуоресценции ФС [7, 11, 148, 149].

Самотушением флуоресценции ФС называется концентрационное тушение флуоресценции ФС другими молекулами того же ФС. Самотушение является частым явлением при исследовании свойств гибридных комплексов. Существует два механизма самотушения флуоресценции: агрегация и гомо-перенос энергии. Агрегация ФС была рассмотрена ранее в разделе 1.3.1. Образование агрегатов крайне нежелательно, поскольку агрегаты ФС не флуоресцируют и не генерируют АФК, хотя эффективно тушат флуоресценцию наночастиц. Кроме того, для идентичных молекул с малой величиной Стоксова сдвига вероятность переноса энергии по механизму Ферстера может быть очень высокой [5]. Фотосенсибилизаторы относятся именно к таким молекулам. Концентрационная зависимость интенсивности флуоресценции ФС в растворе КТ обычно носит куполообразный характер [73, 150, 158]: при низких концентрациях ФС наблюдается рост интенсивности флуоресценции, который затем прекращается и сменяется уменьшением интенсивности флуоресценции ФС вследствие усиления эффекта самотушения.

В остальных случаях (отсутствие переноса заряда, низкие значения соотношения ФС:КТ) направление изменений спектральных свойств ФС при образовании ГК должно определяться возмущением электронной плотности молекулы ФС. В литературе имеются сведения о следующих эффектах комплексообразования:

- 1) батохромный сдвиг спектров поглощения и/или флуоресценции ФС [11 – 13, 73, 151, 159],
- 2) гипсохромный сдвиг спектров поглощения и флуоресценции ФС [8, 157, 160, 161],
- 3) гипохромизм [151, 157, 159, 160],
- 4) уменьшение квантового выхода флуоресценции [160, 161],
- 5) увеличение триплетного квантового выхода [155, 160],
- 6) увеличение времени жизни триплетного состояния [160, 161].

Выход триплетных состояний ФС обычно увеличивается, что объясняют т. н. «эффектом тяжелого атома». Эффект заключается в том, что в присутствии атомов тяжелых металлов (кадмий, теллур) увеличивается вероятность внутримолекулярной конверсии ФС в триплетное состояние, что приводит также к падению квантового выхода флуоресценции ФС. В отдельных случаях, при образовании ГК ион кадмия из квантовой точки может прямо встраиваться в макроцикл безметалльного ФС [161, 162]. В работе [163] отмечается, что величина изменений оптических свойств ФС возрастает с увеличением размера кристалла КТ, по-видимому, из-за большей концентрации тяжелых атомов. Наличие защитной оболочки из сульфида цинка должно снижать влияние тяжелых атомов ядра КТ на свойства ФС.

Гибридные комплексы, основанные на электростатическом притяжении разноименно заряженных наночастиц и фотосенсибилизаторов, не требуют сложных протоколов приготовления и являются достаточно устойчивыми. Однако было замечено, что смешивание одноименно заряженных компонентов также приводит к образованию комплекса [164 – 167]. Следовательно, в образовании ГК могут участвовать иные взаимодействия. Под адсорбцией мы будем понимать все типы нековалентных взаимодействий, отличных от электростатического и обеспечивающих самосборку гибридного комплекса в растворе.

В общем случае, процесс адсорбции заключается во встраивании молекулы ФС (за счет периферических [162] или аксиальных [158, 168, 169] гидрофобных заместителей) в слой лигандов, покрывающих полупроводниковое ядро КТ. Взаимодействие ухудшается вместе с ростом разветвленности заместителя [169]. Интересна работа [168], где продемонстрирована зависимость эффективности переноса энергии от отношения длин лигандов органической оболочки КТ и аксиальных заместителей молекулы ФС. Так, эффективность переноса энергии коррелировала с длиной заместителя, что говорит о более прочном встраивании молекулы ФС за счет большей площади взаимодействия. Если, однако, уменьшить длину лиганда внешней оболочки КТ, то зависимость эффективности переноса энергии от длины аксиального заместителя приобретает куполообразный характер: когда размер заместителя превышает размер лиганда КТ, встраивание заместителя в оболочку КТ оказывается лишь частичным, что приводит к увеличению расстояния между КТ и ФС в комплексе. При образовании ГК за счет адсорбции отмечали разнонаправленные изменения спектральных свойств ФС в зависимости от типа молекулы ФС [152, 170, 171], или отсутствие каких-либо изменений, что связывают с поверхностной адсорбцией, когда встраивание минимально [162]. При адсорбции может наблюдаться агрегация молекул ФС [153].

Как правило, триплетный выход ФС растет при адсорбции на НЧ [165, 170] (однако, не всегда [166]; в [152] наблюдали падение времени жизни триплетного состояния ФС). Это может быть связано с тем, что при встраивании молекулы ФС внутрь органической оболочки КТ уменьшается вероятность тушения триплетного состояния ФС кислородом [171].

Особый интерес представляют комплексы ФС с наночастицами, покрытыми полимерной оболочкой [6, 9, 62, 150, 172 – 175]. Считается, что молекулы ФС в таких комплексах могут встраиваться в слой полимера, покрывающего наночастицу. Этот вывод делается на том основании, что гидродинамический радиус НЧ (вместе с полимерной оболочкой) превышает расстояние донор-акцептор, необходимое для наблюдающегося эффективного переноса энергии по механизму FRET. Нужно отметить, что гидродинамический радиус не совпадает с реальным радиусом НЧ, поэтому вывод о встраивании молекулы ФС внутрь полимерной оболочки НЧ не является вполне доказанным. Тем не менее, наблюдающиеся при взаимодействии с НЧ батохромные [150, 173] или гипсохромные [62] сдвиги спектров поглощения и флуоресценции ФС во всех случаях авторы связывают с адсорбцией ФС в слой полиэтиленгликоля (ПЭГ) [9].

В понятие адсорбции включается координационный тип связывания, когда связь образуется непосредственно между ядром наночастицы и молекулой фотосенсибилизатора. Можно считать доказанным образование координационной связи между третичным атомом азота в составе молекулы ФС и атомами кристаллической решетки CdSe/ZnS КТ в толуоле [36, 58, 171, 176, 177]. Молекулы порфирина без атомов азота в боковых заместителях с КТ не взаимодействуют. Показано, что положение азота в пиридиловом кольце пиридилпорфиринов (рисунок 7) влияет на величину эффективности переноса энергии в ГК. В случае орто-положения атома азота наблюдалось крайне малое тушение флуоресценции КТ, которое значительно возрастало в случае мета-положения и достигало максимального значения при пара-положении азота. При этом необходим плотный контакт между ФС и кристаллом КТ, чему может препятствовать внешняя органическая оболочка наночастицы. Считается, однако, что органическими лигандами покрыта не вся поверхность КТ. Таким образом, образование координационной связи в данном случае не подразумевает вытеснение органических лигандов молекулой фотосенсибилизатора, поскольку адсорбция может происходить на лишенных лигандов участках поверхности наночастицы. Молекула порфирина, очевидно, может адсорбироваться на КТ как плоскостью макроцикла с участием всех боковых пиридиловых колец, так и торцом с участием одного-двух пиридиловых заместителей. Об этом говорит тот факт, что эффективность переноса энергии в ГК растет с увеличением количества пиридиловых заместителей в молекуле порфирина с 1 до 4, но величина W оказывается сравнимой для

монопиридилпорфирина и бипиридилпорфирина с противоположным расположением пиридиловых колец.

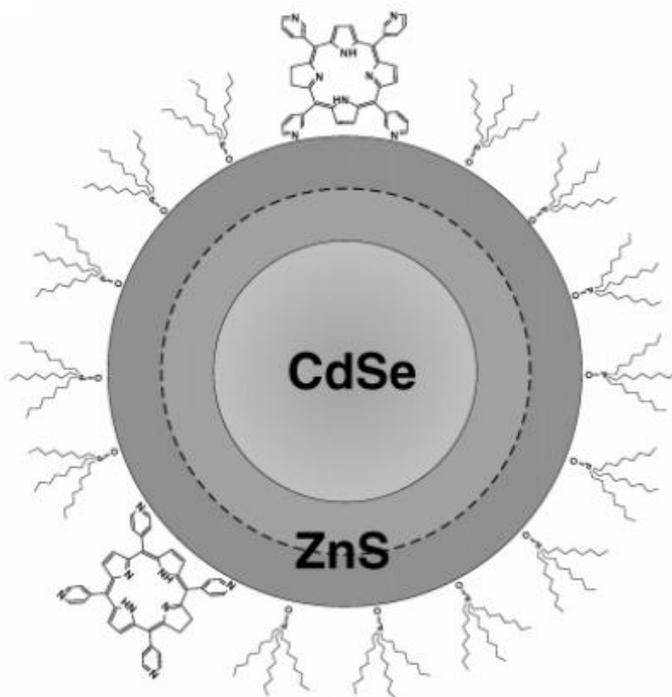


Рисунок 7. Схема гибридного комплекса CdSe/ZnS квантовой точки, покрытой ТОФО, с тетра(мета-N)пиридилпорфирином. Взято с изменениями из [36]

При образовании ГК наблюдали гипсохромное смещение спектра флуоресценции порфирина, а также увеличение длительности его флуоресценции. Выраженность эффектов уменьшалась с увеличением концентрации порфирина в растворе. Авторы интерпретировали этот факт как рост количества свободных молекул порфирина, не связанных с квантовыми точками [178]. Кроме того, при образовании комплекса наблюдали батохромное смещение полосы S_{01} , которое, возможно, было вызвано изменением структуры π -системы электронов при координации атома азота пиридила на атом цинка КТ, или более высокой диэлектрической константой поверхности наночастицы по сравнению с раствором толуола.

Возможность координационного взаимодействия была постулирована в качестве объяснения образования гибридного комплекса между отрицательно заряженной квантовой точкой из CdTe (покрытие из 3-меркаптопропионовой кислоты) и тетрасульфофталоцианином алюминия, также несущим отрицательный заряд [55]. Предполагалось, что молекула ФС координируется атомом алюминия на карбоксильную группу КТ. Идея была распространена на КТ из CdTe, покрытые тиогликолевой кислотой [146, 179]; однако, доказательств взаимодействия COO-Al в литературе, посвященной гибридным комплексам, так и не было приведено.

Комплексы наночастиц и ФС, полученные на основе ковалентного взаимодействия, имеют ряд преимуществ перед ГК, стабилизированными иными типами взаимодействий. Во-первых, взаимодействие осуществляется между конкретными функциональными группами ФС и органической оболочки КТ, поэтому известна точная локализация ФС в ГК. Это позволяет предсказать некоторые фотофизические свойства ГК. Во-вторых, такой ГК с большей вероятностью останется стабильным в присутствии биологических объектов и сред. Следовательно, идея увеличения поглощательной способности ФС за счет наночастицы в таком комплексе гарантированно реализуется. Все это обусловило большой интерес к ковалентно сшитым ФС и наночастицам в биофизических исследованиях [147, 163, 180 – 185].

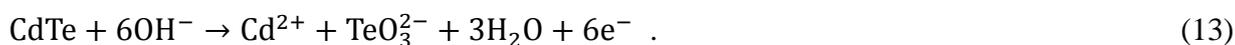
Создание ГК на основе ковалентной связи связано с некоторыми трудностями. Критерием успешной сшивки является появление соответствующих полос в спектрах комбинационного рассеяния или спектрах Фурье в ИК-области [163, 180, 182]. Эти методы не всегда оказываются доступными. Нельзя исключать иных типов взаимодействий при создании ковалентно стабилизированных ГК, из-за чего приходится проводить очистку образца от слабо связавшихся молекул ФС [185] при желании точно установить характер изменений спектральных свойств ФС именно в результате образования ковалентной связи.

Более значимая проблема заключается в том, что линкер, образующийся между молекулой ФС и поверхностью наночастицы, дополнительно увеличивает расстояние между ними. Это отрицательно сказывается на эффективности переноса энергии, поскольку последняя быстро снижается при увеличении дистанции между донором и акцептором энергии. Кроме того, процедура образования ковалентной связи затрудняет контроль соотношения ФС:НЧ в ГК, которое является одним из важнейших параметров, определяющих фотодинамическую эффективность комплекса. По этой причине в ряде работ не удалось провести сравнение свойств ковалентно сшитого ГК и его электростатически стабилизированного аналога [147, 180, 182].

В большинстве работ спектральные изменения ФС при образовании ГК одинаковы для ковалентного и электростатического способов связывания: гипсохромный сдвиг спектра поглощения ФС и гипохромизм [180, 181, 183] или батохромный сдвиг спектра поглощения ФС и гипохромизм [147]. В некоторых работах отмечается отсутствие изменений спектральных свойств ФС при образовании ковалентной связи [182].

Спектральные свойства наночастицы, как правило, не изменяются или незначительно изменяются при комплексообразовании. Очевидно, при образовании ГК фотосенсибилизатор оказывает некоторое влияние на конформационное состояние лигандов внешней оболочки

наночастицы. Считается, что состояние органической оболочки может модифицировать спектральные свойства флуоресцирующего ядра наночастицы. Наиболее подробно эти эффекты продемонстрированы на квантовых точках, покрытых низкомолекулярными лигандами. В работе [154] показано, что инкубация КТ с протопорфирином IX вызывает падение квантового выхода и гипсохромный сдвиг спектра флуоресценции КТ. Авторы полагают, что изменения спектральных свойств КТ вызваны фотоокислением ее поверхности, вероятно, синглетным кислородом. Это подтверждается тем фактом, что покрытие наночастицы дополнительной силиконовой оболочкой предотвращает изменения спектральных свойств КТ. В работе [157] предлагается иной механизм фотоокисления КТ, сопровождающийся переносом электрона на молекулу фотосенсибилизатора:



Образование ГК за счет ковалентной сшивки, вероятно, может приводить к агрегации КТ [185].

1.4.3 Фотодинамические свойства гибридных комплексов

Перенос энергии от флуоресцентной наночастицы, а также наблюдаемое в некоторых случаях увеличение квантового выхода и времени жизни триплетного состояния ФС вследствие комплексообразования должны приводить к усилению генерации молекулой ФС активных форм кислорода. Действительно, при образовании ГК растет поглощательная способность молекулы фотосенсибилизатора в сине-зеленой области спектра (или в ИК-области при использовании АКНЧ), что увеличивает выход АФК при облучении светом соответствующих длин волн [8 – 11, 14, 56, 58, 170]. Тем не менее, в некоторых работах фотодинамическое действие ФС в составе ГК не превышало [184] или оказывалось даже ниже, чем действие однокомпонентного раствора ФС [6, 60 – 62, 152]; наблюдаемые эффекты могут быть вызваны агрегацией ФС [7] или изменением соотношения ФС:КТ в гибридном комплексе [6, 13, 61].

В ряде работ показано, что фотодинамический эффект, оказываемый ГК на бактериальные и эукариотические животные клетки, оказывается более выраженным, чем у исходного ФС [6 – 8, 10 – 13]. В первую очередь это связано с тем, что НЧ в составе ГК изначально отводилась роль наноплатформы для доставки лекарств к клеткам-мишеням. Модификация поверхности НЧ антителами, пептидами и другими молекулами, способствующими проникновению конструкции в клетку, гарантированно усиливает фотодинамический эффект ФС в составе ГК [62]. Интернализация ГК в клетку, однако, не

является необходимой, поскольку клеточная мембрана сама по себе представляет собой подходящую мишень для АФК. Показано, что ГК, стабилизированные за счет нековалентных взаимодействий, способны к неспецифическому проникновению в клетки [12] и остаются стабильными в клеточных компартментах [10, 11, 14]. Во-вторых, увеличение эффективности гибели клеток может достигаться исключительно за счет переноса энергии при возбуждении флуоресценции НЧ в составе ГК [6, 11]. Нужно отметить отсутствие «темновой» токсичности ГК во всех приведенных выше работах.

Эффективность интернализации определяется в первую очередь структурными свойствами НЧ. Если сами НЧ плохо связываются с поверхностью клетки, хорошо связывающийся с клеткой ФС (в отсутствие НЧ) в составе ГК демонстрирует прямо противоположное поведение [7, 13]. Однако, если связывание ФС с НЧ не является достаточно прочным, ФС может покидать ГК и действовать на биологические объекты самостоятельно [9].

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

2.1.1 Флуоресцентные наночастицы

Для изучения влияния заряда НЧ на эффективность формирования и спектральные свойства ГК в качестве доноров энергии были выбраны положительно заряженные (за счет полимерной оболочки «polyT-APS» с аминогруппами) CdSeCdTe/ZnS квантовые точки (далее КТ600(+)), а также отрицательно заряженные (за счет полимерной оболочки с карбоксигруппами) CdTe квантовые точки (далее КТ600(-)).

При исследовании влияния спектральных свойств квантовых точек на процессы переноса энергии в гибридном комплексе мы использовали CdSe/ZnS квантовые точки (далее КТ580, КТ600, КТ620 и КТ640) с полимерной оболочкой, модифицированной карбоксильными группами.

Все КТ, использованные в данной работе, были получены от ООО НТИЦ «Нанотех-Дубна», Россия. Спектральные и структурные характеристики всех вышеперечисленных квантовых точек представлены в таблице 1. Коэффициенты молярной экстинкции, концентрации и размеры ядра КТ определяли методом, предложенным Ю с соавт. [37]. Положение экситонного пика поглощения КТ выявляли путем аппроксимации спектра поглощения КТ суммой гауссианов с помощью программы Fityk 0.9.8 [186]. Квантовый выход флуоресценции φ КТ определяли путем сравнения с веществом-стандартом. В качестве стандарта использовали родамин В, квантовый выход флуоресценции которого принимали равным 0.65 в спиртовом растворе [187]. Регистрировали спектры флуоресценции и поглощения родамина в зависимости от его концентрации в растворе, на основании чего строили калибровочный график, где по оси ординат откладывали величину площади под спектром флуоресценции, а по оси абсцисс – значение оптической плотности родамина на длине волны возбуждения флуоресценции (455 нм). Квантовый выход флуоресценции КТ в спиртовом растворе определяли по формуле

$$\varphi = \varphi_0 \frac{S D_0}{S_0 D} , \quad (14)$$

где S – площадь под спектром флуоресценции, D – оптическая плотность раствора на длине волны возбуждения флуоресценции. Индекс 0 соответствует флуорофору-стандарту (родамин В) с известным квантовым выходом флуоресценции φ_0 .

Таблица 1. Спектральные и структурные характеристики квантовых точек

	Положение спектра флуоресценции, нм	Квантовый выход флуоресценции	Полуширина спектра флуоресценции, нм	Длительность флуоресценции (средняя), нс*	Размер ядра, нм	Размер нанокристалла, нм	Коэффициент молярной экстинкции, л·моль ⁻¹ ·см ⁻¹ **
КТ580	587	0.400	46.6	14.4	3.4	10.0±0.1	145000
КТ600	613	0.045	40.2	11.7	3.6	7.2±0.3	175000
КТ620	623	0.384	33.3	19.4	4.9	10.5±0.2	390000
КТ640	642	0.140	29.9	28.6	6.2	10.4±0.1	730000
КТ600(+)	599	-	40.4	16.0	3.5	7.6±0.2	164000
КТ600(-)	603	-	56.5	33.6	3.3	-	129000

* в водном растворе; регистрация на длине волны в максимуме пика флуоресценции. Возбуждение флуоресценции 455 нм, 10 МГц

** на длине волны максимума экситонного пика поглощения

Апконверсионные наночастицы были представлены нанокристаллами $\text{NaYF}_4(\text{Er}/\text{Tm}, \text{Yb})/\text{NaYF}_4$ с максимумом поглощения в области 980 нм (Mesolight, США). АКНЧ имели оболочку из ПЭГ, модифицированную аминокислотами. Квантовый выход люминесценции данных АКНЧ составлял порядка 0.1%. Концентрацию АКНЧ в растворе определяли согласно [92].

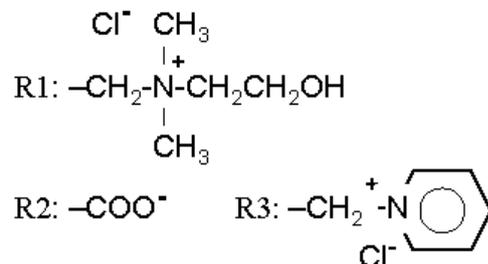
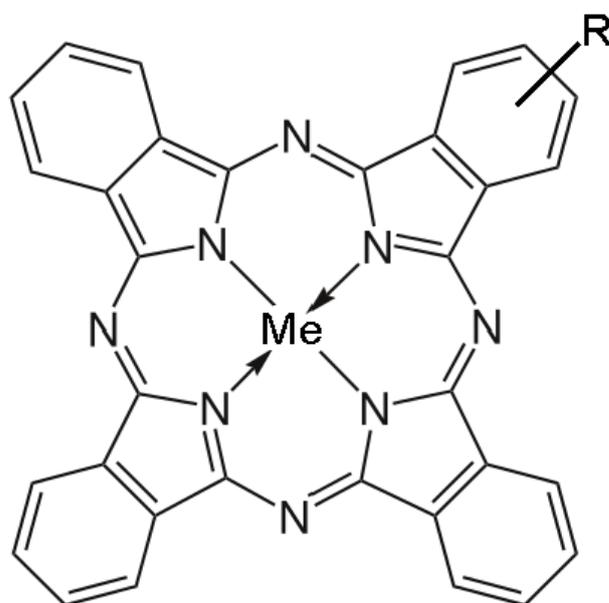
2.1.2 Фталоцианины

В качестве фотосенсибилизаторов мы использовали следующие Фц (рисунок 8):

1. Фталоцианины цинка – положительно заряженный октаакис(пиридинометил)фталоцианин $\text{ZnФц}(+8)$ и отрицательно заряженный октакарбокситфалоцианин $\text{ZnФц}(-8)$.
2. Фталоцианины алюминия – три поликатионных холинзамещенных фталоцианина алюминия со средней степенью замещения 4, 4.5 и 6.5 ($\text{AlФц}(+4)$, $\text{AlФц}(+4.5)$ и $\text{AlФц}(+6.5)$), а также октакарбокситфалоцианин $\text{AlФц}(-8)$.

Все фталоцианины были синтезированы в ФГУП ГНЦ «НИОПИК». Коэффициенты молярной экстинкции, положение длинноволнового пика поглощения и спектра

флуоресценции, а также квантовые выходы генерации синглетного кислорода этих соединений в водном растворе представлены в таблице 2. Нами были выбраны фталоцианины цинка и алюминия, поскольку металлокомплексы Фц с диамагнитными атомами металлов способны к флуоресценции и потому удобны в исследованиях переноса энергии.



Фц	Me	R	Кол-во R
AlФц(+4)	Al	R1	4
AlФц(+4.5)	Al	R1	4-5
AlФц(+6.5)	Al	R1	6-7
AlФц(-8)	Al	R2	8
ZnФц(-8)	Zn	R2	8
ZnФц(+8)	Zn	R3	8

Рисунок 8. Схема строения молекулы металлокомплекса фталоцианина, а также структурная композиция использованных в работе фталоцианинов

Таблица 2. Фотофизические свойства металлокомплексов фталоцианинов

	AlФц(+4)	AlФц(+4.5)*	AlФц(+6.5)*	AlФц(-8)**	ZnФц(-8)**	ZnФц(+8)*
Положение полосы QI, нм	715	681	682	696	689	677
Положение спектра флуоресценции, нм	722	689	691	706	703	692
Коэффициент молярной экстинкции, л*моль ⁻¹ см ⁻¹	150000	150000	185000	185000	180000	180000
Выход синглетного кислорода	-	0.23	0.29	0.12	0.32	0.45
Квантовый выход флуоресценции	-	0.12	0.17	0.27	0.23	0.12

* – согласно [188]

** – согласно [189]

2.2 Методы

2.2.1 Ковалентное связывание трансферрина и квантовых точек

Для насыщения апотрансферрина (Sigma Aldrich, Германия) железом был использован 200 мМ натрий-карбонатный буфер (pH 5.9), содержащий 20 мМ $\text{FeSO}_4(\text{NH}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. К 14 мг апотрансферрина добавили 1 мл вышеописанного буфера, аккуратно перемешали до полного растворения белка и инкубировали образец при $+4^\circ\text{C}$ в течение 2.5 ч. Полученный препарат холо-формы белка (Тф) диализовали против 0.5 л 200 мМ натрий-карбонатного буфера (pH 9.5) при $+4^\circ\text{C}$ в течение ночи.

Ковалентное связывание КТ и Тф осуществляли карбодиимидным методом. Для активации карбоксильных групп квантовых точек к 104 мкл 20 мкМ раствора КТ в 30 мМ ПБС добавили 200 мМ EDC и 500 мМ NHS (Sigma Aldrich, Германия) до конечных концентраций EDC и NHS, равных, соответственно, 2 и 5 мМ (соотношение концентраций КТ:EDC:NHS = 1:100:250). Образец инкубировали при $+25^\circ\text{C}$ 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 Тф над квантовыми точками) в том же буфере и инкубировали при $+25^\circ\text{C}$ в течение 2.5 ч для их сшивки. Инактивировали реакцию добавлением к реакционной смеси 1 М Tris-HCl (pH 7.6) до конечной концентрации 20 мМ и инкубировали полученный препарат в течение 30 мин. Смену буфера для конъюгатов 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 (pH 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.

Для изучения проникновения холо-формы Тф в клетки осуществляли ковалентное связывание белка с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ). К 0.5 мл холотрансферрина добавили 175 мкл 0.5 мг/мл раствора ФИТЦ в 30 мМ натрий-фосфатном буфере (ПБС, рН 7.6) по каплям, аккуратно перемешивая после добавления каждой капли. Образец инкубировали при +4°C в течение 10 ч. Далее проводили смену буфера и удаление избытка ФИТЦ для конъюгата холотрансферрина – ФИТЦ методом гель-фильтрации на колонке NAP-10 (GE Healthcare, США), уравновешенной 30 мМ ПБС.

2.2.2 Абсорбционная спектроскопия

Интенсивность светового потока при его прохождении через исследуемую среду уменьшается вследствие превращения энергии возбуждающего излучения в различные формы внутренней энергии вещества и (или) в энергию вторичного излучения. Способность вещества поглощать свет зависит от электронного строения атомов и молекул, а также от длины волны падающего света, толщины слоя вещества, концентрации вещества, температуры [190]. В эксперименте эффективность поглощения света на длине волны λ характеризуется оптической плотностью $A(\lambda)$, определяемой как

$$A(\lambda) = \log \frac{I_{\lambda}^0}{I_{\lambda}}, \quad (15)$$

где I_{λ}^0 и I_{λ} – интенсивности падающего на образец света и прошедшего через образец, соответственно. Применение абсорбционной спектроскопии основано на объединенном законе Бугера – Ламберта – Бера [191]:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda)cl, \quad (16)$$

где l – длина оптического пути в образце (см), c – концентрация вещества (моль*л⁻¹), $\varepsilon(\lambda)$ – молярный коэффициент поглощения (л*моль⁻¹см⁻¹). Зависимость оптической плотности от концентрации вещества может стать нелинейной при высоких концентрациях вследствие образования иных поглощающих форм вещества.

Спектром поглощения называют зависимость величины оптической плотности вещества A (или коэффициента молярной экстинкции ε) от длины волны. Вид спектра поглощения определяется как природой образующих его атомов и молекул, так и агрегатным состоянием вещества. Спектр вещества в конденсированной фазе определяется не только природой составляющих его молекул, но и межмолекулярными взаимодействиями, влияющими на структуру электронных уровней. Обычно такой спектр состоит из ряда широких полос

различной интенсивности. Иногда в нем проявляется структура колебательных уровней. По спектрам поглощения проводят качественный и количественный анализ веществ.

Абсорбционная спектроскопия широко применяется для изучения строения вещества. Она особенно эффективна при исследовании процессов в жидких средах; по изменениям положения, интенсивности и формы полос поглощения судят об изменениях состава и строения поглощающих свет частиц без их выделения из растворов.

Для измерения поглощательной способности используют спектрофотометры – оптические приборы, состоящие из источника света, камеры для образцов (в случае растворов – отделения для кюветы), монохроматора (призма или дифракционная решетка) и детектора. Сигнал от детектора регистрируется в виде непрерывной кривой (спектра поглощения) или в виде таблиц.

В данной работе спектры поглощения регистрировали с помощью спектрофотометра USB2000 (Ocean Optics, США) с многоканальным детектором ILX511A (Sony, Япония) на фотодиодной матрице (разрешение 0.39 нм на пиксель, отношение сигнал/шум 250/1), позволяющим регистрировать изменения поглощения во всех каналах одновременно, в диапазоне 200 – 1000 нм. Отношение сигнал/шум дополнительно увеличивали путем накопления спектров. Измерения проводили в 10 мм кварцевых или пластиковых кюветах. В качестве образца сравнения использовали раствор (вода, буферный раствор), не содержащий исследуемых веществ.

2.2.3 Флуоресцентная спектроскопия

В акте поглощения молекулой вещества светового кванта электрон молекулы переходит в одно из возбужденных состояний с более высокой энергией. Далее, электрон возвращается в основное состояние в результате нескольких возможных процессов [191]:

1. Внутримолекулярная конверсия (с константой процесса k_{ic})
2. Флуоресценция k_f
3. Синглет-триплетный переход k_{isc}
4. Фосфоресценция k_{ph}
5. Замедленная флуоресценция k_{df}
6. Взаимодействие с другой молекулой (тушение) k_q

Квантовый выход флуоресценции, характеризующий вероятность излучательного перехода электрона с нижнего колебательного подуровня первого возбужденного энергетического уровня S1 на основной уровень S0 (переход 0-0), определяется как

$$\varphi_f = \frac{k_f}{\sum_i k_i} = \frac{k_f}{k_f + k_{df} + k_{ic} + k_{isc} + k_{ph} + k_q} \quad (17)$$

Квантовый выход флуоресценции можно определять прямо (абсолютный квантовый выход) и косвенно (относительный). При прямом способе считается отношение испущенных квантов флуоресценции к общему числу поглощенных квантов; при косвенном способе измерения используется эталонное вещество с уже известным значением φ_f .

Исследование спектров флуоресценции – зависимости интенсивности излучения от длины волны – позволяет проводить качественный и количественный анализ различных компонентов в биологических и модельных системах, а также изучать их взаимодействие друг с другом. Качественный люминесцентный анализ основан на сравнении формы спектров исследуемой смеси веществ с формой спектра индивидуальных соединений, которые могут входить в состав смеси. Для люминесцентного анализа используются растворы с низкой оптической плотностью, в противном случае возникает необходимость учитывать эффекты экранирования и реабсорбции (см. раздел 1.4.1, уравнение 11). Важной особенностью спектра флуоресценции многокомпонентных систем является зависимость его формы от длины волны возбуждения (т. к. при разных длинах волн могут возбуждаться разные соединения).

Несмотря на то, что энергия 0-0 перехода в общем случае одинакова для процессов поглощения и флуоресценции, спектр флуоресценции смещен относительно спектра поглощения в область более длинных волн. Это объясняется тем, что при поглощении фотона электрон испытывает переход на один из колебательных подуровней возбужденного состояния, а затем в результате колебательной релаксации переходит на нижний колебательный подуровень S1, с которого и осуществляется акт флуоресценции. Кроме того, флуоресценция осуществляется в общем случае на какой-либо колебательный подуровень основного состояния, что дополнительно увеличивает величину сдвига. Разница между длинами волн максимумов пиков поглощения и флуоресценции вещества называется Стоксовым сдвигом. Величина Стоксова сдвига зависит от природы молекулы и ее взаимодействия с окружением.

Интенсивность флуоресценции выражают в виде плотности потока фотонов. Она пропорциональна интенсивности возбуждающего света I_0 , квантовому выходу флуоресценции и коэффициенту поглощения $1 - 10^{-D}$ [190]:

$$I = kI_0\varphi_f(1 - 10^{-D}) = kI_0\varphi_f(1 - 10^{-\varepsilon cl}) . \quad (18)$$

Инструментальная константа k зависит от следующих условий эксперимента:

- 1) телесного угла, в пределах которого собран свет флуоресценции,
- 2) ширины спектрального интервала, вырезаемого монохроматором,
- 3) пропускания монохроматора,
- 4) чувствительности приемника.

Из уравнения (18) видно, что интенсивность флуоресценции в общем случае не пропорциональна концентрации. Однако, при малой оптической плотности ($D < 0.1$) можно использовать приближенное выражение, которое получается при разложении исходного в степенной ряд и учете только первого члена этого ряда:

$$I \approx 2.3kI_0\varphi_f\varepsilon cl . \quad (19)$$

Таким образом, при низких концентрациях флуоресцирующего вещества интенсивность флуоресценции пропорциональна концентрации вещества, что позволяет проводить количественный флуоресцентный анализ.

Для регистрации стационарных спектров флуоресценции использовали CCD спектрометр USB4000 (Ocean Optics, США) с детектором TCD1304AP (Toshiba, Япония), производящим регистрацию фотонов в диапазоне 200 – 1100 нм с разрешением 0.25 нм на пиксель и отношением сигнал/шум порядка 300/1. Отношение сигнал/шум дополнительно увеличивали путем накопления спектров.

2.2.4 Флуоресцентная спектроскопия высокого временного разрешения

Как и акт поглощения кванта света, сам акт испускания фотона в результате флуоресценции занимает время порядка фемтосекунд. Тем не менее, молекула M находится в возбужденном синглетном состоянии $^1M^*$ некоторое время (10 пс – 100 нс), прежде чем произойдет дезактивация возбужденного состояния (излучательно с константой k_r или безизлучательно с константой k_{nr}). Таким образом, после короткого облучения (время облучения много меньше характерных времен процессов дезактивации состояния $^1M^*$) в образце появится некоторое количество молекул в возбужденном состоянии $[^1M^*]_0$. Согласно классической химической кинетике, скорость уменьшения заселенности возбужденного состояния определяется формулой

$$-\frac{d[{}^1M^*]}{dt} = (k_r + k_{nr})[{}^1M^*] . \quad (20)$$

Интегрируя это уравнение, получим временную зависимость уменьшения количества молекул в возбужденном состоянии

$$[{}^1M^*] = [{}^1M^*]_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau_s}\right) , \quad (21)$$

где $\tau_s = (k_r + k_{nr})^{-1}$ – время жизни возбужденного синглетного состояния, которое также называют длительностью флуоресценции. На практике измеряют кинетику затухания флуоресценции (уменьшение интенсивности флуоресценции во времени), поскольку интенсивность флуоресценции пропорциональна $[{}^1M^*]$. Длительность флуоресценции является одной из основных характеристик флуорофора, поскольку может дать информацию о взаимодействии флуорофора с его окружением. Многоэкспоненциальный характер кинетики затухания флуоресценции может быть результатом того, что молекулы флуорофора находятся в различных окружениях, либо явиться результатом процессов, протекающих в возбужденных состояниях.

Для большинства органических флуорофоров длительность флуоресценции составляет порядка единиц наносекунд. Следовательно, для измерения времен затухания флуоресценции требуется использования сверхбыстрых электронных устройств и детекторов.

Основным методом, используемым в настоящее время для регистрации кинетик затухания флуоресценции, является метод счета фотонов (time-correlated single photon counting, TCSPC; рисунок 10). Принцип метода заключается в том, что вероятность регистрации единичного фотона в момент времени t после возбуждающей вспышки источника света (как правило, лазера) пропорциональна интенсивности флуоресценции в этот момент времени. Установка настроена таким образом, что за период между двумя лазерными импульсами происходит регистрация не более чем одного фотона. Это необходимо, поскольку технические возможности современной аппаратуры позволяют правильно определить время детекции только первого фотона в данном временном диапазоне [5]. Обычно в среднем на 1000 возбуждающих импульсов регистрируется один фотон (с учетом «мертвого» времени измерения). Это позволяет работать с разбавленными образцами и минимизировать артефакты, связанные с высокими концентрациями веществ (явления реабсорбции и др.). Метод отличается высокой чувствительностью и большим динамическим диапазоном регистрации интенсивности флуоресценции в широком интервале времен (0.1 – 1000 нс).

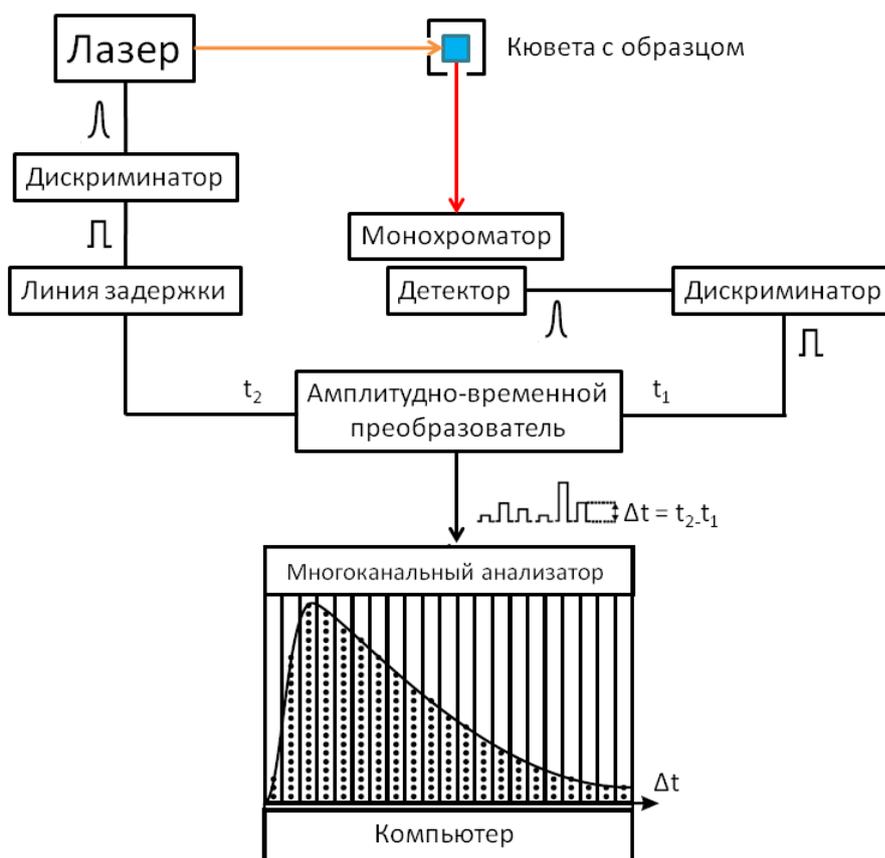


Рисунок 10. Схема установки для регистрации кинетик затухания флуоресценции. Взято с модификациями из [191]

Кинетики затухания флуоресценции с пикосекундным временным разрешением получали с помощью измерительного комплекса на основе системы однофотонного счета SimpleTau-140 (Becker & Hickl, Германия) [192]. Для возбуждения флуоресценции полупроводниковых квантовых точек и фталоцианинов 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. Среднее значение длительности флуоресценции рассчитывали по формуле:

$$\tau = \sum_i a_i \tau_i, \quad (22)$$

где τ_i – время жизни 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.

Стационарные спектры люминесценции АКНЧ были измерены при комнатной температуре с помощью флуориметра Fluorolog-3 (Horiba-Jobin-Yvon, Франция) с кинетической приставкой Fluoro-Hub (Horiba Scientific). При регистрации спектров люминесценции для возбуждения был использован светодиодный лазер с длиной волны излучения 980 нм (1.6 Вт, 12 VDC, Laserlands, Китай), работающий в стационарном режиме. Образец объемом 200 мкл помещался в кварцевую кювету 5x5 мм (Hitachi low-scatter micro cell, # 650-0171) и в течение всего эксперимента постоянно перемешивался магнитной мешалкой. Для увеличения плотности энергии возбуждающего света и интенсивности вторичного излучения между лазером и кюветой с образцом была установлена короткофокусная линза, а сама кювета помещена в специальный держатель с двумя отражающими сферическими зеркалами (Hitachi high-sensitivity cell holder, # 650-0184), что позволяло повысить эффективность светосбора почти в три раза.

Измерение длительности люминесценции АКНЧ проводили на длине волны 540 нм и 655 нм, а длительности флуоресценции Фц(-8) на длине волны 700 нм. В этом случае излучение лазера было модулировано внешним TTL сигналом (5 В) с частотой 50 Гц. Длительность лазерного П-образного светового импульса определялась временем поступающего TTL сигнала (15 мкс). Второй TTL триггерный синхроимпульс (5 В, 1 мкс) для запуска развертки считывания излучаемых квантов следовал через 10 мкс после начала лазерной вспышки. Для этой цели был использован двухканальный генератор Г5-56. Регистрация кинетик затухания люминесценции проводилась с использованием программы DataStation v2.6 (Horiba Scientific) в режиме Multi Channel Scaling (MCS). При записи излучения АКНЧ на длине волны 540 нм шкала времени была установлена равной 1 мс (1000 каналов с шагом 1 мкс), а накопление проводилось в течение 10000 одиночных импульсов. При регистрации на длине волны 655 нм (люминесценция АКНЧ) или 700 нм (ИК-стимулированная флуоресценция Фц(-8)) шкала времени была 2 мс (1000 каналов с шагом 2 мкс), а накопление проводилось в течение 20000 и 100000 импульсов соответственно. Для измерения собственной длительности флуоресценции Фц(-8) на наносекундной шкале времени Fluoro-Hub был переведен в кинетический режим (TCSPC). В этом случае источником импульсного светового возбуждения являлся светодиодный лазер NanoLED-390 (390 нм, ~1 нс, 11 пДж, Horiba Scientific), работающий с частотой 1 МГц. Анализ кинетических кривых проводили с помощью программы DAC-6, входящей в программное обеспечение флуориметра.

