

УЧРЕЖДЕНИЕ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
ИНСТИТУТ ФИЗИЧЕСКОЙ ХИМИИ И ЭЛЕКТРОХИМИИ

ИМ. А.Н. ФРУМКИНА

На правах рукописи

КОНСТАНТИНОВА АННА НИКОЛАЕВНА

**ФОТОСЕНСИБИЛИЗИРОВАННОЕ ОКИСЛЕНИЕ ДИПОЛЬНЫХ
МОЛЕКУЛ НА ПОВЕРХНОСТИ БИСЛОЙНОЙ ЛИПИДНОЙ
МЕМБРАНЫ**

Специальность 03.01.02 - Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
доктор физико-математических наук,
ведущий научный сотрудник
Валерий Сергеевич Соколов

Москва – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений	4
Введение	5
Глава 1. Литературный обзор	
1.1. Фотодинамическая терапия рака	10
1.1.1. Исторический аспект	10
1.1.2. Физико-химический аспект	12
1.1.3. Биологический аспект	14
1.2. Фотосенсибилизаторы	
1.2.1. Порфирины и фталоцианины	16
1.2.2. Квантовый выход синглетного кислорода: влияние выбора молекулы-мишени, длины облучаемого света и состава среды	21
1.2.3. Связывание фталоцианинов и порфиринов с поверхностью мембраны	25
1.2.4. Фотодинамическая активность связанных с мембраной фотосенсибилизаторов	27
1.2.5. Локализация кислорода в мембране	30
1.3. Электростатические потенциалы, возникающие при связывании с мембраной заряженных и нейтральных молекул	31
1.3.1. Распределение электростатического поля в мембране	32
1.3.2. Межфазные потенциалы, возникающие при адсорбции алюмофталоцианинов и стироловых красителей	34
1.3.3. Использование БЛМ для моделирования фотодинамических реакций	40
1.3.4. Постановка задачи	41
Глава 2. Материалы и методы	
2.1. Материалы	43
2.2. Предполагаемые подходы и методы	45
2.2.1. Измерение граничного потенциала с помощью метода компенсации внутримембранного поля (КВП)	45
2.2.2. Описание установки, используемой в методе КВП	47

2.2.3. Измерение ζ -потенциала по электрофоретической подвижности липосом	48
Глава 3. Экспериментальная часть	
3.1. Тест-система для моделирования фотодинамических реакций	50
3.1.1. Модель фотодинамических реакций	50
3.1.2. Адсорбция стироловых красителей на поверхность мембраны	52
3.1.3. Кинетическая модель разрушения стироловых красителей	54
3.1.4. Выбор молекулы мишени	61
3.2. Фотодинамические свойства разносульфированных алюмофталоцианинов	63
3.3. Изучение адсорбционных и фотодинамических свойств тетрасульфированного безметального порфирина	71
3.3.1. Адсорбционные свойства порфирина при нейтральном pH	71
3.3.2. Зависимость заряда мембраны от pH	73
3.3.3. Адсорбция тетрасульфированного порфирина при разных pH	75
3.3.4. Адсорбция di-4-ANEPPS при разных pH	78
3.3.5. Фотодинамические свойства порфирина при различных pH	79
3.4. Фотодинамическая активность метиленового синего	82
Заключение	85
Выводы	86
Список литературы	88

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ФДТ – фотодинамическая терапия рака

ФС – фотосенсибилизатор

AlPcS_n – сульфированные алюмофталоцианины

TPPS₄ – тетрасульфированные порфирин

¹O₂ – синглетный кислород

DPhPC – дифитаноилфосфатидилхолин

GMO - глицеролмоноолеат

БЛМ – бислойная липидная мембрана

Δφ_b – разность граничных потенциалов

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Метод фотодинамической терапии (ФДТ) широко применяется для лечения опухолей, а также в качестве средства дезактивации микроорганизмов, что может служить альтернативой применению антибиотиков. В основе данного метода лежит способность фотосенсибилизаторов (ФС) при освещении видимым светом генерировать активные формы кислорода, главным образом, синглетный кислород ($^1\text{O}_2$). При освещении ФС разрушают жизненно важные молекулы клеток опухолей или микроорганизмов, что приводит к их гибели.

Несмотря на то, что метод ФДТ развивался в течение столетия, настоящий успех начался в 1993 году с первого препарата, запатентованного под торговым названием Фотофрин, который сразу же был одобрен в нескольких странах для лечения определенных типов рака. Фотофрин все еще используется в клинической практике, хотя известны некоторые его отрицательные свойства. Для улучшения метода ФДТ продолжается поиск новых препаратов, и в настоящее время синтезируется большое количество различных порфиринов и других соединений схожей структуры, которые рассматриваются в качестве потенциальных ФС. Направленный поиск новых ФС требует понимания влияния структуры молекул на эффективность ФДТ.

Эффективность ФДТ определяется способностью ФС специфично накапливаться в опухолевых клетках, связываться с мембранными структурами клеток и окислять липиды и белки, входящих в их состав. Для улучшения метода необходимы исследования по определению как структурных факторов, увеличивающих фотодинамическую активность ФС на поверхности мембраны, так и механизмов фотосенсибилизированного окисления компонент клеточной мембраны.

Подобные исследования на клетках (*in vitro*) и интерпретация полученных результатов вызывают определенные трудности ввиду сложности этих биологических объектов. С другой стороны, результаты исследований ФС в

растворе не всегда применимы к клеточным структурам, поскольку свойства мембранно-связанных ФС могут отличаться от таковых в растворе. Это обусловлено большим временем жизни синглетного кислорода в гидрофобной части бислоя, процессами дезагрегации ФС, происходящих в присутствии мембранных структур, фиксированным взаимным расположением ФС и мишеней синглетного кислорода в мембране. В связи с этим для изучения активности мембранно-связанных ФС разрабатываются модельные системы.

В данной работе предложен оригинальный метод изучения адсорбции и фотодинамической активности ФС на бислойной липидной мембране (БЛМ), моделирующей клеточную мембрану. Он основан на измерении скачков потенциала на границе мембраны с раствором. Данный способ позволяет не только исследовать связывание ФС с мембраной, но и оценивать их фотодинамическую активность. Для этого определяется скорость окисления различных встроенных в мембрану мишеней синглетного кислорода в присутствии исследуемых ФС. Разработанная тест-система позволяет не только решить поставленные в работе задачи, но может дополнить список методов для оценки и отбора наиболее перспективных ФС.

Степень разработанности темы. Подробному описанию свойств разрабатываемых, исследуемых и применяемых в России и за рубежом фотосенсибилизаторов (ФС) для фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики опухолей посвящено большое количество обзоров и статей. Большинство исследований этих соединений проводятся либо в культуре клеток, либо в растворах, что не позволяет получить детальную информацию об адсорбционных и фотодинамических свойствах ФС на мембране. Существует ряд работ, в которых были проведены исследования по изучению данных свойств на модельных системах: сурфактантах, липосомах, ленгмюровских монослоях и плоских бислойных липидных мембранах. Методы определения фотодинамической активности ФС на модельных мембранах различаются, в основном, выбором мишеней фотодинамического действия и способом регистрации их окисления. В проведенных ранее работах установлена важная

роль связывания ФС с мембраной в эффективности фотодинамического окисления мембранных компонентов; значительное влияние на эффективность оказывают положение и ориентация молекул ФС на поверхности мембраны. Однако, использованные ранее методы не позволяли количественно охарактеризовать влияние на фотодинамические процессы сродства исследуемых соединений к мембране, а также взаимного расположения молекул мишени и фотосенсибилизатора на поверхности мембраны. В данной работе предложена система, позволяющая изучить влияние данных параметров на фотодинамическую активность мембранно-связанных ФС.

Цель диссертационной работы заключается в разработке тест-системы для оценки фотодинамической эффективности фотосенсибилизаторов на мембране и определении влияния на эффективность положения и ориентации связанных с мембраной фотосенсибилизаторов.