Расчет параметров переноса энергии (см. раздел 1.4.1) в гибридных комплексах наночастица – фталоцианин производили с помощью программы «PhotochemCAD» (США) [193].

2.2.5 Анизотропия флуоресценции

Явление анизотропии флуоресценции связано с тем, что моменты переходов поглощения и флуоресценции в молекуле флуорофора могут быть ориентированы различным образом. В гомогенном растворе ориентация молекул флуорофора является случайной. Предположим, что молекулы не испытывают вращательную диффузию. При облучении раствора поляризованным светом наиболее эффективно поглощают фотон молекулы флуорофора, ориентированные по электрическому вектору возбуждающего света. Таким образом, фракция молекул в возбужденном состоянии является частично ориентированной. Следовательно, поток фотонов, излученных такими молекулами в результате флуоресценции, также будет частично поляризованным. Угол между моментами переходов при поглощении и флуоресценции β определяет максимальное значение наблюдаемой анизотропии (фундаментальной анизотропии)

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3\cos^2\beta - 1}{2} \right). \quad (23)$$

Фундаментальная анизотропия может принимать значения от -0.2 до 0.4. Анизотропия также зависит от длины волны возбуждения флуоресценции. Для достижения максимальных значений анизотропии флуоресценции флуорофора в эксперименте рекомендуют использовать длины волн возбуждения в области длинноволнового пика поглощения молекулы, поскольку в таком случае угол β минимален [5].

В экспериментах по регистрации анизотропии флуоресценции образец облучают светом, прошедшим через вертикальный поляризатор. Перед детектором устанавливают второй поляризатор, положение которого можно менять. Анизотропию флуоресценции определяют как

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}, \quad (24)$$

где I_{\parallel} и I_{\perp} – интенсивности флуоресценции флуорофора при параллельных и скрещенных поляризаторах, соответственно.

Вращательная диффузия молекулы флуорофора за время жизни его возбужденного состояния снижает максимально доступное значение r . Следовательно, наблюдаемое значение анизотропии флуоресценции позволяет оценить скорость вращения молекулы, на которую

может оказывать влияние температура, вязкость раствора, а также образование комплексов с другими молекулами.

Для изучения скорости вращения молекул регистрировали кинетики затухания анизотропии флуоресценции (рисунок 11А). Для этого кинетику затухания флуоресценции регистрировали при двух положениях широкополосных поляризационных фильтров WP25M-UV (Thorlabs, США), расположенных, соответственно, на пути возбуждающего света перед кюветой с образцом и в канале регистрации сигнала флуоресценции от образца. В таком случае, уменьшение интенсивности поляризованной флуоресценции отражает не только процессы дезактивации возбужденного состояния, но и процессы деполяризации, связанные с вращением молекулы. Кинетику затухания анизотропии флуоресценции $r(t)$ вычисляли по формуле

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)}, \quad (25)$$

где $I_{\parallel}(t)$ и $I_{\perp}(t)$ – кинетики затухания флуоресценции при параллельных и скрещенных поляризаторах, соответственно. 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.

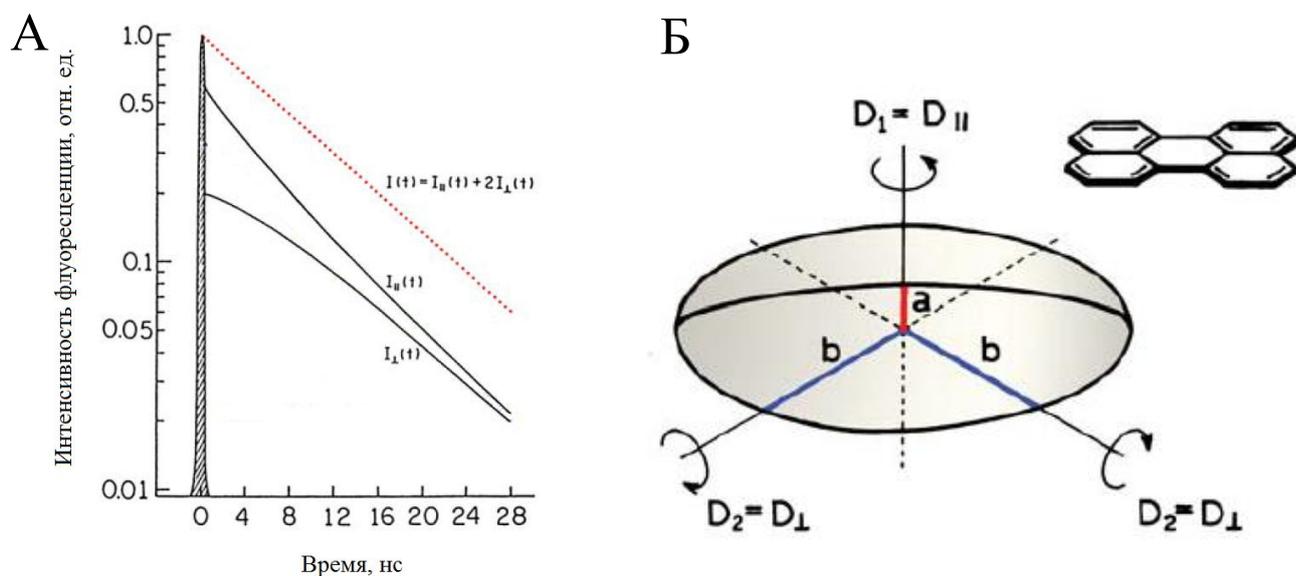


Рисунок 11. Принцип расчета кинетики затухания анизотропии флуоресценции (А). Схема молекулы – плоского эллипсоида вращения (Б). D_1 и D_2 – коэффициенты вращательной диффузии в плоскости молекулы и вне её, соответственно. Взято с изменениями из [5]

Анизотропию флуоресценции вычисляли только для молекул фталоцианина, поскольку использованные в данной работе квантовые точки анизотропией флуоресценции не обладают. Молекулы Фц являются плоскими эллипсоидами вращения (рисунок 11Б). Это значит, что из кинетики затухания анизотропии флуоресценции можно получить два характерных времени вращения молекулы – в плоскости макроцикла и вне плоскости. В данной работе метод регистрации кинетик затухания анизотропии флуоресценции Фц использовали для подтверждения возникновения ГК между фталоцианинами и наночастицами.

2.2.6 Методы регистрации синглетного кислорода

Скорость генерации синглетного кислорода молекулами Фц в комплексе с КТ оценивали при помощи химической ловушки дифенилизобензофурана (ДФБФ) [194]. Данное окрашенное соединение имеет спектр поглощения в синей области спектра (с максимумом на длине волны 415 нм) и при взаимодействии с активными формами кислорода образует бесцветную перекись (рисунок 12). Спиртовой раствор, содержащий Фц и/или КТ, готовили в темноте и добавляли ДФБФ, растворенный в этаноле. Затем раствор облучали актиничным светом, регистрируя уменьшение оптической плотности на длине волны 415 нм до выхода на плато. Методика не рекомендует использовать в качестве возбуждающего света излучение в синей области спектра, так как в таком случае спектр поглощения ДФБФ претерпевает существенные изменения [195]. Мы также обнаружили, что облучение раствора ДФБФ лазером с длиной волны 405 нм вызывает практически полную деградацию вещества в течение нескольких минут. Поэтому в дальнейших исследованиях для изучения сенсibilизированной генерации АФК фталоцианинами в составе ГК мы использовали синий светодиод с максимумом излучения на длине волны 460 нм (ширину спектра излучения ограничивали фильтром, пропускающим свет в диапазоне 430 – 470 нм). Медленная деградация ДФБФ наблюдалась и здесь (снижение оптической плотности в максимуме спектра поглощения ~ 2% в минуту); величина уменьшения оптической плотности ДФБФ в контроле на длине волны 415 нм учитывалась при обработке результатов. Для селективного возбуждения Фц в составе ГК использовали светодиод (230 мВт) с максимумом излучения на длине волны 625 нм.

Скорость генерации синглетного кислорода молекулами Фц в комплексе с АКНЧ оценивали при помощи химической ловушки имидазола в присутствии п-нитрозодиметиланилина (RNO) [196]. Имидазол реагирует с синглетным кислородом с образованием интермедиатов. RNO обладает спектром поглощения в синей области спектра и выцветает при взаимодействии с интермедиатами имидазола. Облучение раствора,

содержащего Фц и/или АКНЧ, производили с помощью светодиодного ИК-лазера (980 нм, 1.6 Вт, 12 VDC, Laserlands, Китай), работающего в стационарном режиме. О генерации гибридным комплексом синглетного кислорода судили по уменьшению оптической плотности в максимуме спектра поглощения RNO (440 нм).

Динамику изменений оптической плотности растворов Фц, наночастиц и ДФБФ исследовали с помощью программного обеспечения Spectrasuite (Ocean Optics, США). Кинетику изменений оптической плотности растворов аппроксимировали моноэкспонентой. Эксперимент проводили в термостатируемой ячейке Qpod 2e (Quantum Northwest, США) при температуре 30°C и постоянном перемешивании раствора магнитной мешалкой.

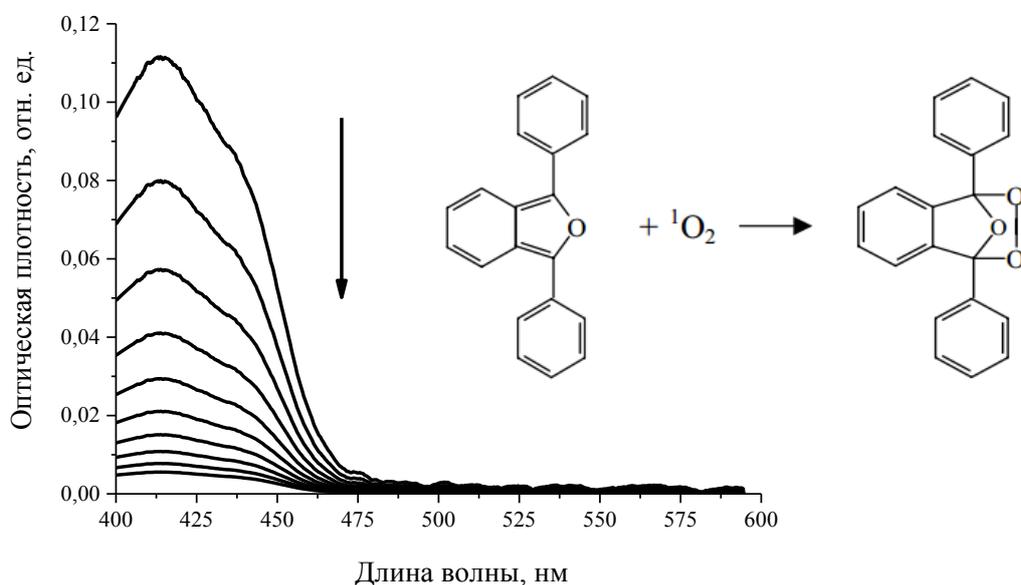


Рисунок 12. Спектр поглощения ДФБФ и его изменение в результате реакции ДФБФ с синглетным кислородом. Справа – образование перекиси при взаимодействии ДФБФ с синглетным кислородом

2.2.7 Методы определения размеров и структуры наночастиц

Метод динамического светорассеяния широко используется при изучении коллоидных растворов частиц [197]. Принцип определения размеров частиц основан на измерении и анализе флуктуаций интенсивности рассеянного света в растворе коллоидных частиц в разные моменты времени. Флуктуации интенсивности рассеянного света возникают из-за неоднородности среды. Благодаря случайному движению частиц интенсивность света осциллирует относительно своего среднего значения. По частоте этих осцилляций можно получить информацию о коэффициенте диффузии коллоидных частиц, который, в свою очередь, связан с

гидродинамическим радиусом частицы R_h уравнением Эйнштейна – Стокса (η – вязкость раствора):

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R_h} . \quad (26)$$

Для жестких сферических частиц гидродинамический радиус практически совпадает с геометрическим радиусом. Однако большинство наночастиц покрыто органической оболочкой, которая может быть частично проницаема для растворителя, поэтому гидродинамический радиус является некоторым условным параметром, превышающим реальное значение радиуса частиц.

Методом динамического светорассеяния также можно рассчитать поверхностный заряд наночастиц. На границе, разделяющей объемную фазу растворителя и фазу внешних слоев частицы (граница скольжения), вследствие заряженности последней, концентрируются противоионы и образуется двойной электрический слой. Положение границы скольжения, где сила, приложенная к заряду диффузной части двойного слоя, уравнивается гидродинамическим трением, в общем случае неизвестно. Поэтому для потенциала, определяемого по электрофоретической подвижности коллоидных частиц, введено понятие электрокинетического, или ζ -потенциала [198]. Измерения ζ -потенциала и гидродинамического радиуса наночастиц проводили на Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Англия).

Исследование кристаллической структуры флуоресцентных наночастиц проводили методом ПЭМ с использованием аналитического просвечивающего электронного микроскопа JEOL JEM-2100 (ускоряющее напряжение 200 кВ, разрешение 0.2 нм). В образец водного раствора КТ/АКНЧ добавляли спирт (10% по объему) для предотвращения агрегации наночастиц. Далее, образец наносили на стандартные объектные медные сетки, покрытые формваровой подложкой с дополнительным напылением углерода методом электродугового испарения графита. После полного высыхания образец помещали в микроскоп и осуществляли фотографирование выборки наночастиц. Анализ размера частиц по выборке проводили с помощью программы ImageJ.

2.2.8 Методы исследования влияния гибридных комплексов на бактериальные и животные раковые клетки

В экспериментах по изучению взаимодействия гибридных комплексов с клеточной стенкой бактериальных клеток использовали эталонные штаммы грамположительных бактерий

Staphylococcus aureus ATCC 25923, грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Бактерии из 10-ти часовой культуры ресуспендировали в стерильном буфере ПБС (рН 7.4) до единицы оптической плотности (на длине волны 600 нм) и инкубировали с КТ, Фц или ГК при комнатной температуре в течение получаса. Затем образец центрифугировали при 10000g 10 минут, после чего отделяли супернатант и анализировали его при помощи абсорбционной и флуоресцентной спектроскопии. Бактериальные клетки с осажденными ГК в преципитате ресуспендировали в буфере ПБС и исследовали методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ) на микроскопе Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 (Nikon Corporation, Япония) и иммерсионным объективом S Fluor 100x. Для возбуждения флуоресценции использовали лазерное излучение с длиной волны 488 и 643 нм. Диаметр конфокальной диафрагмы, характеристики лазерного излучения и оптики микроскопа подбирали согласно рекомендациям производителя. Для получения фотографий бактериальных клеток делали серии оптических срезов толщиной 375 нм.

Фотобактерицидную активность исследуемых Фц, КТ и их комплексов определяли с помощью бактериальной биолюминесцентной тест-системы «Эколюм-08», полученную на основе генно-инженерного штамма *E. coli* (pXen7), биолюминесценция которого обусловлена клонированным полным *lux*-опероном из светящихся почвенных энтомопатогенных бактерий *Photorhabdus luminescens*. Ранее была выявлена корреляция между фотосенсибилизированным тушением биолюминесценции тест-культур *E. coli* pXen7 и их инактивацией, а также инактивацией эталонного штамма бактерий *E. coli* ATCC 25922 в колониеобразующих единицах (КОЕ), на основании чего рутинный способ определения КОЕ может быть заменен экспресс-методом измерения интенсивности биолюминесценции. Измерение интенсивности биолюминесценции бактерий проводили с помощью люминометра «Биотокс» (Россия) при комнатной температуре.

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% конfluenceности монослоя. Далее клетки инкубировали в течение 60 минут в присутствии 0.5 мкМ ГК квантовых точек и фталоцианинов алюминия. По истечении инкубации проводили отмывку теплой средой DMEM. Для исследования активности анализируемых веществ стекла помещали в камеру для прижизненного наблюдения клеток. Ядра клеток выявляли витальным флуоресцентным красителем Hoechst 33342. Прижизненный анализ проводили методом КЛСМ с использованием микроскопа Eclipse Ti-E с конфокальным

модулем A1 (Nikon Corporation, Япония) с объективом Apo TIRF 60×/1.49 Oil при 37°C и 5% CO₂.

Оценку цитотоксического эффекта исследуемых веществ производили с использованием МТТ-теста. Клетки эпидермоидной карциномы человека 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 4 день культивирования. А1Фц(+4.5), КТ580, гибридные комплексы Фц-КТ, а также конъюгаты КТ-Тф и КТ-Тф-Фц вносили в лунки в концентрации 2 мкМ и 0.5 мкМ, по три лунки на каждую концентрацию (итого 6 лунок на образец). Лунки (5 образцов + контроль без веществ) разместили в квадрате 6х6. 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. Для более равномерного освещения планшета перед светодиодом устанавливали диффузор DG20-1500 (Thorlabs, США). Мощность светового потока светодиода регистрировали для каждой лунки с помощью детектора PM160T (Thorlabs, США). При облучении планшет смещали относительно оси светодиода на одну лунку каждые 90 секунд по периферии квадрата 6х6 лунок (всего 20 смещений, общее время облучения 30 минут). Дозу, полученную клетками в каждой лунке, рассчитывали путем суммирования таких доз при каждом смещении планшета.

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). При анализе полученных данных за 100% живых клеток принимали значения оптической плотности в контрольных лунках с клетками, не содержащих исследуемых веществ, но подвергшихся облучению в тех же условиях.

Все вычисления проводили с помощью пакетов программ OriginPro 9.1 («OriginLab Corporation», США) и SPCImage («Becker & Hickl», Германия). Каждый эксперимент был повторен не менее 3 раз.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Гибридные комплексы апконверсионных наночастиц и фталоцианинов

3.1.1 Особенности переноса энергии в гибридном комплексе

Рассмотрим систему, состоящую из молекул донора (D) и акцептора (A). Предположим, что имеется необратимый перенос энергии электронного возбуждения от D на A, т. е. после переноса энергии $D \rightarrow A$ происходит быстрая релаксация возбужденного состояния A по колебательным подуровням, в результате чего обратный перенос энергии $A \rightarrow D$ имеет пренебрежимо малую скорость по сравнению с прямым переносом. Пусть D селективно возбуждается ультракоротким импульсом света, имеющим вид дельта-функции. При этом подразумевается, что интенсивность возбуждающего импульса достаточно мала, так что после возбуждения населенность основного состояния донора уменьшается незначительно. Тогда система уравнений для населенностей возбужденных состояний D и A выглядит следующим образом:

$$\begin{aligned} \frac{dN_D}{dt} &= I_0 c_D \sigma_{01} \delta(t) - k_S N_D - k_M N_D, \\ \frac{dN_A}{dt} &= k_M N_D - k_A N_A. \end{aligned} \quad (27)$$

В этой системе дифференциальных уравнений N_D и N_A обозначают населенности возбужденных уровней донора и акцептора соответственно, k_M – константа скорости переноса энергии, $k_S = 1/\tau_S$ обозначает константу скорости дезактивации возбужденного состояния донора в отсутствие акцептора, c_D – концентрация донора, $k_A = 1/\tau_A$ обозначает константу скорости дезактивации возбужденного состояния акцептора, I_0 – плотность энергии возбуждающего импульса, $\delta(t)$ – дельта-функция.

Обозначим населенность возбужденного состояния донора как N_0 ($N_0 = I_0 c_D \sigma_{01}$). Решая систему уравнений (27) методом Лапласа, имеем:

$$\frac{dN_D}{dt} = -k_S N_D - k_M N_D \quad \rightarrow \quad p\hat{N}_D - N_0 = -k_S \hat{N}_D - k_M \hat{N}_D = -k_D \hat{N}_D; \quad (p + k_D)\hat{N}_D = N_0;$$

где $k_D = k_S + k_M$; \hat{N} обозначает лаплас-образ $N(t)$;

$$\frac{dN_A}{dt} = k_M N_D - k_A N_A \quad \rightarrow \quad p\hat{N}_A = k_M \hat{N}_D - k_A \hat{N}_A; \quad (p + k_A)\hat{N}_A = k_M \hat{N}_D;$$

Отсюда можно получить:

$$\hat{N}_D = \frac{N_0}{(p + k_D)} ;$$

$$\hat{N}_A = \frac{N_0 k_M}{(p + k_D)(p + k_A)} = \frac{N_0 k_M}{(k_D - k_A)} \left(\frac{1}{p + k_A} - \frac{1}{p + k_D} \right) .$$

Производя обратное преобразование Лапласа, получим:

$$N_D = N_0 \exp(-k_D t) ;$$

$$N_A = \frac{k_M N_0}{(k_D - k_A)} (\exp(-k_A t) - \exp(-k_D t)) . \quad (28)$$

При переходе от констант скоростей к временам затухания уравнение (28) принимает вид

$$N_A = \frac{\tau_D \tau_A N_0}{\tau_M (\tau_A - \tau_D)} (\exp(-t/\tau_A) - \exp(-t/\tau_D)) . \quad (29)$$

Для определения времени t_m достижения максимального значения населенности акцептора приравняем к нулю производную N_A в (27) по времени. После несложных преобразований получим:

$$t_m = \frac{1}{(k_A - k_D)} \cdot \ln \left(\frac{k_A}{k_D} \right) = \frac{\tau_D}{(r_{DA} - 1)} \cdot \ln r_{DA} , \quad (30)$$

где $r_{DA} = \tau_D/\tau_A$. Подставляя затем уравнение (30) в (29), получим выражение для максимального значения населенности акцептора:

$$N_{Amax} = N_0 \frac{\tau_D}{\tau_M} \exp \left(-\frac{r_{DA} \ln r_{DA}}{(r_{DA} - 1)} \right) . \quad (31)$$

Рассмотрим предельные случаи. Если $r_{DA} \rightarrow 0$ ($\tau_D \ll \tau_A$) $N_{Amax} = N_0 \tau_D/\tau_M = N_0 k_M/k_D$. При этом, если $k_D \approx k_M$, т. е. скорость переноса энергии значительно больше скорости внутримолекулярных процессов дезактивации возбуждения в молекуле донора, то $N_{Amax} \approx N_0$. В обратном пределе $r_{DA} \rightarrow \infty$ ($\tau_D \gg \tau_A$) $N_{Amax} = N_0 \tau_D/\tau_M r_{DA} = N_0 \tau_A/\tau_M = N_0 k_M/k_A$. В этом случае также будет выполняться соотношение $k_M \ll k_A$, при этом максимальная населенность акцептора будет значительно меньше максимальной населенности донора.

На рисунке 13 представлены примеры кинетик N_D и N_A при различных соотношениях k_D k_A (N_0 полагалось равным 1). Из рисунков видно, что при взаимной замене значений k_A и k_D

длительности фронта и спада кинетики акцептора не меняются, меняется только максимальная населенность акцептора.

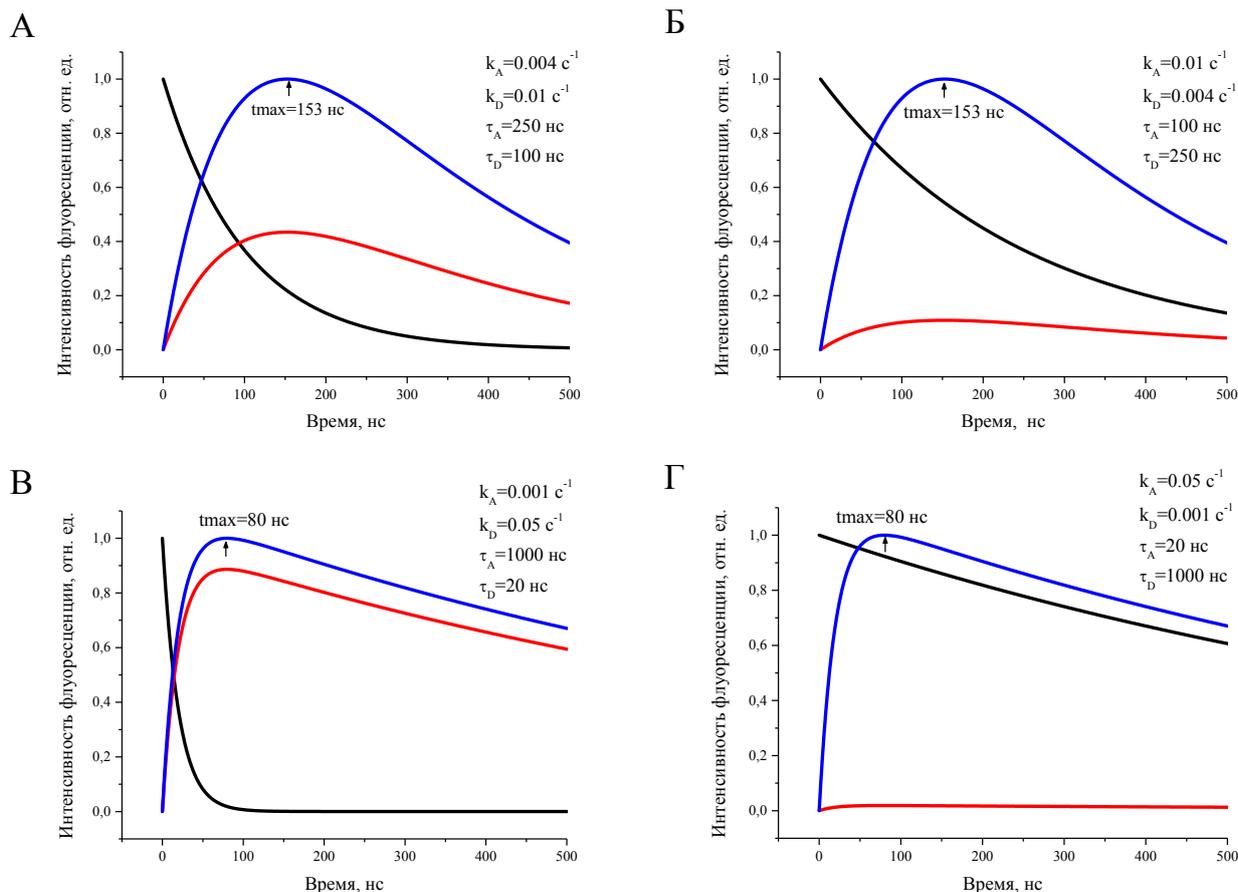


Рисунок 13. Кинетики затухания флуоресценции донора (черные кривые) и акцептора (красные кривые) энергии при безызлучательном переносе энергии в гибридном комплексе с различными параметрами флуоресценции компонентов. Для удобства графики также содержат нормированные кинетики затухания флуоресценции акцептора энергии (синие кривые)

Физический смысл приведенных уравнений состоит в следующем. Если $k_D > k_A$ ($\tau_D < \tau_A$), то скорость обеднения населенности возбужденных состояний молекул акцептора меньше, чем скорость их образования за счет переноса энергии от доноров. В результате за время τ_D населенность акцептора вырастет практически до населенности донора, при этом длительность переднего фронта нарастания свечения акцептора будет близка к времени τ_D . После того, когда населенность донора уменьшится, а населенность акцептора увеличится так, что станет выполняться соотношение $k_M N_D = k_A N_A$ (см. второе уравнение в (27)), населенность акцептора прекратит увеличиваться (кинетика акцептора достигнет максимума), затем населенность акцептора станет уменьшаться со временем $\sim \tau_A$.

В обратном случае, когда $k_A > k_D$ ($\tau_A < \tau_D$), время достижения максимума населенности акцептора будет определяться временем τ_A , так как уже при достаточно малых N_A станет выполняться равенство $k_M N_D = k_A N_A$. Это означает, что хотя населенность донора еще высока, однако населенность акцепторов уже начнет уменьшаться (поступлений от донора уже начинает не хватать для поддержания высокой населенности акцептора). При этом скорость уменьшения населенности акцептора будет определяться скоростью затухания донора (все возбуждения, полученные от донора, быстро тратятся); максимальная населенность акцептора окажется значительно меньше максимальной населенности донора.

3.1.2 Влияние переноса энергии на фотофизические свойства фталоцианинов

Электронное изображение использованных в работе АКНЧ, покрытых полиэтиленгликолем с аминогруппами, приведено на рисунке 14. Видно, что наночастицы представляют собой цилиндры размером 35x24 нм с шестиугольным сечением, на которых прекрасно разрешается атомная структура кристалла. Образец обладает высокой монодисперсией по размерам частиц. Метод динамического светорассеяния дает значения гидродинамического диаметра частиц ~ 400 нм в воде, что может свидетельствовать о существовании АКНЧ в водных растворах в виде агрегатов. Похожие значения величины гидродинамического диаметра АКНЧ были получены нами и для других растворителей, таких как этанол и диметилсульфоксид.

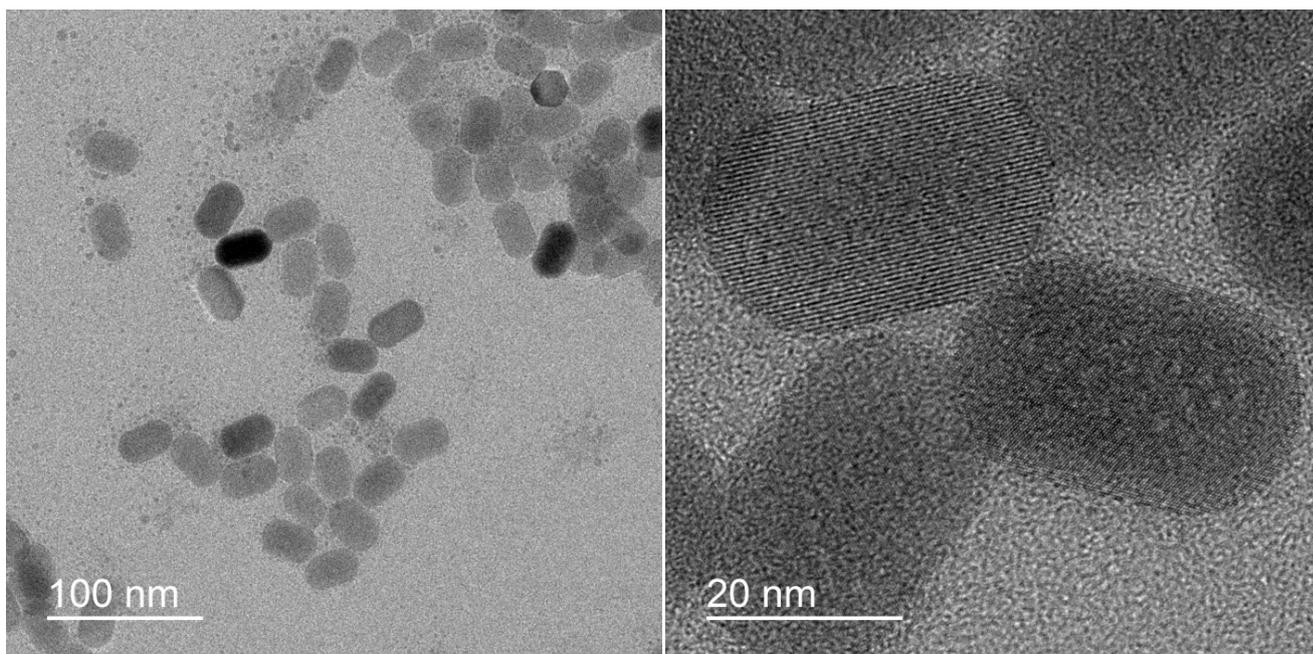


Рисунок 14. Изображения АКНЧ, полученные методом ПЭМ (200 кэВ)

Спектр люминесценции АКНЧ показан на рисунке 15. Несмотря на низкую концентрацию раствора АКНЧ (20 нМ) и небольшой квантовый выход люминесценции (< 1%), высокая чувствительность детектора позволила проводить количественный анализ спектральных свойств АКНЧ. Спектр люминесценции состоит из двух групп полос в красной (главный максимум на длине волны 654 нм) и зеленой (главный максимум на длине волны 540 нм) области спектра. Красная полоса люминесценции АКНЧ хорошо перекрывается со спектром поглощения фталоцианинов, поэтому мы ожидали получить высокие значения эффективности переноса энергии в гибридном комплексе.

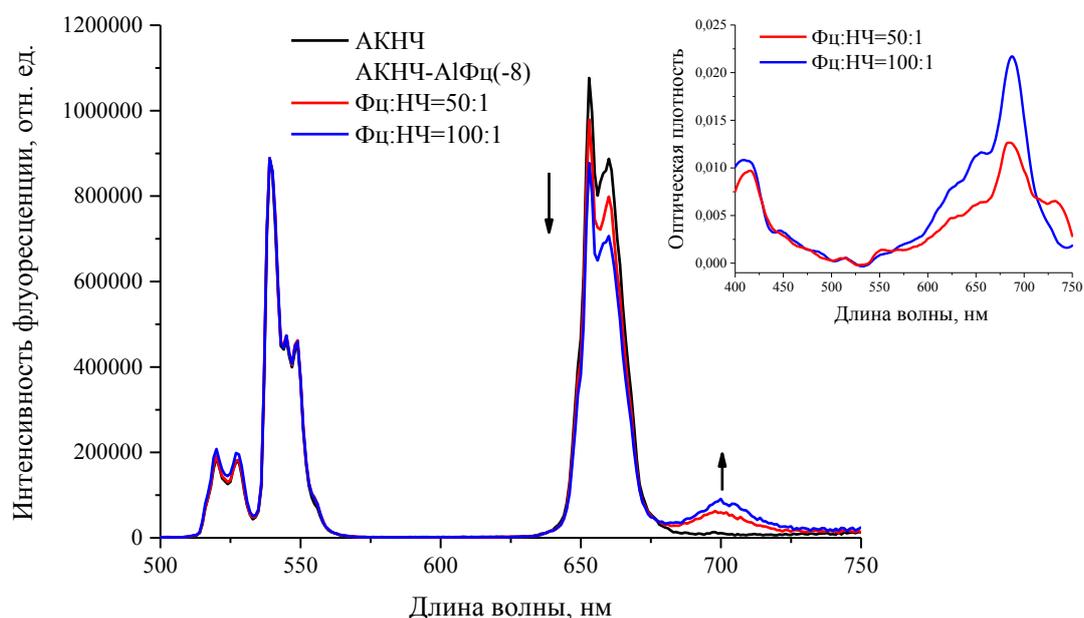


Рисунок 15. Спектр люминесценции АКНЧ в контроле в водном растворе и в присутствии возрастающих концентраций AlФц(-8). На вставке – спектр поглощения AlФц(-8) в тех же образцах АКНЧ-AlФц(-8). Стрелка вниз обозначает тушение длинноволновой полосы люминесценции АКНЧ, стрелка вверх – увеличение интенсивности сенсibilизированной флуоресценции фталоцианина. Возбуждение лазером 980 нм в непрерывном режиме

Мы инкубировали АКНЧ как с поликатионными, так и с полианионными фталоцианинами различных металлов. В растворе с поликатионными фталоцианинами алюминия мы не наблюдали тушения люминесценции АКНЧ. Напротив, инкубация наночастиц с октакарбокситфалоцианинами цинка и алюминия вызывала значительное снижение интенсивности люминесценции АКНЧ. Интересно, что в буферном растворе ПБС АКНЧ и полианионные фталоцианины не образуют ГК, хотя повышение ионной силы водного раствора до 0.2 М (NaCl) не препятствовало комплексообразованию. Кроме того, АКНЧ быстро агрегировали в буфере ПБС. В работе [199] деградация апконверсионных наночастиц в

буферах, содержащих неорганические фосфаты, объясняется тем, что фосфаты лантаноидов являются более устойчивыми соединениями, чем фториды и оксиды. Следовательно, в присутствии фосфатов лантаноиды выходят из состава наночастиц, где они содержатся в виде фторидов или оксидов.

Полианионные фталоцианины цинка и алюминия эффективно адсорбируются на поверхность АКНЧ, вызывая перезарядку ζ -потенциала наночастиц (рисунок 16). Кроме того, образование гибридного комплекса при высоких соотношениях [Фц]:[НЧ] способствует агрегации наночастиц: гидродинамический диаметр последних увеличивается более чем в 6 раз (рисунок 16, вставка). АКНЧ в присутствии высоких (более 10 мкМ) концентраций Фц(-8) полностью выпадают в осадок в течение суток с момента инкубации.

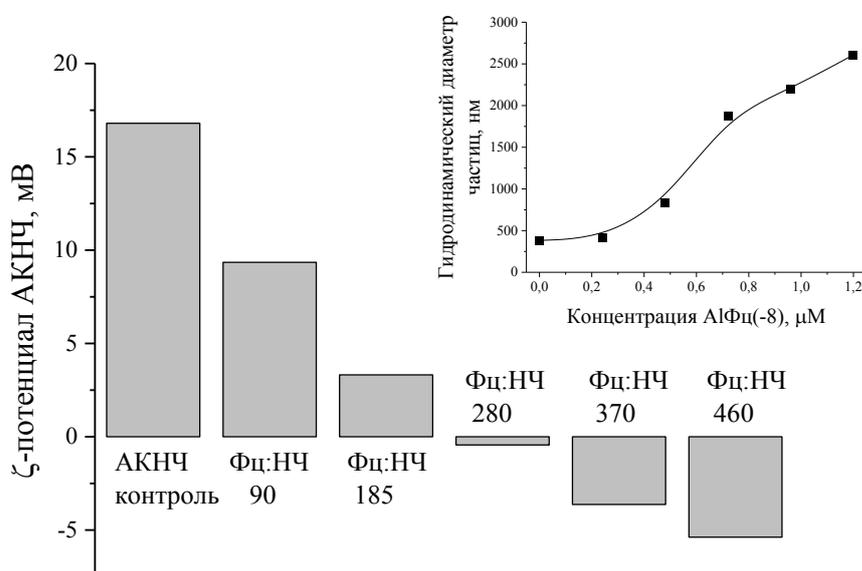


Рисунок 16. ζ -потенциал АКНЧ при различной концентрации АlФц(-8). На вставке: гидродинамический диаметр частиц в тех же образцах

Металлокомплексы октакарбокситфалоцианинов склонны к агрегации на поверхности апконверсионных наночастиц. В контроле без АКНЧ оптическая плотность раствора Фц(-8) линейно зависит от его концентрации в диапазоне 100 нМ – 10 мкМ (рисунок 17). Однако, в присутствии наночастиц (20 нМ) в спектре поглощения фталоцианинов появляются дополнительные пики (рисунок 18). Так, в растворе АlФц(-8) с АКНЧ уже при низких значениях [Фц]:[НЧ] наряду с мономерами Фц (пик с максимумом на длине волны 695 нм) имеется фракция димеров (пик с максимумом на длине волны 643 нм). При дальнейшем увеличении концентрации Фц в спектре поглощения появляются две новые компоненты.

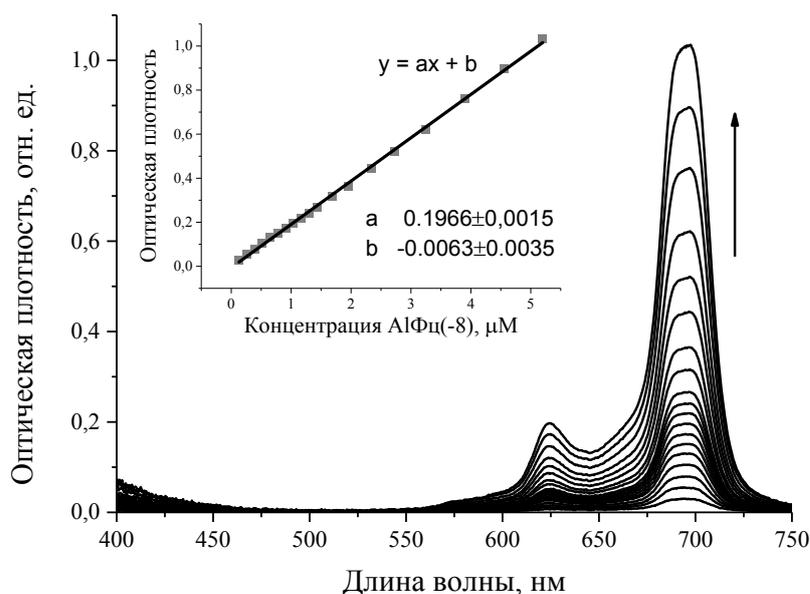


Рисунок 17. Спектр поглощения АІФц(-8) в дистиллированной воде при различной концентрации фталоцианина. Стрелка показывает рост оптической плотности раствора фталоцианина при увеличении его концентрации. На вставке: концентрационная зависимость оптической плотности в максимуме длинноволнового пика поглощения фталоцианина (697 нм)

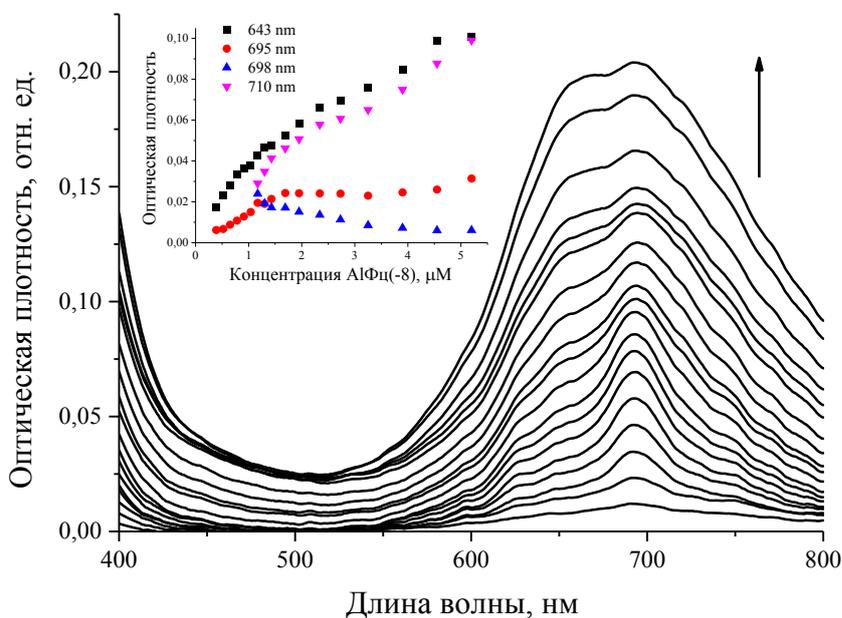


Рисунок 18. Спектр поглощения АІФц(-8) в дистиллированной воде в присутствии АКНЧ при различной концентрации фталоцианина. Стрелка показывает рост оптической плотности раствора фталоцианина при увеличении его концентрации. На вставке: концентрационная зависимость оптической плотности раствора АКНЧ-АІФц(-8) в области длинноволнового пика поглощения Фц при различных длинах волн

Уменьшающаяся с концентрацией Фц фракция с пиком в области 698 нм, вероятно, связана с мономерами; фракция с широким пиком в области 710 нм, по-видимому, соответствует полимерным агрегатам Фц, дополнительно рассеивающих световой поток. Для дальнейших экспериментов по переносу энергии в качестве акцептора мы использовали АlФц(8-), поскольку данный фталоцианин подвергался меньшей димеризации в комплексе с АКНЧ, чем ZnФц(-8). Интересно, что ряд детергентов (лаурилдиметиламиноксид, додецилсульфат или холат натрия, 0.5%) способствует мономеризации Фц, однако оказалось, что это происходит за счет дезинтеграции гибридного комплекса.