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

1. Исследование влияния положения и ориентации ФС на мембране на их фотодинамическую эффективность на примере разносульфированных алюмофталоцианинов и тетрасульфированного порфирина.
2. Изучение влияния строения молекул-мишеней на их способность к окислению синглетным кислородом на примере стироловых красителей серий ANEPPS и RH.
3. Изучение влияния взаимной локализации фотосенсибилизатора и мишени относительно мембраны на фотодинамическую эффективность.
4. Определение механизмов тушения синглетного кислорода в мембране молекулами-мишенями.

Объект и предмет исследований. Объектом исследования являются фотосенсибилизаторы, использующиеся в клинической практике в методе фотодинамической терапии для лечения рака. Предметом исследования являются фотодинамическая активность данных соединений на поверхности мембраны.

Научная новизна. С помощью разработанных оригинальных методов впервые удалось продемонстрировать влияние положения и ориентации связанных с

мембраной ФС на их фотодинамическую активность. В частности, показано, что молекулы ФС, сильнее погружающиеся в бислой, обладают большей эффективностью. В то же время, расположение и ориентация хромофорного кольца ФС в мембране оказывают существенное влияние на тушение синглетного кислорода молекулами как самих ФС, так и мишеней.

Теоретическая и практическая значимость. Теоретическая значимость данной работы состоит в определении влияния положения и ориентации фотосенсибилизаторов на поверхности мембраны на их фотодинамическую активность, а также в определении механизмов фотодинамического окисления стироловых красителей, встроенных в БЛМ. Практическая значимость работы состоит в разработке тест-системы для изучения взаимодействия ФС с БЛМ с помощью оригинального метода измерения разности граничных потенциалов бислойной липидной мембраны, которая позволяет сравнивать эффективность ФС различной структуры, а также влияние на нее внешних условий (липидного состава мембраны, pH, ионной силы раствора). Итоги работы могут способствовать созданию новых более эффективных лекарственных препаратов.

Методология диссертационного исследования. Работа носит экспериментальный характер. Основным методом экспериментального исследования является метод компенсации внутримембранного электрического поля, который позволяет измерять скачок электрического потенциала на границе мембраны. Данный метод позволяет изучать адсорбцию и фотодинамическое разрушение заряженных и дипольных молекул на БЛМ.

Положения, выносимые на защиту.

1. Разработана тест-система для оценки фотодинамической эффективности фотосенсибилизаторов, адсорбированных на липидный бислой;
2. Определено влияние положения и ориентации ФС на мембране на их фотодинамическую активность;
3. Выявлено влияние взаимной локализации ФС и мишеней синглетного кислорода на разрушение последних;

4. Охарактеризован процесс "тушения" синглетного кислорода молекулами-мишенями.

Достоверность результатов обеспечивается корректной постановкой задачи; применением в эксперименте адекватных методов компенсации мембранного поля и корреляционного светорассеяния, позволивших изучить процессы адсорбции различных молекул на поверхности мембранных систем; достаточным количеством повторяемых экспериментов; соответствием полученных в эксперименте результатов и выводов данным, ранее опубликованным в литературе, а также предсказаниям теоретической модели.

Личный вклад. Автор диссертации принимал непосредственное участие в обосновании и разработке всех основных этапов формулирования цели и задач исследования, поиске и анализе литературных данных, в планировании и проведении научных экспериментов, обработке и анализе полученных результатов, формулировании выводов, а также в подготовке публикаций и докладов на научных конференциях.

Публикации. Автором опубликовано всего 7 статей, из них по теме диссертации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science, Scopus, RSCI – 4 статьи.

Апробация работы. Результаты работы доложены на 9 российских и международных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, трех глав, заключения, основных результатов, выводов и списка литературы. Работа изложена на 101 странице, содержит 32 рисунка и 5 таблиц. Библиография включает 120 источников.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Фотодинамическая терапия рака

1.1.1. Исторический аспект

Концепция фотодинамической терапии восходит к 1900 году, когда студент-медик Оскар Рааб обнаружил, что микроорганизмы парамеции, которые были инкубированы определенными красителями, такими как акридин, фенилакредин, эозин в нетоксичных и малотоксичных концентрациях (в темноте), под влиянием солнечного света погибают [1]. Когда впоследствии было установлено, что кислород также необходим для возникновения этого опосредованного светом убивающего эффекта, был введен термин «фотодинамическое действие». Основателем фототерапии считается датский физик Нильс Финсен, который провел первые медицинские исследования в области применения солнечного света или света, получаемого от угольной дуги, для лечения туберкулезной волчанки, за что в 1903 г. получил Нобелевскую премию. Несмотря на успех этих опытов, метод развивался крайне медленно.

Современный этап развития ФДТ начался с 1960-х годов с исследований Ричарда Липсона, который показал, что введение онкологическим больным препарата, содержащий частично очищенную смесь производных гематопорфирина, полученную путем обработки гематопорфирина смесью серной и уксусной кислот с последующим щелочным гидролизом, позволяет регистрировать флуоресценцию опухолей [2]. Широкое клиническое применение ФДТ началось в 1970-х годах в США, во многом благодаря усилиям доктора Томаса Догерти, который был первым врачом, применившим и опубликовавшим клинические результаты проведения ФДТ злокачественных новообразований различных локализаций [3]. Это вызвало интерес у исследователей по всему миру и положило начало широкому применению данного метода в клинической практике. В 1993 году использованная Т. Догерти очищенная смесь производных

гематопорфиринов стала первым запатентованным препаратом, под торговым названием «Фотофрин», который был одобрен в нескольких странах для лечения определенных типов рака. Позднее появились другие препараты на основе производных гематопорфирина, которые используются в медицинской практике в настоящее время под торговыми названиями «Фотосан» (Германия) и «Фотогем» (Россия). Эти препараты представляют собой смесь мономерных, димерных и олигомерных порфиринов.

Хотя «Фотофрин» по-прежнему является наиболее часто используемым ФС во всем мире, он имеет множество признанных недостатков, включая трудности при фармацевтической стандартизации (поскольку представляет собой смесь веществ), светочувствительность кожи, которая может сохраняться в течение недель или месяцев и может сильно беспокоить пациентов, а также относительно небольшой пик поглощения при 630 нм, что делает его неэффективным в случае объемных опухолей, проникновение света в которых проблематично. Это побудило к поиску лучших новых фотосенсибилизаторов, некоторые из которых получили клиническое одобрение. Были синтезированы химически чистые соединения, имеющие высокий максимум поглощения на 650-750 нм. и обладающие меньшей фототоксичностью: 1) производные хлорофилла и бактериохлорофилла: феофорбид а, бактериохлорофилл а, хлорин е, лизин-хлорин е и др., которые в клинической практике запатентованы под коммерческими названиями «Тукад», «Хлорин еб», «Фоскан», «Фотохлорин», «Фотодитазин», «Радахлорин» и «Фотолон»; 2) тетраазопорфирины: фталоцианины и нафталоцианины, наиболее известный запатентованный препарат на основе соединений данной группы – «Фотосенс».

Несомненно, каждый из синтезированных препаратов обладает весомыми преимуществами, но они имеют и ряд недостатков: сложные и дорогостоящие процессы синтеза («Тукад», «Хлорин еб», лизин-хлорин е, «Фотодитазин»), фототоксичность («Фотодитазин», «Фотосенс»), гидрофобность («Тукад», «Фоскан»), недостаточная химическая устойчивость (лизин-хлорин е, «Тукад»), невысокая селективность накопления препарата в опухолевых клетках

(«Фотосенс»), неоднородная структура («Радахлорин»). В связи с наличием этих недостатков, многие из данных ФС являются узконаправленными и используются для лечения только определенных форм злокачественных новообразований.

Сложность создания новых препаратов связана с большим количеством предъявляемых к ним требований. «Идеальный» фотосенсибилизатор должен иметь максимум поглощения между 650 и 780 нм., для того, чтобы избежать параллельного поглощения света эндогенными красителями, включая оксигемоглобин, дезоксигемоглобин, меланин, цитохромы и т.д, и молекулами воды. Еще одним критерием для применения фотосенсибилизатора является его устойчивость к окислению синглетным кислородом $^1\text{O}_2$ или другими активными формами кислорода, образующимися в процессе жизнедеятельности [4,5]. Также ФС должен иметь высокий квантовый выход синглетного кислорода и обладать достаточной растворимостью. ФС должен избирательно накапливаться в опухолях и быстро выводиться из организма. Хотя точные механизмы «эффекта локализации» не изучены, некоторые ФС способны достигать накопления в опухолях в соотношении 5:1 по сравнению с окружающей тканью. В настоящее время ведется большое количество исследований с целью получить ФС, максимально отвечающий данным требованиям.

1.1.2. Физико-химический аспект

Фотосенсибилизаторы (ФС) – класс синтетических или природных соединений, способные поглощать свет, переходя в возбужденное состояние, и передавать поглощенную энергию молекулам кислорода или других веществ, индуцируя химические реакции. Поглотив квант света, молекула переходит в короткоживущее возбужденное синглетное состояние (10^{-9} - 10^{-7} с.). Поскольку возбужденное состояние энергетически невыгодно, то молекула стремится вернуться в основное состояние: она способна излучить энергию (флуоресцировать), рассеять энергию или распасться на части, а может перейти в триплетное долгоживущее состояние в случае интеркомбинационной конверсии. В

случае ФС высокий квантовый выход триплетного состояния достигается за счет наличия эффективного сопряжения π -орбиталей хромофора и повышенного спин-орбитального взаимодействия, которое обеспечивается путем введения атомов металлов, таких как Zn, Al, Cu и др.

Находясь в триплетном состоянии, соединения могут рассеять энергию, фосфоресцировать или вступить в химическую реакцию. Вследствие запрета излучательного перехода между состояниями с различной мультиплетностью, время жизни $^3\text{ФС}$ в триплетном состоянии может достигать 10^{-4} с., что увеличивает вероятность его взаимодействия с другими молекулами. Наибольший интерес представляют те реакции, которые приводят к образованию свободных радикалов и активных форм кислорода (АФК), поскольку именно это дало возможность использования данных соединений для лечения и диагностики раковых заболеваний. К таким реакциям относятся: 1) реакции передачи электрона и протона окружающим молекулам (механизм I типа), в результате которой образуются гидроксид-ион OH^\cdot , высокоактивный супероксид анион $\text{O}_2^{\cdot-}$ и перекись водорода H_2O_2 ; 2) реакции передачи энергии молекулярному кислороду с образованием синглетного кислорода $^1\text{O}_2$.

Образовавшиеся молекулы АФК, взаимодействуя с компонентами клеточных мембран, способны разрушить ее. Несмотря на то, что все АФК весьма токсичны, полагают, что наибольший вклад по механизму I типа вносит именно радикал OH^\cdot , который способен проникать через биологические мембраны и инициировать перекисное окисление липидов [6, 7]. Молекула $^1\text{O}_2$ при взаимодействии с ненасыщенными жирными кислотами присоединяется непосредственно к атому углерода двойной связи, образуя гидропероксид [9]. Однако, гидропероксиды липидов стабильны при комнатной температуре и при отсутствии в реакционной среде металлов. Повышение температуры или появление свободных радикалов и переходных металлов запускает цепную реакцию перекисного окисления [10]. Когда окислительной деградации подвергается значительная часть фосфолипидов, то липидная фаза становится более ригидной. Это ограничивает конформационную подвижность бислоя, что приводит к снижению

функциональной активности ферментов, репторов, белков [118], вызывая гибель клетки. С другой стороны, $^1\text{O}_2$ способен повреждать ароматические аминокислоты, входящие в состав белков (цистеин, метионин, тирозин, гистидин и триптофан) [8, 117], что тоже приводит к потере их активности. В настоящее время предполагается, что реакции I и II типа могут протекать одновременно и вклад этих реакций зависит от ФС, субклеточной локализации, типа окисляемого субстрата и концентрация кислорода [11].

Таким образом, эффективность ФС, главным образом, определяется эффективностью переноса электрона или возбуждения от молекулы ФС к окружающим молекулам и/или кислороду.

1.1.3. Биологический аспект

Специфичное накопление ФС в раковых клетках является одним из наиболее важных явлений, лежащих в основе полезности ФДТ, и одна из самых больших её проблем. Данный факт связан с коротким периодом полураспада $^1\text{O}_2$, измеряемого в наносекундах, поскольку цитотоксическая молекула может диффундировать в клетках только на расстояние до 20 нм [12]. Следовательно, субклеточная локализация фотосенсибилизатора определяет, какие органеллы (митохондрии, лизосомы, эндоплазматический ретикулум, плазматические мембраны и т. д.) повреждаются в первую очередь. Считается, что локализация ФС в различных органеллах играет важную роль в выборе типа механизма гибели клеток: апоптоз, некроз и аутофагия. На практике такие механизмы дифференциальной гибели клеток, вызванные ФДТ, можно в основном наблюдать *in vitro* при определенных концентрациях фотосенсибилизатора и плотности энергии света. *In vivo* ситуация более сложная, и разрушение опухоли, вероятно, является результатом сочетания апоптотической и некротической гибели клеток.

После того, как ФС вводится в кровоток, происходит череда событий, для завершения которых может потребоваться разное время для различных ФС. Сначала ФС должен прийти в равновесие с компонентами крови, что включает

процессы дезагрегации ФС и связывание с белковыми компонентами сыворотки, которые доставляют ФС в разные области опухоли. Тип «транспорта» зависит от химических свойств ФС (в частности гидрофобности). Было показано, что гидрофобные фотосенсибилизаторы, такие как $AlPcS_1$, $AlPcS_2$, связываются с липопротеинами и локализуются преимущественно в клетках паренхимы опухолевой ткани, в то время как более гидрофильные препараты, таких как $TPPS_4$ и $AlPcS_4$, связываются с альбумином или глобулинами и накапливаются преимущественно в сосудистой строме [115]. Экспериментально показана важность не только разрушения клеток опухоли, но и разрушения кровеносной системы (эндотелий или другие компоненты кровеносных стенок) и/или внеклеточного матрикса [116]. Высокая эффективность действие ФДТ является результатом двойной локализации ФС, при котором происходит как разрушение как стромального, так и паренхиматозное отдела опухоли [115].

Поскольку сосудистая сеть и опухоль состоят из отдельных клеток, идентификация субклеточной локализации является актуальным вопросом. Эксперименты *in vitro* для гидрофильных ФС показали гранулированную внеядерную картину локализации, соответствующую локализации в лизосомах [13, 14], в то время как гидрофобные ФС накапливаются преимущественно во внутриклеточных локусах, митохондриальных, липосомальных и плазматических мембранах [15]. В общем, фотосенсибилизированное разрушение мембран проявляется в виде набухания клеток [16], выделения везикул, содержащих фермента-маркеры плазматической мембраны, цитозольных и лизосомальных ферментов [17, 18], деполяризации плазматической мембраны [19], ингибировании активности ферментов плазматической мембраны, таких как Na^+/K^+ -АТФаза и Mg^{2+} -АТФаза [20], и окисления липидов [21, 22]. В частности, в случае $AlPcS_1$ и $AlPcS_2$ продемонстрировано существенное разрушение цитоплазматической мембраны, приводящее к утечке цитоплазматических и других клеточных компонент через «дыры» в мембране клеток, при ФДТ [23].

Таким образом, не зависимо от места локализации, проникая внутрь опухоли, ФС накапливаются в областях с мембранными структурами. Вопрос о мишенях

синглетного кислорода при разрушении мембраны остается открытым, нет сомнений в возможности повреждения как белков, так и липидов, поскольку оба этих процесса наблюдались *in vitro*.

В настоящее время для улучшения ФДТ проводят эксперименты по соединению уже известных ФС с носителями, обеспечивающими целенаправленную доставку лекарственных препаратов к опухолевым клеткам. Была предложена идея по соединению различных фотосенсибилизаторов с биомолекулами (белками, в частности антителами, липопротеинами низкой плотности; нуклеиновыми кислотами и др.), транспортными везикулами (лизосомами, или синтетически сенсibilизированными переносчиками, такими как циклодекстрим и каликсарен), наночастицами и наноструктурами (золото, графен, фуллерен, диоксид титана и т.д.), которые имеют селективность по отношению к раковым клеткам [24-29]. К сожалению, пока эти исследования не увенчались успехом, и специфическое накопление ФС в раковых клетках - одна из главных проблем современной ФДТ.