При облучении раствора гибридных комплексов АКНЧ и АlФц(-8) светом с длиной волны 980 нм мы наблюдали тушение люминесценции АКНЧ и сенсibilизированную флуоресценцию фталоцианина, что свидетельствует о переносе энергии по механизму FRET (рисунок 15). Флуоресценцию АlФц(-8) в контроле без АКНЧ при освещении в ИК-области зарегистрировать не удалось вследствие крайне низких коэффициентов молярной экстинкции фталоцианинов в этой области спектра. Нужно отметить, что тушение люминесценции АКНЧ наблюдается только в красной области (полоса 654 нм), поскольку именно здесь наблюдается перекрывание спектра люминесценции донора энергии и поглощения акцептора ($J = 4.5 \cdot 10^{-13} \text{ см}^6$). Наибольшую величину интенсивности флуоресценции Фц наблюдали для соотношения 100 – 150 молекул Фц на одну наночастицу. При дальнейшем увеличении концентрации Фц его флуоресценция при 700 нм исчезает, очевидно, вследствие агрегации молекул Фц на поверхности АКНЧ. В этих же условиях с увеличением концентрации Фц происходит дальнейшее уменьшение интенсивности фотолюминесценции АКНЧ при 654 нм (на величину порядка 90% от исходного уровня). Мы считаем, что при высоких концентрациях АlФц(-8) находится на поверхности наночастиц, но уже в димерной форме. Спектр поглощения димеров Фц также перекрывается с красной полосой фотолюминесценции АКНЧ, поэтому тушение люминесценции АКНЧ продолжается с увеличением концентрации Фц. Так как димеры Фц практически не флуоресцируют, то вся переданная им энергия возбуждения расходуется в процессе тепловой дезактивации.

Тушение люминесценции АКНЧ выражается в уменьшении ее интенсивности и длительности. Кинетики люминесценции наночастиц в присутствии АlФц(-8) и в контроле показаны на рисунке 19. В водном растворе кинетика фотолюминесценции АКНЧ в зеленой области спектра имеет нарастающую и затухающую компоненты с характерным временем 25.7 ± 0.6 и 86.5 ± 1.3 мкс, соответственно. В присутствии АlФц(-8) в соотношении 100 молекул на наночастицу времена этих процессов достоверно не изменяются (25.1 ± 0.6 и 84.9 ± 1.3 мкс, соответственно). Спектры фотолюминесценции АКНЧ и поглощения Фц слабо перекрываются

в этой области спектра, и перенос энергии маловероятен. Кинетика фотолюминесценции АКНЧ в красной области спектра также имеет нарастающую и затухающую компоненты с характерным временем 78.7 ± 3.1 мкс и 213.8 ± 16.6 мкс, соответственно. В присутствии АlФц(8-) характерные времена люминесценции АКНЧ уменьшаются (73.3 ± 1.3 мкс – нарастающая и 175.7 ± 11.2 мкс – затухающая компонента). Таким образом, эффективность переноса энергии, оцениваемая по уменьшению длительности фотолюминесценции донора, составила $\sim 18\%$ (рисунок 19, вставка).

Собственная длительность флуоресценции АlФц(-8) в комплексе с наночастицей достаточно короткая – при возбуждении светом 390 нм характерное время составляет 4.40 ± 0.02 нс (рисунок 20, вставка). Однако, при возбуждении наночастиц светом 980 нм с последующим апконверсионным переносом энергии на Фц длительность флуоресценции последнего составляла уже 142.1 ± 15.4 мкс (рисунок 20). Эта величина немного короче, но очень близка к длительности фотолюминесценции АКНЧ, измеренной при 654 нм в этих же условиях (175.7 ± 11.2 мкс). Полученный результат хорошо подтверждает рассмотренный ранее вариант взаимодействия молекул D – A (рисунок 13Г), когда длительность люминесценции акцептора должна приближаться ко времени жизни долгоживущего возбужденного состояния донора энергии, несмотря на короткое собственное время люминесценции молекулы акцептора.

Величины эффективности переноса энергии $W \sim 10 - 20\%$ типичны для ГК с участием АКНЧ. Так, при использовании полупроводниковых нанокристаллов в качестве акцепторов энергии от АКНЧ, величина W составила 14.8% [106]. В работе [200] удалось добиться значений $W \sim 18\%$ и $\sim 21\%$ в гибридных комплексах АКНЧ с тетрасульфо- и тетракарбокситфаллоцианинами алюминия, соответственно. Больших значений эффективности переноса энергии получить не удастся, поскольку в переносе энергии участвуют не все излучающие центры в наночастице [106]. Параметр W зависит от расстояния между донором и акцептором энергии; наблюдаемому значению эффективности переноса энергии соответствует среднее расстояние между излучающими лантаноидами АКНЧ и молекулами Фц $R \sim 27 \text{ \AA}$ (расстояние Ферстера $R_0 = 20.9 \text{ \AA}$, константа переноса энергии $k = 1000 \text{ c}^{-1}$). Нужно отметить, что наличие множества отдельных излучающих центров в наночастице приводит к трудностям в определении стехиометрии комплекса и оценке ее влияния на эффективность переноса энергии [96]. В таком случае расстояние между донором и акцептором, рассчитанное из параметра W , сложно физически интерпретировать. Тем не менее, малая величина R означает, что Фц проникают вглубь органической оболочки АКНЧ и что в переносе энергии участвуют только те излучающие центры, которые расположены близко к поверхности АКНЧ. Поскольку линейные

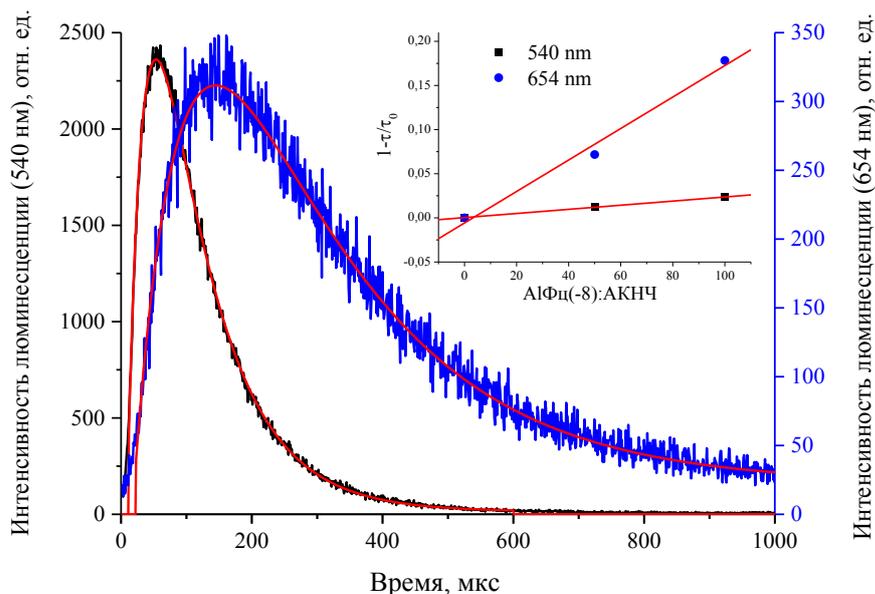


Рисунок 19. Кинетики затухания люминесценции наночастиц, измеренные в максимуме зеленой (540 нм) и красной (654 нм) полосы люминесценции, а также их аппроксимация суммой возрастающей и затухающей экспонент (красные кривые). На вставке: тушение люминесценции АКНЧ на разных длинах волн при добавлении AlFц(-8). Возбуждение люминесценции лазером 980 нм в импульсном режиме

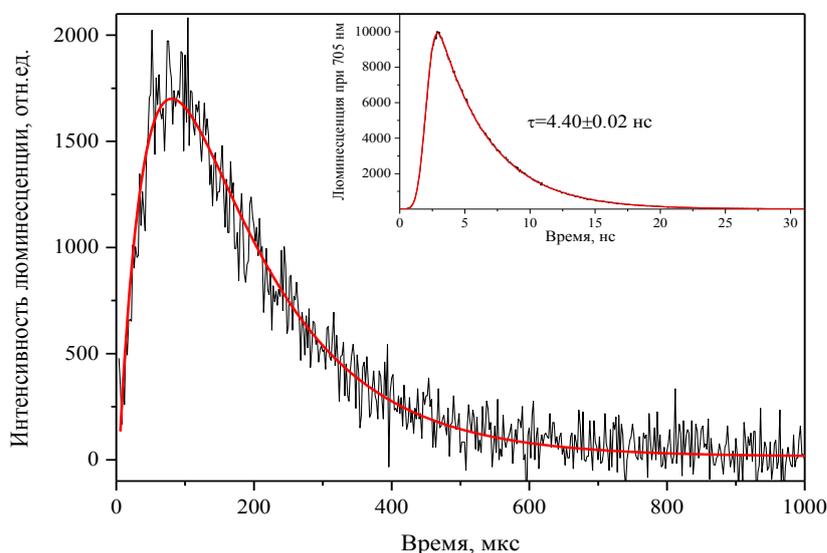


Рисунок 20. Кинетика затухания индуцированной люминесценции AlFц(-8) в смеси с АКНЧ с соотношением 100:1, измеренная на длине волны 705 нм при возбуждении лазером 980 нм в импульсном режиме, а также ее аппроксимация суммой возрастающей и затухающей экспонент (красная кривая). На вставке: кинетика собственной люминесценции AlFц(-8) в водном растворе без АКНЧ, полученная методом счета фотонов при возбуждении импульсами длительностью 0.8 нс на длине волны 390 нм

размеры АКНЧ были оценены в 35×24 нм, значительная часть лантаноидов находится от молекул Фц на расстоянии, намного превышающем эффективные расстояния для переноса энергии. Эти центры могут передавать энергию акцепторам излучательно в менее эффективном процессе реабсорбции [201]. Одним из способов увеличить долю лантаноидов, способных участвовать в безызлучательном переносе энергии, является уменьшение линейных размеров АКНЧ, что сопряжено с уменьшением квантового выхода люминесценции наночастиц. Покрытие АКНЧ защитной оболочкой, уменьшающей вероятность тушения люминесценции наночастицы растворителем, приводит к уменьшению эффективности переноса энергии из-за увеличения расстояния до акцепторов энергии [102].

Образование ГК фталоцианина с АКНЧ должно приводить к увеличению поглощательной способности фталоцианина в ИК-области спектра; следовательно, можно ожидать генерацию АФК в растворе АКНЧ-АлФц(-8) при освещении инфракрасным светом. Для этого лазер был переведен в режим постоянного излучения с высокой мощностью для максимального сенсibilизированного фотодинамического эффекта Фц; нагрев воды предотвращали путем использования термостата и перемешивания раствора в кювете. В качестве сенсора АФК использовали окрашенный п-нитрозодиметиланилин (RNO), необратимо выцветающий в присутствии имидазола и синглетного кислорода. Действительно, нам удалось зарегистрировать уменьшение оптической плотности в пике поглощения RNO (рисунок 21).

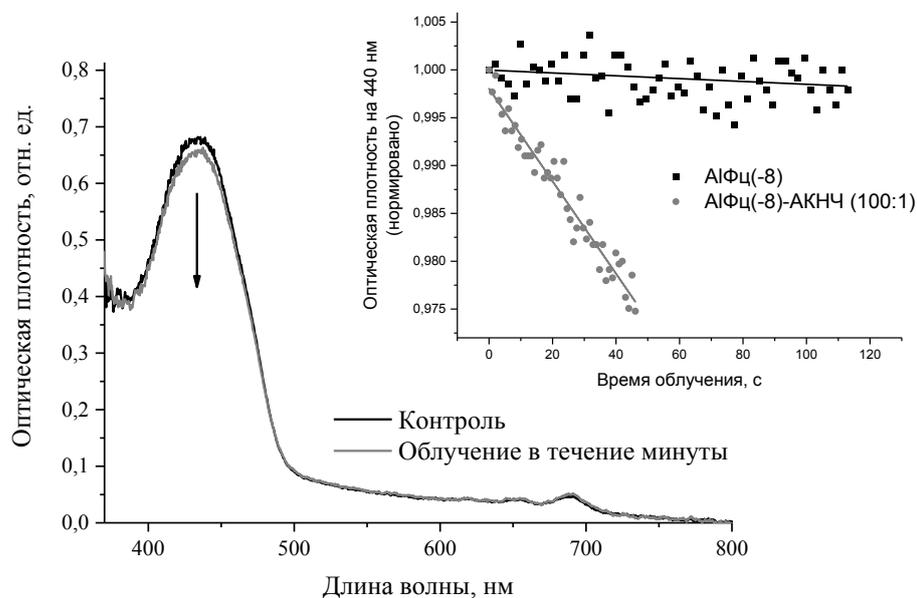


Рисунок 21. Изменение спектра поглощения водного раствора АКНЧ-АлФц(-8) (Фц:НЧ=100:1), RNO (50 мкМ) и имидазола (10 мМ) при облучении светом с длиной волны 980 нм (1.5 Вт) в течение минуты. На вставке: изменение оптической плотности в том же образце на длине волны 440 нм

Под действием лазерного излучения на длине волны 980 нм RNO выцветает только в присутствии всех компонентов ГК и имидазола. Низкую скорость процесса можно объяснить тем, что концентрации компонентов ГК в растворе были крайне малы вследствие низкой концентрации АКНЧ в исходном растворе. Кроме того, особенности переноса энергии в ГК на основе АКНЧ определяют слабую заселенность возбужденного состояния Фц и, как следствие, низкие скорости образования АФК.

3.2 Гибридные комплексы квантовых точек и фталоцианинов

3.1.1 Влияние переноса энергии на фотофизические свойства фталоцианинов

В гибридных комплексах полупроводниковых квантовых точек и фталоцианинов при освещении в области поглощения КТ происходит перенос энергии возбуждения от КТ на молекулу Фц согласно индуктивно-резонансному механизму. При этом мы наблюдали характерные изменения спектральных свойств как донора энергии, так и ее акцептора.

Кинетика затухания флуоресценции КТ в контрольном растворе без Фц имеет три временные компоненты. Характерные значения длительности флуоресценции CdSe/ZnS КТ представлены в таблице 3. В присутствии Фц интенсивность и длительность флуоресценции КТ снижаются. Изменения значений отдельных временных компонент кинетики затухания флуоресценции КТ состава CdSeCdTe/ZnS, а также их вкладов в зависимости от концентрации Фц показаны на рисунке 22.

Изменения параметров кинетики затухания флуоресценции КТ в результате переноса энергии на Фц можно объяснить следующим образом. Согласно широко распространенному представлению, быстрая компонента кинетики затухания флуоресценции КТ связана с излучательной рекомбинацией экситона, а более медленные – с флуоресценцией в результате рекомбинации экситона из дефекта кристаллической решетки КТ. В данном случае, очевидно, имеется два типа дефектов в структуре кристалла. Все три процесса могут иметь место в одном нанокристалле, а их вклады зависят от количества дефектов кристаллической решетки.

Поскольку медленные компоненты имеют характерные значения времени порядка десятков нс, это означает, что разница энергий электронных уровней, образованных дефектами и S1 уровнем экситона, достаточно мала. Тем не менее, спектр флуоресценции, осуществляющейся с участием дефектов кристалла, должен иметь батохромный сдвиг. Таким образом, мы должны рассматривать спектр флуоресценции КТ как суперпозицию трех

спектров. Действительно, кинетики затухания флуоресценции КТ, регистрируемые на длинноволновом плече спектра флуоресценции, имеют больший вклад медленных компонент и большее значение длительности флуоресценции, чем кинетики затухания флуоресценции на коротковолновом плече спектра.

Таблица 3. Значения времен t_i и их вкладов a_i в кинетике затухания флуоресценции CdSe/ZnS квантовых точек в буферном растворе (ПБС) и при добавлении AlФц(+6.5). [Фц]:[КТ] = 10:1. Длина волны возбуждения флуоресценции 455 нм

	a_1 , %	a_2 , %	a_3 , %	t_1 , нс	t_2 , нс	t_3 , нс
КТ580	39.9	36.3	23.8	1.29	6.79	20.72
+ Фц	50.8	34.1	15.1	0.84	4.81	17.98
КТ600	45.1	38.0	16.9	0.76	4.37	16.60
+ Фц	59.7	30.7	9.6	0.53	3.17	14.21
КТ620	32.9	52.4	14.7	2.26	15.63	49.07
+ Фц	51.5	31.0	17.6	1.19	5.81	22.35
КТ640	41.1	39.8	19.1	2.02	11.19	31.65
+ Фц	48.1	31.3	20.5	0.96	4.97	20.52

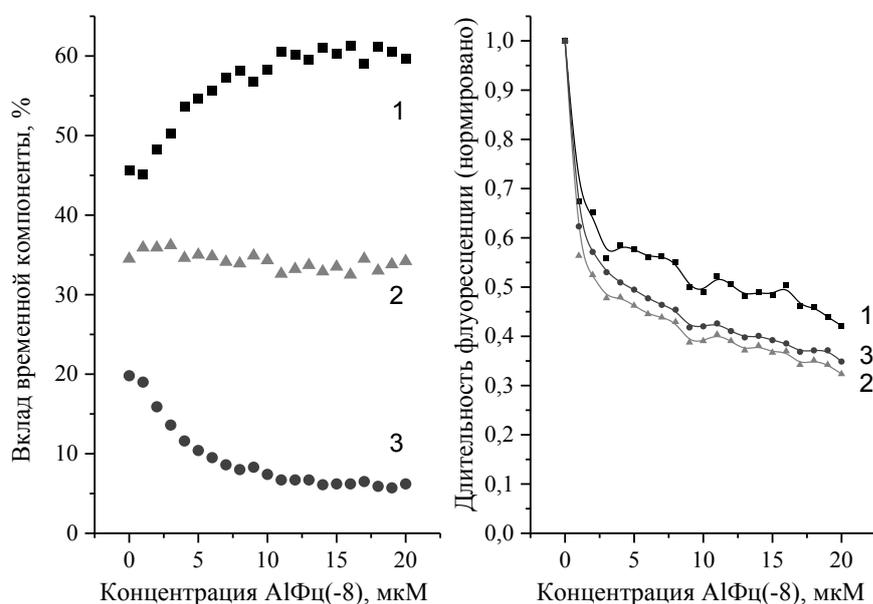


Рисунок 22. Изменение вкладов временных компонент (быстрой 1, средней 2 и медленной 3), а также соответствующих значений времен в кинетике затухания флуоресценции КТ600(+) при увеличении концентрации AlФц(-8) в растворе (буфер ПБС). Времена компонент кинетики нормированы на значения в контрольном растворе КТ в отсутствие фталоцианина. Длина волны возбуждения флуоресценции 455 нм

Вклад дефектов в общую флуоресценцию КТ весьма значителен (более 50 %); в некоторых случаях вклад средней компоненты a_2 сопоставим (КТ640) или превышает (КТ620) вклад a_1 . Интересно, что величина квантового выхода флуоресценции не коррелирует с вкладом a_1 ; следовательно, данные дефекты кристаллической решетки КТ не уменьшают квантовый выход флуоресценции частиц. Дефекты, вызывающие появление медленных компонент в кинетике затухания флуоресценции КТ, нельзя интерпретировать как дефекты ядра и дефекты защитной оболочки. Теоретически, чем толще защитная оболочка, тем больше вероятность образования дефектов; однако, нами не выявлено связи толщины защитной оболочки (таблица 8) и вкладом какой-либо из компонент (таблица 3). Образование ГК с фталоцианинами вызывает изменения вкладов временных компонент и изменения значений соответствующих времен. По характеру воздействия Фц можно выделить две группы CdSe/ZnS КТ. У КТ580 и КТ600 тушение флуоресценции возрастает в ряду $t_3 \rightarrow t_2 \rightarrow t_1$; вклад быстрой компоненты увеличивается, вклад медленных компонент снижается, причем вклад a_3 уменьшается сильнее, чем вклад a_2 . В случае КТ620 и КТ640 тушение длительности флуоресценции t_2 максимально; вклад быстрой компоненты увеличивается, вклад компоненты a_2 снижается, вклад a_3 практически не изменяется. У КТ600(+) тушение длительности флуоресценции t_2 также максимально; вклад быстрой компоненты увеличивается, но вклад компоненты a_2 не изменяется, а вклад a_3 уменьшается (рисунок 22). Мы могли бы ожидать следующего эффекта, характерного для всех использованных в работе КТ. Более медленные компоненты должны тушиться фталоцианином более эффективно, поскольку спектр медленных компонент сдвинут в длинноволновую область спектра и, следовательно, сильнее перекрывается со спектром поглощения Фц. Однако, экспериментальные данные либо не подтверждают это предположение, либо явно ему противоречат.

Альтернативная гипотеза связывает многоэкспоненциальный характер флуоресценции КТ с гетерогенностью размера r нанокристаллов. Известно, что покрытие ядер КТ (одинакового размера) защитной оболочкой может приводить к значительному увеличению полидисперсности размеров частиц [28]. Чем толще защитная оболочка, тем больше размер самой частицы. Увеличение толщины оболочки приводит к увеличению длительности флуоресценции КТ (минимизировано влияние внешней среды) и сопровождается куполообразной зависимостью величины квантового выхода флуоресценции КТ от ее размера [27]. Таким образом, кинетика затухания флуоресценции КТ представляет собой сумму кинетик затухания флуоресценции отдельных частиц с индивидуальными спектральными характеристиками; программа обработки кинетик затухания флуоресценции, однако, позволяет проводить аппроксимацию не более чем тремя компонентами. Следовательно, три компоненты

кинетики затухания флуоресценции КТ в данной интерпретации физического смысла не имеют и условно соответствуют трем фракциям КТ. Быстрая компонента соответствует КТ с тонкой защитной оболочкой, средняя – КТ с защитной оболочкой большей толщины, медленная – КТ с защитной оболочкой максимальной толщины. Вклад этих фракций в общую амплитуду флуоресценции должен определяться двумя факторами: зависимостью величины квантового выхода флуоресценции от толщины защитной оболочки КТ и относительной концентрацией частиц в данной фракции. Здесь мы не учитываем тот факт, что с увеличением размера частицы растет коэффициент молярной экстинкции, поскольку предполагаем монодисперсность образца КТ по размеру ядра. Нужно отметить, что вклад средней компоненты может и не быть больше вкладов a_1 и a_3 , так как в конкретном образце КТ выборка по величине квантового выхода флуоресценции может находиться в любом месте куполообразной зависимости $\varphi(r)$. Количество слоев ZnS в составе использованных в данной работе КТ превышает 3 (таблица 8), которое является оптимальным для усиления квантового выхода флуоресценции [27], так что с увеличением размеров КТ величина φ должна уменьшаться. Большие значения длительности в длинноволновом плече спектра флуоресценции КТ можно объяснить тем, что увеличение толщины защитной оболочки кристалла вызывает батохромный сдвиг экситонного пика поглощения КТ [28], и, следовательно, спектра флуоресценции.

Фталоцианины, в таком случае, тушат флуоресценцию КТ разных размеров с разной эффективностью. Увеличение размеров КТ может положительно сказаться на величине W по причине большего интеграла перекрытия, однако меньшие величины φ должны снизить эффективность переноса энергии. По-видимому, последний фактор оказывается решающим для пар фталоцианинов с КТ580, КТ600 и КТ600(+). В парах Фц с КТ620 и КТ640, по-видимому, имеет место совокупное влияние нескольких факторов, отчего все временные компоненты тушатся с сопоставимой эффективностью. Неясной остается причина увеличения вклада быстрой компоненты, поскольку при более выраженном тушении флуоресценции этой фракции ее относительный вклад должен уменьшаться.

В рамках этой работы мы не можем продемонстрировать достаточные доказательства в пользу той или иной гипотезы; исследования подобного характера и глубины требуют отдельной специальной работы. Комплексы КТ-Фц представляют собой многокомпонентную систему с большим числом скрытых параметров; их выявление и изучение их влияния на спектральные характеристики КТ подразумевают направленный высококачественный синтез нанокристаллов с заданными свойствами.

Тушение флуоресценции квантовых точек молекулами фталоцианинов в классификации С.И. Вавилова относится ко 2-му роду (тушение возбужденного состояния молекулы), которое в современной терминологии называют динамическим. Об этом свидетельствует уменьшение длительности флуоресценции КТ при увеличении концентрации тушителя флуоресценции (Фц) (рисунок 22). Тушением флуоресценции КТ в результате диффузионных столкновений молекул Фц и КТ можно пренебречь, поскольку при используемых концентрациях тушителя ($[Фц] \sim 10 - 1000 \text{ нМ}$) вероятность столкновений КТ и Фц за время жизни возбужденного состояния КТ крайне мала. Кроме того, в случае диффузионно-контролируемой реакции при увеличении температуры раствора возрастает частота столкновений молекул флуорофора и тушителя, что приводит к усилению тушения флуоресценции флуорофора. Однако для разных ГК мы наблюдаем либо уменьшение степени тушения ($1-I/I_0$) флуоресценции КТ фталоцианином с увеличением температуры, либо отсутствие такой зависимости (рисунок 23). Частичное восстановление потушенной фталоцианином флуоресценции КТ при увеличении температуры раствора можно интерпретировать как диссоциацию гибридного комплекса при высоких температурах.

В образовании ГК могут принимать участие разные типы взаимодействий. Особый интерес представляет исследование роли электростатических сил в этом процессе. Мы изучали перенос энергии от КТ на Фц в их четырех различных комбинациях: КТ600(+)-ZnФц(-8); КТ600(+)-ZnФц(+8); КТ600(-)-ZnФц(-8); КТ600(-)-ZnФц(+8). В водном растворе аминогруппы органической оболочки КТ способны присоединять H^+ при нейтральном рН и, следовательно, КТ600(+) имеют поверхностный положительный заряд. Предполагалось, что в растворах одноименно заряженных КТ и Фц комплексы образовываться не будут вследствие электростатического отталкивания молекул. На установке, совмещающей флуоресцентную спектроскопию с методом счета фотонов, производилась запись интенсивности и длительности флуоресценции квантовых точек (отрицательно или положительно заряженных) в смеси с постепенно возрастающей концентрацией фталоцианинов цинка (с зарядом молекулы -8 или +8). Аналогично исследовались параметры флуоресценции акцептора в отсутствие донора энергии. Также согласно теории FRET нами были рассчитаны основные характеристики исследуемых систем (таблица 4). Кроме того, мы исследовали перенос энергии в ГК КТ600 и КТ600(+) с AlФц(+4.5) и AlФц(+6.5) с целью оценки влияния количества боковых заместителей молекулы Фц на эффективность переноса энергии (рисунок 24).

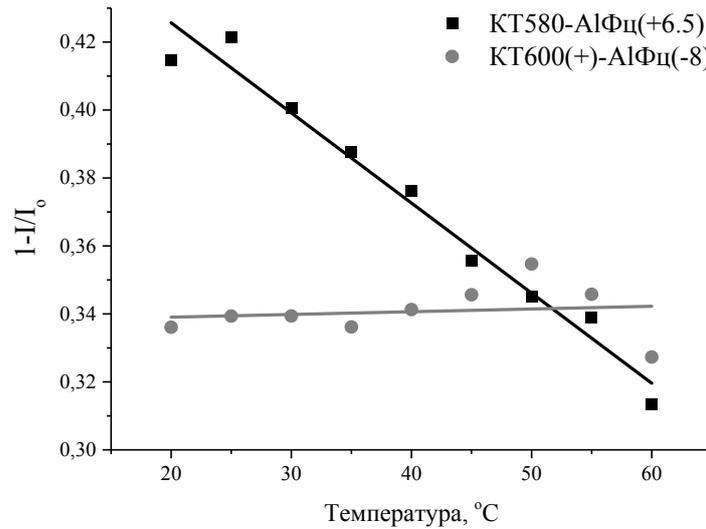


Рисунок 23. Температурная зависимость тушения интенсивности флуоресценции квантовых точек (на длине волны максимума спектра флуоресценции) фталоцианинами алюминия ([Фц]:[КТ] = 5:1) в буферном растворе (ПБС). Длина волны возбуждения флуоресценции 445 нм

Таблица 4. Параметры FRET для различных комбинаций КТ и Фц. R_0 – ферстеровский радиус, R – расстояние между донором и акцептором энергии, k – константа скорости переноса энергии, J – интеграл перекрытия спектров флуоресценции донора энергии (КТ) и поглощения акцептора энергии (Фц), W – эффективность переноса энергии. В скобках указан вклад безызлучательного переноса энергии в общее тушение флуоресценции КТ. Длина волны возбуждения флуоресценции 405 нм

	КТ600(+) ZnФц(+8)	КТ600(+) ZnФц(-8)	КТ600(-) ZnФц(+8)	КТ600(-) ZnФц(-8)
W	0.551 (88%)	0.929 (96.5%)	0.934 (94.5%)	0.1 (35.4%)
$R_0, \text{Å}$	60.5	57.7	62.88	60.4
$R, \text{Å}$	58.5	36.7	40.4	87
$k, *10^6 \text{ c}^{-1}$	72.3	861	394	3.24
$J, *10^{-13} \text{ см}^6$	3.79	2.84	4.77	3.74

Наибольшая эффективность переноса энергии (порядка 95% при максимальной концентрации Фц) наблюдается в противоположно заряженных парах КТ – Фц (таблица 4), что свидетельствует о ключевой роли электростатических сил в образовании ГК. Одноименно заряженные пары КТ-Фц также образуют комплексы. Регистрируя кинетику затухания анизотропии флуоресценции обоих Фц в растворе, содержащем КТ600(+), мы увидели две компоненты (данные не показаны). Быстрая компонента (около 0.3 нс, доля ~ 75%), очевидно,

соответствует времени вращения свободных молекул Фц, а медленная (около 3.5 нс, вклад ~ 25%) характеризует вращение Фц, находящегося на поверхности КТ. Это говорит о том, что поликатионные фталоцианины алюминия способны образовывать комплексы и с положительно заряженными квантовыми точками, хотя доля связанного Фц в комплексе с такими КТ достаточно мала. Несмотря на сравнимые величины интегралов перекрытия J, эффективность переноса энергии в таких комплексах ниже (до 50%). Однако, величины W достаточно существенны, чтобы быть следствием случайных столкновений Фц и КТ в растворе при данных концентрациях. Комплексы между одноименно заряженными Фц и частицами КТ образуются, по-видимому, за счет иных типов взаимодействий, более слабых по сравнению с электростатическими.

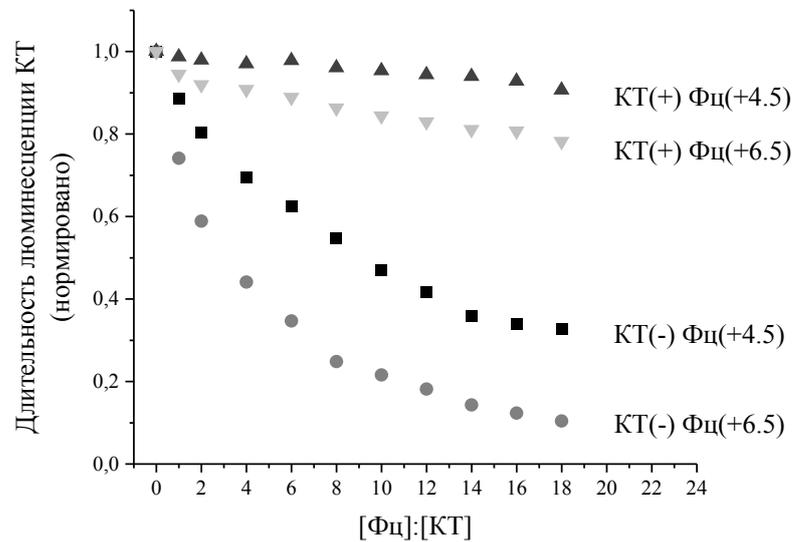


Рисунок 24. Тушение флуоресценции КТ600 и КТ600(+) в растворе с концентрацией 20 нМ при титровании раствором фталоцианина алюминия. Длительность флуоресценции КТ нормирована на ее значение в растворе КТ без Фц. Длина волны возбуждения флуоресценции 455 нм

Доля связанных с КТ600(+) фталоцианинов АlФц(+4.5) и АlФц(+6.5) была почти одинакова, что означает отсутствие влияния количества боковых заместителей у данных Фц на эффективность образования комплекса. Более сильное по сравнению с АlФц(+4.5) тушение флуоресценции КТ600(+) фталоцианином АlФц(+6.5) мы объясняем так же, как и более выраженное тушение им флуоресценции отрицательно заряженной квантовой точки: большие величины интеграла перекрытия спектров J и коэффициентов молярной экстинкции АlФц(+6.5).

Комплексы, состоящие из разноименно заряженных компонентов, значительно отличаются по спектральным свойствам. Так, перенос энергии в гибридном комплексе

КТ600(+)-ZnФц(-8) более эффективен при меньших концентрациях акцептора по сравнению с КТ600(-)-ZnФц(+8), а константа переноса энергии выше в два раза. В ГК фталоцианинов цинка с КТ600(+) тушение флуоресценции КТ одинаково при расчетах из интенсивности и длительности флуоресценции, то есть перенос энергии между КТ и Фц происходит, в основном, безызлучательно. В ГК фталоцианинов цинка с КТ600(-) длительность флуоресценции КТ уменьшается относительно контроля не так сильно, как интенсивность флуоресценции, что означает присутствие иных механизмов тушения. Кроме того, мы обнаружили, что спектр поглощения смеси КТ600(-)-ZnФц(+8) отличается от суммы спектров поглощения однокомпонентных растворов КТ и Фц аналогичной концентрации (рисунок 25). В растворе без КТ ZnФц(+8) имеет спектр поглощения, типичный для мономерной формы. Наблюдаемое поглощение Фц в составе ГК в красной области спектра характерно для димеров Фц, которые имеют низкий квантовый выход флуоресценции и не способны генерировать синглетный кислород.

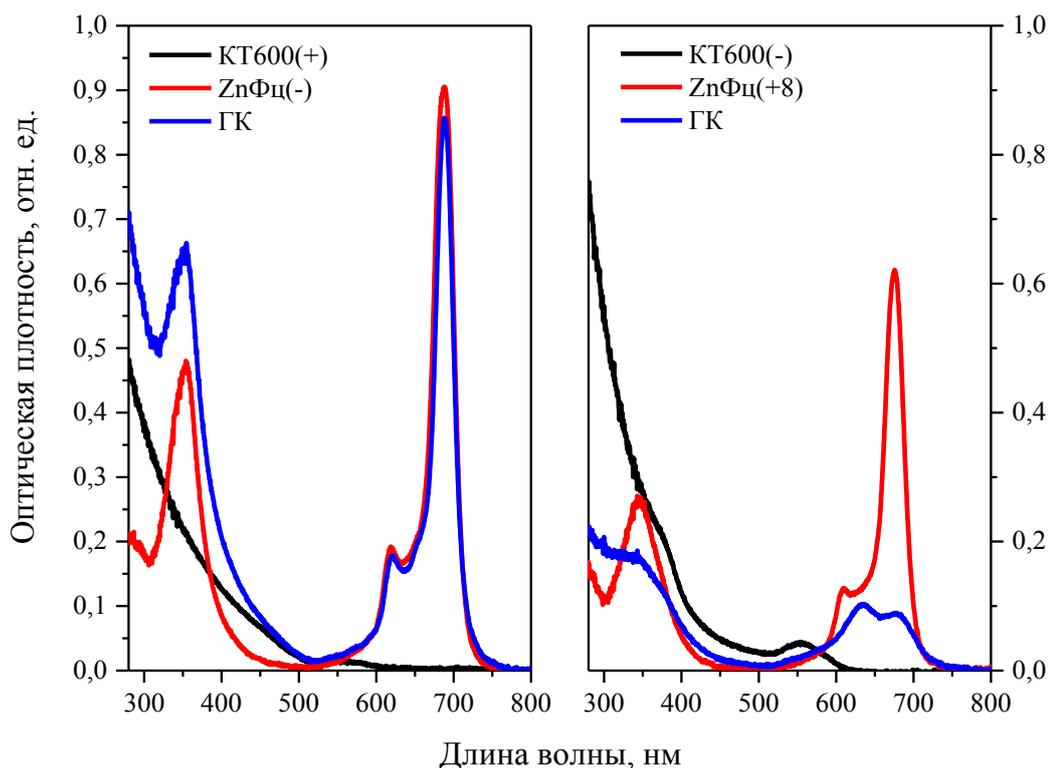


Рисунок 25. Спектры поглощения КТ, Фц, и их разноименно заряженных комплексов. Соотношение концентраций Фц:КТ составило: КТ600(+)-ZnФц(-8) – 1:2, КТ600(-)-ZnФц(+8) – 2:3

В результате переноса энергии должна возрасти интенсивность флуоресценции акцептора, на основании чего мы можем рассчитать коэффициент усиления его флуоресценции по формуле

$$A = \frac{I_{AD}}{I_A} - 1, \quad (32)$$

где I_{AD} – интенсивность флуоресценции акцептора энергии в присутствии донора энергии, I_A – интенсивность флуоресценции акцептора энергии в отсутствие донора энергии. Мы добавляли к раствору ZnФц(-8) водный раствор квантовой точки КТ600(+) и записывали динамику изменения интенсивности и длительности флуоресценции КТ и Фц в разных каналах регистрации методом счета фотонов.

Коэффициент усиления флуоресценции Фц изменяется в зависимости от времени инкубации Фц и КТ (рисунок 26). Величина параметра A в момент добавления квантовой точки к раствору Фц составила 230%, однако с увеличением времени инкубации величина коэффициента A снижается, а на больших временах даже становится меньше нуля (рисунок 26А). При этом длительность флуоресценции Фц возрастает на 7 % и остается постоянной. Очевидно, эффект не связан с режимом работы лазера (рисунок 26Б) и является следствием структурных взаимодействий Фц с органической оболочкой КТ. Таким образом, в смеси после добавления КТ образуются комплексы с высокоэффективным переносом энергии, но в последующие моменты времени уменьшается число таких комплексов. Вероятно, образующийся в процессе облучения раствора синглетный кислород вызывает деструкцию частиц донора энергии: в процессе титрования в этой паре КТ – Фц мы наблюдали сдвиг спектра флуоресценции КТ в область коротких длин волн на 4.5 нм и уменьшение полуширины спектра на 5 нм.

Поскольку в ГК, образованных разноименно заряженными компонентами, перенос энергии осуществлялся гораздо эффективнее, чем в смеси одноименно заряженных КТ и Фц, для дальнейших работ были выбраны отрицательно заряженные КТ и поликатионные фталоцианины алюминия. Квантовые точки представляли собой нанокристаллы CdSe/ZnS, покрытые полимерной оболочкой с карбоксильными группами. КТ отличались размером ядра нанокристалла и, следовательно, положением спектра флуоресценции. Таким образом, варьируя ГК одного и того же Фц с разными КТ, можно получить зависимость эффективности переноса энергии от спектральных свойств КТ. Мы использовали алюминиевые Фц, т. к. алюминиевые фталоцианины менее склонны к агрегации в водных растворах, чем фталоцианины цинка. Кроме того, алюминиевые Фц обладают большей фотостабильностью [112] и растворимостью в воде [202]. Алюминиевые Фц отличались средним количеством заряженных периферических групп, что позволяет изучить влияние величины заряда (и связанного с ним параметра отношения гидрофильность/гидрофобность) молекулы Фц на взаимодействие между КТ и Фц в ГК.