1.2. Фотосенсибилизаторы

1.2.1. Порфирины и фталоцианины

Большинство ФС, используемых в настоящее время для ФДТ, представляют собой циклические тетрапиррольные структуры: порфирины и их аналоги, хлорины, бактериохлорины, фталоцианины и др. Их достоинства и недостатки подробно рассмотрены в [8]. В связи с этим, остановимся подробно только на некоторых нюансах, акцентируя внимание на соединениях, которые будут использованы в данном исследовании: сульфированные алюмофталоцианины ($AlPcS_n$) и тетрасульфированный порфирин TPPS₄ (рис. 1).

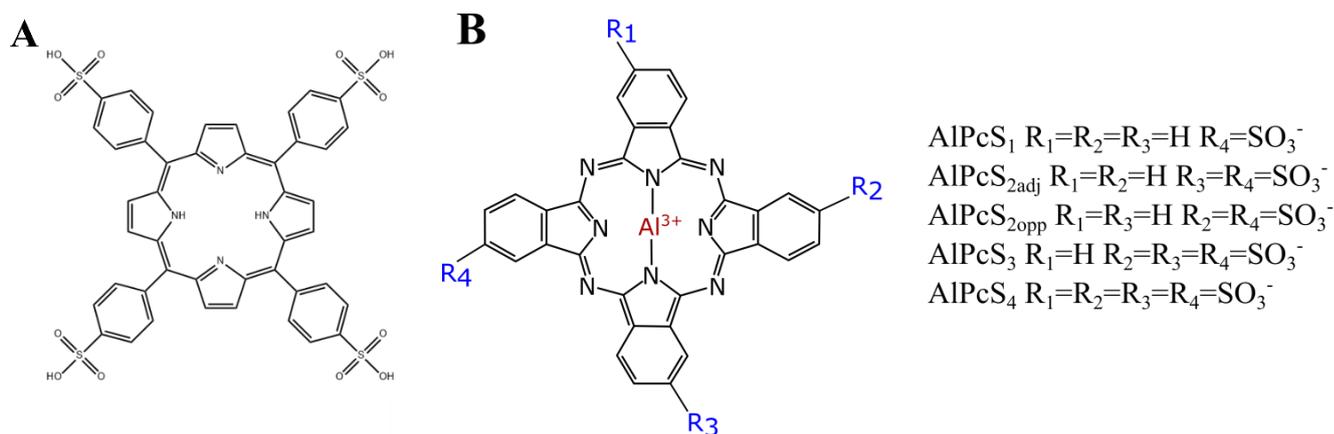


Рисунок 1. Структуры: А) $TPPS_4$ и В) $AlPcS_n$.

Фталоцианины обычно ассоциируются с порфиринами из-за сходства их структур. Ароматический цикл фталоцианина (рис. 2) представляет собой четыре изоиндольных звена, связанных атомами азота в азоположении, в то время как порфириновое макрокольцо состоит из четырех пиррольных звеньев, связанных посредством метиновых мостиков $-CH=$. Фталоцианины, по сравнению с порфиринами, имеют более сопряженную кольцевую структуру (из-за наличия четырех дополнительных фенильных групп), что приводит к сильному поглощению излучения с большей длиной волны, чем порфирины: $\epsilon^{670} = 10^5 M^{-1} cm^{-1}$ (примерно в 50 раз выше, чем у производных гематопорфирина в том же диапазоне абсорбции) [30].

В безметальной форме кольцо порфиразина содержит два водорода, которые называются пиррольными [31]. С увеличением кислотности возможно протонирование центра порфиринового кольца двумя протонами, что приводит к появлению частичного положительного заряда в этом регионе и изменению конформации макрокольца от плоской до седлообразной. Данный феномен был продемонстрирован для тетрасульфированного безметального порфирина ($TPPS_4$) [32]. Значения pK для первого и второго присоединенного атома водорода очень близки к значению 4,8 и могут быть уменьшены при добавлении соли в раствор порфирина: изменение концентрации $NaCl$ до 0,4 М изменяет pK до 4,5 [33, 38]. Авторы предполагают, что это связано с образованием “облака” ионов Na^+ вокруг

молекулы порфирина, которое и определяет значения рК как функцию концентрации соли.

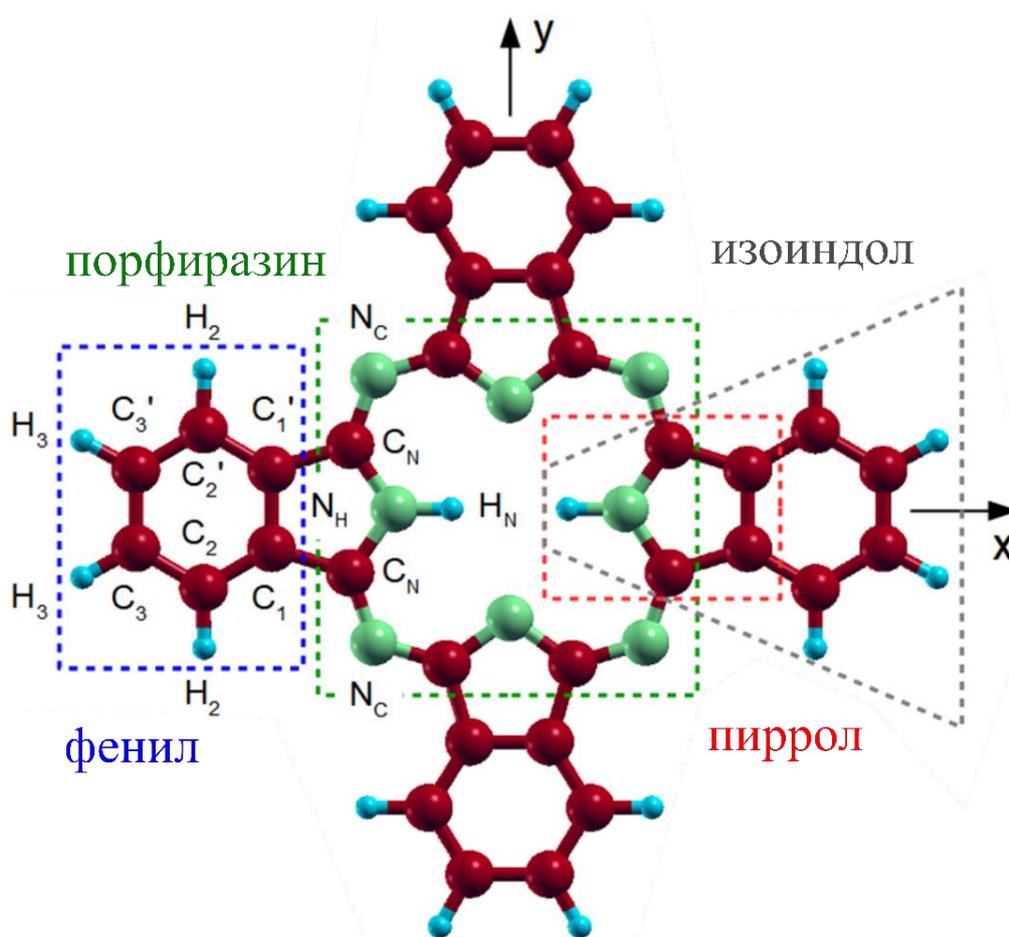


Рисунок 2. Геометрия безметалльного фталоцианина [120].

Одним из важных свойств порфиринов и фталоцианинов является их способность координироваться с ионами металлов с образованием прочных внутрикомплексных солей, в этом случае происходит замещение двух пиррольных атомов водорода на ион металла. К настоящему времени получены комплексы практически со всеми металлами периодической системы. Характер взаимодействия между ионом и макрокольцом может носить, преимущественно, электростатическое взаимодействие, в этом случае образуются лабильные комплексы с ионным типом связи, а может сопровождаться заполнением вакантных орбиталей иона металла σ -электронами центральных атомов азота [31]. В результате образуются настолько прочные соединения, что металлокомплексы не обменивают координационный ион на протоны даже при низких значениях рН.

Природа металла с одной стороны не сильно влияет на спектры оптического поглощения, а с другой – демонстрирует большие вариации в значениях квантовых выходов образования возбужденных триплетных состояний, а также времени их жизни [34], что влияет на эффективность данных соединений как ФС. Было показано, что координация с ионами Al^{3+} , Zn^{2+} , Ga^{3+} улучшает фотосенсибилизирующую активность фталоцианинов, с Fe, Cu, Gd – нет [34-37].

В зависимости от своего радиуса ион металла может либо занимать центр координационной полости, ограниченной четырьмя атомами азота, либо быть приподнятым над плоскостью макрокольца. Поскольку получение стабильных комплексов порфиринов и фталоцианинов связано с образованием 4 эквивалентных связей атома металла с азотом, то если координируется трех или четырех зарядный атом, возможно также присоединение дополнительных лигандов, располагающихся над и под плоскостью макрокольца. Такие лиганды называются экстралигандами, а образующиеся комплексы – экстракомплексами [31]. Если экстралиганды присоединяются перпендикулярно плоскости макроцикла, то такие лиганды называют аксиальными лигандами. Образование такой связи может привести не только к изменению суммарного заряда молекулы, но и к изменению структуры фталоцианинового кольца: для некоторых производных фталоцианина наблюдается выход иона металла из плоскости кольца при введении лиганда.

Расширение ароматического кольца (плоской гидрофобной структуры) за счет присоединения дополнительных бензольных колец приводит к увеличению склонности к агрегации фталоцианинов в водных растворах. Агрегацию фталоцианинов обычно изображают как компланарную ассоциацию колец, развивающуюся от мономера к димеру и комплексам более высокого порядка. Образование агрегатов наблюдается при различных внешних условиях [33, 38, 39], что сильно влияет на физико-химические свойства ФС, изменяя их UV спектры, значения квантового выхода, времена жизни синглетного кислорода и триплетного состояния. Растворение фталоцианинов в воде может быть улучшено путем инкапсуляции или конъюгации ФС с наноматериалами, квантовыми

точками, липосомами и поверхностно-активными веществами, что, в свою очередь, улучшает эти свойства [40-43]. Агрегация также может быть минимизирована путем добавления аксиального лиганда с высокой полярностью для координации с металлическим центром макроцикла [44]. Еще одним способом изменения гидрофобности является введение заряженных групп на периферию этих макроциклов. Типичные периферические замены, приводящие к продуктам с повышенной растворимостью в воде и пониженной склонностью к агрегации, включают сульфированные, фосфорные и карбоксильные группы [6, 30, 33].

Взаимосвязь липофильности и склонности к агрегации наглядно можно продемонстрировать на примере разносульфированных алюмофталоцианинов $AlPcS_n$ (рис. 1), липофильность которых определяется количеством сульфогрупп на периферии [45]: чем меньше количество сульфогрупп тем, гидрофобнее соединение. Эксперименты по определению степени агрегации $AlPcS_n$ проводились как для монодисперсных и изомерно чистых в отношении позиционирования сульфонатов на соответствующих смежных ($AlPcS_{2adj}$) и противоположных ($AlPcS_{2opp}$) бензогруппах фталоцианина разносульфированных алюмофталоцианинов препаратов, так и для коммерческих полидисперсных смесей (таб.1) [30, 46].

Монодисперсные сульфированные алюмофталоцианины в отличие от коммерческих смесей сильно агрегируют в водных растворах, причем уменьшение степени сульфирования и степени их симметрии (для $AlPcS_{2adj}$) приводит к увеличению степени агрегации. Данный результат подтверждается экспериментами на клетках, в которых, несмотря на полученные другие численные значения процентов мономеров, общая тенденция остается неизменной: при уменьшении числа сульфогрупп увеличивается способность к агрегации [47]. В отличие от монодисперсных препаратов, коммерческие препараты практически не агрегируют в водных растворах, что в свою очередь связано с тем, что они представляют собой полидисперсные смеси. Это означает,

что смешивание фталоцианинов с различной степенью сульфирования подавляет агрегацию.

ФС	AlPc	AlPcS _{2adj}	AlPcS _{2opp}	AlPcS ₄	AlPcS _{2mix}	AlPcS _{4mix}	AlPcS _{3mix}
степень агрегации	85±5	85±5	75±5	37±5	11±5	12±5	0

Таблица 1. Процент агрегированных фталоцианинов, измеренный по уменьшению максимума поглощения мономера на 672 нм в фосфатном буфере по сравнению с дезагрегирующим растворителем ДМСО [30, 46].

1.2.2. Квантовый выход синглетного кислорода: влияние выбора молекулы-мишени, длины облучаемого света и состава среды

Одним из самых важных фотофизических параметров, определяющим фотосенсибилизирующие способности соединения, является квантовый выход синглетного кислорода (Φ_{Δ}), под которым понимают вероятность того, что после поглощения кванта света фотосенсибилизатор перейдет в возбужденное состояние и передаст энергию кислороду, образуя, таким образом, синглетный кислород $^1\text{O}_2$.

Для большинства фотосенсибилизаторов квантовый выход Φ_{Δ} варьируется в диапазоне 0,3-0,8. Количество $^1\text{O}_2$ сильно зависит от таких факторов, как взаимодействие сенсibilизатора с окружающими биополимерами, агрегация сенсibilизатора, количество кислорода в среде и побочные реакции. Выполнение требования высокого значения Φ_{Δ} подразумевает высокое значение квантового выхода триплетного состояния Φ_T и времени жизни триплетного состояния τ_T , а также то, что энергия триплетного состояния выше энергии образования $^1\text{O}_2$. Именно поэтому в течение долго времени проводятся исследования по определению этих параметров в различных средах. В таб. 2 представлены значения квантовых выходов синглетного кислорода для используемых в работе соединений, которые были найдены в литературе.

Для обнаружения синглетного кислорода в настоящее время применяются, главным образом, два методических подхода. Одним из методов является SOLM, в котором измеряется люминесценция генерируемого синглетного кислорода на 1270 нм. Однако, спектральная область (1270нм.) не удобна для оптических измерения, да и интенсивность фосфоресценции мала, в связи с чем для проведения исследований требуются сложные высокочувствительные приборы.

Другой способ, фотохимический метод, основан на измерении взаимодействия (распада) различных молекул-мишеней с генерируемым синглетным кислородом после облучения. Однако, данный метод менее специфичен к синглетному кислороду, поскольку молекулы мишени способны взаимодействовать с другими АФК, образующимися при освещении. Влияние выбора молекулы-мишени на значения квантового выхода показано в работе [48]. Как видно из таб. 2, значения квантового выхода $^1\text{O}_2$ в случае TPPS₄ сильно варьируются в зависимости от выбора мишени, для L-триптофана были получены значения 0,5 и 0,33, для п-нитрозодиметиланилина - значение 0,48, а для имидазола - 0,71 [48].

На значение квантового выхода также влияет длина волны облучаемого света [49]. Для TPPS₄ и AlPcS₄ максимум квантового выхода достигался при облучении на 424 нм. и 673 нм. соответственно, что соответствует максимумам пиков поглощения для этих соединений. Это показало необходимость облучения ФС на длине волны, соответствующей максимуму поглощения, для максимизации квантового выхода синглетного кислорода.

Еще одним параметром, влияющим на количество генерируемого кислорода, является состав среды. Например, добавление альбумина сыворотки крови в раствор увеличивает количество генерируемого $^1\text{O}_2$ для TPPS₄ в 1,1 раза, а в присутствии липосом фосфотидилхолина наблюдается уменьшение данного значения в 2,5 раза [48]. В работе Кузнецовой [5] было показано влияние детергента TritonX-100 на количество сгенерированного кислорода для смесей AlPcS_n в фосфатном буфере. Было показано, что для сульфированных фталоцианинов, содержащих в среднем около двух сульфогрупп (AlPcS_{2mix}), добавление детергента приводит к увеличению значения Φ_Δ с $\sim 0,01$ до $0,15 \pm 0,02$,

в то время как для препарата «Фотосенс» ($AlPcS_{mix}$) такого эффекта не наблюдалось ($\Phi_{\Delta} \approx 0.42 \pm 0.06$). Поскольку в растворителе ДМСО, в котором данные смеси существуют в мономерной форме, значения квантовых выходов для $AlPcS_{2mix}$ и $AlPcS_{mix}$ приблизительно равны 0.39 [6] и 0.48 [50], то данный феномен объясняется процессом дезагрегации малосульфированных соединений в присутствии детергента, который не наблюдается для смеси $AlPcS_{mix}$, который существует в фосфатном буфере виде мономеров.