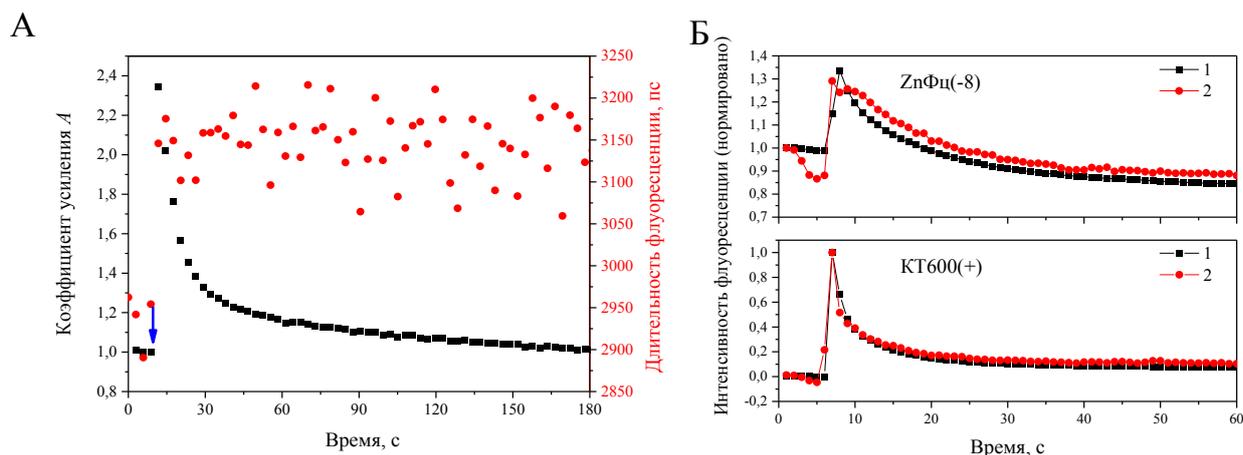


Рисунок 26. Изменения коэффициента усиления и длительности флуоресценции ZnФц(-8) (0.33 мкМ, коэффициент усиления нормирован на значение начального уровня флуоресценции) как результат добавления КТ600(+) (момент добавления отмечен стрелкой). 64 кинетики, накопление каждой 3 с (А). Динамика изменения коэффициента усиления флуоресценции Фц и интенсивности флуоресценции КТ (нормировано на значение интенсивности флуоресценции КТ сразу после образования ГК) в том же опыте в различных режимах работы лазера (1 – режим непрерывной работы лазера; 2 – генерация импульсов с частотой 25 МГц) (Б)

Исследование переноса энергии проводили во всех парах КТ и Фц. На установке, совмещающей флуоресцентную спектроскопию с методом счета фотонов, производили регистрацию интенсивности и длительности флуоресценции КТ (концентрация составляла 20 нМ) в растворе с постепенно возрастающей концентрацией Фц. Аналогично для сравнения исследовали параметры флуоресценции акцептора в отсутствие донора энергии. Кроме того, в программе PhotoChemCad по кривым тушения флуоресценции КТ были рассчитаны некоторые параметры модели FRET (ферстеровский радиус, расстояние между донором и акцептором энергии и константа скорости переноса энергии), сведенные в таблицу 5.

В паре с любой КТ AlФц(+6.5) дает наибольшее перекрытие спектров среди всех Фц. Хотя максимумы поглощения AlФц(+6.5) и AlФц(+4.5) практически совпадают, AlФц(+6.5) по сравнению с AlФц(+4.5) имеет более выраженное плечо слева от главного пика. Спектр поглощения AlФц(+4) сильно смещен в длинноволновую область спектра, поэтому интеграл перекрытия J в парах КТ с этим Фц оказывается наименьшим. Эффективность переноса энергии, а также константа скорости переноса энергии в ГК увеличиваются в ряду AlФц(+4) < AlФц(+4.5) < AlФц(+6.5), что обусловлено ростом величины J в той же последовательности. Кроме того, поглощательная способность AlФц(+6.5) превышает таковую AlФц(+4) и AlФц(+4.5) (таблица 2), что дополнительно увеличивает константу переноса энергии. В данном эксперименте эффективность переноса энергии не зависит от эффективности связывания Фц с

КТ, поскольку время инкубации ГК перед измерениями было выбрано достаточным для полного связывания любых КТ и Фц. Таким образом, заряд молекулы Фц в данном случае оказывает влияние на перенос энергии, т. к. обуславливает спектральные свойства Фц.

Таблица 5. Параметры FRET для различных ГК отрицательно заряженных CdSe/ZnS КТ и поликатионных фталоцианинов алюминия ($[КТ] = 20$ нМ, $[Фц] = 2$ мкМ, Фц:КТ = 100:1). R_0 – ферстеровский радиус, R – расстояние между донором и акцептором энергии в комплексе, k – константа скорости переноса энергии, W – эффективность переноса энергии

Компоненты ГК		W (%)	J, $\cdot 10^{-13} \text{ см}^6$	$R_0, \text{ \AA}$	$R, \text{ \AA}$	$k, \cdot 10^8 \text{ с}^{-1}$
AlФц(+4)	КТ580	20.9±0.4	1.621	47.9	59.7	0.33
	КТ600	80.0±0.5	4.052	38.7	30.7	6.55
	КТ620	47.2±2.7	4.139	55.6	56.7	1.48
	КТ640	87.1±2.4	6.981	51.2	37.3	5.44
AlФц(+4.5)	КТ580	44.5±3.0	1.426	46.8	48.6	1.41
	КТ600	80.6±0.1	2.956	36.7	29.0	7.97
	КТ620	64.0±2.5	3.759	54.7	49.7	2.37
	КТ640	84.5±3.0	6.485	50.6	38.2	3.73
AlФц(+6.5)	КТ580	80.1±1.0	2.903	52.7	41.8	6.85
	КТ600	76.8±0.5	5.678	41.0	33.6	7.41
	КТ620	94.6±1.1	7.139	60.9	37.8	33.11
	КТ640	92.3±0.3	11.762	55.9	37.0	10.00

С увеличением длины волны максимума флуоресценции КТ интеграл перекрытия J возрастает. Таким образом, мы ожидали зарегистрировать увеличение эффективности переноса энергии в зависимости от типа КТ в ряду пар Фц с $КТ580 < КТ600 < КТ620 < КТ640$. Однако полученные результаты (таблица 5) не подтверждают наши предположения. В первую очередь это связано с тем, что интеграл перекрытия спектров флуоресценции донора и поглощения акцептора энергии не является единственным параметром, определяющим эффективность переноса энергии. Не менее важными характеристиками являются квантовый выход флуоресценции и размер КТ. Мы использовали эквимольные растворы Фц и эквимольные растворы КТ, так как в этом случае значительно упрощается сравнение полученных результатов. Однако это решение имеет недостаток. Поскольку каждое соединение обладает индивидуальным значением коэффициента поглощения (см. таблицы 1 и 2), при равных концентрациях количество поглощенных, а следовательно, и высветившихся фотонов будет для каждого вещества своё, даже если квантовые выходы флуоресценции одинаковы. Тем не менее, принятое нами решение представляется единственно верным в рамках цели работы, которая направлена на поиск ГК обладающих наибольшей способностью к генерации АФК и обеспечивающих эффективное фотодинамическое действие.

Эффективность переноса энергии от КТ к Фц в комплексе возрастает в ряду КТ580 < КТ620 < КТ640 как следствие увеличения величины интеграла перекрытия J . Несмотря на то, что квантовый выход флуоресценции КТ640 почти в три раза меньше, чем квантовый выход флуоресценции КТ620, а размер этих нанокристаллов практически совпадает (таблица 1), увеличение интеграла перекрытия в ~ 1.7 раза достаточно, чтобы перенос энергии от КТ640 был эффективнее. Этот факт свидетельствует о наличии еще неизвестных характеристик КТ, влияющих на фотопроцессы в ГК. Максимальная эффективность переноса энергии среди исследованных ГК наблюдается в парах Фц с КТ600. По-видимому, это можно объяснить большой полидисперсностью данного образца КТ (таблица 8). В растворе КТ600 функциональна только определенная доля частиц (см. раздел 3.2.3); следовательно, при титровании фталоцианином по сравнению с растворами других КТ в растворе КТ600 реальное соотношение Фц:КТ в флуоресцирующих комплексах оказывается больше, чем 100:1.

Одновременно с кривыми тушения флуоресценции КТ для тех же соотношений [Фц]:[КТ] был рассчитан коэффициент усиления флуоресценции Фц A (рисунок 27). Видно, что величина A увеличивается в рядах $Al_{Фц(+4)} < Al_{Фц(+4.5)} < Al_{Фц(+6.5)}$ и $КТ580 < КТ600 < КТ620 < КТ640$, что совпадает с таковой последовательностью для интеграла перекрытия спектров J в данных парах КТ и Фц. Также растет и длительность флуоресценции Фц: учитывая, что длительность флуоресценции $Al_{Фц(+4)}$, $Al_{Фц(+4.5)}$ и $Al_{Фц(+6.5)}$ в отсутствие КТ составила 3.6, 4.76 и 4.71 нс соответственно, то в составе ГК мы наблюдали их 2-2.8-кратное увеличение (данные не показаны). Нужно отметить, что длительность флуоресценции Фц в результате переноса энергии стремится к значению длительности флуоресценции КТ, поскольку длительность сенсibilизированной флуоресценции акцептора энергии прямо зависит от времени жизни возбужденного состояния донора энергии (см. раздел 3.1.1).

В этом эксперименте мы наблюдали уменьшение параметра A с увеличением концентрации Фц. Другими словами, усиления при высоких концентрациях Фц не происходит. Радиус эффективного сечения поглощения молекул КТ и Фц, рассчитанный из молярного коэффициента поглощения на длине волны возбуждения КТ (405 нм), составит для $Al_{Фц(+4.5)}$ и КТ620 0.3 Å и 4.1 Å, соответственно. При низких соотношениях Фц:КТ в ГК вследствие большего сечения поглощения вероятность поглощения кванта света квантовой точкой выше, чем фталоцианином. В этой области отношения концентраций [Фц]:[КТ] мы наблюдаем максимальные значения коэффициента усиления флуоресценции Фц. Однако, при дальнейшем увеличении отношения [Фц]:[КТ] общее сечение поглощения Фц также увеличивается и при Фц:КТ = 14 становится равным сечению поглощения КТ. Следовательно, с увеличением Фц:КТ фталоцианины все больше экранируют квантовую точку; вероятность поглощения света

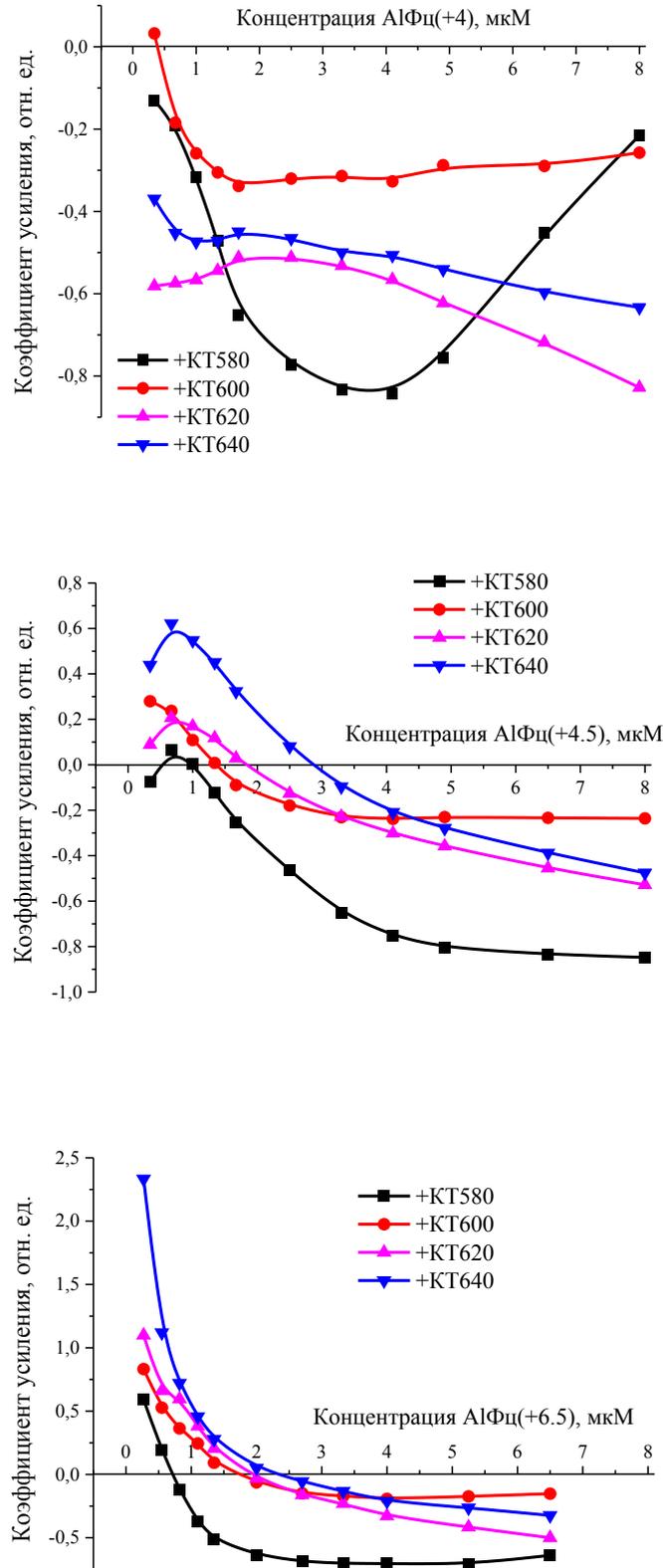


Рисунок 27. Зависимость коэффициента усиления флуоресценции фталоцианина алюминия (сверху вниз: AlФц(+4), AlФц(+4.5) и AlФц(+6.5), соответственно) от его концентрации в водных растворах ГК (концентрация квантовых точек 20 нМ)

квантовой точкой снижается, что уменьшает количество актов переноса энергии в единицу времени. Поскольку коэффициент молярной экстинкции адсорбированного на квантовой точке фталоцианина ниже, чем у Фц в растворе (см. раздел 3.2.2), коэффициент усиления флуоресценции Фц при избытке красителя падает и может стать отрицательным. При дальнейшем увеличении концентрации молекул Фц в растворе должно произойти насыщение, когда все сайты связывания Фц на КТ окажутся занятыми. Таким образом, будет увеличиваться концентрация свободных молекул Фц в растворе, поэтому величина A должна стремиться к нулю из области отрицательных значений. Действительно, такое поведение было замечено в парах Фц с КТ580, как с квантовой точкой, обладающей наименьшей адсорбционной способностью (таблица 8) среди КТ, использованных в эксперименте.

Суммируя результаты исследования, мы рассчитали коэффициент усиления флуоресценции для AlФц(+4.5) в парах с КТ600 и КТ620 в большом интервале концентраций Фц, где соотношение [Фц]:[КТ] варьировали от 1:1 до 100:1 (рисунок 28А). Кроме того, для трех точек этой зависимости ([Фц]:[КТ] = 25:1, 50:1 и 100:1) были зарегистрированы кинетики затухания анизотропии флуоресценции AlФц(+4.5) (рисунок 28Б). Нужно отметить, что все молекулы Фц даже при очень высоких соотношениях [Фц]:[КТ] оказываются связанными с КТ, поскольку коэффициент усиления флуоресценции Фц так и остается отрицательным, а кинетики затухания анизотропии флуоресценции Фц описываются в одноэкспоненциальном приближении, что означает отсутствие свободных молекул Фц в растворе.

Интересно, что в контроле без КТ зависимость интенсивности флуоресценции Фц от его концентрации переставала быть линейной и достигала насыщения при увеличении концентрации Фц свыше 14 мкМ, что соответствует отношению [Фц]:[КТ] = 70:1 на рисунке 28А. При дальнейшем увеличении концентрации Фц интенсивность его флуоресценции уменьшается вследствие концентрационных эффектов. Следовательно, самотушение флуоресценции Фц на поверхности КТ должно наступать при еще меньших концентрациях Фц, чем в контроле без КТ. Таким образом главными причинами снижения величины коэффициента усиления флуоресценции Фц при увеличении параметра [Фц]:[КТ] являются самотушение флуоресценции Фц и увеличение собственной поглощательной способности Фц. По этой причине коэффициент усиления флуоресценции принимает максимальное значение при соотношениях Фц:КТ = 1:1 и менее.

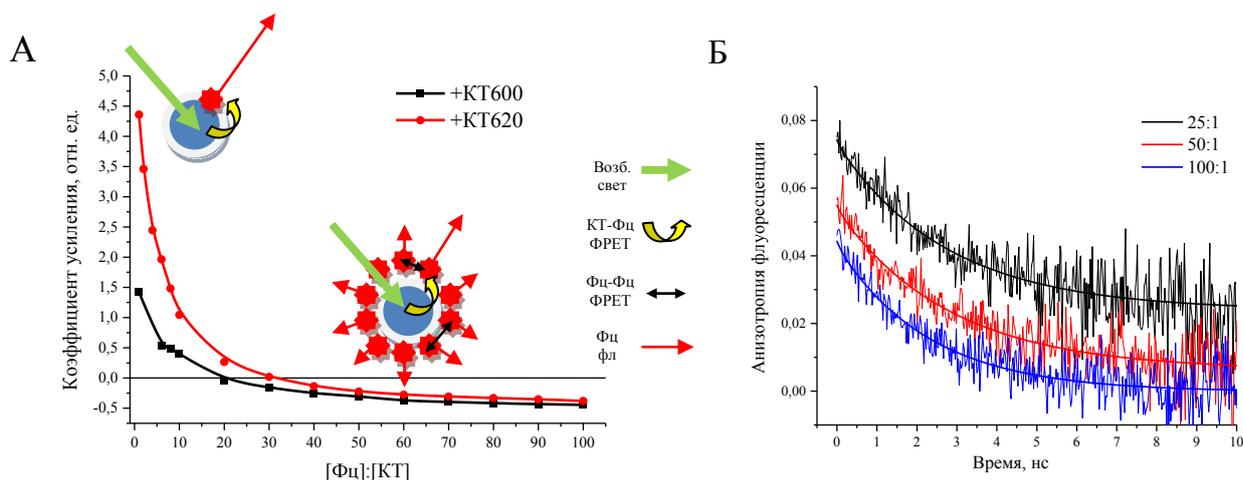


Рисунок 28. Концентрационная зависимость коэффициента усиления флуоресценции AlФц(+4.5) в парах с различными КТ в водном растворе (А). Длина волны возбуждения флуоресценции 405 нм. Кинетики затухания анизотропии флуоресценции AlФц(+4.5) в паре с КТ600 при различных соотношениях [Фц]:[КТ] (Б). Время инкубации – 30 мин

Кинетики затухания анизотропии флуоресценции Фц на рисунке 28Б отличаются амплитудой r_0 , которая уменьшается с увеличением отношения [Фц]:[КТ]. Известно, что наличие переноса энергии вызывает снижение величины фундаментальной анизотропии [5]. Возможно, с увеличением локальной концентрации молекул Фц на поверхности КТ возрастает вероятность переноса энергии между соседними молекулами Фц, например, по механизму FRET. Перенос энергии может иметь место, поскольку величина Стоксова сдвига в спектре фталоцианинов достаточно мала, что обеспечивает значительное перекрытие спектров флуоресценции донорной молекулы Фц и поглощения акцепторной молекулы Фц. Наличие переноса энергии между молекулами Фц в ГК свидетельствует о небольших расстояниях между ними при высоких значениях [Фц]:[КТ].

Для установления зависимости величины коэффициента усиления флуоресценции Фц от длины волны облучения раствора ГК мы регистрировали спектр возбуждения флуоресценции алюминиевых фталоцианинов в составе ГК (рисунок 29А). На основе полученных данных для каждой длины волны облучения был рассчитан параметр A (рисунок 29Б). Видно, что наибольшие значения коэффициент усиления флуоресценции Фц принимает в сине-зеленой области спектра, 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.

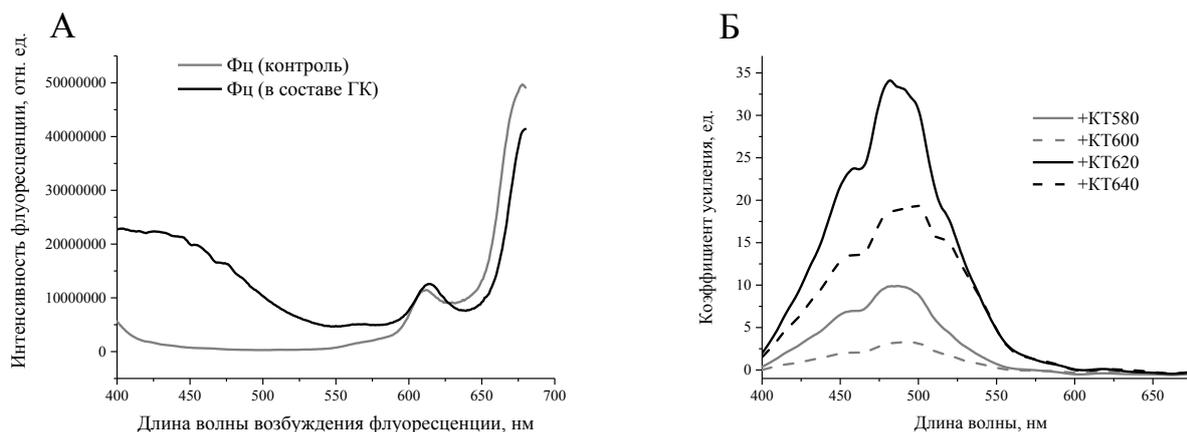


Рисунок 29. Спектр возбуждения флуоресценции AlФц(+6.5) в ГК с КТ580 ([Фц]:[КТ] = 3:1) (А). Зависимость коэффициента усиления флуоресценции AlФц(+6.5) в ГК с CdSe/ZnS КТ ([Фц]:[КТ] = 3:1) от длины волны возбуждения (Б). Длина волны регистрации флуоресценции Фц 695 нм

На следующем этапе работы мы исследовали способность к генерации синглетного кислорода полученными ГК. В стандартной кварцевой кювете готовили спиртовой раствор ДФБФ. Затем в кювету добавляли тестируемое вещество (Фц, КТ, ГК) и спустя необходимое для установления равновесия в растворе время (30 с) производили облучение синим светодиодом ($287 \text{ мкМ квантов/с} \cdot \text{м}^2$) в течение 5 минут. С помощью функции StripChart записывали временную динамику изменения поглощения на длине волны 415 нм (в максимуме поглощения ДФБФ). Так как КТ и Фц также имеют поглощение в этой области, их вклад вычитался. Полученное снижение поглощения ДФБФ нормировали на величину оптической плотности его раствора непосредственно перед облучением.

Для облучения нами был выбран синий светодиод с максимумом излучения на длине волны 460 нм, поскольку в этой области спектра фталоцианины обладают низкими значениями коэффициентов молярной экстинкции (рисунок 30), и прогнозируемое нами усиление выработки АФК можно было бы легко объяснить переносом энергии с КТ, которые обладают хорошей поглощательной способностью на длине волны 460 нм. Ввиду незначительного поглощения в синей области AlФц(+4.5) и AlФц(+6.5) в концентрации 0.85 мкМ оказались неспособными к выработке синглетного кислорода (рисунок 31А); AlФц(+4), хотя и с низкой скоростью, но продуцирует синглетный кислород, поскольку длинноволновый хвост от полосы Core у этого соединения простирается до 500 нм.

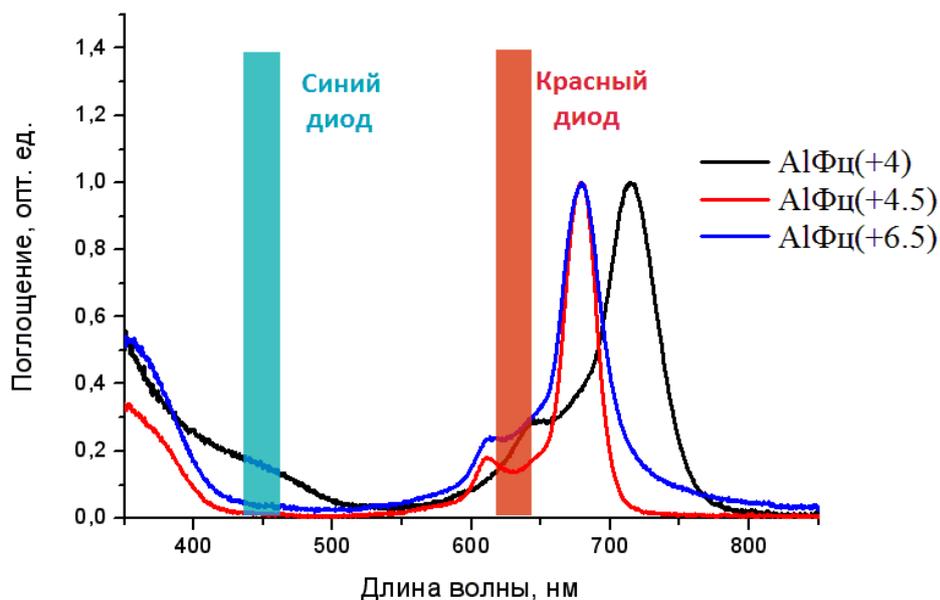


Рисунок 30. Спектры поглощения использованных в работе поликатионных фталоцианинов алюминия. Также показаны спектры излучения светодиодов (описание в тексте)

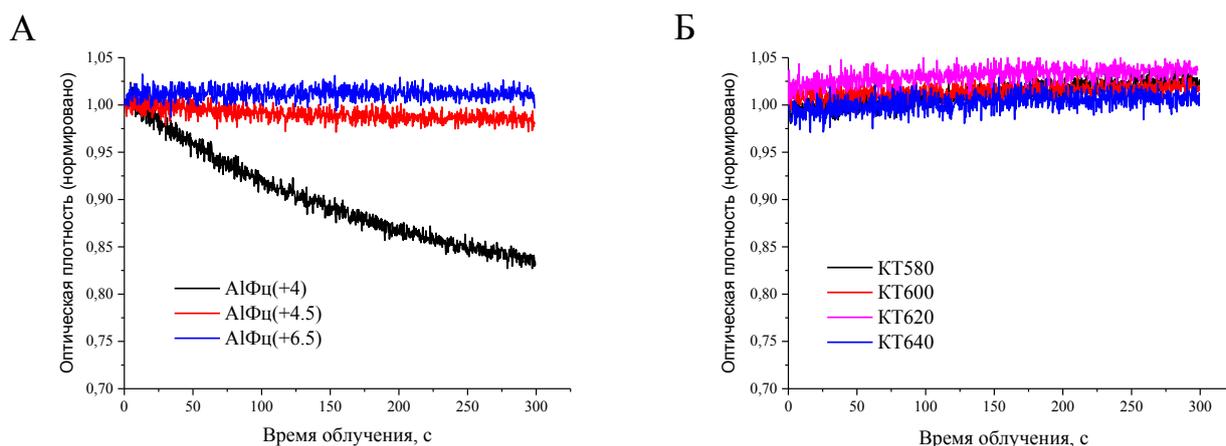


Рисунок 31. Изменение поглощения ДФБФ (на длине волны 415 нм) в растворах поликатионных фталоцианинов алюминия (А) и отрицательно заряженных CdSe/ZnS КТ (Б) при облучении синим светом (460 нм; общее время облучения 5 минут). Поглощение нормировано на оптическую плотность раствора ДФБФ перед облучением

Квантовые точки в концентрации 60 нМ не генерируют синглетный кислород в тех же условиях (рисунок 31Б). Более того, в процессе облучения оптическая плотность на длине волны 415 нм немного увеличивается. Имея величину поглощения на 460 нм, сравнимую с таковой у ДФБФ, КТ могут конкурировать с химической ловушкой за световой поток. Поскольку ДФБФ деградирует при освещении синим светом, уменьшение доступного светового потока должно приводить к снижению скорости деградации; следовательно, использование процедуры учета выгорания ДФБФ в контроле без КТ может приводить к артефактам.

Также мы измерили скорость фотоокисления ДФБФ в растворах гибридных комплексов. Концентрации компонентов в смеси были равны концентрациям в их контрольных растворах; соотношение [Фц]:[КТ] составило 14:1. Для количественной оценки данных кривые снижения поглощения ДФБФ аппроксимировали затухающей экспонентой $F(x) = A_0 + Ae^{(-x/\tau)}$, откуда определяли константу скорости снижения поглощения $1/\tau$, пропорциональную скорости генерации синглетного кислорода.

КТ за счет переноса энергии значительно усиливает выход синглетного кислорода фталоцианинов алюминия (рисунок 32). Для всех трех типов Фц наибольший эффект дают КТ600, КТ620 и КТ640. Среди Фц наибольшее увеличение скорости генерации синглетного кислорода было зарегистрировано у AlФц(+6.5), поскольку в контроле он демонстрировал самые низкие значения скорости образования синглетного кислорода. В лучших случаях константа скорости фотоокисления ДФБФ возросла в 3.5 – 3.6 раза.

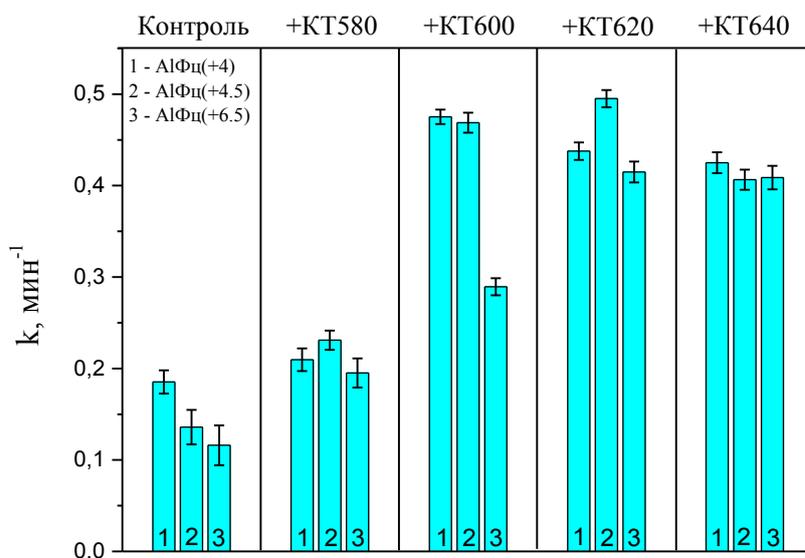


Рисунок 32. Константа скорости фотоокисления ДФБФ в растворах ГК поликатионных фталоцианинов алюминия и отрицательно заряженных CdSe/ZnS КТ, а также растворов Фц в отсутствие КТ (цифры 1, 2 и 3 обозначают AlФц(+4), AlФц(+4.5) и AlФц(+6.5) соответственно). Облучение синим светом (460 нм, 285 мкМ квантов/с*м²; общее время облучения 5 минут)

Поскольку ГК действительно генерируют синглетный кислород за счет переноса энергии от КТ к молекулам фталоцианина, необходимо сравнить эффективность генерации АФК гибридными комплексами КТ – Фц при облучении сине-зеленым светом и фталоцианинами при облучении красным светом. Мы использовали красный светодиод (615 – 655 нм, максимум

изучения 635 нм, 143 мкМ квантов/с*м²) и облучали растворы Фц в тех же концентрациях с тем же количеством ДФБФ в течение 5 минут. Результаты показаны на рисунке 33А.

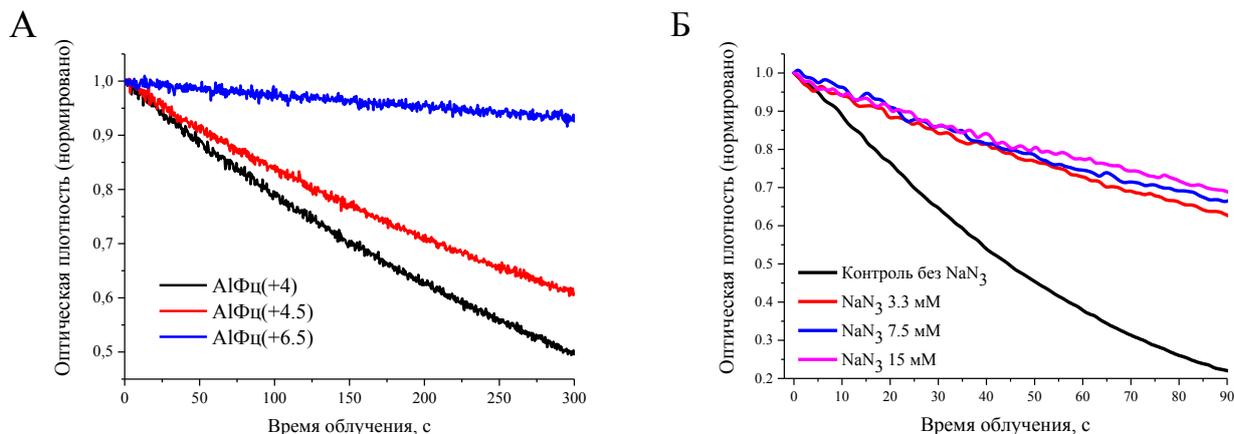


Рисунок 33. Изменение поглощения ДФБФ (на длине волны 415 нм) в растворах поликатионных фталоцианинов алюминия (А). Выцветание ДФБФ при облучении раствора AlФц(+4.5) в зависимости от концентрации азиды натрия (Б). Поглощение нормировано на оптическую плотность раствора ДФБФ перед облучением. Облучение красным светом (максимум излучения 635 нм)

В растворах Фц при облучении красным светом оптическая плотность ДФБФ уменьшается за 5 минут на 40 – 50%, как и в растворах с ГК, но надо иметь в виду, что синий светодиод генерирует вдвое больший световой поток по сравнению с красным. Поэтому константы скорости фотоокисления ДФБФ при облучении красным светом ($2.43 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ у AlФц(+4), $2.4 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ у AlФц(+4.5) и $0.8 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ в случае AlФц(+6.5)) ниже, чем при облучении синим. Кроме того, облучение на длине волны 635 нм приходится на коротковолновое плечо полосы QI поглощения Фц. Облучение же, например, в области 680 нм при эквивалентном синему светодиоду световом потоке, вероятно, должно вызывать полную деградацию ДФБФ менее чем за пять минут. Таким образом, мнение о том, что комплексы КТ-Фц лучше освещать там, где поглощают оба компонента, оказывается небезосновательным.

Заметим, что использованные нами поликатионные фталоцианины алюминия генерируют не только синглетный кислород, но и другие АФК. Так, добавление избытка (~ 10 мМ) азиды натрия NaN₃ (тушителя синглетного кислорода) в раствор Фц при облучении красным светом не вызывает полной остановки фотоокисления ДФБФ (рисунок 33Б). Похожие результаты для сульфированных фталоцианинов алюминия получены ранее [10]. Добавим, что однокомпонентный раствор ДФБФ, как и ДФБФ в присутствии КТ без Фц, не выцветает при освещении красным светом.

При освещении красным светом AlФц(+6.5) генерирует синглетный кислород намного хуже, чем AlФц(+4.5), хотя значение квантового выхода генерации АФК AlФц(+6.5) в воде больше, чем у AlФц(+4.5) (таблица 2). Использование этанола явилось необходимой мерой для осуществления данной методики регистрации синглетного кислорода, поскольку ДФБФ обладает низкой растворимостью в воде. Побочные эффекты, связанные со сменой растворителя, могли исказить полученные данные. С помощью метода счета фотонов были получены значения интенсивности и длительности флуоресценции всех КТ и Фц в воде и спирте. Результаты представлены в таблице 6.

Таблица 6. Параметры флуоресценции CdSe/ZnS КТ и поликатионных алюминиевых фталоцианинов в зависимости от природы растворителя

	Вода		Этанол	
	Интенсивность	Длительность, нс	Интенсивность	Длительность, нс
КТ580	159.5	8.19	267.5	12.2
КТ600	33.7	9.24	24.9	3.95
КТ620	294	12.63	510.2	17.67
КТ640	248.9	10.33	497.6	17.5
AlФц(+4)	36.4	3.45	48.4	3.64
AlФц(+4.5)	108.5	4.88	151.3	4.89
AlФц(+6.5)	60	4.86	16.3	5.32

В спиртовом растворе мы наблюдаем значительное (более чем в 3.7 раза) снижение интенсивности флуоресценции AlФц(+6.5). Кроме того, мы обнаружили, что в этаноле снижается и оптическая плотность этого фталоцианина (~ 1.6 раза). Вероятно, этим объясняются низкие значения константы скорости фотоокисления ДФБФ в спиртовом растворе этого Фц. При переходе от водного раствора к спиртовому поглощение снижается и у AlФц(+4) (на 9%), оптическая плотность раствора AlФц(+4.5) от природы растворителя не зависит. В целом, интенсивность и длительность флуоресценции как КТ, так и Фц в спирте увеличиваются. Исключение составляют КТ600. Возможно, причиной тому могут быть поверхностные дефекты данной КТ (см. раздел 3.2.3). Различиями оптических свойств в воде и этаноле можно объяснить и несоответствие между значением коэффициента усиления флуоресценции Фц и скоростью фотоокисления ДФБФ в зависимости от типа КТ.

Одним из основных недостатков органических красителей является высокая скорость фотовыцветания. В случае фталоцианинов этот эффект связан с тем, что молекула Фц может

быть не только генератором АФК, но и их тушителем. Мы показали, что фотовыцветание Фц происходит в составе ГК при облучении раствора светом в сине-зеленой области спектра, где коэффициент молярной экстинкции Фц пренебрежимо мал (рисунок 34А). При облучении раствора ГК светом на длине волны 515 нм мы наблюдали необратимое уменьшение оптической плотности в красной области спектра, что свидетельствует о разрушении электронной структуры молекулы Фц. Оптическая плотность и интенсивность флуоресценции Фц снижаются параллельно (рисунок 34Б), так что дезинтеграции ГК не происходит, и тушение флуоресценции Фц определяется исключительно разрушением макроцикла. Явление представляет собой светозависимый процесс; при выключении источника света деградация не происходит (рисунок 34Б, вставка). Фотовыцветание Фц в составе ГК приводит к восстановлению флуоресценции квантовой точки.

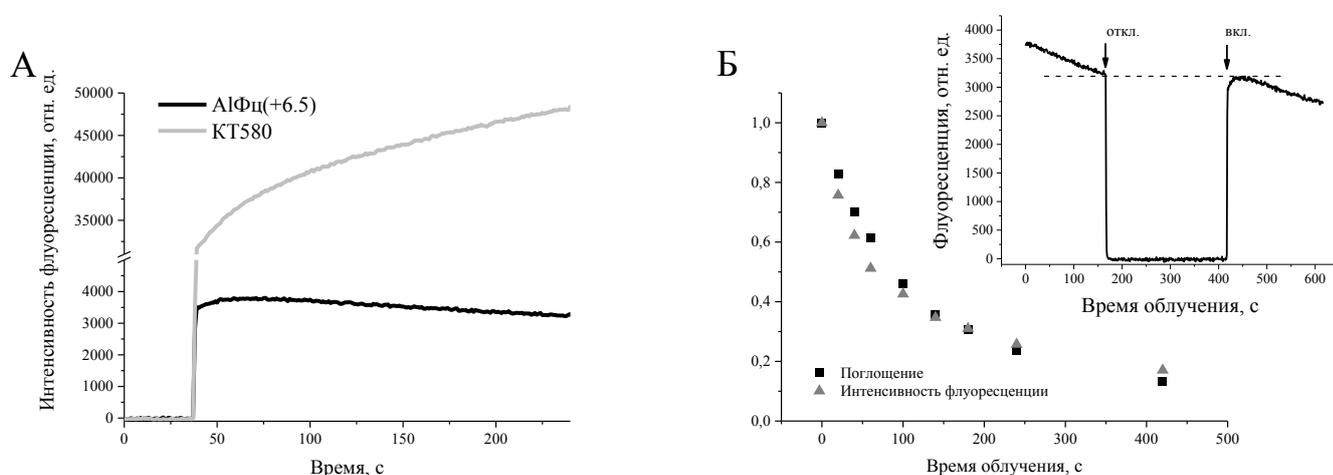


Рисунок 34. Временная динамика интенсивности флуоресценции KT580 (590 нм) и AlФц(+6.5) в составе ГК при облучении раствора лазером 515 нм в постоянном режиме (А). Изменение интенсивности флуоресценции (695 нм) и оптической плотности (685 нм) фталоцианина в этой же системе при облучении образца с помощью синего светодиода (460 нм) (Б). Параметры нормированы на величины в момент включения источника света. На вставке – динамика изменения интенсивности флуоресценции Фц в той же системе при временном прекращении облучения

3.2.2 Изменение спектральных свойств фталоцианинов при образовании гибридного комплекса

В присутствии флуоресцентных наночастиц изменяются спектральные свойства использованных в данной работе фталоцианинов. Изменения спектральных свойств Фц вызваны образованием ГК вследствие взаимодействия молекул красителя с органической оболочкой наночастицы. Это можно доказать, исследуя кинетику затухания анизотропии флуоресценции Фц в присутствии КТ (рисунок 35). В контроле в водном растворе в отсутствие

КТ поликатионные фталоцианины алюминия демонстрируют двухкомпонентную кинетику затухания анизотропии с характерными значениями корреляционных времен вращения 0.1 и 0.5 – 0.6 нс. Величина $r_0 = \sum r_{0i}$ не превышает 0.1, что меньше теоретического значения предельной поляризации для молекул этого типа и хорошо согласуется с данными для других металлокомплексов Фц [111]. Поскольку дипольные моменты поглощения (в двух Q-полосах, где происходило возбуждение флуоресценции) Фц лежат в плоскости макроцикла молекулы, быстрая компонента, очевидно, соответствует вращению в плоскости макроцикла. Это выражается в значительном изменении амплитуды анизотропии от 0.09 до 0.02. Медленная компонента с меньшей амплитудой (~ 0.02) соответствует вращению вне плоскости макроцикла, что требует большей перестройки водного окружения молекулы Фц.