Не только отсутствие (присутствие) детергентов, но и pH среды, может влиять на процесс димеризации фталоцианинов, что в свою очередь изменяет квантовый выход 1O_2 (рис. 3). Для $AlPcS_n$ влияние pH на значение квантового выхода Φ_{Δ} было интерпретировано в терминах зависимости от pH природы осевых лигандов координационного иона Al^{3+} . Изменение pH приводит к протонированию аксиальных гидроксид-ионов с pK равными 2,5, 3,5, 5,0 и 8,0 [51], что вызывает агрегацию фталоцианина. В случае безметального порфирина ($TPPS_4$) уменьшение pH приводит к образованию протонированной формы, которая, как показали исследования [52], также склонна к агрегации. Уменьшение pH с нейтральных значений до 4.0 приводит к изменению Φ_{Δ} для $TPPS_4$ с 0,62 до 0,31 [38]. Поскольку добавление соли NaCl также вызывает процесс агрегации, то было показано уменьшение Φ_{Δ} с 0,62 до 0.45 [38] при добавлении 0,1M NaCl.

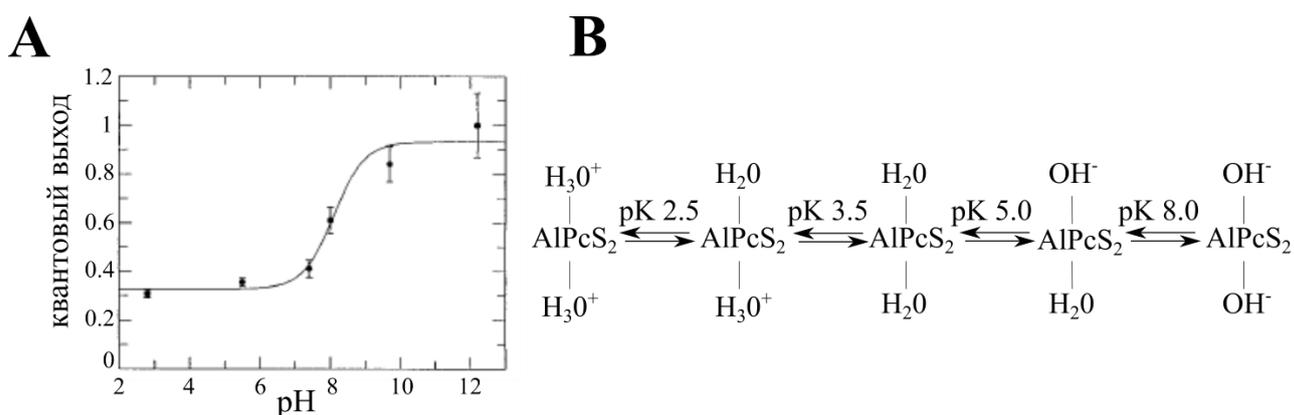


Рисунок 3. А) Зависимость относительного квантового выхода 1O_2 от pH среды. Эксперимент проведен при концентрации $AlPcS_2$ 10мкМ в натрий фосфатном буфер [51]. В) Зависимость осевых лигандов от pH среды для $AlPcS_2$ [51].

	C, mkM	λ , nm	Φ_{Δ}	solvent	Тушитель	refs
TPPS ₄	8mkM	644	0.62 ±0.01	pH7.4/Triton100	Лизоцим	[49]
	8mkM	643	0.58±0.01	pH7.4/Triton100	Лизоцим	[49]
	8mkM	546	0.56±0.08	pH7.4/Triton100	Лизоцим	[49]
	8mkM	424	0.69±0.02	pH7.4/Triton100	Лизоцим	[49]
	20mkM	540	0.71	PBS pH 7.4	имидазол	[48]
	20mkM	540	0.50	PBS pH 7.4	триптофан	[48]
	20mkM	630	0.33	PBS pH 7.4	триптофан	[48]
	2.5mkM	540	0.48	PBS pH 7.4	RNO	[48]
AlPcS ₄	1mkM	700	0,22±0,03	pH7.4/Triton100	ADMA	[6]
	8mkM	673	0,43±0,04	pH7.4/Triton100	лизоцим	[49]
	8mkM	630	0,39±0,03	pH7.4/Triton100	лизоцим	[49]
	8mkM	543	0,33±0,01	pH7.4/Triton100	лизоцим	[49]
	OD=0.2	660	0.15±0.05	DMF	¹ O ₂	[54]
	OD=0.2	680	0.20±0.06	DMF	DPBF	[54]
	OD=0.2	680	0.07±0.1	0.1M CTAC/H ₂ O	DPBF	[54]
AlPcS _{3mix}	OD=0.2	685	0.48	DMSO	DPBF	[50]
	OD=0.2	677	0.42	PBS pH7.4	ADMA	[50]
	1mkM	700	0.42±0.06	pH7.4	ADMA	[6]
	5mkM	675	0.38	pH7	ADMA	[35]
AlPcS ₂	1mkM	700	0.15	pH7.4/Triton100	ADMA	[6]
	1mkM	700	~0,01	PBS	ADMA	[6]
	1mkM	700	0,39±0,06	DMSO	ADMA	[6]
	-	666	0,225±0,008	pH7/детергент	RNO	[53]

Таблица 2. Квантовые выходы синглетного кислорода из литературных данных.

Таким образом, значения квантового выхода ¹O₂ зависят от выбранной молекулы мишени, длины освещаемого света и состава раствора/растворителя,

который в большей степени определяет степень агрегации исследуемых соединений.

1.2.3. Связывание фталоцианинов и порфиринов с поверхностью мембраны

Из-за короткого времени жизни и, следовательно, диффузионного расстояния синглетного кислорода в биологических системах [55, 56], минимизация расстояние между ФС и мишенями фотодинамического действия важна для их эффективности. В действительности, показана необходимость связывания ФС с мембраной для фотосенсибилизируемого повреждения мембранных структур [57, 58]. Одним из процессов, препятствующим связыванию ФС с мембраной, является агрегация. Поскольку в большинстве своем только мономерные формы ФС способны связываться с мембраной, то количество и скорость адсорбции молекул определяется процессом дезагрегации. Показано, что изменение pH раствора $AlPcS_n$, приводящее к изменению в координационной сфере фталоцианина [51, 48] и увеличению количества агрегатов в растворе, приводит к десорбции соединений с мембраны [60, 61].

На количество связанных с мембраной молекул также влияет заряд адсорбирующейся молекулы. Один из способов изменить заряд молекулы – это введение заряженных групп на периферию. Это позволяет не только уменьшить склонность фталоцианинов к агрегации, но и увеличить сродство к мембране за счет электростатических взаимодействий между адсорбирующимися молекулами и липидами: фталоцианины с катионными заместителями имеют большее сродство к отрицательно заряженным мембранным системам, чем с анионными [58, 62]. Интересный результат был получен в экспериментах с липосомами, состоящими из цвиттерионного фосфатидилхолина, с которыми более эффективно связываются фотосенсибилизаторы с катионными ($AlPcN_4$) заместителями, чем с анионными ($AlPcS_4$) [48]. Такое различие в первую очередь связано с присутствием окисленных продуктов данного липида в модельной

системе [64]. Наличие окисленных продуктов формирует небольшой отрицательный заряд на липосомах, что и объясняет получаемый результат.