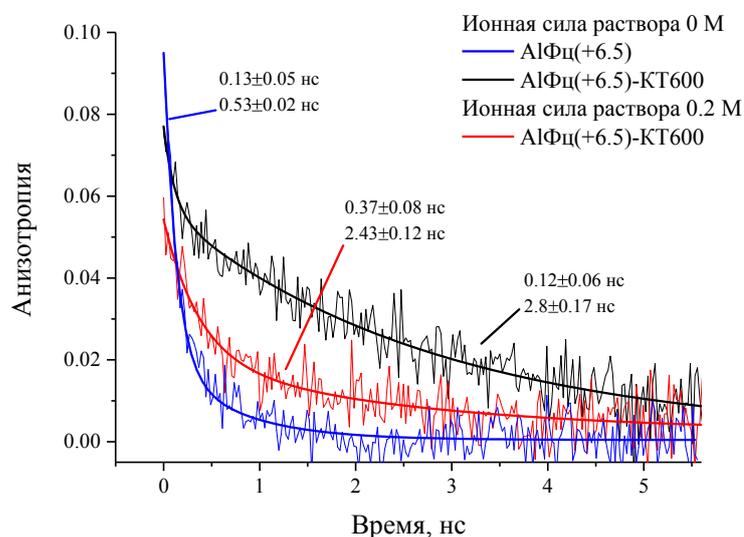


Рисунок 35. Кинетика затухания анизотропии флуоресценции фталоцианина AlФц(+6.5) в водном растворе (синяя кривая), а также в комплексе с КТ600 ([Фц]:[КТ] = 1:1) в водном растворе (черная кривая) и в растворе с ионной силой 0.2 М (красная кривая)

При добавлении к раствору Фц эквимолярного количества КТ кинетика затухания анизотропии флуоресценции Фц изменяется: в кинетике присутствует единственная компонента с характерными значениями корреляционных времен 2.8 – 3 нс в водном растворе и 2.5 нс в растворе с ионной силой 0.2 М. По-видимому, это время соответствует вращению молекулы Фц, связанного с КТ в гибридном комплексе, поскольку время вращения самого ГК вследствие значительного размера КТ должно быть гораздо больше. Так, время вращения красителя 2-толуидинонафталин-6-сульфоната в комплексе с апомиоглобином (линейные размеры глобулы 4.5 x 3.5 x 2.5 нм) было оценено в 20 нс [203].

Мы провели анализ спектральных и фотофизических свойств поликатионных фталоцианинов алюминия в присутствии отрицательно заряженных CdSe/ZnS квантовых точек.

При анализе изменений спектра поглощения Фц в растворе с КТ мы не учитывали полосу Соре, поскольку из-за больших коэффициентов молярной экстинкции КТ в этой области спектра наблюдается эффект взаимной экранировки спектров Фц и КТ. Флуоресценцию Фц возбуждали красным светом (655 нм) и регистрировали положение спектра флуоресценции и длительность флуоресценции Фц с помощью стационарной спектроскопии и спектроскопии высокого временного разрешения. Результаты представлены в таблице 7.

Характерные изменения спектров поглощения и флуоресценции Фц при добавлении КТ показаны на рисунке 36. При образовании гибридного комплекса с КТ мы наблюдали батохромный сдвиг спектров поглощения и флуоресценции Фц, причем также изменяется величина Стоксова сдвига (таблица 7) и уменьшается коэффициент молярной экстинкции Фц в области длинноволнового пика поглощения. Данный эффект не связан с влиянием поглощения КТ на тех же длинах волн вследствие крайне низких коэффициентов молярной экстинкции КТ в этой области спектра. Интересно, что перекрывание спектров поглощения КТ и Фц в синей области спектра приводит к тому, что суммарная оптическая плотность раствора ГК оказывается меньше, чем сумма оптических плотностей отдельных растворов Фц и КТ соответствующей концентрации. Это можно объяснить эффектом комплексообразования в качестве аналогии влияния агрегации на просветление концентрированного раствора. Батохромный сдвиг тетрапиррольных соединений наблюдается при переходе в более

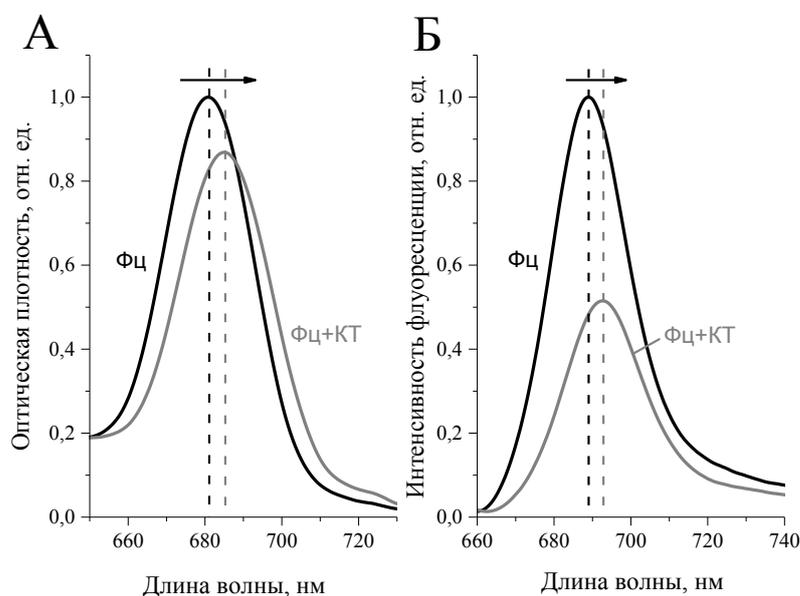


Рисунок 36. Изменения спектральных характеристик (длинноволнового пика поглощения А и спектра флуоресценции Б) А1Фц(+6.5) при добавлении раствора КТ580. Длина волны селективного возбуждения флуоресценции Фц 655 нм. Интенсивность флуоресценции и оптическая плотность нормированы на соответствующие значения в максимуме пиков

Таблица 7. Изменение фотофизических свойств поликатионных фталоцианинов алюминия при образовании комплекса с отрицательно заряженными квантовыми точками (ядро CdSe/ZnS). Селективное возбуждение флуоресценции Фц осуществлялось на длине волны 655 нм

	Положение полосы QI поглощения (λ_{abs}), нм	Оптическая плотность в λ_{abs}	Положение спектра флуоресценции (λ_{em}), нм	Стоксов сдвиг, нм	Длительность флуоресценции, нс	Скорость образования $^1\text{O}_2$, мин ⁻¹	Квантовый выход флуоресценции	Полуширина спектра флуоресценции, нм
AlФц(+4.5)	684.1	0.35±0.015	688.9	4.8	4.43±0.04	1.02	0.12	21.0
+КТ580	→3.2	-24%	→3.7	5.3	3.89±0.04	0.92	-66.3%	21.3
+КТ600	→3.4	-19.3%	→3.3	4.7	5.04±0.08	0.26	-53.9%	20.9
+КТ620	→2.6	-15.6%	→3.6	5.8	3.94±0.05	3.88	-48.2%	20.9
+КТ640	→1.9	-11.6%	→3.6	6.5	4.96±0.04	4.38	-24.9%	19.6
AlФц(+6.5)	680.9	0.44±0.013	685	4.1	4.46±0.05	1.73	0.17	21.8
+КТ580	→2.5	-17.8%	→0.8	2.4	4.08±0.04	1.59	-45.4%	21.9
+КТ600	→2.8	-15.1%	→1	2.3	4.35±0.04	0.37	-40.3%	22.1
+КТ620	→2.2	-11.9%	→2	3.9	4.07±0.11	4.55	-39.1%	22.3
+КТ640	→1.8	-7.7%	→2	4.3	4.29±0.7	5.28	-26.6%	22.0

гидрофобную среду и обычно не превышает 5 нм [111]. Таким образом, молекулы Фц хотя бы частично интеркалируют во внешнюю органическую оболочку КТ.

Амплитуда изменений спектральных характеристик выражена сильнее у AlФц(+4.5) по сравнению с AlФц(+6.5). Этот эффект не связан с различием в эффективности образования ГК, поскольку локализация данных Фц в ГК совпадает (раздел 3.2.5), и является следствием особенностей строения молекул соответствующих фталоцианинов.

При взаимодействии с КТ уменьшается интенсивность флуоресценции фталоцианинов. Данный эффект связан с уменьшением величины коэффициента молярной экстинкции и квантового выхода флуоресценции (в отсутствие переноса энергии уменьшается длительность флуоресценции Фц на поверхности КТ). С увеличением соотношения Фц:КТ в ГК данные эффекты становятся более выраженными (рисунок 37), поскольку локальная концентрация Фц в составе ГК растет значительно быстрее, чем в контроле без КТ. Таким образом, при высоких значениях соотношения [Фц]:[КТ] в растворе интенсивность флуоресценции Фц уменьшается за счет изменения спектральных характеристик вследствие образования комплекса с КТ и последующих концентрационных эффектов.

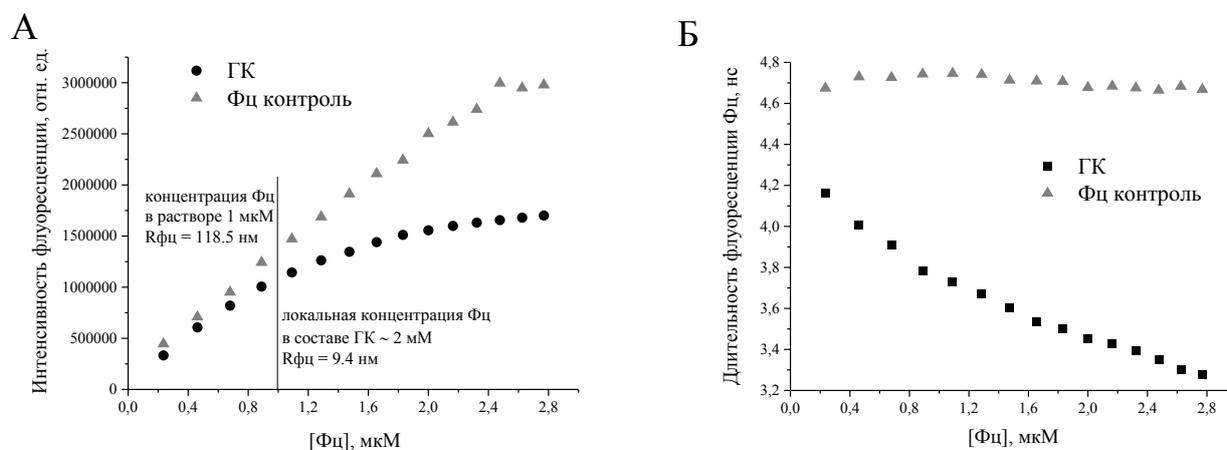


Рисунок 37. Изменения интенсивности (А) и длительности (Б) флуоресценции AlФц(+6.5) в ГК с КТ580 и в контроле без КТ в зависимости от концентрации Фц. $R_{фц}$ – расстояние между двумя молекулами Фц в среде (вода в случае однокомпонентного раствора Фц и органическая оболочка КТ в случае раствора ГК). Длина волны возбуждения флуоресценции 655 нм

Наблюдаемые изменения формы спектра поглощения фталоцианинов алюминия при образовании ГК могут влиять на параметры переноса энергии возбуждения от КТ на Фц. Мы сравнили параметры FRET, полученные для комплексов поликатионных фталоцианинов с КТ600 и КТ620, с учетом изменения спектральных свойств Фц при адсорбции на КТ и без учета этого эффекта (таблица 9). Интеграл перекрытия спектров флуоресценции донора энергии

(КТ) и поглощения акцептора энергии (Фц) оказывается в среднем на 7% меньше вследствие батохромного сдвига длинноволнового пика поглощения Фц и уменьшения его оптической плотности. Другие параметры теории FRET изменяются менее значительно (1 – 2%). Таким образом, для точных расчетов расстояния между донором и акцептором энергии в ГК процедура учета спектральных характеристик Фц в связанном с КТ состоянии необходима.

Изменение оптических свойств фталоцианинов алюминия в присутствии КТ может оказывать влияние на фотодинамические свойства Фц. Известно, что при образовании ГК наблюдается увеличение квантового выхода триплетных состояний Фц [155, 160] или увеличение времени жизни триплетного состояния [160, 161]. Мы изучали характер изменения генерации синглетного кислорода фталоцианином в зависимости от концентрации и типа КТ в растворе. Для этого мы использовали ДФБФ как химическую ловушку активных форм кислорода, регистрируя скорость выцветания этого соединения на длине волны 415 нм. В узкой кварцевой кювете готовили спиртовой раствор (конечный объем 100 мкл), последовательно добавляя этанол, 2 мкл спиртового раствора ДФБФ, варьируемое количество 1.5 мкМ раствора КТ (0 в контроле Фц, 2, 5, 10 и 30 мкл) и 15 мкл 3 мкМ раствора Фц. Облучение раствора производилось красным светодиодом (спектр излучения показан на рисунке 38А). Кривую выцветания ДФБФ аппроксимировали моноэкспонентой, константы скорости процессов для растворов Фц и Фц – КТ в соотношении 1:1 указаны в таблице 7.

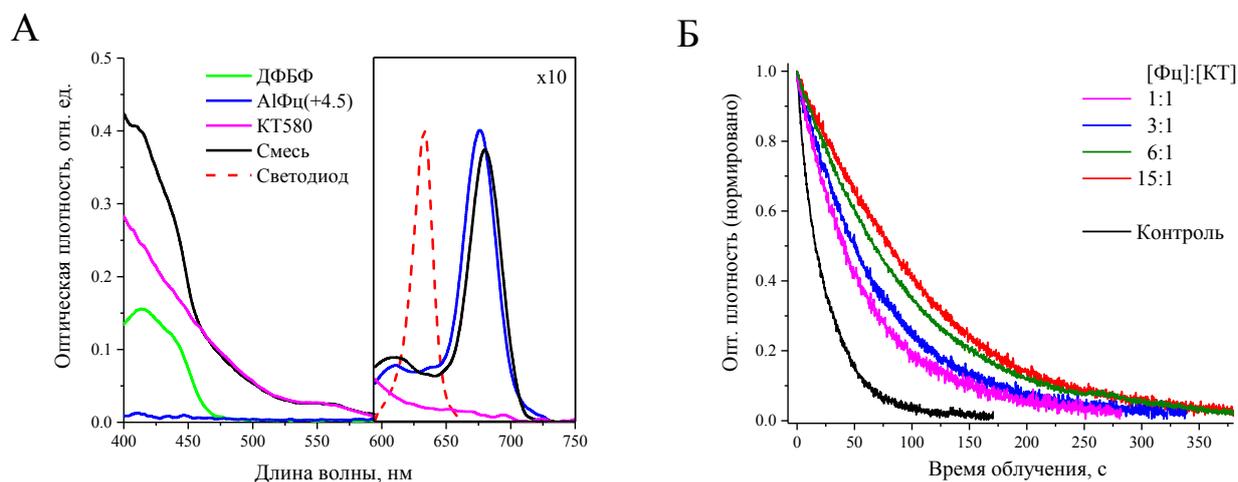


Рисунок 38. Спектр поглощения спиртовых растворов ДФБФ, АlФц(+4.5), КТ580 и их смеси ([Фц]:[КТ] = 1:1) (А). Спектр излучения светодиода показан красной пунктирной линией. Выцветание ДФБФ (на длине волны 415 нм) в зависимости от времени облучения раствора, содержащего АlФц(+4.5) без КТ и ГК этого фталоцианина с КТ580 с различным соотношением [Фц]:[КТ] (Б)

Из рисунка 38Б видно, что сам факт присутствия КТ в растворе достаточен для изменения способности молекул Фц генерировать АФК. Константа скорости фотоокисления ДФБФ в случае облучения раствора, содержащего Фц и КТ580 (или КТ600) в соотношении 1:1, оказывается меньше, чем в случае облучения однокомпонентного раствора Фц. Вероятно, уменьшение скорости генерации АФК фталоцианином в связанном с КТ состоянии может быть результатом уменьшения оптической плотности раствора Фц при добавлении КТ. Кроме того, доступность кислорода для Фц и ДФБФ вблизи или внутри органической оболочки КТ может отличаться от таковой в растворе без наночастиц. В паре Фц с КТ620 (или КТ640) мы наблюдали увеличение скорости фотоокисления ДФБФ (данные не показаны). Очевидно, данный эффект является результатом переноса энергии от КТ на Фц, поскольку данные квантовые точки поглощают свет в области длин волн более 600 нм (коротковолновая граница излучения светодиода соответствовала длине волны 600 нм).

Поскольку кинетика выцветания ДФБФ во всех случаях моноэкспоненциальна, мы можем сделать вывод об отсутствии взаимодействия между ДФБФ и ГК. В противном случае в кинетике фотоокисления ДФБФ наблюдали бы две временные компоненты: быструю, связанную с разрушением молекул ДФБФ вблизи поверхности КТ, а также более медленную, связанную либо с диффузией свободных молекул ДФБФ к поверхности КТ, либо с разрушением свободных молекул ДФБФ в растворе. Это существенно, так как магнитную мешалку в этом эксперименте не использовали.

С увеличением соотношения Фц:КТ в ГК скорость генерации синглетного кислорода фталоцианином дополнительно уменьшается (рисунок 38Б, для других КТ данные аналогичны, не показаны). Данный эффект не может быть связан с оптическими свойствами КТ, поскольку в таком случае величина изменений скорости фотоокисления ДФБФ оказалась бы пропорциональна концентрации КТ в растворе. По-видимому, основная причина явления связана с увеличением вероятности самотушения флуоресценции Фц при возрастании концентрации молекул Фц на поверхности КТ, что может приводить к уменьшению выхода триплетных возбужденных состояний Фц.

3.2.3 Исследование структурных свойств квантовых точек

Известно, что оптические свойства КТ определяются строением полупроводникового ядра [37]. Для измерения размера ядра КТ мы использовали косвенный метод, основанный на установлении эмпирических отношений между некоторыми характеристиками КТ. Так, зная длину волны максимума экситонного пика поглощения КТ, можно оценить размер CdSe ядра,

коэффициент молярной экстинкции на соответствующей длине волны и, следовательно, концентрацию КТ в растворе, что является необходимым условием для создания ГК с заданным стехиометрическим соотношением компонентов. Данная методика рассчитана на хорошо разрешенный экситонный пик поглощения КТ с выраженным максимумом. В нашем случае эти пики разрешались не для всех образцов квантовых точек (рисунок 39А).

Для определения положения экситонного пика мы проводили аппроксимацию спектра поглощения КТ суммой гауссианов в области 400 – 700 нм. В зависимости от образца КТ, для данной процедуры понадобилось 3 – 4 гауссиана (рисунок 39Б). Для дальнейших расчетов была использована длина волны гауссовой кривой, соответствующей максимуму экситонного пика поглощения КТ. Результаты расчетов представлены в таблице 8.

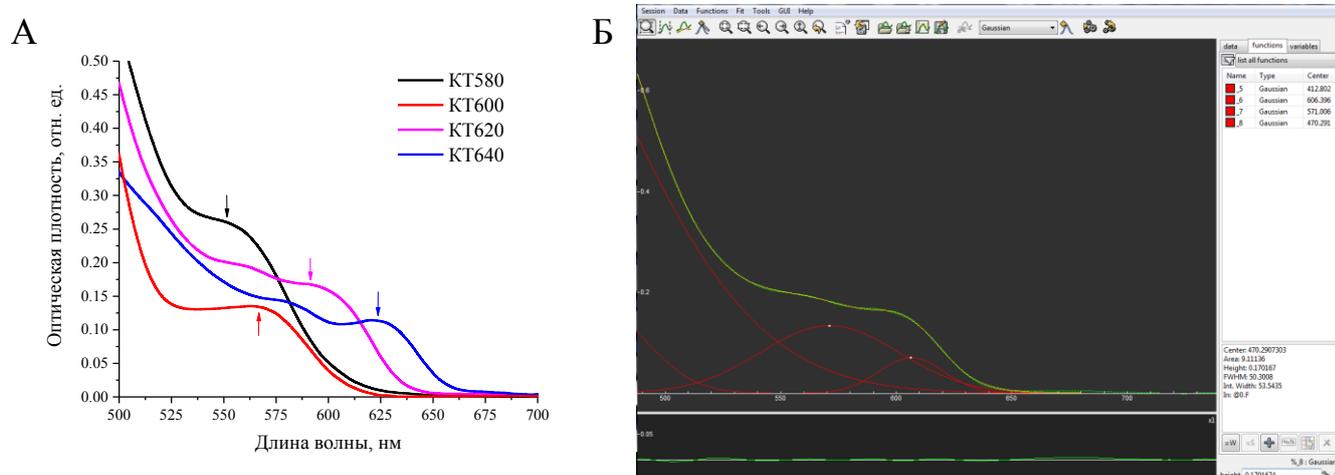


Рисунок 39. Спектры поглощения CdSe/ZnS квантовых точек в области экситонного пика (примерное положение указано стрелкой) (А). Образцы не нормированы по концентрации. Пример аппроксимации спектра поглощения КТ суммой гауссианов (Б)

Общий диаметр кристалла КТ (включающего CdSe ядро и защитную ZnS оболочку) был измерен при помощи метода ПЭМ (рисунок 40). Видно, что каждый образец КТ имеет различное распределение по размерам. Наиболее узким распределением по размерам обладают КТ580 и КТ640; интересно, что среднее значение диаметра частиц этих КТ практически совпадает. Учитывая разницу в размерах ядер КТ, мы установили, что слой ZnS оболочки КТ580 имеет толщину порядка 3.2 нм, а слой ZnS оболочки КТ640 – 2.1 нм. Этот результат согласуется с положением, что более толстая защитная оболочка способствует увеличению квантового выхода флуоресценции КТ (таблица 1).

Распределение по размерам КТ600 и КТ620 имеет более сложный характер. Так, в случае гистограммы КТ620 можно видеть два максимума, однако нельзя с полной уверенностью сказать, что причиной появления двух фракций является различие именно в толщине слоя ZnS,

а не ядра. Вероятно, оба фактора имеют место, но поскольку полуширина спектров флуоресценции всех изученных КТ практически одинакова, можно предполагать, что толщина защитной оболочки оказывает большее влияние на итоговое распределение по размерам КТ620. В образце КТ600 наблюдалось большое количество мелких частиц с максимумом в районе 7 нм, плавно переходящее в менее выраженную фракцию с максимумом в районе 13 нм. Крайне низкий квантовый выход флуоресценции КТ600 мы связываем с тонкой ZnS оболочкой большей части частиц.

Таблица 8. Структурные характеристики квантовых точек состава CdSe/ZnS. Количество монослоев ZnS в защитной оболочке оценивали, исходя из характерной толщины монослоя 0.31 нм [27]. В последнем столбце приведены данные об адсорбционной способности КТ на примере поликатионных фталоцианинов алюминия (см. рисунок 41)

	Измерение поглощения	ПЭМ		Толщина защитной оболочки, нм (в скобках – количество монослоев ZnS)	Гидродинамический диаметр наночастиц, нм	Максимальное количество адсорбированных молекул Фц
	Диаметр ядра, нм	Диаметр частицы, нм	Полидисперсность, %			
КТ580	3.4	10±0.7	13.2	3.3 (10)	43.1±2.9	70
КТ600	3.6	7.2±0.9	22.2	1.8 (6)	11.0±1.2	125
КТ620	4.9	10.5±0.8	23.5	2.8 (9)	52.6±8.1	730
КТ640	6.2	10.4±0.7	11	2.1 (7)	85.0±0.8	1600

Использованные в работе КТ покрыты полимерной оболочкой с различными функциональными группами. Адсорбционную способность КТ состава CdSe/ZnS оценивали по изменению спектральных свойств AlФц(+4.5) при разных соотношениях [Фц]:[КТ] в растворе. Из данных, приведенных в разделе 3.2.1, следует, что при взаимодействии с КТ снижается квантовый выход флуоресценции Фц, а также наблюдается батохромный сдвиг его спектра флуоресценции. Следовательно, величина смещения спектра и интенсивность флуоресценции Фц могут служить критериями связывания. Для возбуждения флуоресценции Фц использовали красный свет, чтобы минимизировать эффекты от переноса энергии в комплексе. Нужно отметить, что более удобным критерием является смещение спектра флуоресценции Фц, так как для оценки его величины можно использовать свет и при других длинах волн. Это связано с тем, что перенос энергии влияет только на интенсивность флуоресценции, но не на положение самого спектра. В эксперименте к раствору AlФц(+4.5) в концентрации 300 нМ производилось последовательное добавление возрастающих концентраций КТ, по положению спектра флуоресценции Фц строились кривые концентрационной зависимости. Данные представлены на рисунке 41.

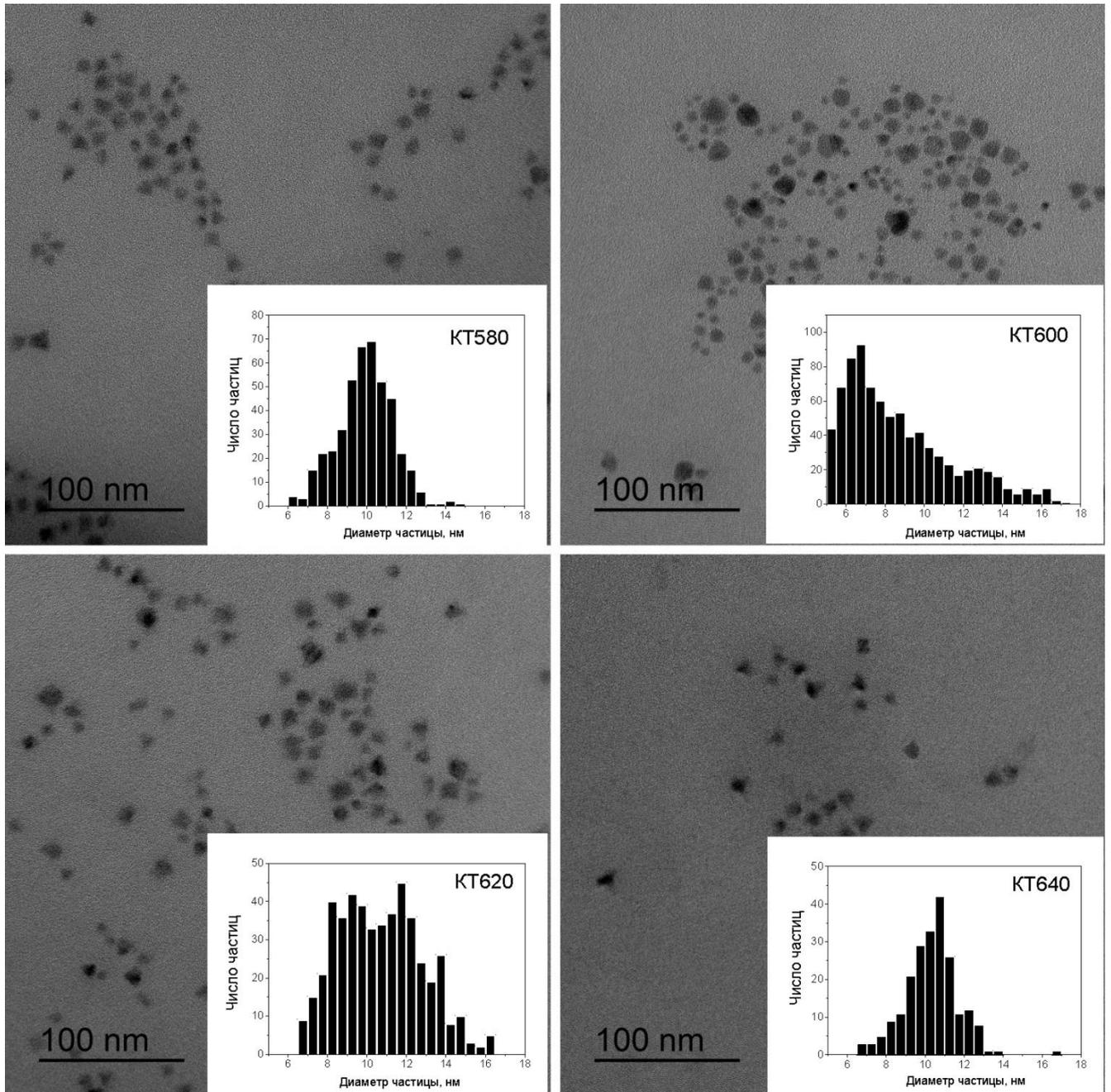


Рисунок 40. Изображения квантовых точек, полученные методом ПЭМ. Выборка для анализа распределения размеров нанокристаллов составила 433, 823, 485 и 216 частиц для КТ580, КТ600, КТ620 и КТ640, соответственно

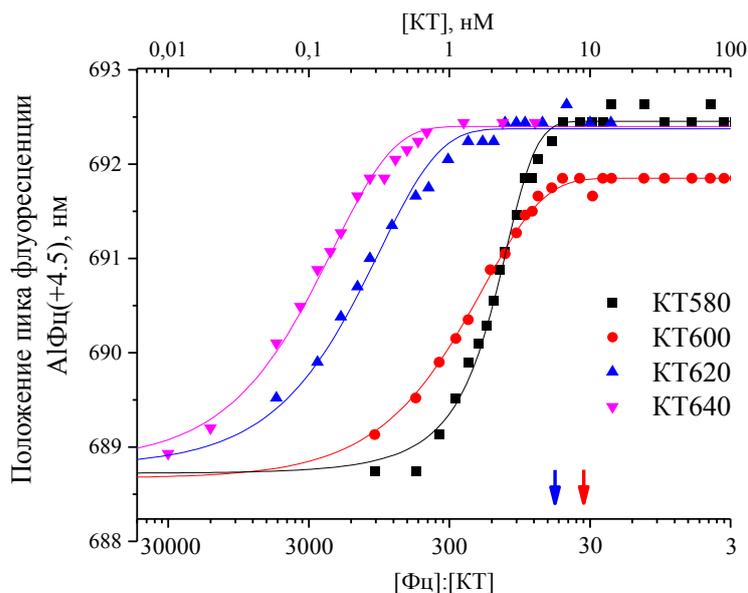


Рисунок 41. Батохромное смещение спектра флуоресценции $\Delta\lambda_{\text{Фц}(+4.5)}$ в зависимости от концентрации и типа КТ состава CdSe/ZnS. Интенсивность флуоресценции Фц нормирована на ее величину в контроле без КТ

Кривая концентрационной зависимости является типичной S-образной кривой с насыщением, которое характеризует полное связывание с КТ всех молекул Фц в растворе. Рассчитанное из кривых связывания количество сайтов связывания Фц для разных КТ указано в таблице 8. Видно, что квантовые точки отличаются по способности связывать фталоцианины алюминия. Вероятно, эти отличия вызваны разницей в размерах наночастиц. Для оценки размера КТ мы использовали метод динамического светорассеяния. Гидродинамические диаметры КТ в водном растворе приведены в таблице 8. Действительно, существует корреляция между количеством сайтов связывания Фц и размером частицы. КТ отличаются по размеру в первую очередь за счет толщины органической оболочки (разница размеров самого нанокристалла составляет ~ 1 нм). Таким образом, количество сайтов Фц связывания определяется размером органической оболочки наночастиц.

3.1.5 Общие представления об архитектуре гибридного комплекса квантовых точек и металлофталоцианинов

Чтобы установить локализацию молекул Фц в комплексе с наночастицей, покрытой полимерной оболочкой, необходимо знать три параметра данной системы:

1. Размер наночастицы (вместе с полимерной оболочкой);
2. Размер нанокристалла;
3. Расстояние между донором и акцептором энергии.

Размер кристаллического ядра наночастицы определяет минимально возможное расстояние между донором и акцептором энергии, поскольку молекула Фц не может проникнуть в кристаллическую решетку КТ. Таким образом, измерение размера кристаллического ядра КТ может быть критерием правильности расчетов по теории FRET для данной пары донор-акцептор.

Оценить размер наночастицы можно, используя метод динамического светорассеяния. Нужно, однако, отметить, что гидродинамический размер частицы включает в себя слой связанной воды, поэтому реальный размер частицы оказывается меньше гидродинамического на неопределенную величину.

Положение молекул Фц в ГК, а также динамика образования комплекса на примере ГК КТ620-А1Фц(+6.5) показаны на рисунке 42. Используя данные по расстоянию между Фц и КТ620 (таблица 9) и данные по размеру кристаллического ядра КТ (таблица 1), мы можем оценить, насколько глубоко молекулы Фц могут проникать внутрь полимерной оболочки КТ. Расстояние между центрами донора и акцептора равно 5.7 нм для комплекса Фц с КТ620 (усреднение для обоих Фц). Радиус КТ620, согласно таблице 1, составляет в среднем (учитывая полидисперсность частиц) 5.3 нм. Следовательно, расстояние от молекулы Фц внутри полимерной оболочки КТ до самого нанокристалла составляет менее 1 нм и примерно одинаково для всех КТ.

Таким образом, органическая оболочка данных квантовых точек позволяет молекулам Фц с достаточно большим зарядом проникать практически до самого кристаллического ядра. Известно, что поликатионные фталоцианины эффективно встраиваются в биологические мембраны и могут проникать сквозь них [204]. Открытым остается вопрос, возможна ли интеркаляция поликатионных Фц в монослой прекурсора (ТОФО), непосредственно

покрывающий нанокристалл. В первую очередь, это связано с малой толщиной этого монослоя (< 1 нм) относительно погрешностей измерения линейных размеров методами ПЭМ и счета фотонов (в сумме $\pm 0.8 - 1.3$ нм).

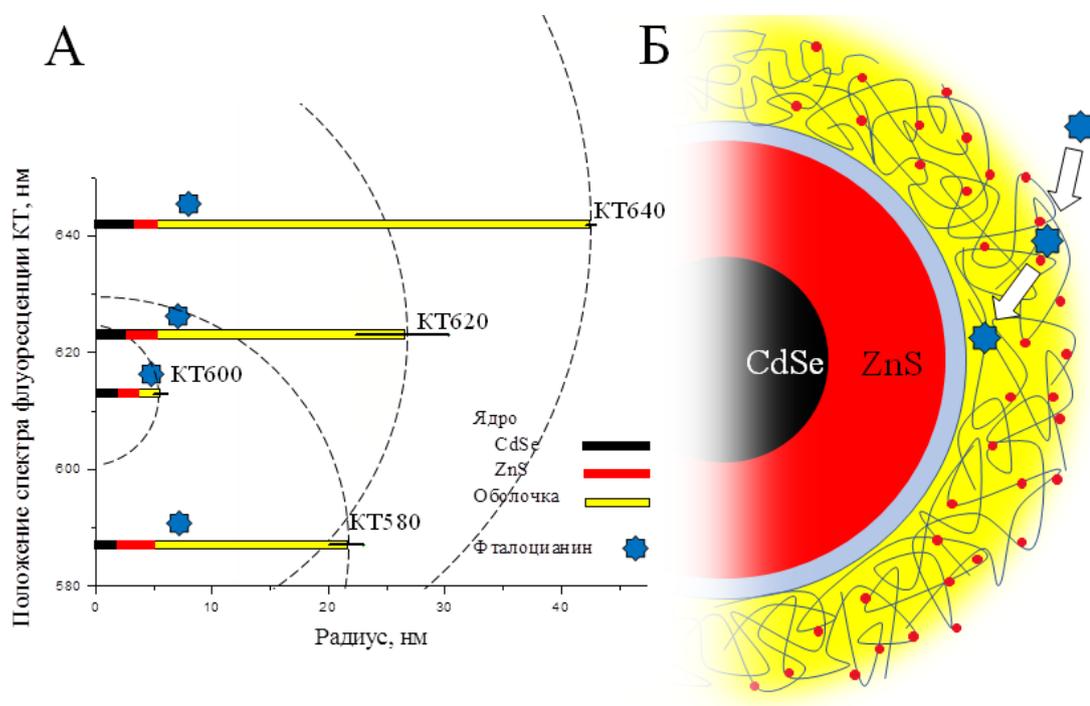


Рисунок 42. Линейные размеры квантовых точек состава CdSe/ZnS, а также положение молекул AlФц(+6.5) в гибридном комплексе, вычисленное на основе экспериментальных данных по тушению флуоресценции КТ (А). Схема взаимодействия AlФц(+6.5) с КТ620 (Б). Голубым цветом выделен слой ТОФО, выполняющего роль прекурсора в синтезе квантовых точек

Рассмотрим ГК Фц с КТ620. При данной локализации Фц на расстоянии 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 в объеме органической оболочки КТ. Оценить объем органической оболочки можно, вычитая объем кристаллического ядра из общего объема наночастицы. Учитывая количество сайтов связывания Фц на КТ620, локальную концентрацию Фц в ГК с данной КТ можно оценить в 17 мМ. Таким образом, полимерная оболочка наночастиц обладает значительными адсорбционными свойствами.

Глубина проникновения молекул Фц внутрь органической оболочки КТ определяет фотофизические свойства комплекса. Взаимодействие Фц с компонентами оболочек КТ вызывает изменение оптических свойств фталоцианинов, что приводит к замедлению скорости генерации АФК фталоцианином внутри органической оболочки КТ по сравнению с молекулами Фц в водном окружении. Перенос энергии в ГК вызывает увеличение эффективности генерации

АФК, которое не только нивелирует ослабление фотодинамических свойств Фц в результате комплексообразования, но и значительно превышает фотодинамические свойства Фц в отсутствие КТ.

При использованных в работе значениях соотношения [Фц]:[КТ] (до 100:1) все молекулы Фц находятся в связанном с КТ состоянии (для разноименно заряженных ГК). Факт отсутствия в растворе Фц и КТ фракции свободных молекул фталоцианинов подтверждается спектральными характеристиками Фц. Так, наличие в растворе фракций свободных и связанных с КТ молекул Фц, обладающих разными спектрами поглощения, привело бы к уширению длинноволнового пика поглощения Фц в растворе с КТ. Тем не менее, полуширина полосы QI поглощения Фц при добавлении КТ не меняется (рисунок 35). Кинетики затухания анизотропии флуоресценции Фц, инкубированных с КТ в течение получаса, содержат только одну компоненту, соответствующую вращению Фц в составе ГК. Быстрая компонента, характерная для свободного Фц, наблюдается в растворе Фц – КТ только в первые минуты после приготовления раствора. Моноэкспоненциальный характер кинетики затухания анизотропии флуоресценции свидетельствует, что молекулы Фц испытывают только один тип вращательных движений в органической оболочке КТ.

3.1.5 Влияние ионной силы раствора на перенос энергии в гибридных комплексах

К настоящему моменту большинство исследованных гибридных комплексов было получено путем самосборки и стабилизации за счет нековалентных взаимодействий. Ионная сила среды является важным параметром, определяющим электростатическое взаимодействие Фц и КТ и, следовательно, способным оказать значительное влияние на фотодинамические свойства и устойчивость ГК *in vitro* и *in vivo*. Таким образом, исключительную важность имеет вопрос о сохранении фотодинамических свойств таких комплексов при значениях ионной силы окружающей среды, соответствующим таковым *in vivo*.

Для оценки влияния ионной силы на электростатическое взаимодействие отрицательно заряженных CdSe/ZnS КТ и поликатионных фталоцианинов алюминия были приготовлены пять растворов NaCl со значением ионной силы 0, 0.05, 0.1, 0.15 и 0.2 М, соответственно (ионная сила плазмы крови человека и большинства других биологических жидкостей близка к 0.15). Исследование анизотропии флуоресценции Фц в растворах с различной ионной силой показало, что уже при значении ионной силы раствора 0.05 М кинетика затухания анизотропии становится однокомпонентной с характерным временем вращения 0.4 нс (в водном растворе наблюдались две компоненты, 0.1 и 0.5 нс). Возможно, облако противоионов вокруг молекулы

Фц способствует изменению формы молекулы, вращающейся вместе со своей гидратной оболочкой, с дискообразной на более близкую к сферической, и это вызывает вырождение корреляционных времен разных осей вращения в одно.

В растворах ГК с различной ионной силой мы также наблюдали вращение молекул красителя с характерными временами порядка 2 нс, причем отсутствовала компонента, характеризующая вращение молекул Фц, не связанных с КТ. В водном растворе без соли характерное время затухания анизотропии флуоресценции Фц в составе ГК было оценено в 2.8 – 3 нс. Таким образом, при увеличении ионной силы раствора молекулы Фц не покидают ГК, однако подвижность молекул возрастает.

Увеличение степени свободы молекул акцептора может оказать влияние на эффективность переноса энергии [205]. К растворам с различной ионной силой, содержащим КТ в концентрации 0.2 мкМ, производилось последовательное добавление Фц; каждая новая порция Фц приводила к возрастанию его концентрации в конечном растворе на 0.2 мкМ. Таким образом, соотношение [Фц]:[КТ] в растворе увеличивалось от 1:1 до 10:1. Через три минуты после добавления каждой очередной порции Фц и установления равновесия регистрировали интенсивность и длительность флуоресценции КТ и Фц методом счета фотонов. Одновременно производилась регистрация стационарных спектров флуоресценции донора и акцептора энергии, что позволяло контролировать возможное изменение формы спектров. На основании полученных данных строили зависимости $I_{DA}/\eta I_D$ и τ_{DA}/τ_D от концентрации Фц, где I_{DA} и τ_{DA} – интенсивность и длительность флуоресценции донора энергии (КТ) в присутствии акцептора (Фц), I_D и τ_D – интенсивность и длительность флуоресценции КТ в контроле в отсутствие тушителя, η – коэффициент коррекции. Данные по тушению флуоресценции КТ фталоцианинами алюминия показаны на рисунке 43 на примере КТ600. Нужно отметить, что зависимости I_{DA}/I_D и τ_{DA}/τ_D для каждой пары КТ – Фц и при каждом значении ионной силы практически идентичны, что говорит об отсутствии механизмов тушения, отличных от FRET. Параметры теории FRET, рассчитанные на основе данных тушения флуоресценции КТ фталоцианинами с соотношением концентраций [Фц]:[КТ] = 1:1 приведены в таблице 9.