Другим структурным фактором, определяющим взаимодействие ФС с мембраной, является тип центрального атома ФС [65, 66]. Показано, что связывание сульфированных фталоцианинов с фосфолипидной мембраной происходит за счет образования координационной связи между центральным атомом и фосфатной группой. Необходимость наличия фосфатной группы для адсорбции этих молекул на мембрану подтверждается в опытах на липидах глицеролмоноолеата, не содержащих фосфат, на которых адсорбция фталоцианинов не наблюдается. С другой стороны, необходимо, чтобы атом металла был пента или гекса координирован. Данный факт подтверждается экспериментами с никелевым фталоцианином: тетракоординированный атом никеля в составе ФС не позволяет молекуле адсорбироваться на поверхность мембраны [65]. Однако, пента и гекса координированные атомы металла способны в растворе образовывать достаточно прочную связь с экстралигандом, что может ингибировать процесс адсорбции. Например, связывание $AlPcS_n$ с мембраной подавляется в присутствии фторидов [57, 61, 65, 67], за счет образования конкурирующей сильной координационной связи алюминий-фторид.

В зависимости от количества заряженных заместителей, прикрепленных к макрокольцу, ФС могут располагаться на поверхности, встраиваться в мембрану и/или проникать через нее. В частности, для сульфированных ФС доказано, что трижды и четырежды сульфированные фталоцианины и $TPPS_4$ располагаются практически на поверхности мембраны без погружения в бислои, в то время как моно и дважды сульфированные при адсорбции встраиваются в БЛМ [68, 70, 71]. Более того, количество заместителей и пространственное распределения заряженных и незаряженных групп определяет глубину погружения и ориентацию молекул на поверхности бислоя [69]. На рис. 4 представлены данные, полученные методом молекулярной динамики: глубина погружения, определяемая расстоянием между центрами масс ФС и бислоя, и ориентация ФС, угол между нормалью к плоскости макрокольца порфирина и осью z [69]. В

зависимости от количества положительно заряженных метил-пиридиновых заместителей два, три и четыре, порфирины обозначаются как P_2 , P_3 и P_4 , соответственно. Индексы *adj* и *opp* указывают на взаимное расположение заряженных групп: на смежных или противоположных позициях. Показано, чем меньше количество заместителей, тем более вертикально и глубже погружен порфирин в БЛМ. Исключением из этого правила является ФС, с двумя группами, расположенными на противоположных позициях (P_{2opp}), который практически не погружается в бислои.

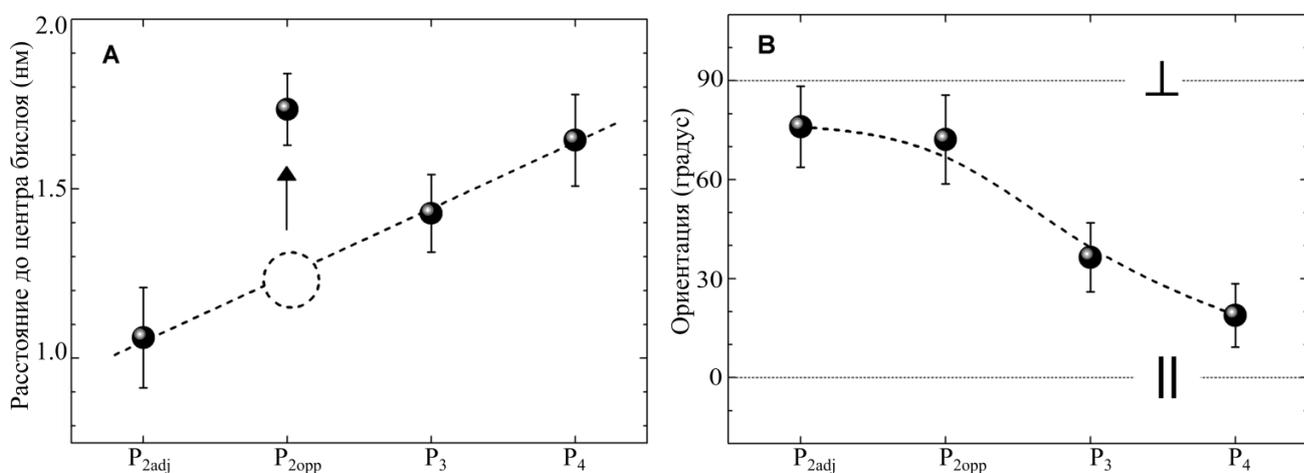


Рисунок 4. Глубина погружения (A) и ориентация (B) ФС на поверхности мембраны в зависимости от количества заряженных групп и их расположения для катионных безметалльных порфиринов с различным количеством метил-пиридиновых заместителей. Предельные случаи, когда фотосенсибилизатор лежит идеально параллельно (II) и перпендикулярно (I) поверхности бислоя, показаны горизонтальными штриховыми линиями [69].

1.2.4. Фотодинамическая активность адсорбированных на мембрану фотосенсибилизаторов

Опосредованные синглетным кислородом фотодинамические реакции на мембране отличаются от тех, что происходят в водной среде. Данный факт связан с тремя нюансами: 1) время жизни синглетного кислорода внутри мембраны больше по сравнению с раствором (или цитоплазмой); 2) для

фотосенсибилизируемого повреждения мембранных структур необходимо, чтобы ФС адсорбировался на мембрану; 3) расположение мишеней синглетного кислорода, в случае с клеткой это белки и ненасыщенные липиды, - фиксировано, и все места атаки $^1\text{O}_2$ располагаются в гидрофобной области мембраны. К настоящему времени доказана корреляция между фотодинамической активностью и адсорбционными свойствами: ФС, имеющие низкое сродство к мембране, менее эффективны при повреждении фосфолипидов или встроенных в мембрану мишеней синглетного кислорода по сравнению с ФС имеющими большую степень связывания [57, 58, 61]. Более того для AlPcS_n определено, что эффективность этих фталоцианинов уменьшается в следующем порядке: $\text{AlPcS}_2 > \text{AlPcS}_1 > \text{AlPcS}_3 > \text{AlPcS}_4$ (рис.5), что соответствует уменьшению сродства к бислою, которое определялось по измеренному ζ -потенциалу липосом с адсорбированными на ними AlPcS_n [57]. Однако, тенденция «чем больше адсорбированных на поверхность молекул, тем больше количество поврежденных мишеней синглетного кислорода» справедлива для AlPcS_n только при низких концентрациях. Данный факт связан со способностью AlPcS_n тушить $^1\text{O}_2$ [72], приводя к уменьшению количества разрушенных мишеней.

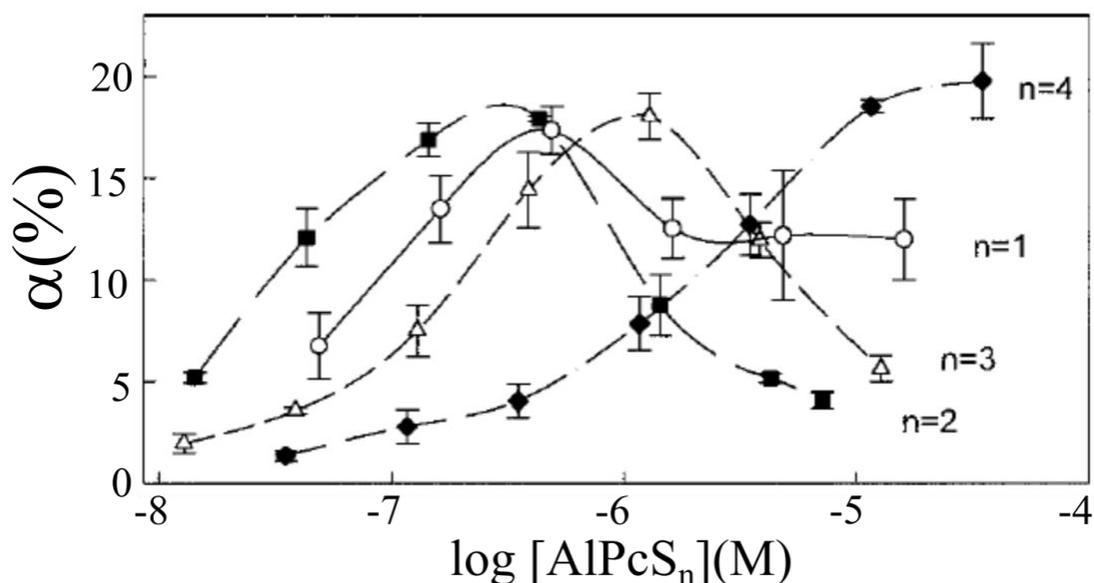


Рисунок 5. Зависимость относительной амплитуды фотоинактивации грамицидинового канала α (%) от концентрации AlPcS_n в растворе с различным количеством сульфогрупп [57].