Из таблицы 9 следует, что расстояние R между донором и акцептором для каждой КТ практически не зависит от типа Фц. Это говорит о том, что молекулы Фц в водных растворах формируют с квантовыми точками устойчивые комплексы, причем расстояние R в значительной степени определяется радиусом КТ. Таким образом, исходя из данных таблицы 9, разность R для КТ600 и КТ620 с учетом погрешности можно оценить в 1.6 нм, что в четыре раза больше, чем разница в радиусах их ядер (таблица 1). Поскольку состав и толщина

органической оболочки, обеспечивающей КТ водорастворимость и заряд, для КТ600 и КТ620 одинаковы, то дополнительная разница радиусов КТ в 1.2 нм должна быть связана с неодинаковостью толщины защитной оболочки ZnS ядер КТ600 и КТ620. Действительно, разница толщины защитной оболочки КТ600 и КТ620, согласно таблице 4, составляет ~ 1 нм, что хорошо согласуется с результатами эксперимента.

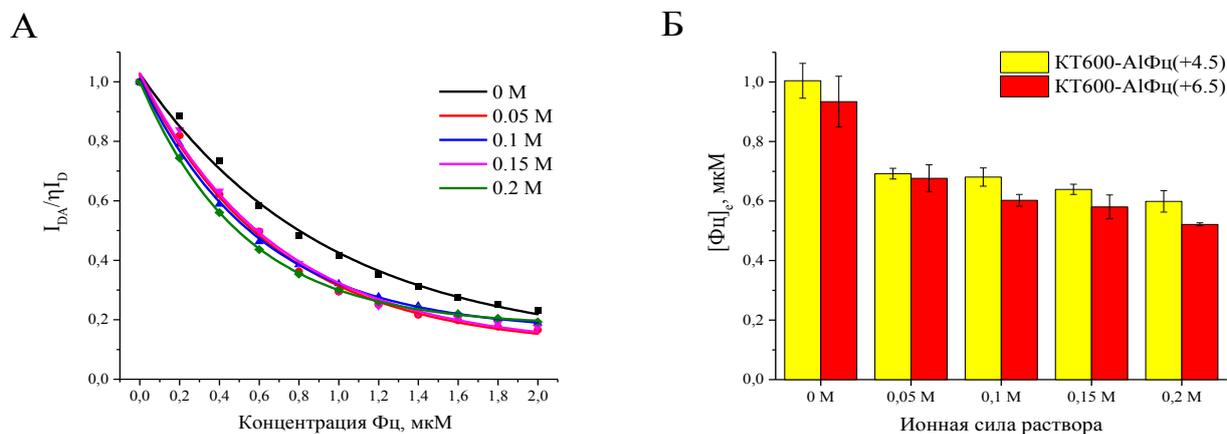


Рисунок 43. Изменения относительного квантового выхода флуоресценции КТ600 в паре с AlPc(+6.5) в зависимости от концентрации фталоцианина при различной ионной силе раствора (А). Концентрация Фц, вызывающая тушение флуоресценции КТ в e раз (получена путем аппроксимации кривых тушения флуоресценции КТ на рисунке 43А моноэкспонентой) в зависимости от ионной силы для различных ГК (Б)

Таблица 9. Параметры теории FRET в различных ГК поликатионных фталоцианинов алюминия и отрицательно заряженных КТ состава CdSe/ZnS. R_0 – ферстеровский радиус, R – расстояние между донором и акцептором энергии, k – константа скорости переноса энергии, J – интеграл перекрытия спектров флуоресценции донора энергии (КТ) и поглощения акцептора энергии (Фц), W – эффективность переноса энергии. Водный раствор, $[\text{Фц}]:[\text{КТ}] = 1:1$. Значения в скобках указаны с учетом изменений спектра поглощения Фц при образовании комплекса с КТ

ГК	W	$R_0, \text{\AA}$	$R, \text{\AA}$	$J, *10^{-13} \text{ см}^{-6}$	$k, *10^7 \text{ с}^{-1}$
КТ600-AlPc(+4.5)	0.111	29.8 (29.4)	42.1 (41.4)	3.33 (3.06)	1.46 (1.47)
КТ620-AlPc(+4.5)	0.436	43.6 (42.8)	56.6 (55.6)	3.52 (3.16)	1.19 (1.19)
КТ600-AlPc(+6.5)	0.219	33.0 (32.7)	40.8 (40.4)	6.15 (5.86)	3.27 (3.27)
КТ620-AlPc(+6.5)	0.485	48.5 (48.0)	58.0 (57.4)	6.67 (6.26)	1.95 (1.94)

Из рисунка 43 видно, что при переходе из водного раствора в раствор с ненулевой ионной силой эффективность переноса энергии от КТ к Фц увеличивается, а при дальнейшем увеличении значений ионной силы раствора эффект уже мало зависит от ее величины. Мы полагаем, что наблюдаемая картина является следствием совокупного действия нескольких факторов, описанных ниже.

Во-первых, при увеличении значения ионной силы в растворе мы наблюдали увеличение коэффициента молярной экстинкции Фц, а также сдвиг спектров поглощения и флуоресценции Фц в длинноволновую область, сопровождающийся уменьшением величины Стоксова сдвига (таблица 10). Возможно, это является следствием изменения сольватного состояния молекулы Фц и экранировки боковых заряженных групп Фц противоионами, т. к. изменение состояния и положения периферических заместителей при изменении величины ионной силы оказывает влияние на оптические свойства фталоцианинов [110]. Увеличивая значение ионной силы раствора до 0.05 М, мы также наблюдали увеличение интенсивности флуоресценции Фц. Однако дальнейшее увеличение величины ионной силы до 0.2 М не оказывало значительного эффекта. Вероятно, образование облака противоионов вокруг молекул Фц при первоначальном увеличении ионной силы раствора до 0.05 М имеет большое значение в наблюдаемом эффекте. Хотя с ростом величины ионной силы также увеличивается оптическая плотность раствора Фц (таблица 10), не выполняется соотношение $I/I_0 = D/D_0$, где I и D – интенсивность флуоресценции Фц и оптическая плотность его раствора с ненулевой ионной силой, I_0 и D_0 – при нулевой ионной силе, соответственно. Можно сделать вывод, что в присутствии соли увеличивается квантовый выход флуоресценции Фц. В то же время мы не увидели достоверных изменений длительности флуоресценции Фц в зависимости от ионной силы, то есть сумма констант дезактивации возбужденного состояния Фц остается постоянной. Это может говорить о том, что увеличение ионной силы раствора вызывает изменение зарядового состояния молекулы Фц и тем самым способствует увеличению константы скорости флуоресценции, одновременно вызывая снижение вероятности дезактивации возбужденного состояния по другим каналам – внутренней конверсии или синглет-триплетному переходу.

Увеличение молярного коэффициента поглощения Фц приводит к росту величины интеграла перекрывания спектров J и потому может быть в значительной степени ответственно за увеличение эффективности переноса энергии при переходе из водного раствора в раствор с ненулевой ионной силой.

Известно, что ионная сила раствора, как и качественный состав ионов, оказывает значительное влияние на спектральные и фотодинамические характеристики порфиринов и

фталоцианинов, в ряде случаев приводя к образованию димеров и агрегатов [206]. В выбранном интервале значений ионной силы растворов использованных нами фталоцианинов мы не обнаружили агрегации молекул Фц.

Таблица 10. Спектральные свойства поликатионных фталоцианинов алюминия в водных растворах с разной ионной силой. Длина волны возбуждения флуоресценции 655 нм

	Ионная сила раствора, М	Положение полосы QI поглощения, нм	Положение спектра флуоресценции, нм	Коэффициент экстинкции, л · моль ⁻¹ · см ⁻¹	Интенсивность флуоресценции, отн. ед.	Длительность флуоресценции, нс
AlФц(+4.5)	0	681.8	697.1	150000*	181.3	5.35
	0.05	683.0	698.5	164200	243.9	5.37
	0.1	683.4	698.7	171000	251.5	5.36
	0.15	683.7	698.7	175900	251.9	5.34
	0.2	683.7	698.7	178200	242.6	5.32
AlФц(+6.5)	0	679.8	693.6	185000*	217.5	5.04
	0.05	681.4	694.8	190800	301.9	5.05
	0.1	682.4	694.8	195800	303.9	5.06
	0.15	682.7	694.8	200000	301.2	5.05
	0.2	683.0	694.8	206000	307.9	5.05

*коэффициенты молярной экстинкции в водном растворе (без добавления соли) приведены в соответствии с данными Макарова с соавторами [188].

Во-вторых, в растворе квантовых точек без Фц с увеличением ионной силы происходит заметное уменьшение квантового выхода флуоресценции КТ. Известно, что после поглощения кванта света в КТ и образования экситона один из носителей заряда (электрон или «дырка») может локализоваться на дефектах кристаллической структуры ядра КТ. Таким образом, квантовая точка оказывается в «выключенном» состоянии, когда рекомбинация пары электрон-«дырка» и, следовательно, флуоресценция невозможна. Предполагается, что конформационное состояние лигандов во внешней органической оболочке КТ может оказывать влияние на вероятность перехода квантовой точки в «выключенное» состояние [24]. С увеличением ионной силы раствора КТ с ядром CdSe/ZnS проявляли заметное уменьшение интенсивности (рисунок 44) и длительности флуоресценции (КТ600 с 11.7 нс в водном растворе до 9.8 нс в растворе с ионной силой 0.2 М; КТ620 – с 19.4 до 16.7 нс), т. е. квантового выхода флуоресценции. Возможно, катионы натрия, образующие облако противоионов у отрицательно заряженной поверхности КТ, изменяют локальное электрическое поле и зарядовое состояние органической оболочки КТ, что увеличивает вероятность локализации носителя заряда на дефектах кристалла и тем самым способствует снижению квантового выхода флуоресценции. Вероятность перехода КТ в «выключенное» состояние в значительной степени зависит от толщины защитной оболочки и количества дефектов на кристаллической решетке КТ и определяет величину квантового выхода флуоресценции КТ. Как видно из рисунка 44, в данном

диапазоне значений ионной силы флуоресценция КТ600 тушится сильнее, чем КТ620, по-видимому, из-за тонкой защитной оболочки ZnS этой квантовой точки. Уменьшение квантового выхода флуоресценции КТ в присутствии ионов натрия и хлора должно способствовать уменьшению эффективности переноса энергии на акцептор; однако нужно отметить, что в присутствии молекул красителя влияние ионов соли на конформационное состояние органической оболочки КТ может отличаться.

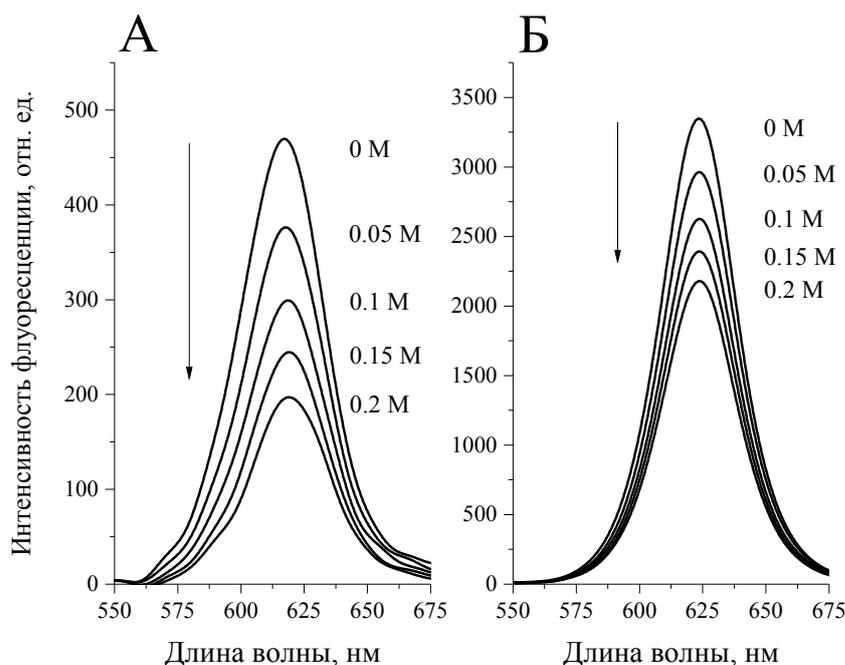


Рисунок 44. Изменения спектра флуоресценции 0.1 мкМ водного раствора КТ600 (А) и КТ620 (Б) в зависимости от ионной силы раствора

Факт влияния ионной силы раствора на спектральные свойства КТ свидетельствует о том, что слой полимера, входящий в состав органической оболочки КТ, является достаточно рыхлым. Вероятно, слой ТОФО также может покрывать нанокристалл не по всей площади его поверхности. Рыхлостью полимерного слоя можно объяснить и относительно быстрое проникновение молекул Фц вглубь полимера, проявляющееся в увеличении эффективности переноса энергии в ГК в течение нескольких минут инкубации КТ и Фц.

В-третьих, с увеличением ионной силы раствора мы наблюдали уменьшение гидродинамического диаметра КТ. Так, гидродинамический диаметр КТ620 уменьшался более чем в 2 раза при добавлении к водному раствору КТ 2 М раствора NaCl до значения ионной силы 0.05 М. При дальнейшем увеличении ионной силы раствора гидродинамический диаметр КТ продолжал уменьшаться, но незначительно (на величину $\sim 5\%$ от значения в растворе с 0.05 М соли). Таким образом, при увеличении ионной силы раствора происходит сжатие и

уплотнение органической оболочки КТ, что может уменьшить значение расстояния донор-акцептор (в среднем по ансамблю Фц) и способствовать увеличению эффективности переноса энергии электронного возбуждения.

Четвертым фактором можно считать ослабление электростатического взаимодействия между КТ и Фц в комплексе с увеличением ионной силы раствора. Действительно, как мы установили, подвижность молекул Фц в органической оболочке КТ возрастала с увеличением ионной силы. Увеличение подвижности молекул Фц в составе ГК может привести к увеличению значения ориентационного фактора χ^2 и тем самым способствовать увеличению эффективности переноса энергии [205].

Поскольку эффективность переноса энергии возбуждения в ГК возрастала с увеличением ионной силы раствора, сенсibilизированная флуоресценция Фц в ГК также должна была усилиться. Значения коэффициента усиления A флуоресценции Фц в парах с различными квантовыми точками ([Фц]:[КТ] = 1:1 для соответствия таблице 9) в зависимости от ионной силы раствора приведены в таблице 11.

Таблица 11. Коэффициент усиления флуоресценции поликатионных фталоцианинов алюминия в парах с КТ600 и КТ620 в зависимости от ионной силы раствора

Ионная сила, М	КТ600-АлФц(+4.5)	КТ620-АлФц(+4.5)	КТ600-АлФц(+6.5)	КТ620-АлФц(+6.5)
0	1.32	4.36	0.81	2.26
0.05	0.63	3.44	-0.04	0.85
0.10	0.24	2.67	-0.19	0.69
0.15	0.01	2.02	-0.26	0.45
0.20	-0.04	1.81	-0.28	0.44

Из таблицы 11 видно, что наблюдается обратная корреляция между величиной коэффициента усиления флуоресценции Фц и эффективностью переноса энергии в ГК. Важно отметить, что коэффициент усиления флуоресценции не отражает эффективность самого безызлучательного переноса энергии от КТ на Фц. Чтобы оценить увеличение интенсивности флуоресценции Фц непосредственно вследствие переноса энергии от КТ, необходимо в качестве I_A (в формуле (32)) использовать интенсивность I'_A флуоресценции Фц на поверхности КТ в отсутствие переноса энергии, поскольку в результате адсорбции молекул Фц на поверхность внешней органической оболочки КТ спектральные свойства Фц изменяются. Методом счета фотонов при возбуждении светом с $\lambda = 655$ нм регистрировали интенсивность флуоресценции раствора Фц до и после добавления КТ ([Фц]:[КТ] = 1:1). Поскольку коэффициент экстинкции КТ на используемой длине волны излучения лазера крайне мал, то все

наблюдаемые изменения флуоресценции Фц не являлись следствием переноса энергии. Результаты показаны на рисунке 45А.

Из рисунка 45А (синие столбцы) следует, что интенсивность флуоресценции Фц при взаимодействии с КТ снижается ($I'_A/I_A < 1$). В случае AlФц(+6.5) это снижение составило 30% в комплексе с КТ600 и 45% в комплексе с КТ620. Таким образом, в формуле для коэффициента усиления флуоресценции в качестве контроля следует брать интенсивность флуоресценции Фц на поверхности КТ, а не в растворе в отсутствие КТ. В таком случае коэффициент усиления флуоресценции вследствие переноса энергии (равный цифре со стрелкой на рисунке 45Б за вычетом единицы) для AlФц(+6.5) окажется выше, чем для AlФц(+4.5).

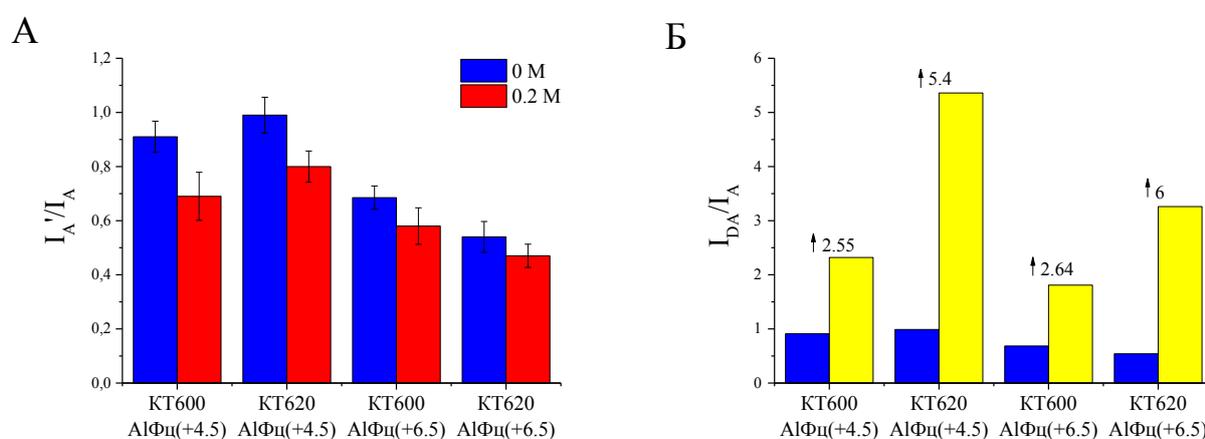


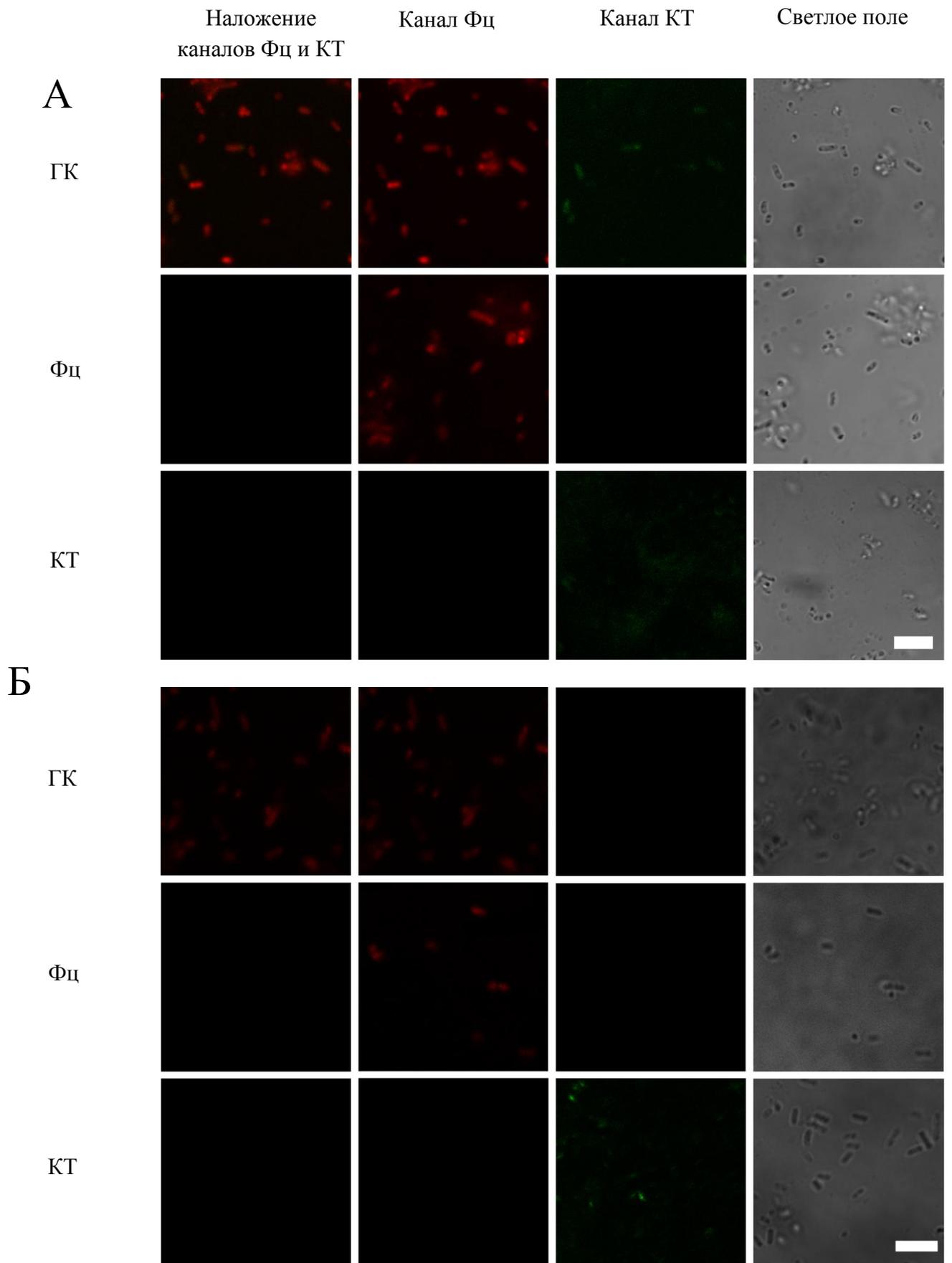
Рисунок 45. Интенсивность I'_A флуоресценции алюминиевых фталоцианинов, отнесенная к ее значению I_A в растворе Фц без КТ, в парах с различными КТ при значении ионной силы раствора 0 М (синие столбцы) и 0.2 М (красные столбцы) (А). Сравнительные изменения интенсивности флуоресценции Фц в результате образования гибридного комплекса (синие столбцы, из рисунка 38А) и в результате переноса энергии (желтые столбцы; данные взяты из таблицы 10 для водного раствора, $I_{DA}/I'_A = A + 1$) (Б). Цифры со стрелками показывают, во сколько раз возросла интенсивность флуоресценции Фц, находящегося в комплексе с КТ, в результате переноса энергии (т. е. собственно коэффициент усиления флуоресценции Фц $I_{DA}/I'_A = A + 1$). [Фц]:[КТ] = 1:1. Длина волны возбуждения флуоресценции 655 нм

3.1.6 Взаимодействие электростатически стабилизированных гибридных комплексов с бактериальными клетками

Для эффективного фотодинамического действия требуется непосредственный контакт ФС с биологическим объектом. Для изучения взаимодействия ГК с биологическими объектами на примере бактерий нами были выбраны ГК, образованные отрицательно заряженными КТ и А1Фц(+4.5) или А1Фц(+6.5) как наиболее изученные. Известно, что, несмотря на отрицательный заряд поверхности, КТ могут адсорбироваться на клетки за счет других типов взаимодействий [51, 64, 65]. Локализация молекул Фц глубоко внутри полимерного слоя, покрывающего кристаллическое ядро КТ, может препятствовать деструкции ГК в присутствии биомолекул и поддерживать высокую эффективность переноса энергии от КТ к Фц. В таком случае, мы ожидали увидеть флуоресценцию обоих компонентов ГК с помощью КЛСМ при облучении лазером в области, где Фц обладает минимальным сечением поглощения. В качестве донора энергии использовали КТ580, так как спектр флуоресценции КТ600, КТ620 и КТ640 сильно перекрывается со спектром флуоресценции выбранных Фц, что не позволяет полностью разделить сигналы КТ и Фц в каналах регистрации (550 – 650 и 650 – 750 нм) флуоресценции микроскопа.

В экспериментах были использованы грамположительные и грамотрицательные бактерии, поскольку неспецифическая адсорбция ГК в общем случае зависит от состава и типа клеточной стенки. Бактерии инкубировали с ГК из расчета 3 млн ГК на одну клетку (оптимальное число молекул поликатионных Фц на одну бактериальную клетку было определено в 10 млн, [Фц]:[КТ] = 3:1). При выборе соотношения Фц:КТ в ГК исходили из удобства регистрации флуоресценции компонентов ГК. При низких соотношениях [Фц]:[КТ] интенсивность флуоресценции Фц мала из-за низкой концентрации, а при высоких – из-за эффектов самотушения. При [Фц]:[КТ] = 3:1 флуоресценция КТ потушена не слишком сильно, а сенсibilизированная флуоресценция Фц сопоставима с интенсивностью флуоресценции КТ. Изображения, полученные после получаса инкубации, показаны на рисунке 46.

После получасовой инкубации бактерии осаждали путем центрифугирования, долю связавшихся с клетками молекул Фц, КТ или ГК вычисляли по спектрам поглощения этих компонентов в супернатанте. Флуоресценцию не использовали для количественных оценок, поскольку известно, что флуоресценция как КТ, так и Фц при связывании с бактериями может тушиться [65, 140]. Осадок, содержащий бактерии, ресуспендировали и исследовали изменения ξ -потенциала бактериальных клеток после инкубации. Поскольку для ГК, содержащих



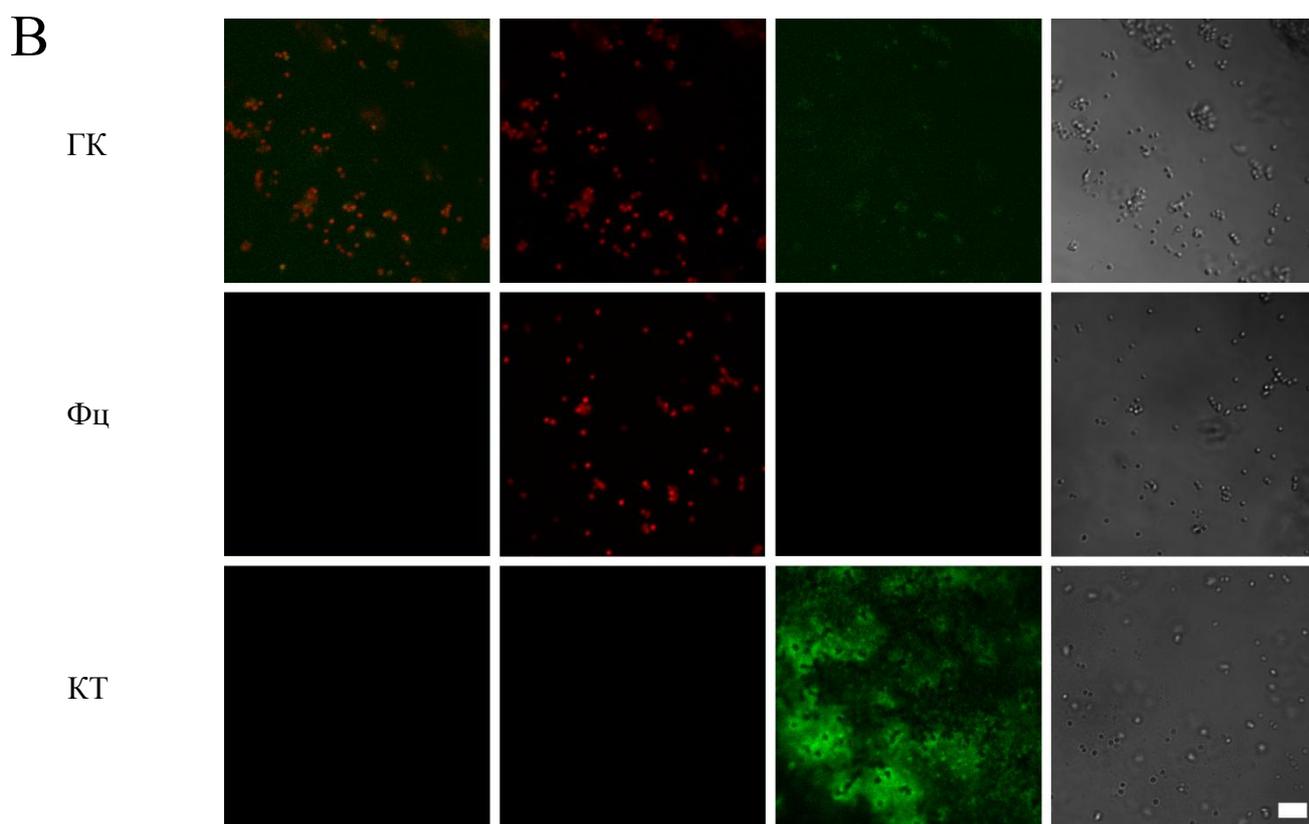


Рисунок 46. Изображения грамотрицательных (*Escherichia coli* А, *Pseudomonas aeruginosa* Б) и грамположительных (*Staphylococcus aureus* В) бактерий, полученные методом КЛСМ. Инкубацию бактерий проводили с А1Фц(+6.5), КТ580 и их ГК. Флуоресценция КТ и Фц показана зеленым и красным цветом соответственно. Возбуждение флуоресценции КТ и Фц производили лазерным излучением с длиной волны 488 и 643 нм, соответственно. Масштаб 2 мкм

А1Фц(+4.5) и А1Фц(+6.5), были получены достоверно не отличающиеся результаты, далее будут приведены данные только для ГК на основе А1Фц(+6.5). Результаты представлены в таблице 12.

В контроле без КТ молекулы поликатионных фталоцианинов хорошо связываются с бактериальными клетками. Раствор бактерий, имеющий оптическую плотность порядка единицы, содержит $\sim 10^8$ клеток в миллилитре объема. Мы оценили количество связавшихся молекул А1Фц(+6.5) на одну клетку для всех использовавшихся в работе бактерий. Оно составило 2.13, 6.28 и 3.08 млн молекул Фц для *S. aureus*, *P. aeruginosa* и *E. coli*, соответственно. Спектры поглощения и флуоресценции Фц, адсорбированных на клеточную стенку, имеют батохромный сдвиг по сравнению с контролем в отсутствие бактерий. Величина батохромного сдвига зависит от штамма бактерии, что, по-видимому, означает наличие разных сайтов связывания у каждого типа бактерии. Известно, что батохромный сдвиг спектров молекул тетрапиррольного ряда наблюдается при их взаимодействии с липидами мембран

[207]. Бактериальные клетки, инкубированные с Фц, интенсивно флуоресцируют в области 650 – 750 нм при облучении красным светом (643 нм); методом КЛСМ мы выявили поверхностную локализацию молекул Фц, связавшегося с бактериями.

Таблица 12. Параметры, характеризующие взаимодействие AlФц(+6.5), КТ580 и их ГК с различными бактериями. Контроль – однокомпонентный раствор бактерии

Штамм бактерии	Доля связавшихся молекул, %		[Фц]:[КТ] в супернатанте (3:1 в контроле)	ξ-потенциал, мВ			
	Фц	КТ		Контроль	Фц	ГК	КТ
<i>S. aureus</i>	21.3	11.4	2.43:1	-29	-29	-28.6	-29.5
<i>P. aeruginosa</i>	62.8	7.8	2.36:1	-14.7 (54.9%)	-22	-23	-25 (99%)
				-30.7 (45.1%)			-51.8 (1%)
<i>E. coli</i>	30.8	5.7	2.32:1	-38.9 (82.5%)	-27.1	-39.5 (86%)	-37.8
				-22.1 (17.5%)			-24.6 (14%)

В супернатантах, полученных после инкубации бактерий с Фц, спектры поглощения и флуоресценции Фц также сдвинуты в красную область спектра (данные не показаны). Следовательно, молекулы Фц в супернатантах оказываются связанными с неустановленными бактериальными метаболитами. Величина сдвига зависит от типа бактерий и не совпадает с величиной сдвига спектров Фц, связанного с бактериальными клетками.

У исследованных в данной работе грамотрицательных бактерий имеются две субпопуляции организмов, обладающие разным ξ-потенциалом. При инкубации с Фц ξ-потенциал грамотрицательных бактерий изменяется: субпопуляции исчезают, ξ-потенциал принимает промежуточное значение. Интересно, что ξ-потенциал грамположительной бактерии *S. aureus* при инкубации с Фц не изменяется. По-видимому, сайты связывания Фц в данном случае не вносят вклада в поверхностный потенциал оболочки бактерии.

КТ также взаимодействуют с бактериями, однако, с меньшей эффективностью, чем фталоцианины (таблица 12). Это указывает на важность электростатических сил в процессе связывания. Наиболее выраженной адсорбционной способностью обладает *S. aureus*; КТ в присутствии грамотрицательных бактерий осаждаются хуже. Инкубация КТ этого типа с водным раствором липополисахаридов (ЛПС) *E. coli*, меченых флуоресцеином, не привела к изменению спектральных характеристик флуорофоров (данные не показаны), что означает отсутствие взаимодействия КТ и ЛПС в растворе. Следовательно, ЛПС не являются сайтами связывания КТ на клеточной стенке грамотрицательных бактерий. Нужно отметить, что КТ при используемых параметрах центрифугирования в отсутствие бактерий не осаждаются.

Связывание является непрочным; методом КЛСМ было установлено, что КТ действительно связаны с клетками грамотрицательных бактерий, но также наблюдался сигнал свободных КТ в окружающем растворе. В случае *S. aureus* наблюдали достаточно интенсивную флуоресценцию КТ, которая, однако, исходила от свободных КТ в окружающем клетки растворе. Несмотря на достаточно высокую степень связывания (порядка 10%), интенсивность флуоресценции КТ, инкубированных с бактериальными клетками, была крайне низкой, что может говорить о тушении флуоресценции КТ на поверхности клеток. В результате инкубации с КТ ξ -потенциал *S. aureus* и *E. coli* остался неизменным; ξ -потенциал *P. aeruginosa*, инкубированных с КТ, имеет промежуточное значение между значениями ξ -потенциала субпопуляций данной бактерии. Вторая минорная компонента (вклад $\sim 1\%$), очевидно, соответствует ξ -потенциалу свободных КТ в растворе. Интересно, что КТ в одном и том же образце раствора бактерий связываются с отдельными особями с разной эффективностью (рисунок 46А).

Гибридные комплексы, образованные КТ580 и поликатионными фталоцианинами алюминия осаждаются в присутствии бактерий с эффективностью, сопоставимой с квантовыми точками. Вероятно, Фц мало изменяет поверхностные свойства ГК, играющие ключевую роль во взаимодействии с бактериями, поскольку Фц локализован глубоко внутри органической оболочки КТ. При облучении бактерий, инкубированных с ГК, светом с длиной волны 488 нм мы не зарегистрировали сенсibilизированной флуоресценции Фц, по-видимому, вследствие низкой концентрации связавшихся ГК. Исследование поглощения ГК в супернатантах, содержащих не связавшиеся с бактериями комплексы, показало, что соотношение Фц:КТ в ГК уменьшилось в среднем на 20% (величина сопоставима для всех типов бактерий). Это означает, что Фц способен выходить из состава ГК и взаимодействовать с бактериями отдельно от КТ. Это подтверждается тем, что методом КЛСМ мы регистрируем интенсивный сигнал в канале Фц в образце бактерий, инкубированных с ГК. Также очевидно, что изменение ξ -потенциала *P. aeruginosa* в результате инкубации с ГК связано с Фц, адсорбированным на клеточную стенку, поскольку оно соответствует изменению ξ -потенциала в случае инкубации данной бактерии с раствором Фц.

Оценка изменения эффективности переноса энергии в ГК при инкубации с бактериями представляет определенную сложность вследствие следующих эффектов:

1. Флуоресценция КТ разгорается при облучении супернатанта лазером на длине волны 465 нм (в 2 раза за время ~ 10 с). Интересно, что интенсивность сенсibilизированной флуоресценции Фц при этом не меняется (рисунок 47А).

2. В спектрах флуоресценции ГК появляется пик флуоресценции метаболитов бактерий в области 450 – 550 нм (рисунок 47А). Флуоресцирующие метаболиты могут влиять на перенос энергии в ГК. Спектр флуоресценции метаболитов появляется в случае инкубации любой из исследованных бактерий с Фц, КТ или ГК только при облучении лазером в синей области спектра.

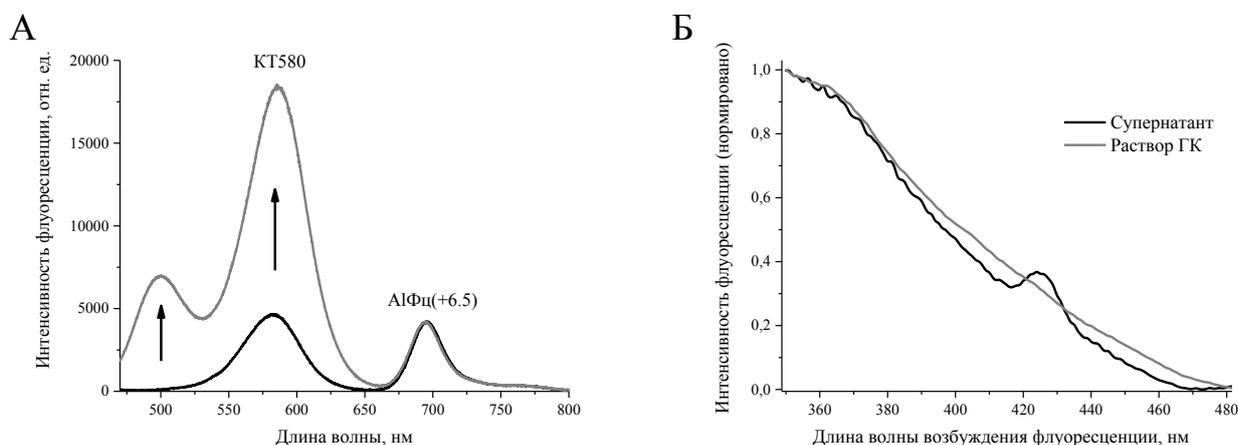


Рисунок 47. Спектр флуоресценции супернатанта, полученного после центрифугирования раствора бактерий *S. aureus* с гибридными комплексами КТ580-AlФц(+6.5) через 5 (черная кривая) и 60 (красная кривая) секунд после начала освещения образца лазерным излучением на длине волны 465 нм (А). Спектр возбуждения флуоресценции в том же образце (супернатант) и в контрольном растворе ГК (без инкубации с бактериями) на длине волны 500 нм (Б)

Для оценки фотодинамического действия электростатически стабилизированных ГК на бактерии мы инкубировали пары КТ600(+)-ZnФц(-8) и КТ600(-)-ZnФц(+8) с биолюминесцентным штаммом *E. coli* рХеп7. Соотношение [КТ]:[Фц] составило 1:2 и 2:3 в первом и во втором случае, соответственно. Соблюдая постоянство конечной концентрации действующих веществ в растворе, мы провели четыре контрольных эксперимента для оценки влияния на бактерии разных типов КТ и Фц по отдельности. Бактериальный раствор облучали синим светодиодом (430 – 470 нм) 1, 2, 3, 4 и 5 минут, после чего регистрировали интенсивность люминесценции штамма. Результаты показаны на рисунке 48.

При облучении водного раствора бактерий интенсивность их биолюминесценции снижается, скорее всего, из-за действия эндогенных фотосенсибилизаторов. Мы учитывали этот факт при оценке действия ГК, Фц и КТ на бактериальные клетки. При облучении синим светом раствора бактерий, инкубировавшихся с фталоцианинами цинка, мы наблюдали гибель бактерий. Данный эффект связан с тем, что Фц имеют ненулевые коэффициенты молярной экстинкции в синей области спектра и потому могут оказывать некоторое фотодинамическое

действие. Инактивация бактерий положительно заряженным фталоцианином цинка выражена сильнее, чем инактивация отрицательно заряженным Фц, что согласуется с литературными данными [140] и подтверждает важную роль электростатического взаимодействия водорастворимых фотосенсибилизаторов с клеточной стенкой бактерии в эффективной инактивации микроорганизмов. Интересно, что обе КТ вызывают гибель бактерий, причем цитотоксичность проявляется только на свету. Очевидно, эффективность связывания КТ также зависит от их поверхностного заряда, поскольку КТ600(+) токсичнее, чем КТ600(-). Отметим, что данные квантовые точки существенно отличаются друг от друга по структуре и элементному составу нанокристалла, поэтому выявить влияние заряда поверхности КТ как отдельного фактора не представляется возможным. Таким образом, гибель бактерии происходит в присутствии КТ обоих типов, по-видимому, вследствие неспецифической адсорбции наночастиц на клеточную стенку.

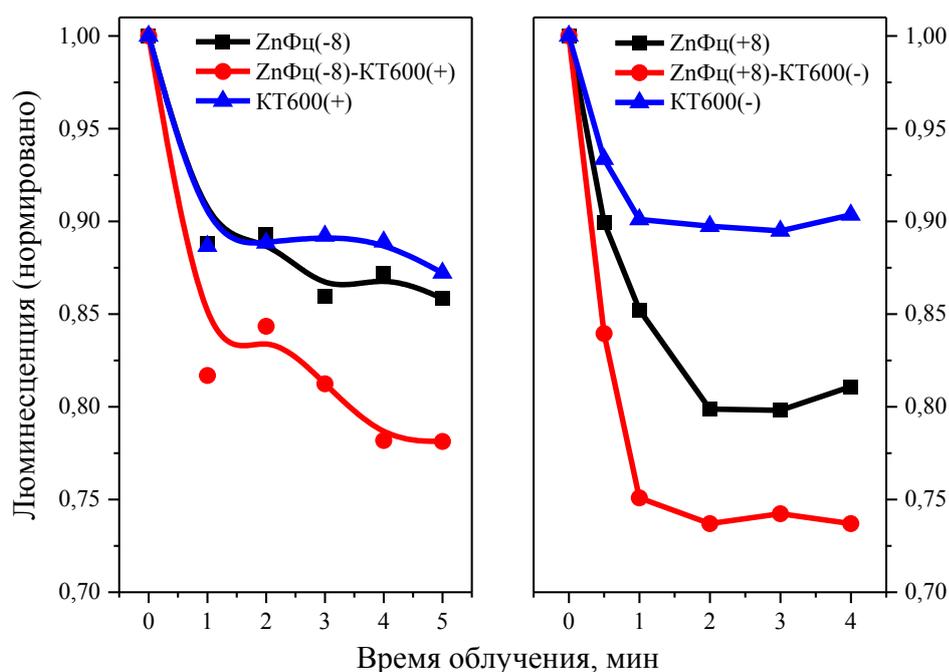


Рисунок 48. Изменение интенсивности биолюминесценции клеток *E. coli* (pXen7) в присутствии фталоцианинов цинка, КТ и их гибридных комплексов при адаптации бактерий к свету (430 – 470 нм, 3000 мкЭ). Нормировка по интенсивности люминесценции в отсутствие облучения

Фотодинамический эффект, оказываемый ГК обоих типов на бактериальные клетки, превосходит таковой эффект однокомпонентного раствора Фц, что подтверждает целесообразность использования ГК фотосенсибилизаторов в ФДИ. Величина эффекта, однако, оказывается меньше суммы эффектов Фц и КТ по отдельности. Возможно, инактивирующее действие КТ и Фц при инкубации бактерий с ГК осуществляется независимо друг от друга.

Результаты некоторых исследований показывают, что при инкубации бактерий с ГК квантовые точки в определенной концентрации способны оказывать защитное действие [6, 7, 13].

Неожиданностью стал факт значительного усиления люминесценции бактерий в присутствии отрицательно заряженных CdSe/ZnS КТ (в ~ 8 раз при концентрации КТ 20 нМ). Последующее облучение вызвало уменьшение интенсивности свечения на 10%, однако через 30 секунд интенсивность люминесценции восстановилась до уровня, предшествовавшего освещению синим светодиодом. В растворах, содержащих бактерии и ГК фталоцианинов алюминия с этими КТ наблюдали тот же эффект. Вероятно, явление не связано с регистрацией детектором флуоресценции КТ наряду со свечением бактерий, т. к. при инкубации с тем же штаммом отрицательно заряженные КТ состава CdTe вызывали снижение интенсивности люминесценции *E. coli*. Стоит отметить, что корреляция между инактивацией бактерий *E. coli* рХен7 и снижением интенсивности их свечения устанавливается отдельно для каждого токсина [140], и, вообще говоря, не исключены случаи, когда такой корреляции может и не быть.

3.1.7 Фотодинамическое действие гибридных комплексов на раковые клетки

Наиболее эффективное фотодинамическое действие ФС достигается за счет проникновения молекул действующего вещества внутрь клеток. Мы решили осуществить направленную доставку ГК в животные клетки, используя трансферрин (Тф) в качестве агента, опосредующего эндоцитоз.

При получении холо-формы трансферрина путем насыщения ионами железа исходного образца Тф изменяются флуоресцентные свойства белка. В кинетике затухания флуоресценции Тф имеются две временные компоненты (1.73 и 2.82 нс в максимуме пика). При переходе апо-Тф → холо-Тф снижается длительность быстрой компоненты (в 1.6 раза), ее вклад в общую флуоресценцию увеличивается (с $80 \pm 1.6\%$ до $93 \pm 1.2\%$); вклад медленной компоненты, соответственно, уменьшается. Интересно, что данные изменения наблюдаются при анализе кинетик затухания флуоресценции Тф как в максимуме спектра флуоресценции, так и на его коротко- и длинноволновом плечах. Длительность медленной компоненты в максимуме спектра флуоресценции не изменяется, но увеличивается на длинноволновом плече спектра. Также, при переходе апо-Тф → холо-Тф значительно снижается интенсивность флуоресценции, а сам спектр испытывает небольшой батохромный сдвиг. Мы связываем изменения спектральных свойств белка с изменением его конформации в результате связывания ионов трехвалентного железа [208].

В качестве контроля мы изучили захват трансферрина клетками в отсутствие компонентов ГК. Для этого к холо-форме Тф карбодимидным методом пришивали краситель флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ). Итоговое соотношение ФИТЦ:Тф после очистки образца диализом от не связавшегося красителя составило 3:1. В отсутствие сшивающих агентов ФИТЦ не взаимодействует с белком, что подтверждается в эксперименте по регистрации кинетики затухания анизотропии флуоресценции ФИТЦ (рисунок 49). В контроле без белка ФИТЦ демонстрирует корреляционное время вращения 0.23 ± 0.016 нс, которое достоверно не изменяется в присутствии трансферрина (0.232 ± 0.007 нс). Кинетика затухания анизотропии флуоресценции ФИТЦ, ковалентно сшитого с белком, оказалась двухкомпонентной с временем 0.35 ± 0.03 нс, характеризующим вращение красителя в комплексе с белком, и временем 20.8 ± 2.7 нс, связанным с вращением самого конъюгата. При образовании конъюгата не наблюдается изменения флуоресцентных свойств белка, тогда как спектр поглощения ФИТЦ смещается на 2 нм в длинноволновую область спектра без изменения оптической плотности раствора в максимуме спектра поглощения.

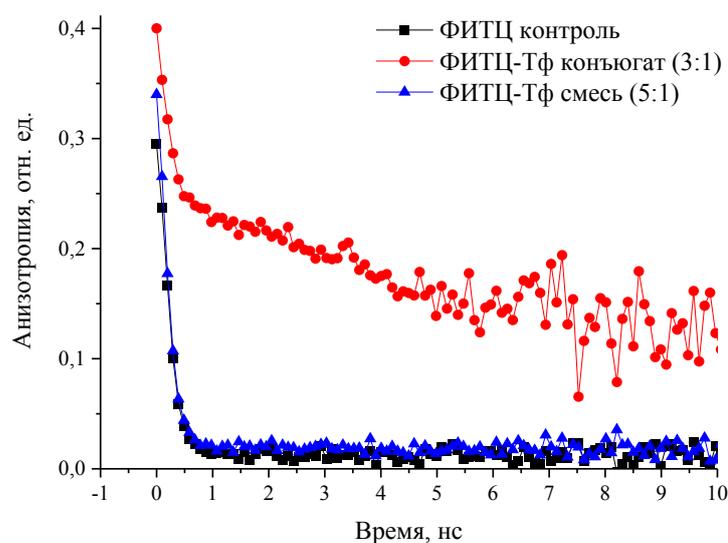


Рисунок 49. Кинетика затухания анизотропии флуоресценции ФИТЦ в контрольном растворе, в смеси с холо-Тф и ковалентно сшитого с холо-Тф. Длина волны возбуждения флуоресценции 515 нм

В экспериментах мы использовали культуру эпидермоидной карциномы человека линии А431, клетки которой экспрессируют на цитоплазматическую мембрану избыточное количество рецепторов к Тф. Конъюгат ФИТЦ-Тф инкубировали с клетками в течение 15 минут, после чего исследовали распределение конъюгата внутри клеток (рисунок 50, ряд 4).

Действительно, Тф эффективно проникает в клетки путем эндоцитоза, что свидетельствует об успешном насыщении исходного апо-белка ионами железа.

Ковалентную сшивку Тф и КТ580 мы осуществили, используя карбодимидный метод. Соотношение Тф:КТ в комплексе после очистки образца от не связавшихся компонентов оказалось близко к 1:1 согласно оценке концентраций компонентов по спектрам поглощения конъюгата с известными коэффициентами молярной экстинкции КТ и Тф (мы предполагаем, что значения ϵ не меняются при образовании комплекса). Методом КЛСМ было установлено, что конъюгат КТ-Тф проникает внутрь клеток и локализуется в перинуклеарном компартменте в составе везикул (рисунок 50, ряд 3).

После этого, к раствору конъюгата Тф-КТ добавили $Al\Phi\psi(+4.5)$ до соотношения $\Phi\psi:КТ$ в гибридном комплексе 15:1. Поскольку неспецифическое связывание $\Phi\psi$ с молекулой Тф может привести к увеличению расстояния между центрами КТ и $\Phi\psi$ в комплексе Тф-ГК и к уменьшению эффективности переноса энергии, мы исследовали взаимодействие между $\Phi\psi$ и Тф спектральными методами. Оказалось, что поликатионные и полианионные фталоцианины цинка и алюминия, использованные в данной работе, не взаимодействуют с апо- и холо-Тф в отсутствие КТ: при инкубации Тф и $\Phi\psi$ ($[\Phi\psi]:[Тф] = 10:1$) спектральные свойства компонентов не меняются, кинетика затухания анизотропии флуоресценции $\Phi\psi$ в присутствии Тф полностью соответствует кинетике в контрольном растворе $\Phi\psi$. Таким образом, Тф не изменяет фотодинамические свойства ГК. Результаты инкубации конъюгата Тф-ГК с клетками показаны на рисунке 51, ряд 3. Из рисунка следует, что ГК эффективно проникают внутрь клетки за счет эндоцитоза, опосредованного трансферрином. Кроме того, мы наблюдаем сенсibilизированную флуоресценцию фталоцианина при возбуждении флуоресценции КТ на длине волны 532 нм (рисунок 51, ряд 4). Таким образом, КТ и $\Phi\psi$ не только колокализуются внутри клеток, но и сохраняют контакт в процессе взаимодействия с плазматической мембраной клеток и последующего эндоцитоза. Нужно отметить, что ГК, не связанный с Тф, проникает внутрь клеток гораздо менее эффективно (рисунок 51, ряд 1); при этом мы не регистрируем свечения $\Phi\psi$ при облучении образца зеленым светом, что говорит о дезинтеграции ГК (рисунок 51, ряд 2). В контроле КТ580 проникает в клетки в течение 1 часа инкубации, однако интенсивность сигнала в канале регистрации флуоресценции КТ крайне мала (рисунок 50, ряд 2). По-видимому, как и в экспериментах с бактериальными клетками, адсорбционные свойства ГК определяются свойствами поверхности КТ, отрицательный заряд которой препятствует эффективному взаимодействию с клеточной мембраной. $Al\Phi\psi(+4.5)$ в контроле без КТ и Тф плохо связывался с цитоплазматической мембраной клеток А431 и был

локализован преимущественно в везикулах внутри клетки (рисунок 50, ряд 1). Таким образом, эффективность проникновения А1Фц(+4.5) внутрь клеток эпидермоидной карциномы человека увеличивается в ряду Фц – Фц-КТ – Фц-КТ-Тф, причем в последнем случае реализуется потенциал КТ и как наноплатформы для доставки ФС, и как светособирающей антенны для молекул фталоцианина.

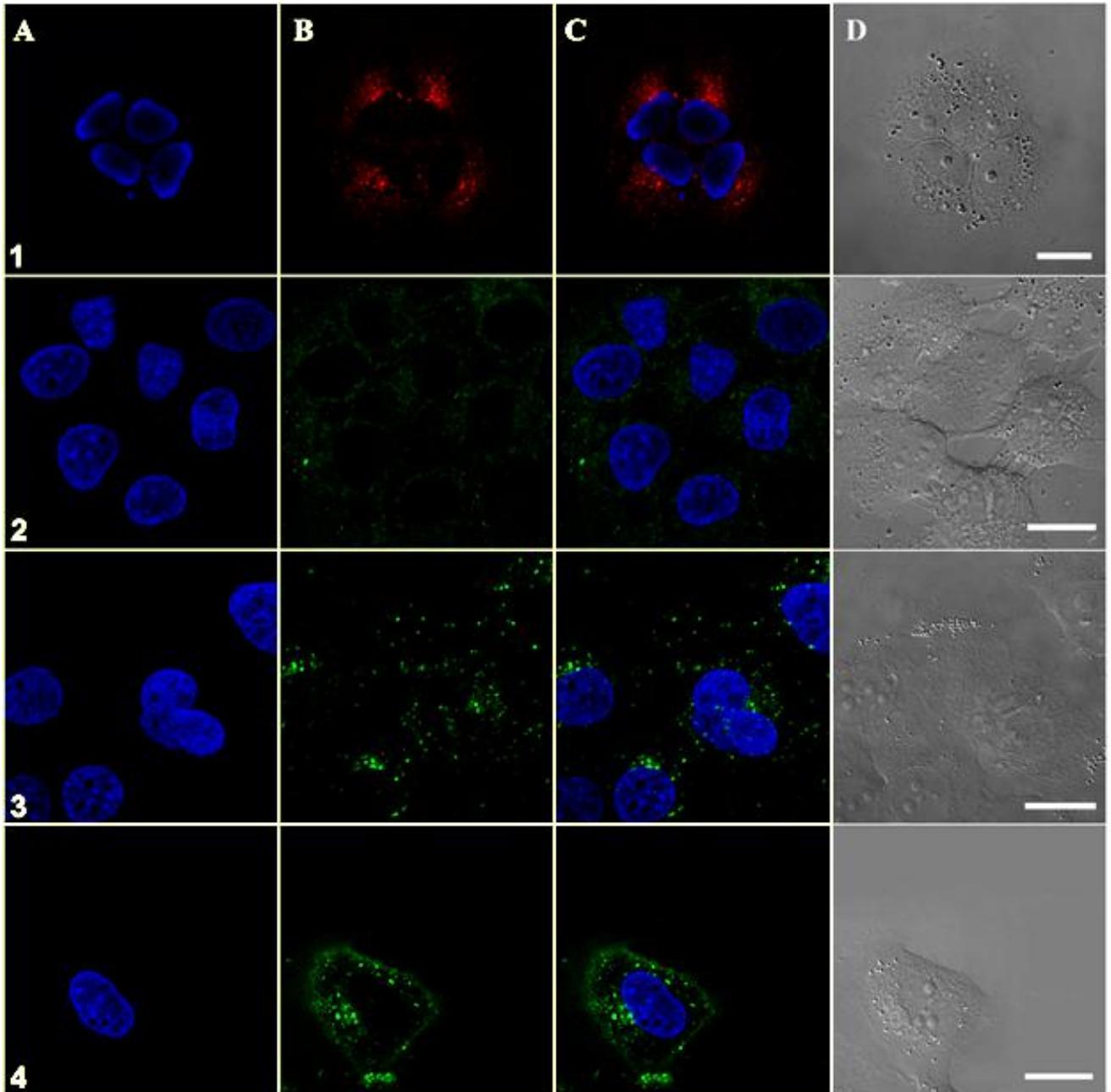


Рисунок 50. Локализация А1Фц(+4.5) (1), КТ580 (2), а также конъюгатов КТ580-Тф (3) и ФИТЦ-Тф (4) в клетках линии А431. Инкубация в течение 1 часа. Ряды: А – Hoechst 33342, В – действующее вещество, С – наложение каналов А и В, D – изображение в проходящем свете. Длина волны возбуждения флуоресценции: Hoechst – 408 нм, ФИТЦ – 488 нм, КТ – 532 нм, Фц – 643 нм. Масштаб 20 мкм

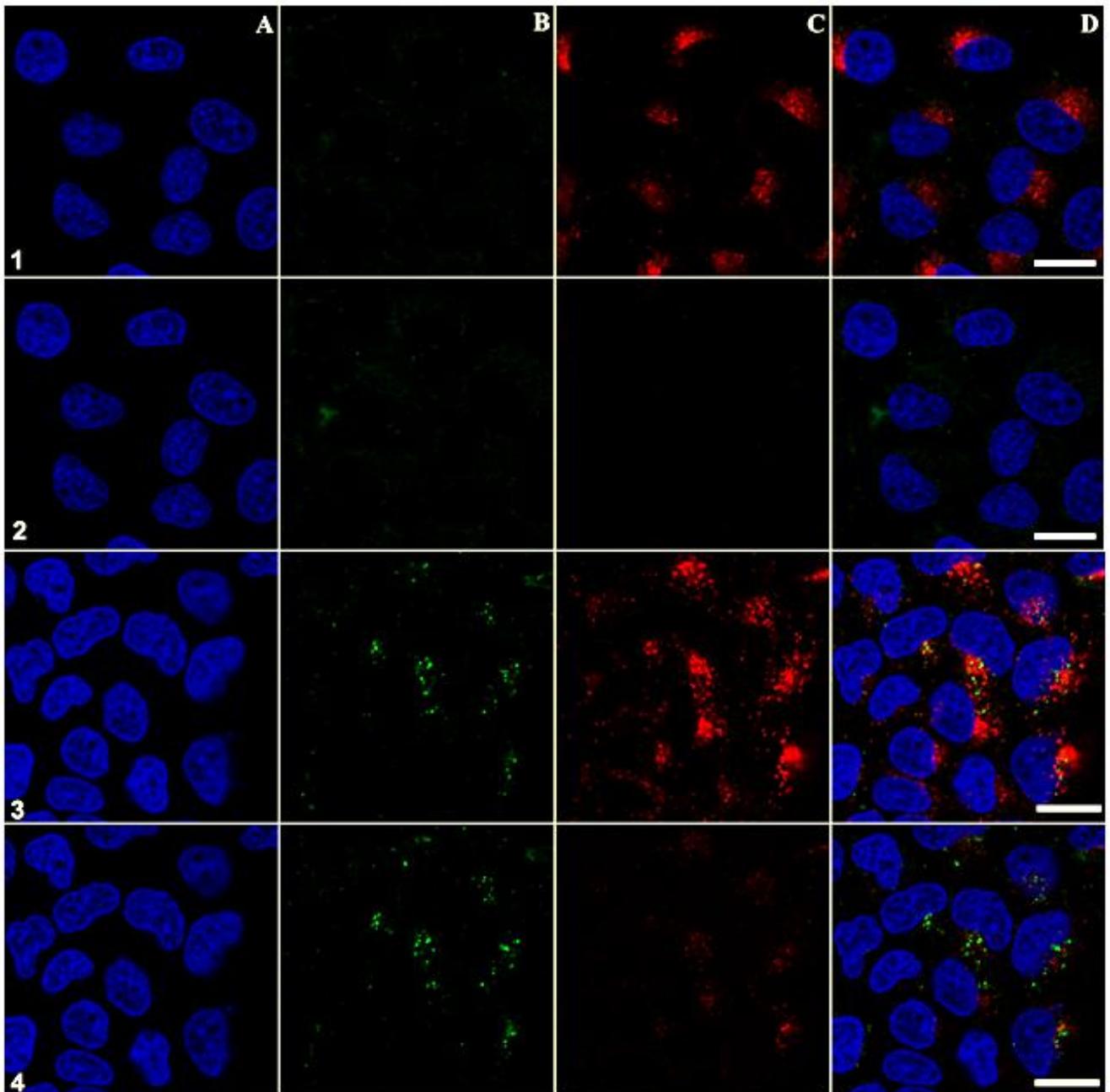


Рисунок 51. Локализация ГК AIFc(+4.5)-KT580 (1, 2) и конъюгата ГК-Tf (3, 4) в клетках линии A431. Инкубация в течение 1 часа. А – Hoechst 33342, В – КТ, С – Фц, D – наложение каналов А, В и С. Длина волны возбуждения флуоресценции: Hoechst – 408 нм, КТ – 532 нм, Фц – 643 нм. В вариантах 2 и 4 прямое возбуждение флуоресценции Фц не осуществлялось. Масштаб 20 мкм

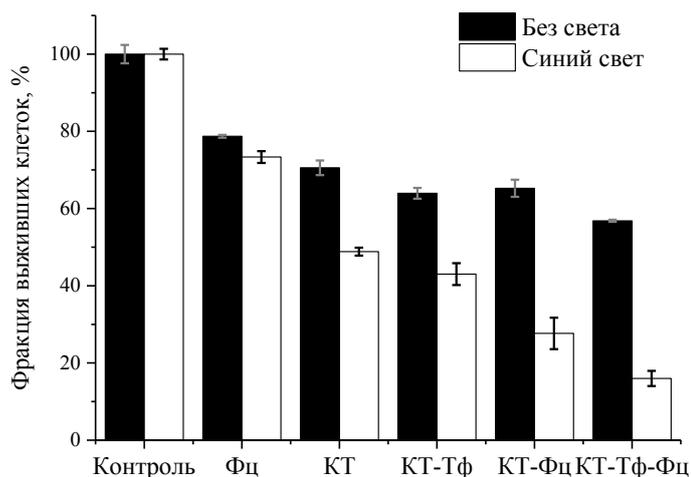


Рисунок 52. Зависимость процента выживших клеток линии А431 от типа действующего вещества в темноте и после освещения синим светом (400 – 500 нм, доза 42.9 Дж)

Для оценки эффективности фотодинамического действия конъюгатов на раковые клетки использовали тест МТТ. Метод основан на способности живых клеток восстанавливать тетразолиевые красители в нерастворимый формазан, имеющий пурпурную окраску. Формазан растворяют в ДМСО и с помощью абсорбционной спектрометрии оценивают его концентрацию, пропорциональную количеству выживших клеток. Схема облучения клеток в лунках планшета была выбрана таким образом, чтобы минимизировать стандартное отклонение средней дозы (42.9 ± 2.7 Дж), напрямую оказывающее влияние на стандартное отклонение при расчетах выживаемости клеток по выборке. 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.

На рисунке 52 показаны значения выживаемости клеток, инкубированных с исследуемыми веществами, после освещения планшета в течение получаса. В качестве контроля выступили клетки, к которым во время эксперимента не производилось добавлений исследуемых веществ. Нужно отметить, что выживаемость клеток в темновом и световом контроле (т. е. в облученных лунках и в лунках, не подвергшихся действию света) достоверно не отличалась. Видно, что А1Фц(+4.5) вызывает гибель более 25% клеток, поскольку полоса Соре данного фталоцианина перекрывается со спектром излучения светодиода в области 400 – 420 нм. В комплексе с КТ580 А1Фц(+4.5) генерирует АФК более эффективно вследствие переноса энергии электронного возбуждения от КТ, что приводит к гибели ~ 70% 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.

Интересно, что КТ580 также обладают фототоксичностью, превышающей цитотоксичность А1Фц(+4.5). Проникновение КТ580 внутрь клеток за счет ковалентной сшивки с Тф приводит лишь к незначительному уменьшению выживаемости клеток линии А431. Можно предположить, что цитотоксический эффект КТ оказывается посредством мембранных структур клетки.

Характер цитотоксического действия комбинации фталоцианина с КТ (или конъюгатом КТ-Тф) анализировали с помощью формулы Джина [209]:

$$Q = E_{a+b} / (E_a + E_b - E_a \times E_b), \quad (33)$$

Где E_a , E_b , и E_{a+b} – доля погибших клеток при инкубации клеток с Фц, КТ (КТ-Тф) или их ГК, соответственно. Значения $Q < 0.85$ означают антагонизм действия двух веществ, значения $Q \geq 1.15$ означают синергетический эффект, когда два вещества взаимно усиливают действие друг друга, промежуточные значения $0.85 \leq Q < 1.15$ означают независимое действие двух веществ.

Поскольку компоненты ГК обладают как «темновой», так и фототоксичностью (их суммарный эффект соответствует белым столбикам на рисунке 52), необходимо оценить Q для двух типов токсичности по отдельности. В случае «темновой» токсичности (рисунок 52, черные столбцы) нами выявлено независимое действие КТ и Фц, граничащее с антагонизмом ($Q = 0.78 - 0.87$). Вклад антагонизма можно объяснить тем, что в КТ, покрытые полимерной оболочкой, хорошо адсорбируют молекулы ФС. В ряде работ показано, что цитотоксический эффект ФС, равномерно распределенного по поверхности клетки, оказывается более выраженным, чем в том случае, если ФС сконцентрирован в оболочке наночастицы, взаимодействующей с клеткой [62,173]. В случае фототоксичности (разница между черными и белыми столбиками на рисунке 52) мы наблюдаем высокую степень синергизма действия КТ и Фц в комплексе ($Q = 1.45$ в ГК и 1.62 в конъюгате ГК с трансферрином), очевидно, вследствие переноса энергии электронного возбуждения от КТ к молекулам фталоцианина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью оптических методов было показано, что в водных растворах флуоресцентные наночастицы, покрытые оболочкой из амфифильного 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 сенсibilizированную флуоресценцию фталоцианинов. Следовательно, флуоресцирующие наночастицы увеличивают эффективное сечение поглощения Фц в синезеленой (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 рН и ионной силы раствора на взаимодействие КТ и Фц. Показано, что спектральные свойства ГК не изменяются в диапазоне значений рН от 5 до 9 единиц при постоянном значении ионной силы раствора; эффективность переноса энергии в ГК (Фц: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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АКНЧ – апконверсионная наночастица

ГК – гибридный комплекс

ДФБФ – дифенилизобензофуран

ИК – инфракрасный

КЛСМ – конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

КТ – квантовая точка

КТ600(+)- положительно заряженные CdSeCdTe/ZnS квантовые точки

КТ600(-) – отрицательно заряженные CdTe квантовые точки

КТ580, КТ600, КТ620, КТ640 – отрицательно заряженные CdSe/ZnS квантовые точки

ЛПС – липополисахарид

НЧ – наночастица

ПБС – натрий-фосфатный буферный раствор

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

ТОФО – триоктилфосфиноксид

Тф – трансферрин

УФ – ультрафиолетовый

ФДИ – фотодинамическая инактивация микроорганизмов

ФДТ – фотодинамическая терапия

ФИТЦ – флуоресцеинизотиоцианат

ФС – фотосенсибилизатор

Фц – фталоцианин

AlФц(x) – фталоцианин алюминия с зарядом x (холинил – положительный заряд, карбокси – отрицательный)

EDC – N-этил-N (3-диметиламинопропил) карбодиимид

FRET – индуктивно-резонансный перенос энергии

NHS – N-гидроксисукцинимид

RNO – p-нитрозодиметиланилин

TCSPC – time-correlated single photon counting, метод счета фотонов,

ZnФц(x) – фталоцианин цинка с зарядом x (карбокси – отрицательный заряд; пиридинометил – положительный)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- [1] Tappeiner H., Jodlbauer A. Die sensibilizierende wirkung fluorescender substanzen // Leipzig FCW Vogel. 1907.
- [2] Henderson B.W., Dougherty T.J. How does photodynamic therapy work? // Photochem. Photobiol. 1992. Vol. 55, № 1. P. 145–157.
- [3] Hamblin M.R., Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? // Photochem. Photobiol. Sci. 2004. № 3. P. 436–450.
- [4] Macdonald I.J., Dougherty T.J. Basic principles of photodynamic therapy // J. Porphyr. Phthalocyanines. 2001. Vol. 5, № 2. P. 105–129.
- [5] Lakowicz J.R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd ed. New York: Springer, 2006.
- [6] Narband N., Mubarak M., Ready D., Parkin I.P., Nair S.P., Green M.A., Beeby A., Wilson M. Quantum dots as enhancers of the efficacy of bacterial lethal photosensitization // Nanotechnology. 2008. Vol. 19, № 44.
- [7] Rakovich A., Savateeva D., Rakovich T., Donegan J.F., Rakovich Y.P., Kelly V., Lesnyak V., Eychemüller A. CdTe quantum dot/dye hybrid system as photosensitizer for photodynamic therapy // Nanoscale Res. Lett. 2010. Vol. 5, № 4. P. 753–760.
- [8] Duong H.D., Rhee J.I. Singlet oxygen production by fluorescence resonance energy transfer (FRET) from green and orange CdSe/ZnS QDs to protoporphyrin IX (PpIX) // Chem. Phys. Lett. Elsevier B.V., 2011. Vol. 501, № 4–6. P. 496–501.
- [9] Wang C., Tao H., Cheng L., Liu Z. Near-infrared light induced in vivo photodynamic therapy of cancer based on upconversion nanoparticles // Biomaterials. Elsevier Ltd, 2011. Vol. 32, № 26. P. 6145–6154.
- [10] Li L., Zhao J.F., Won N., Jin H., Kim S., Chen J.Y. Quantum Dot - Aluminum phthalocyanine Conjugates perform photodynamic reactions to kill cancer cells via fluorescence resonance energy transfer (FRET) // Nanoscale Res. Lett. Nanoscale Research Letters, 2012. Vol. 7, № 1. P. 1.
- [11] Rotomskis R., Valanciunaite J., Skripka A., Steponkiene S., Spogis G., Bagdonas S., Streckyte G. Complexes of functionalized quantum dots and chlorin e6 in photodynamic therapy // Lith. J.

- Phys. 2013. Vol. 53, № 1. P. 57–68.
- [12] Martynenko I. V., Kuznetsova V.A., Orlova A.O., Kanaev P.A., Maslov V.G., Loudon A., Zaharov V., Parfenov P., Gun'ko Y.K., Baranov A. V., Fedorov A. V. Chlorin e6-ZnSe/ZnS quantum dots based system as reagent for photodynamic therapy // *Nanotechnology*. IOP Publishing, 2015. Vol. 26, № 5. P. 55102.
- [13] Viana O.S., Ribeiro M.S., Rodas A.C.D., Rebouças J.S., Fontes A., Santos B.S. Comparative study on the efficiency of the photodynamic inactivation of candida albicans Using CdTe Quantum Dots, Zn(II) Porphyrin and Their Conjugates as Photosensitizers // *Molecules*. 2015. Vol. 20, № 5. P. 8893–8912.
- [14] Zhu K., Liu G., Hu J., Liu S. Near-Infrared Light-Activated Photochemical Internalization of Reduction-Responsive Polyprodrug Vesicles for Synergistic Photodynamic Therapy and Chemotherapy // *Biomacromolecules*. 2017. Vol. 18, № 8. P. 2571–2582.
- [15] Maksimov E.G., Gvozdev D.A., Strakhovskaya M.G., Paschenko V.Z. Hybrid structures of polycationic aluminum phthalocyanines and quantum dots // *Biochem*. 2015. Vol. 80, № 3. P. 323–331.
- [16] Gvozdev D.A., Maksimov E.G., Strakhovskaya M.G., Ivanov M. V., Paschenko V.Z., Rubin A.B. The effect of ionic strength on spectral properties of quantum dots and aluminum phthalocyanine complexes // *Nanotechnologies Russ*. 2017. Vol. 12, № 1–2. P. 73–85.
- [17] 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. A CdSe/ZnS quantum dot-based platform for the delivery of aluminum phthalocyanines to bacterial cells // *J. Photochem. Photobiol. B Biol. Elsevier*, 2018. Vol. 187. P. 170–179.
- [18] Олейников В.А., Суханова А.В., Набиев И.Р. Флуоресцентные полупроводниковые нанокристаллы в биологии и медицине // *Российские нанотехнологии*. 2007. Vol. 2, № 1–2. P. 160–173.
- [19] Kim J.Y., Voznyy O., Zhitomirsky D., Sargent E.H. 25th Anniversary Article: Colloidal Quantum Dot Materials and Devices: A Quarter-Century of Advances // *Adv. Mater*. 2013. № 25. P. 4986–5010.
- [20] Murray C.B., Norris D.J., Bawendi M.G. Synthesis and Characterization of Nearly Monodisperse CdE (E = S, Se, Te) Semiconductor Nanocrystallites // *J. Am. Chem. Soc*. 1993.

Vol. 115, № 19. P. 8706–8715.

- [21] Juzenas P., Chen W., Sun Y.P., Coelho M.A.N., Generalov R., Generalova N., Christensen I.L. Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer // *Adv. Drug Deliv. Rev. Elsevier B.V.*, 2008. Vol. 60, № 15. P. 1600–1614.
- [22] Spanhel L., Haase M., Weller H., Henglein A. Photochemistry of Colloidal Semiconductors. 20. Surface Modification and Stability of Strong Luminescing CdS Particles // *J. Am. Chem. Soc.* 1987. Vol. 109, № 19. P. 5649–5655.
- [23] Lane L.A., Smith A.M., Lian T., Nie S. Compact and Blinking-Suppressed Quantum Dots for Single-Particle Tracking in Live Cells // *J. Phys. Chem. B.* 2014.
- [24] Cordones A.A., Leone S.R. Mechanisms for charge trapping in single semiconductor nanocrystals probed by fluorescence blinking // *Chem. Soc. Rev.* 2013. Vol. 42, № 8. P. 3209.
- [25] Kortan A.R., Opila R.L., Bawendi M.G., Steigerwald M.L., Carroll P.J., Brus L.E. Nucleation and Growth of CdSe on ZnS Quantum Crystallite Seeds, and Vice Versa, in Inverse Micelle Media // *J. Am. Chem. Soc.* 1990. Vol. 112, № 4. P. 1327–1332.
- [26] Hines M.A., Guyot-Sionnest P. Synthesis and Characterization of Strongly Luminescing ZnS-Capped CdSe Nanocrystals // *J. Phys. Chem.* 1996. Vol. 100, № 2. P. 468–471.
- [27] Grabolle M., Ziegler J., Merkulov A., Nann T., Resch-Genger U. Stability and fluorescence quantum yield of CdSe-ZnS quantum dots - Influence of the thickness of the ZnS shell // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008. Vol. 1130. P. 235–241.
- [28] Dabbousi B.O., Rodriguez-Viejo J., Mikulec F. V., Heine J.R., Mattoussi H., Ober R., Jensen K.F., Bawendi M.G. (CdSe)ZnS Core-Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites // *J. Phys. Chem. B.* 1997. Vol. 101, № 46. P. 9463–9475.
- [29] Orfield N.J., McBride J.R., Keene J.D., Davis L.M., Rosenthal S.J. Correlation of atomic structure and photoluminescence of the same quantum dot: Pinpointing surface and internal defects that inhibit photoluminescence // *ACS Nano.* 2015. Vol. 9, № 1. P. 831–839.
- [30] Hohng S., Ha T. Near-Complete Suppression of Quantum Dot Blinking in Ambient Conditions // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. Vol. 126, № 5. P. 1324–1325.
- [31] Wang X., Qu L., Zhang J., Peng X., Xiao M. Surface-related emission in highly luminescent

- CdSe quantum dots // *Nano Lett.* 2003. Vol. 3, № 8. P. 1103–1106.
- [32] Kapitonov A.M., Stupak A.P., Gaponenko S. V., Petrov E.P., Rogach A.L., Eychmüller A. Luminescence Properties of Thiol-Stabilized CdTe Nanocrystals // *J. Phys. Chem. B.* 1999. Vol. 103, № 46. P. 10109–10113.
- [33] Bawendi M.G., Carroll P.J., Wilson W.L., Brus L.E. Luminescence properties of CdSe quantum crystallites: Resonance between interior and surface localized states // *J. Chem. Phys.* 1992. Vol. 96, № 2. P. 946–954.
- [34] An L., Chao K., Zeng Q., Han X., Yuan Z., Xie F., Fu X., An W. Energy Transfer from CdSe Quantum Dots to Porphyrin via Two-Photon Excitation // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2013. Vol. 13. P. 1368–1371.
- [35] Wuister S.F., Swart I., Van Driel F., Hickey S.G., Donega C. De Mello. Highly Luminescent Water-Soluble CdTe Quantum Dots // *Nano Lett.* 2003. Vol. 3, № 4. P. 503–507.
- [36] Zenkevich E., Cichos F., Shulga A., Petrov E.P., Blaudeck T., von Borczyskowski C. Nanoassemblies Designed from Semiconductor Quantum Dots and Molecular Arrays // *J. Phys. Chem. B.* 2005. Vol. 109. P. 8679–8692.
- [37] Yu W.W., Qu L., Guo W., Peng X. Experimental Determination of the Extinction Coefficient of CdTe, CdSe, and CdS Nanocrystals // *Chem. Mater.* 2003. Vol. 15, № 14. P. 2854–2860.
- [38] Chen Y., Rosenzweig Z. Luminescent CdS quantum dots as selective ion probes // *Anal. Chem.* 2002. Vol. 74, № 19. P. 5132–5138.
- [39] Liu J., Yang X., Wang K., He X., Wang Q., Huang J., Liu Y. Aggregation control of quantum dots through ion-mediated hydrogen bonding shielding // *ACS Nano.* 2012. Vol. 6, № 6. P. 4973–4983.
- [40] Zhu J., Zhao Z.J., Li J.J., Zhao J.W. CdTe quantum dot-based fluorescent probes for selective detection of Hg (II): The effect of particle size // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* Elsevier B.V., 2017. Vol. 177. P. 140–146.
- [41] Coe S., Woo W.K., Bawendi M.G., Bulovic V. Electroluminescence from single monolayers of nanocrystals in molecular organic devices // *Nature.* 2002. Vol. 420. P. 800–803.
- [42] Klimov V.I., Mikhailovsky A.A., Xu S., Malko A., Hollingsworth J.A., Leatherdale C.A., Eisler H.J., Bawendi M.G. Optical Gain and Stimulated Emission in Nanocrystal Quantum Dots //

- Science (80-.). 2000. Vol. 290. P. 314–317.
- [43] Jin S., Son H.J., Farha O.K., Wiederrecht G.P., Hupp J.T. Energy Transfer from Quantum Dots to Metal – Organic Frameworks for Enhanced Light Harvesting // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. № 135. P. 955–958.
- [44] Sun X.W., Chen J., Song J.L., Zhao D.W., Deng W.Q. Ligand capping effect for dye solar cells with a CdSe quantum dot sensitized ZnO nanorod photoanode // *Opt. Express.* 2010. Vol. 18, № 2. P. 460–465.
- [45] Yoshii M., Kobayashi H., Tada H. Sub-Bandgap Excitation-Induced Electron Injection from CdSe Quantum Dots to TiO₂ in a Directly Coupled System // *ChemPhysChem.* 2015. Vol. 16, № 9. P. 1846–1851.
- [46] Schmitt F.J., Maksimov E.G., Hätti P., Weißenborn J., Jeyasangar V., Razjivin A.P., Paschenko V.Z., Friedrich T., Renger G. Coupling of different isolated photosynthetic light harvesting complexes and CdSe/ZnS nanocrystals via Förster resonance energy transfer // *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* Elsevier B.V., 2012. Vol. 1817, № 8. P. 1461–1470.
- [47] Algar W.R., Krull U.J. Quantum dots as donors in fluorescence resonance energy transfer for the bioanalysis of nucleic acids, proteins, and other biological molecules // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. Vol. 391, № 5. P. 1609–1618.
- [48] Chan W.C.W., Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection // *Science (80-.).* 1998. Vol. 281, № 5385. P. 2016–2018.
- [49] Medintz I.L., Mattoussi H., Clapp A.R. Potential clinical applications of quantum dots. // *Int. J. Nanomedicine.* 2008. Vol. 3, № 2. P. 151–167.
- [50] Shao L., Gao Y., Yan F. Semiconductor quantum dots for Biomedical applications // *Sensors.* 2011. Vol. 11, № 12. P. 11736–11751.
- [51] Schneider R., Wolpert C., Guilloteau H., Balan L., Lambert J., Merlin C. The exposure of bacteria to CdTe-core quantum dots: The importance of surface chemistry on cytotoxicity // *Nanotechnology.* 2009. Vol. 20, № 22.
- [52] Nordberg G.F., Fowler B.A., Nordberg M., Friberg L.T. *Hand-book on the Toxicology of Metals.* 3rd ed. San Diego: Academic Press, 2008. 975 p.
- [53] Peng L., He M., Chen B., Wu Q., Zhang Z., Pang D., Zhu Y., Hu B. Cellular uptake, elimination

- and toxicity of CdSe/ZnS quantum dots in HepG2 cells // *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 2013. Vol. 34, № 37. P. 9545–9558.
- [54] Bruneau A., Fortier M., Gagne F., Gagnon C., Turcotte P., Tayabali A., Davis T.A., Auffret M., Fournier M. In Vitro Immunotoxicology of Quantum Dots and Comparison with Dissolved Cadmium and Tellurium // *Environ. Toxicol.* 2013. Vol. 30, № 1. P. 9–25.
- [55] Ma J., Chen J.Y., Idowu M., Nyokong T. Generation of singlet oxygen via the composites of water-soluble thiol-capped CdTe quantum dots-sulfonated aluminum phthalocyanines // *J. Phys. Chem. B*. 2008. Vol. 112, № 15. P. 4465–4469.
- [56] Singh S., Chakraborty A., Singh V., Molla A., Hussain S., Singh M.K., Das P. DNA mediated assembly of quantum dot–protoporphyrin IX FRET probes and the effect of FRET efficiency on ROS generation // *Phys. Chem. Chem. Phys.* Royal Society of Chemistry, 2015. Vol. 17, № 8. P. 5973–5981.
- [57] Samia A.C.S., Chen X., Burda C. Semiconductor quantum dots for photodynamic therapy // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. Vol. 125, № 51. P. 15736–15737.
- [58] Zenkevich E.I., Sagun E.I., Knyukshto V.N., Stasheuski A.S., Galievsky V.A., Stupak A.P., Blaudeck T., von Borczyskowski C. Quantitative analysis of singlet oxygen (1O_2) generation via energy transfer in nanocomposites based on semiconductor quantum dots and porphyrin ligands // *J. Phys. Chem. C*. 2011. Vol. 115, № 44. P. 21535–21545.
- [59] Ipe B.I., Lehnig M., Niemeyer C.M. On the Generation of Free Radical Species from Quantum Dots // *Small*. 2005. Vol. 1, № 7. P. 706–709.
- [60] Shi L., Hernandez B., Selke M. Singlet Oxygen Generation from Water-Soluble Quantum Dot - Organic Dye Nanocomposites // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. Vol. 128, № 19. P. 6278–6279.
- [61] Tsay J.M., Trzoss M., Shi L., Kong X., Selke M., Jung E., Weiss S. Singlet Oxygen Production by Peptide-coated Quantum Dot-Photosensitizer Conjugates // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. Vol. 129, № 21. P. 6865–6871.
- [62] Yaghini E., Giuntini F., Eggleston I.M., Suhling K., Seifalian A.M., MacRobert A.J. Fluorescence lifetime imaging and FRET-induced intracellular redistribution of tat-conjugated quantum dot nanoparticles through interaction with a phthalocyanine photosensitiser // *Small*. 2014. Vol. 10, № 4. P. 782–792.
- [63] Priester J.H., Stoimenov P.K., Mielke R.E., Webb S.M., Ehrhardt C., Zhang J.P., Stucky G.D.,

- Holden P.A. Effects of soluble cadmium salts versus cdse quantum dots on the growth of planktonic pseudomonas aeruginosa // Environ. Sci. Technol. 2009. Vol. 43, № 7. P. 2589–2594.
- [64] Lu Z., Li C.M., Bao H., Qiao Y., Toh Y., Yang X. Mechanism of antimicrobial activity of CdTe quantum dots. // Langmuir. 2008. Vol. 24, № 21. P. 5445–5452.
- [65] Slaveykova V.I., Startchev K., Roberts J. Amine- and carboxyl- quantum dots affect membrane integrity of bacterium Cupriavidus metallidurans CH34 // Environ. Sci. Technol. 2009. Vol. 43, № 13. P. 5117–5122.
- [66] Lai L., Lin C., Xiao C.Q., Xu Z.Q., Han X.L., Fu L., Li D.W., Mei P., Jiang F.L., Guo Q.L., Liu Y. Adhesion of quantum dots-induced membrane damage of Escherichia coli // J. Colloid Interface Sci. 2013. Vol. 389, № 1. P. 61–70.
- [67] Yang C., Xie H., Li Q.C., Sun E.J., Su B.L. Adherence and interaction of cationic quantum dots on bacterial surfaces // J. Colloid Interface Sci. Elsevier Inc., 2015. Vol. 450. P. 388–395.
- [68] He S.J., Cao J., Li Y.S., Yang J.C., Zhou M., Qu C.Y., Zhang Y., Shen F., Chen Y., Li M.M., Xu L.M. CdSe/ZnS quantum dots induce photodynamic effects and cytotoxicity in pancreatic cancer cells // World J. Gastroenterol. 2016. Vol. 22, № 21. P. 5012–5022.
- [69] Morelli E., Salvadori E., Bizzarri R., Cioni P., Gabellieri E. Interaction of CdSe/ZnS quantum dots with the marine diatom Phaeodactylum tricornutum and the green alga Dunaliella tertiolecta: A biophysical approach // Biophys. Chem. Elsevier B.V., 2013. Vol. 182. P. 4–10.
- [70] Geys J., Nemmar A., Verbeken E., Smolders E., Ratoi M., Hoylaerts M.F., Nemery B., Hoet P.H.M. Acute Toxicity and Prothrombotic Effects of Quantum Dots: Impact of Surface Charge // Environ. Health Perspect. 2008. Vol. 116, № 12. P. 1607–1613.
- [71] Liu J., Erogbogbo F., Yong K.T., Ye L., Liu J., Hu R., Chen H., Hu Y., Yang Y., Yang J., Roy I., Karker N.A., Swihart M.T., Prasad P.N. Assessing Clinical Prospects of Silicon Quantum Dots: Studies in Mice and Monkeys // ACS Nano. 2013. Vol. 7, № 8. P. 7303–7310.
- [72] Chatterjee D.K., Fong S.L., Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm // Adv. Drug Deliv. Rev. Elsevier B.V., 2008. Vol. 60, № 15. P. 1627–1637.
- [73] Martynenko I. V., Kuznetsova V.A., Orlova A.O., Kanaev P.A., Gromova Y., Maslov V.G., Baranov A. V., Fedorov A. ZnSe/ZnS quantum dots - photosensitizer complexes: optical properties and cancer cell photodynamic destruction effect // Proc. SPIE. 2014. Vol. 9126. P.

91263C.

- [74] Jia X., Jia L. Nanoparticles Improve Biological Functions of Phthalocyanine Photosensitizers Used for Photodynamic Therapy // *Curr. Drug Metab.* 2012. Vol. 13, № 8. P. 1119–1122.
- [75] Bakalova R., Ohba H., Zhelev Z., Ishikawa M., Baba Y. Quantum dots as photosensitizers? // *Nat. Biotechnol.* 2004. Vol. 22, № 11. P. 1360–1361.
- [76] Samia A.C.S., Dayal S., Burda C. Quantum Dot-based Energy Transfer: Perspectives and Potential for Applications in Photodynamic Therapy // *Photochem. Photobiol.* 2006. Vol. 82, № 3. P. 617.
- [77] Yaghini E., Seifalian A.M., MacRobert A.J. Quantum dots and their potential biomedical applications in photosensitization for photodynamic therapy // *Nanomedicine.* 2009. Vol. 4, № 3. P. 353–363.
- [78] Biju V., Mundayoor S., Omkumar R. V., Anas A., Ishikawa M. Bioconjugated quantum dots for cancer research: Present status, prospects and remaining issues // *Biotechnol. Adv. Elsevier Inc.*, 2010. Vol. 28, № 2. P. 199–213.
- [79] Iversen T.G., Skotland T., Sandvig K. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies // *Nano Today. Elsevier Ltd*, 2011. Vol. 6, № 2. P. 176–185.
- [80] Ruan G., Agrawal A., Marcus A.I., Nie S. Imaging and tracking of Tat peptide-conjugated quantum dots in living cells: New insights into nanoparticle uptake, intracellular transport, and vesicle shedding // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. Vol. 129, № 47. P. 14759–14766.
- [81] Kawabata H. Transferrin and transferrin receptors update // *Free Radic. Biol. Med. Elsevier B.V.*, 2018.
- [82] Tortorella S., Karagiannis T.C. Transferrin receptor-mediated endocytosis: A useful target for cancer therapy // *J. Membr. Biol.* 2014. Vol. 247, № 4. P. 291–307.
- [83] Richardson D.R., Ponka P. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells // *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* 1997. Vol. 1331, № 1. P. 1–40.
- [84] Schieber C., Bestetti A., Lim J.P., Ryan A.D., Nguyen T.L., Eldridge R., White A.R., Gleeson P.A., Donnelly P.S., Williams S.J., Mulvaney P. Conjugation of Transferrin to Azide-Modified

- CdSe/ZnS Core – Shell Quantum Dots using Cyclooctyne Click Chemistry // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2012. Vol. 51, № 42. P. 10523–10527.
- [85] Guan L.Y., Li Y.Q., Lin S., Zhang M.Z., Chen J., Ma Z.Y., Zhao Y.D. Characterization of CdTe/CdSe quantum dots-transferrin fluorescent probes for cellular labeling // *Anal. Chim. Acta.* Elsevier B.V., 2012. Vol. 741. P. 86–92.
- [86] Heer S., Kömpe K., Güdel H.U., Haase M. Highly efficient multicolour upconversion emission in transparent colloids of lanthanide-doped NaYF₄ nanocrystals // *Adv. Mater.* 2004. Vol. 16, № 23–24. P. 2102–2105.
- [87] Auzel F. Upconversion and Anti-Stokes Processes with f and d Ions in Solids // *Chem. Rev.* 2004. Vol. 104, № 1. P. 139–173.
- [88] Generalova A.N., Chichkov B.N., Khaydukov E. V. Multicomponent nanocrystals with anti-Stokes luminescence as contrast agents for modern imaging techniques // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2017. Vol. 245. P. 1–19.
- [89] Кузнецова Ю.О. ПЕРЕДАЧА ЭЛЕКТРОННОГО ВОЗБУЖДЕНИЯ В АП-КОНВЕРСИОННЫХ НАНОЧАСТИЦАХ, СОДЕРЖАЩИХ РЕДКОЗЕМЕЛЬНЫЕ ИОНЫ // *Известия Самарского научного центра Российской академии наук.* 2013. Vol. 15, № 4. P. 112–115.
- [90] Gorris H.H., Ali R., Saleh S.M., Wolfbeis O.S. Tuning the dual emission of photon-upconverting nanoparticles for ratiometric multiplexed encoding // *Adv. Mater.* 2011. Vol. 23, № 14. P. 1652–1655.
- [91] Vetrone F., Naccache R., Mahalingam V., Morgan C.G., Capobianco J.A. The active-core/active-shell approach: A strategy to enhance the upconversion luminescence in lanthanide-doped nanoparticles // *Adv. Funct. Mater.* 2009. Vol. 19, № 18. P. 2924–2929.
- [92] Mackenzie L.E., Goode J.A., Vakurov A., Nampi P.P., Saha S., Jose G., Millner P.A. The theoretical molecular weight of NaYF₄:RE upconversion nanoparticles // *Sci. Rep. Springer US,* 2018. Vol. 8, № 1. P. 1–11.
- [93] Peng L., Liu B., Han T. Preparation and upconversion luminescence of monodisperse Gd₂O₃:Ho³⁺, Yb³⁺-nanocrystals // *J. Rare Earths.* The Chinese Society of Rare Earths, 2013. Vol. 31, № 7. P. 650–654.
- [94] Ryabova A. V., Pominova D. V., Krut'ko V.A., Komova M.G., Loschenov V.B. Spectroscopic

- research of upconversion nanomaterials based on complex oxide compounds doped with rare-earth ion pairs: Benefit for cancer diagnostics by upconversion fluorescence and radio sensitive methods // *Photonics Lasers Med.* 2013. Vol. 2, № 2. P. 117–128.
- [95] Würth C., Kaiser M., Wilhelm S., Grauel B., Hirsch T., Resch-Genger U. Excitation power dependent population pathways and absolute quantum yields of upconversion nanoparticles in different solvents // *Nanoscale*. Royal Society of Chemistry, 2017. Vol. 9, № 12. P. 4283–4294.
- [96] Resch-Genger U., Gorris H.H. Perspectives and challenges of photon-upconversion nanoparticles - Part I: routes to brighter particles and quantitative spectroscopic studies // *Anal. Bioanal. Chem. Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017. Vol. 409, № 25. P. 5855–5874.
- [97] Chen G., Qiu H., Prasad P.N., Chen X. Upconversion Nanoparticles: Design, Nanochemistry, and Applications in Theranostics // *Chem. Rev.* 2014. Vol. 114, № 10. P. 5161–5214.
- [98] Yi G.S., Chow G.M. Water-Soluble NaYF₄Yb,Er(Tm)/NaYF₄/Polymer Core Shell/Shell Nanoparticles with Significant Enhancement of Upconversion Fluorescence // *Chem. Mater.* 2007. Vol. 19, № 5599. P. 341–343.
- [99] Chen Z., Chen H., Hu H., Yu M., Li F. Versatile Synthesis Strategy for Carboxylic Acid – functionalized Upconverting Nanophosphors as Biological Labels Versatile Synthesis Strategy for Carboxylic Biological Labels // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. Vol. 130, № 6. P. 3023–3029.
- [100] Chen N.T., Cheng S.H., Liu C.P., Souris J., Chen C.T., Mou C.Y., Lo L.W. Recent Advances in Nanoparticle-Based Förster Resonance Energy Transfer for Biosensing, Molecular Imaging and Drug Release Profiling // *Int. J. Mol. Sci.* 2012. Vol. 13, № 12. P. 16598–16623.
- [101] Mendez-Gonzalez D., Lopez-Cabarcos E., Rubio-Retama J., Laurenti M. Sensors and bioassays powered by upconverting materials // *Adv. Colloid Interface Sci.* Elsevier, 2017. Vol. 249, № January. P. 66–87.
- [102] Drees C., Raj A.N., Kurre R., Busch K.B., Haase M., Piehler J. Engineered Upconversion Nanoparticles for Resolving Protein Interactions inside Living Cells // *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2016. Vol. 55, № 38. P. 11668–11672.
- [103] Gorris H.H., Resch-Genger U. Perspectives and challenges of photon-upconversion nanoparticles - Part II: bioanalytical applications // *Anal. Bioanal. Chem. Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017. Vol. 409, № 25. P. 5875–5890.
- [104] Sharipov M., Tawfik S.M., Gerelkhuu Z., Huy B., Lee Y.I. Phospholipase A2-Responsive

- Phosphate Micelle-Loaded UCNPs for Bioimaging of Prostate Cancer Cells // *Sci. Rep.* Springer US, 2017. Vol. 7, № 1. P. 1–9.
- [105] Wang L., Yan R., Huo Z., Wang L., Zeng J., Bao J., Wang X., Peng Q., Li Y. Fluorescence resonant energy transfer biosensor based on upconversion-luminescent nanoparticles // *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2005. Vol. 44, № 37. P. 6054–6057.
- [106] Bednarkiewicz A., Nyk M., Samoc M., Streck W. Up-conversion FRET from Er³⁺/Yb³⁺: NaYF₄ nanophosphor to CdSe quantum dots // *J. Phys. Chem. C.* 2010. Vol. 114, № 41. P. 17535–17541.
- [107] Yan C., Dadvand A., Rosei F., Perepichka D.F. Near-IR Photoresponse in New Up-Converting CdSe/NaYF₄:Yb, Er Nanoheterostructures // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. Vol. 132. P. 8868–8869.
- [108] Zhan Q., Wang B., Wen X., He S. Controlling the excitation of upconverting luminescence for biomedical theranostics: neodymium sensitizing // *Opt. Mater. Express.* 2016. Vol. 6, № 4. P. 1011.
- [109] Que Y., Feng C., Lu G., Huang X. Polymer-Coated Ultrastable and Biofunctionalizable Lanthanide Nanoparticles // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2017. Vol. 9, № 17. P. 14647–14655.
- [110] Kadish K.M., Smith K.M., Guillard R. Volume 17/Phthalocyanines: properties and materials // *The porphyrin handbook.* San Diego: Academic Press, 2003.
- [111] Гуринович Г.П., Севченко А.И., Соловьев К.Н. Спектроскопия порфиринов // *Успехи физических наук.* 1963. Vol. 79, № 2. P. 173–234.
- [112] Idowu M., Nyokong T. Photosensitizing properties of octacarboxy metallophthalocyanines in aqueous medium and their interaction with bovine serum albumin // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2008. Vol. 200, № 2–3. P. 396–401.
- [113] Gonçalves P.J., De Boni L., Borissevitch I.E., Zílio S.C. Excited state dynamics of meso-tetra(sulphonatophenyl) metalloporphyrins // *J. Phys. Chem. A.* 2008. Vol. 112, № 29. P. 6522–6526.
- [114] Ogunsipe A., Nyokong T. Photophysicochemical consequences of bovine serum albumin binding to non-transition metal phthalocyanine sulfonates // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2005. Vol. 4, № 7. P. 510.
- [115] Kuznetsova N.A., Gretsova N.S., Derkacheva V.M., Mikhalenko S.A., Solov'eva L.I.,

- Yuzhakova O.A., Kaliya O.L., Luk'yanets E.A. Generation of singlet oxygen with anionic aluminum phthalocyanines in water // *Russ. J. Gen. Chem.* 2002. Vol. 72, № 2. P. 300–306.
- [116] Iqbal Z., Hanack M., Ziegler T. Synthesis of an octasubstituted galactose zinc(II) phthalocyanine // *Tetrahedron Lett.* Elsevier Ltd, 2009. Vol. 50, № 8. P. 873–875.
- [117] Wróbel D., Boguta A. Study of the influence of substituents on spectroscopic and photoelectric properties of zinc phthalocyanines // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2002. Vol. 150, № 1–3. P. 67–76.
- [118] Çakır D., Göksel M., Çakır V., Durmuş M., Biyiklioglu Z., Kantekin H. Amphiphilic zinc phthalocyanine photosensitizers: synthesis, photophysical properties and in vitro studies for photodynamic therapy // *Dalt. Trans.* 2015. Vol. 44, № 20. P. 9646–9658.
- [119] Oleinick N.L., Antunez A.R., Clay M.E., Rihter B.D., Kenney M.E. New Phthalocyanine Photosensitizers for Photodynamic Therapy // *Photochem. Photobiol.* 1993. Vol. 57, № 2. P. 242–247.
- [120] Gonçalves P.J., Corrêa D.S., Franzen P.L., De Boni L., Almeida L.M., Mendonça C.R., Borissevitch I.E., Zílio S.C. Effect of interaction with micelles on the excited-state optical properties of zinc porphyrins and J-aggregates formation // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* Elsevier B.V., 2013. Vol. 112. P. 309–317.
- [121] Maiti N.C., Mazumdar S., Periasamy N. J- and H-Aggregates of Porphyrin–Surfactant Complexes: Time-Resolved Fluorescence and Other Spectroscopic Studies // *J. Phys. Chem. B.* 1998. Vol. 102, № 9. P. 1528–1538.
- [122] Gandini S.C.M., Yushmanov V.E., Borissevitch I.E., Tabak M. Interaction of the Tetra (4-sulfonatophenyl) porphyrin with Ionic Surfactants: Aggregation and Location in Micelles // *Langmuir.* 1999. Vol. 15, № 9. P. 6233–6243.
- [123] Kuznetsova N.A., Bulgakov R.A., Solovyova L.I., Shevchenko E.N., Slivka L.K., Kaliya O.L., Lukyanets E.A. Effect of pH on acid-base and photophysical properties of 2,3,9,10,16,17,23,24-octacarboxyphthalocyanines in aqueous media. 2016. Vol. 9, № 2. P. 186–192.
- [124] Suchan A., Nackiewicz J., Hnatejko Z., Waclawek W., Lis S. Octacarboxyphthalocyanines – compounds of interesting spectral, photochemical and catalytic properties // *Dye. Pigment.* 2009. Vol. 80. P. 239–244.

- [125] Suchan A., Nackiewicz J., Hnatejko Z., Waclawek W., Lis S. Spectral studies of zinc octacarboxyphthalocyanine aggregation // *Dye. Pigment. Elsevier Ltd*, 2009. Vol. 80, № 2. P. 239–244.
- [126] Gandini S.C.M., Yushmanov V.E., Perussi J.R., Tabak M., Borissevitch I.E. Binding of the Mn(III) complex of meso-tetrakis(4-N-methyl- pyridiniumyl) porphyrin to DNA. Effect of ionic strength // *J. Inorg. Biochem.* 1999. Vol. 73, № 1–2. P. 35–40.
- [127] Petrášek Z., Phillips D. A time-resolved study of concentration quenching of disulfonated aluminium phthalocyanine fluorescence // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2003. Vol. 2, № 3. P. 236–244.
- [128] Шинкаренко Н.В., Алесковский В.Б. Химические свойства синглетного молекулярного кислорода и значение его в биологических системах // *Успехи химии.* 1982. Vol. 51, № 5. P. 713–735.
- [129] Taquet J.P., Frochot C., Manneville V., Barberi-Heyob M. Phthalocyanines Covalently Bound to Biomolecules for a Targeted Photodynamic Therapy // *Curr. Med. Chem.* 2007. Vol. 14, № 15. P. 1673–1687.
- [130] Sobolev A.S. Modular nanotransporters of anticancer drugs conferring cell specificity and higher efficiency // *Biochem.* 2009. Vol. 74, № 13. P. 1567–1574.
- [131] Muehlmann L.A., Ma B.C., Longo J.P.F., Almeida Santos M. de F.M., Azevedo R.B. Aluminum-phthalocyanine chloride associated to poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy // *Int. J. Nanomedicine.* 2014. Vol. 9, № 1. P. 1199–1213.
- [132] Rosenthal I. Phthalocyanines As Photodynamic Sensitizers // *Photochem. Photobiol.* 1991. Vol. 53, № 6. P. 859–870.
- [133] Ribeiro A.P.D., Andrade M.C., Bagnato V.S., Vergani C.E., Primo F.L., Tedesco A.C., Pavarina A.C. Antimicrobial photodynamic therapy against pathogenic bacterial suspensions and biofilms using chloro-aluminum phthalocyanine encapsulated in nanoemulsions // *Lasers Med. Sci.* 2015. Vol. 30, № 2. P. 549–559.
- [134] Krasnovsky A.A. Jr. Singlet Molecular Oxygen in Photobiochemical Systems: IR Phosphorescence Studies // *Membr. Cell Biol.* 1998. Vol. 12, № 5. P. 665–690.
- [135] Pasternack R.F., Gibbs E.J., Collings P.J., DePaula J.C., Turzo L.C., Terracina A. A

- nonconventional approach to supramolecular formation dynamics. The kinetics of assembly of DNA-bound porphyrins // *J. Am. Chem. Soc.* 1998. Vol. 120, № 24. P. 5873–5878.
- [136] Ambroz M., MacRobert A.J., Morgan J., Rumbles G., Foley M.S.C., Phillips D. Time-resolved fluorescence spectroscopy and intracellular imaging of disulphonated aluminium phthalocyanine // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 1994. Vol. 22, № 2. P. 105–117.
- [137] El-Far M.A., Pimstone N.R. Selective in Vivo Tumor Localization of Uroporphyrin Isomer I in Mouse Mammary Carcinoma: Superiority over Other Porphyrins in a Comparative Study // *Cancer Res.* 1986. Vol. 46, № 9. P. 4390–4394.
- [138] Tominaga T.T., Yushmanov V.E., Borissevitch I.E., Imasato H., Tabak M. Aggregation phenomena in the complexes of iron tetraphenylporphine sulfonate with bovine serum albumin // *J. Inorg. Biochem.* 1997. Vol. 65, № 4. P. 235–244.
- [139] Pashkovskaya A.A., Perevoshchikova I. V., Maizlish V.E., Shaposhnikov G.P., Kotova E.A., Antonenko Y.N. Interaction of Tetrasubstituted Cationic Aluminum Phthalocyanine with Artificial and Natural Membranes // *Biochemistry.* 2009. Vol. 74, № 9. P. 1021–1026.
- [140] Страховская М.Г., Антоненко Ю.Н., Пашковская А.А., Котова Е.А., Киреев В., Жуховицкий В.Г., Кузнецова Н.А., Южакова О.А., Негримовский В.М., Рубин А.Б. Электростатическое связывание замещенных металлофталоцианинов с клетками энтеробактерий: роль в фотодинамической инактивации // *Биохимия.* 2009. Vol. 74, № 12. P. 1603–1614.
- [141] Selbo P., Høgset A., Berg K., Prasmickaite L. Photochemical Internalisation: A Novel Drug Delivery System // *Tumor Biol.* 2002. Vol. 3. P. 103–112.
- [142] Martinez De Pinillos Bayona A., Mroz P., Thunshelle C., Hamblin M.R. Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers // *Chem. Biol. Drug Des.* 2017. Vol. 89, № 2. P. 192–206.
- [143] Ferster T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz // *Ann. Phys.* 1948. № 437. P. 55–75.
- [144] Clapp A.R., Medintz I.L., Mauro J.M., Fisher B.R., Bawendi M.G., Mattoussi H. Fluorescence Resonance Energy Transfer between Quantum Dot Donors and Dye-Labeled Protein Acceptors // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. Vol. 126, № 1. P. 301–310.
- [145] Borissevitch I.E. More about the inner filter effect: Corrections of Stern-Volmer fluorescence

- quenching constants are necessary at very low optical absorption of the quencher // *J. Lumin.* 1999. Vol. 81, № 3. P. 219–224.
- [146] Orlova A.O., Gubanova M.S., Maslov V.G., Vinogradova G.N., Baranov A. V., Fedorov A. V., Goukko I. Spectral-luminescence properties of the complexes formed by similarly charged CdTe quantum dots and tetrasulfophthalocyanine molecules // *Opt. Spectrosc.* 2010. Vol. 108, № 6. P. 927–933.
- [147] D'Souza S., Antunes E., Nyokong T. Synthesis and photophysical studies of CdTe quantum dot-monosubstituted zinc phthalocyanine conjugates // *Inorganica Chim. Acta. Elsevier B.V.*, 2011. Vol. 367, № 1. P. 173–181.
- [148] Vishratina A.K., Martynenko I. V., Orlova A.O., Maslov V.G., Fedorov A. V., Gun Y.K. Investigation of biocompatible complexes of Mn²⁺ doped ZnS quantum dots with chlorin e6 // *J. Opt. Technol.* 2014. Vol. 81, № 8. P. 444–448.
- [149] Dadadzhanov D.R., Martynenko I. V., Orlova A.O., Maslov V.G., Fedorov A. V., Baranov A. V. The formation of molecular aggregates of sulfophthalocyanine in complexes with semiconductor nanocrystals // *Opt. Spectrosc.* 2015. Vol. 119, № 5. P. 738–743.
- [150] Skripka A., Valanciunaite J., Dauderis G., Poderys V., Kubiliute R., Rotomskis R. Two-photon excited quantum dots as energy donors for photosensitizer chlorin e6 // *J. Biomed. Opt.* 2013. Vol. 18, № 7. P. 78002.
- [151] Keane P.M., Gallagher S.A., Magno L.M., Leising M.J., Clark I.P., Greetham G.M., Towrie M., Gun'ko Y.K., Kelly J.M., Quinn S.J. Photophysical studies of CdTe quantum dots in the presence of a zinc cationic porphyrin // *Dalt. Trans.* 2012. Vol. 41, № 42. P. 13159.
- [152] Suchánek J., Lang K., Novakova V., Zimcik P., Zelinger Z., Kubát P. Photophysical properties of CdSe quantum dot self-assemblies with zinc phthalocyanines and azaphthalocyanines // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2013. Vol. 12, № 5. P. 743.
- [153] Arvani M., Virkki K., Abou-Chahine F., Efimov A., Schramm A., Tkachenko N. V., Lupo D. Photoinduced hole transfer in QD–phthalocyanine hybrids // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2016. Vol. 18, № 39. P. 27414–27421.
- [154] Zhang X., Liu Z., Ma L., Hossu M., Chen W. Interaction of porphyrins with CdTe quantum dots // *Nanotechnology.* 2011. Vol. 22, № 19.
- [155] Moeno S., Nyokong T. Opposing responses elicited by positively charged phthalocyanines in

- the presence of CdTe quantum dots // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2009. Vol. 201, № 2–3. P. 228–236.
- [156] Aly S.M., Ahmed G.H., Shaheen B.S., Sun J., Mohammed O.F. Molecular-Structure Control of Ultrafast Electron Injection at Cationic Porphyrin-CdTe Quantum Dot Interfaces // *J. Phys. Chem. Lett.* 2015. Vol. 6, № 5. P. 791–795.
- [157] Moeno S., Idowu M., Nyokong T. Spontaneous charge transfer between zinc tetramethyl-tetra-2,3-pyridinoporphyrazine and CdTe and ZnS quantum dots // *Inorganica Chim. Acta.* 2008. Vol. 361, № 9–10. P. 2950–2956.
- [158] Dayal S., Królicki R., Lou Y., Qiu X., Berlin J.C., Kenney M.E., Burda C. Femtosecond time-resolved energy transfer from CdSe nanoparticles to phthalocyanines // *Appl. Phys. B Lasers Opt.* 2006. Vol. 84, № 1–2. P. 309–315.
- [159] Vaishnavi E., Renganathan R. “Turn-on-off-on” fluorescence switching of quantum dots–cationic porphyrin nanohybrid: a sensor for DNA // *Analyst.* 2014. Vol. 139, № 1. P. 225–234.
- [160] Idowu M., Chen J.Y., Nyokong T. Photoinduced energy transfer between water-soluble CdTe quantum dots and aluminium tetrasulfonated phthalocyanine // *New J. Chem.* 2008. Vol. 32, № 2. P. 290–296.
- [161] Ahmed G.H., Aly S.M., Usman A., Eita M.S., Melnikov V.A., Mohammed O.F. Quantum confinement-tunable intersystem crossing and the triplet state lifetime of cationic porphyrin–CdTe quantum dot nano-assemblies // *Chem. Commun. Royal Society of Chemistry*, 2015. Vol. 51, № 38. P. 8010–8013.
- [162] Chambrier I., Banerjee C., Remiro-Buenamañana S., Chao Y., Cammidge A.N., Bochmann M. Synthesis of Porphyrin-CdSe Quantum Dot Assemblies: Controlling Ligand Binding by Substituent Effects // *Inorg. Chem.* 2015. Vol. 54, № 15. P. 7368–7380.
- [163] Tshangana C., Nyokong T. Photophysical properties gallium octacarboxy phthalocyanines conjugated to CdSe@ZnS quantum dots // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* Elsevier B.V., 2015. Vol. 151. P. 397–404.
- [164] Moeno S., Antunes E., Khene S., Litwinski C., Nyokong T. The effect of substituents on the photoinduced energy transfer between CdTe quantum dots and mercapto substituted zinc phthalocyanine derivatives. // *Dalt. Trans.* 2010. Vol. 39. P. 3460–3471.
- [165] Moeno S., Antunes E., Nyokong T. The determination of the photosensitizing properties of

- mercapto substituted phthalocyanine derivatives in the presence of quantum dots capped with mercaptopropionic acid // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* Elsevier B.V., 2011. Vol. 218, № 1. P. 101–110.
- [166] Moeno S., Nyokong T. The photophysical studies of a mixture of CdTe quantum dots and negatively charged zinc phthalocyanines // *Polyhedron*. 2008. Vol. 27, № 8. P. 1953–1958.
- [167] Jhonsi M.A., Renganathan R. Investigations on the photoinduced interaction of water soluble thioglycolic acid (TGA) capped CdTe quantum dots with certain porphyrins // *J. Colloid Interface Sci.* Elsevier Inc., 2010. Vol. 344, № 2. P. 596–602.
- [168] Dayal S., Lou Y., Samia A.C.S., Berlin J.C., Kenney M.E., Burda C. Observation of Non-Forster-Type Energy-Transfer Behavior in Quantum Dot - Phthalocyanine Conjugates // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. Vol. 6. P. 13974–13975.
- [169] Dayal S., Li J., Li Y.S., Wu H., Samia A.C.S., Kenney M.E., Burda C. Effect of the functionalization of the axial phthalocyanine ligands on the energy transfer in QD-based donor-acceptor pairs // *Photochem. Photobiol.* 2008. Vol. 84, № 1. P. 243–249.
- [170] Tekdaş D.A., Durmuş M., Yanik H., Ahsen V. Photodynamic therapy potential of thiol-stabilized CdTe quantum dot-group 3A phthalocyanine conjugates (QD-Pc) // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2012. Vol. 93, № March 2012. P. 313–320.
- [171] Lemon C.M., Karnas E., Bawendi M.G., Nocera D.G. Two-Photon Oxygen Sensing with Quantum Dot-Porphyrin Conjugates // *Inorg. Chem.* 2013. Vol. 31, № 9. P. 1713–1723.
- [172] Valanciunaite J., Skripka A., Streckyte G., Rotomskis R. Complex of water-soluble CdSe/ZnS quantum dots and chlorin e6: interaction and FRET // *Laser Appl. Life Sci.* 2010. Vol. 7376. P. 737607-1–7.
- [173] Valanciunaite J., Skripka A., Araminaite R., Kalantojus K., Streckyte G., Rotomskis R. Spectroscopic study of non-covalent complex formation between different porphyrin analogs and quantum dots with lipid-based coating // *Chemija*. 2011. Vol. 22, № 4. P. 181–187.
- [174] Borissevitch I.E., Parra G.G., Zagidullin V.E., Lukashev E.P., Knox P.P., Paschenko V.Z., Rubin A.B. Cooperative effects in CdSe/ZnS-PEGOH quantum dot luminescence quenching by a water soluble porphyrin // *J. Lumin.* Elsevier, 2013. Vol. 134. P. 83–87.
- [175] KURABAYASHI T., FUNAKI N., FUKUDA T., AKIYAMA S., SUZUKI M. CdSe/ZnS Quantum Dots Conjugated with a Fluorescein Derivative: a FRET-based pH Sensor for

Physiological Alkaline Conditions // *Anal. Sci.* 2014. Vol. 30, № 5. P. 545–550.

- [176] Zenkevich E.I., Stupak A.P., Goehler C., Krasselt C., von Borczyskowski C. Tuning Electronic States of a CdSe / ZnS Quantum Dot by Only One Functional Dye Molecule // *ACS Nano*. 2015. Vol. 9, № 3. P. 2886–2903.
- [177] Blaudeck T., Zenkevich E.I., Abdel-Mottaleb M., Szwaykowska K., Kowerko D., Cichos F., Von Borczyskowski C. Formation principles and ligand dynamics of nanoassemblies of CdSe quantum dots and functionalised dye molecules // *ChemPhysChem*. 2012. Vol. 13, № 4. P. 959–972.
- [178] Zenkevich E.I., Blaudeck T., Shulga A.M., Cichos F., von Borczyskowski C. Identification and assignment of porphyrin-CdSe hetero-nanoassemblies // *J. Lumin.* 2007. Vol. 122–123, № 1–2. P. 784–788.
- [179] Orlova A.O., Martynenko I. V., Maslov V.G., Fedorov A. V., Gun'ko Y.K., Baranov A. V. Investigation of complexes of CdTe quantum dots with the AlOH-sulphophthalocyanine molecules in aqueous media // *J. Phys. Chem. C*. 2013. Vol. 117, № 44. P. 23425–23431.
- [180] Britton J., Antunes E., Nyokong T. Fluorescence studies of quantum dots and zinc tetraamino phthalocyanine conjugates // *Inorg. Chem. Commun. Elsevier B.V.*, 2009. Vol. 12, № 9. P. 828–831.
- [181] Britton J., Antunes E., Nyokong T. Fluorescence quenching and energy transfer in conjugates of quantum dots with zinc and indium tetraamino phthalocyanines // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2010. Vol. 210, № 1. P. 1–7.
- [182] Chidawanyika W., Litwinski C., Antunes E., Nyokong T. Fluorescence quenching and energy transfer in conjugates of quantum dots with zinc and indium tetraaminot-low symmetry phthalocyanine conjugate // *J. Photochem. Photobiol. A Chem. Elsevier B.V.*, 2010. Vol. 212, № 1. P. 27–35.
- [183] D'Souza S., Antunes E., Litwinski C., Nyokong T. Photophysical behavior of zinc monoaminophthalocyanines linked to mercaptopropionic acid-capped CdTe quantum dots // *J. Photochem. Photobiol. A Chem. Elsevier B.V.*, 2011. Vol. 220, № 1. P. 11–19.
- [184] Charron G., Stuchinskaya T., Edwards D.R., Russell D.A., Nann T. Insights into the mechanism of quantum dot-sensitized singlet oxygen production for photodynamic therapy // *J. Phys. Chem. C*. 2012. Vol. 116, № 16.

- [185] Adegoke O., Khene S., Nyokong T. Fluorescence “switch on” of conjugates of CdTe@ZnS quantum dots with Al, Ni and Zn tetraamino-phthalocyanines by hydrogen peroxide: Characterization and applications as luminescent nanosensors // *J. Fluoresc.* 2013. Vol. 23, № 5. P. 963–974.
- [186] Wojdyr M. Fityk: A general-purpose peak fitting program // *J. Appl. Crystallogr.* 2010. Vol. 43, № 5 PART 1. P. 1126–1128.
- [187] Kubin R.F., Fletcher A.N. Fluorescence quantum yields of some rhodamine dyes // *J. Lumin.* 1982. Vol. 27, № 4. P. 455–462.
- [188] Макаров Д.А., Кузнецова Н.А., Южакова О.А., Саввина Л.П., Калия О.Л., Лукьянец Е.А., Негримовский В.М., Страховская М.Г. Влияние степени замещения поликатионных фталоцианинов цинка и алюминия на их физико-химические свойства и фотодинамическую активность // *Журнал физической химии.* 2009. Vol. 83, № 6. P. 1183–1190.
- [189] Nackiewicz J., Kliber M. Synthesis and selected properties of metallo and metal-free 2,3,9,10,16,17,23,24-octacarboxyphthalocyanines // *Rev. Accounts.* 2015. Vol. 2015, № 1. P. 269–299.
- [190] Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов. Москва: Дрофа, 2006. 285 p.
- [191] Valeur B. *Molecular Fluorescence. Principles and Applications.* 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2002. 437 p.
- [192] Becker W., Benndorf K., Bergmann A., Biskup C., König K., Tirlapur U., Zimmer T. FRET measurements by TCSPC laser scanning microscopy // *Proc. SPIE.* 2001. Vol. 4431. P. 94–98.
- [193] Du H., Fuh R.C.A., Li J., Corkan L.A., Lindsey J.S. PhotochemCAD: A Computer-Aided Design and Research Tool in Photochemistry // *Photochem. Photobiol.* 1998. Vol. 68, № 2. P. 141–142.
- [194] Krieg M. Determination of singlet oxygen quantum yields with 1,3-diphenylisobenzofuran in model membrane systems // *J. Biochem. Biophys. Methods.* 1993. Vol. 27. P. 143–149.
- [195] Nakamura K., Ishiyama K., Ikai H., Kanno T., Sasaki K., Niwano Y., Kohno M. Reevaluation of analytical methods for photogenerated singlet oxygen // *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2011. Vol. 49, № 2. P. 87–95.

- [196] Kraljic I., Moshni S.E. A new method for the detection of singlet oxygen in aqueous solutions // *Photochem. Photobiol.* 1978. Vol. 28. P. 577–581.
- [197] Куликов К.Г., Кошлан Т.В. Определение размеров коллоидных частиц при помощи метода динамического рассеяния света // *Журнал технической физики.* 2015. Vol. 85, № 12. P. 26–32.
- [198] Ермаков Ю.А. Равновесие ионов вблизи липидных мембран - эмпирический анализ простейшей модели // *Коллоидный журнал.* 2000. Vol. 62. P. 437–449.
- [199] Plohl O., Kraft M., Kovač J., Belec B., Ponikvar-Svet M., Würth C., Lisjak D., Resch-Genger U. Optically detected degradation of NaYF₄:Yb,Tm-based upconversion nanoparticles in phosphate buffered saline solution // *Langmuir.* 2017. Vol. 33, № 2. P. 553–560.
- [200] Watkins Z., Uddin I., Britton J., Nyokong T. Characterization of conjugates of NaYF₄:Yb,Er,Gd upconversion nanoparticle with aluminum phthalocyanines // *J. Mol. Struct. Elsevier Ltd,* 2017. Vol. 1130. P. 128–137.
- [201] Su Q., Feng W., Yang D., Li F. Resonance energy transfer in upconversion nanoplatforms for selective biodetection // *Acc. Chem. Res.* 2017. Vol. 50, № 1. P. 32–40.
- [202] Devonshire R., Fowler G.J.S. Photobleaching of 1,3-diphenylisobenzofuran by novel phthalocyanine dye derivatives // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 1992. Vol. 14. P. 177–185.
- [203] Lakowicz J.R., Gratton E., Cherek H., Maliwal B.P., Laczko G. Determination of time-resolved fluorescence emission spectra and anisotropies of a fluorophore-protein complex using frequency-domain phase-modulation fluorometry // *J. Biol. Chem.* 1984. Vol. 259, № 17. P. 10967–10972.
- [204] Orekhov P.S., Kholina E.G., Bozdaganyan M.E., Nesterenko A.M., Kovalenko I.B., Strakhovskaya M.G. Molecular Mechanism of Uptake of Cationic Photoantimicrobial Phthalocyanine across Bacterial Membranes Revealed by Molecular Dynamics Simulations // *J. Phys. Chem. B.* 2018. Vol. 122, № 14. P. 3711–3722.
- [205] Красильников П.М., Лукашев Е.П., Нокс П.П., Сейфуллина Н.Х., Рубин А.Б. ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ ОТ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК К ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИМ РЕАКЦИОННЫМ ЦЕНТРАМ RB. SPHAEROIDES В ДИАПАЗОНЕ ТЕМПЕРАТУР 100-310 К // *Биофизика.* 2018. Vol. 63, № 6. P. 1111–1123.
- [206] Aggarwal L.P.F., Borissevitch I.E. On the dynamics of the TPPS4 aggregation in aqueous

- solutions: Successive formation of H and J aggregates // *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2006. Vol. 63, № 1. P. 227–233.
- [207] Parra G.G., Borissevitch G., Borissevitch I.E., Ramos A.P. Quantum dot effects upon the interaction between porphyrins and phospholipids in cell membrane models // *Eur. Biophys. J.* 2015. Vol. 45, № 3. P. 219–227.
- [208] Jeffrey P.D., Bewley M.C., MacGillivray R.T.A., Mason A.B., Woodworth R.C., Baker E.N. Ligand-induced conformational change in transferrins: Crystal structure of the open form of the N-terminal half-molecule of human transferrin // *Biochemistry.* 1998. Vol. 37, № 40. P. 13978–13986.
- [209] Jin Z.J. Additivity effect of drug combination // *Zhong Guo Yao Li Xue Bao.* 1980. Vol. 1. P. 70–76.