Эффективность фотосенсибилизаторов определяется не только количеством связанных с мембраной соединений, но и с их расположением. В процессе фотосенсибилизации центральное кольцо порфирина играет важную роль, поскольку оно представляет собой π -сопряженную систему, которая действует как хромофор. При перемещении хромофора в область мембраны, обогащенную кислородом и с более длительным временем жизни сгенерированного синглетного кислорода, концентрация сгенерированного синглетного кислорода должна увеличиваться, поэтому появилось предположение, что глубина погружения ФС в бислой может сильно влиять на повреждение мембраны [73]. Эта гипотеза была подтверждена в экспериментальных [73, 74] и теоретической [69] работах.

Используя в качестве мишени $^1\text{O}_2$ молекулы DMA (9,10-Dimethylanthracene) и АРА (9-antraceneprionic acid), которые различным образом связываются с мембраной, были оценены квантовые выходы синглетного кислорода для производных фотопорфирина в зависимости от расстояния эффективного центра фотопорфиринов (центра генерации $^1\text{O}_2$) до центра мембраны липосом. Показано, что при уменьшении этого расстояния от ~ 19 А до ~ 7 А, т.е. при продвижении хромофорной группы внутрь мембраны липосомы и вследствие этого формирования синглетного кислорода на большей глубине внутри мембраны, квантовый выход, измеренный с помощью неполярного погруженного в мембрану DMA, увеличивается более чем в 2,5 раза. В тоже время вертикальное расположение практически не влияло на эффективность фотоокисления расположенного на поверхности непогруженного АРА. Эти результаты было подтверждены аналогичными исследованиями для производных гематопорфиринов [74]. Таким образом, чем глубже сгенерирован синглетный кислород, тем большая вероятность прореагировать с расположенной внутри мембраны мишенью. Этот вывод был подтвержден с помощью молекулярного динамического моделирования фотодинамической эффективности серии

катионных безметалльных порфиринов с различной степенью гидрофобности и, следовательно, разной глубиной погружения в бислои [69].

Данные работы теоретически и экспериментально обосновывают тот факт, что фотодинамическая эффективность ФС зависит от количества соединений на поверхности мембраны, их позиции и ориентации.

1.2.5. Локализация кислорода в мембране

Воздействие различных сенсibilizаторов на мембраны сильно отличаются друг от друга, и их эффективность также зависит не только от картины локализации ФС, но также от локализации синглетного кислорода $^1\text{O}_2$, который является необходимым цитотоксическим агентом, радиус действия которого меньше 0,02 мкм, что делает область повреждения сильно ограниченной.

На рис. 6 представлено распределение АФК между водной фазой и липидным бислоем. Как видно из графика максимум концентрации гидрофобного O_2 (и его аналога $^1\text{O}_2$) расположен в центре бислоя. Экспериментальные данные показали [75], что количество кислорода внутри бислоя в среднем в 3,5 раза больше, чем в водной среде. Поскольку время жизни синглетного кислорода ($^1\text{O}_2$) в липидном бислое (7-35 мкс в зависимости от типа липида) намного больше, чем в растворе (цитоплазме 0,2 мкс), то нет необходимости в расположении мишеней синглетного кислорода (белки, ненасыщенные связи липидов и т.д.) в непосредственной близости с местом его генерации [55, 56, 58]. Сгенерированный кислород имеет достаточное количество времени, чтобы продиффундировать до места окисления, расположенных на расстоянии до нескольких десятков нанометров.

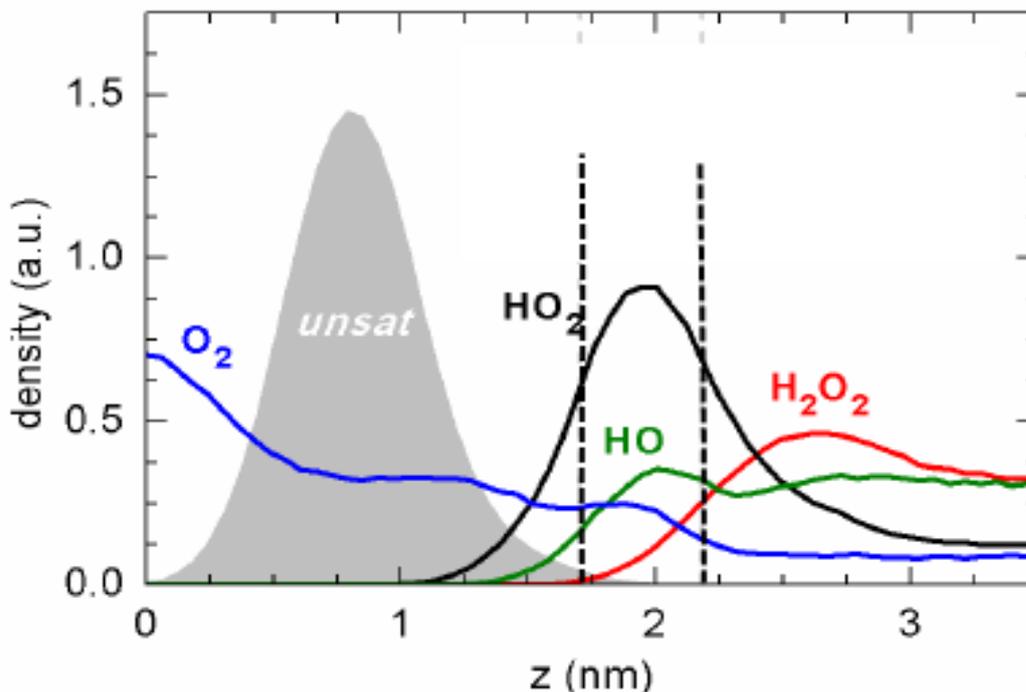


Рисунок 6. Распределение различных АФК и липидных ненасыщенных связей (*unsat*). Расстояние z отсчитывается от центра бислоя. Вертикальные пунктирные линии обозначают средние позиции групп карбонилэфира ($z=1.52$ нм) и фосфата ($z=1.89$ нм) [76].

1.3. Электростатические потенциалы, возникающие при связывании с мембраной заряженных и нейтральных молекул

Многие физиологически важные процессы сопровождаются переносом заряда через мембрану и прилегающие слои. И перенос заряда, и связывание с поверхностью зависят от распределения электрического поля на границе мембраны, которое определяется полярной областью липидов, ориентированными молекулами воды и других связанных с мембраной соединений. Для изучения электростатических явлений на границах мембраны, вызванных связыванием веществ, представляющих биологический интерес, или неорганических ионов широко используются плоские липидные бислои (БЛМ) и липосомы [77-79]. Имеющиеся электрохимические методы исследования, позволяют определить

разницу между референтной точкой, которая обычно принимается за точку в растворе и средним потенциалом некоторой плоскости, параллельной границе раздела мембраны. Положение данной плоскости зависит от используемого метода измерения. Все эти методы измерения основаны на различных физических процессах, что обеспечивает их независимость и взаимодополняемость для получения информации об «электрическом профиле» мембраны.

1.3.1. Распределение электростатического поля в мембране

Точная картина распределения электрического поля в мембране очень сложна и требует знания о расположении всех заряженных и дипольных молекул вблизи границы раздела фаз. Однако, она может быть аппроксимирована плавными изменениями на мембране и во многих случаях достаточно информации об этой «усредненной электростатической структуре», которая представлена на рис. 7. Общее падение потенциала на мембране, мембранный потенциал φ_m , состоит из падения потенциала внутри гидрофобного региона мембраны, φ_{in} , и двух межфазных скачков потенциала в области границ мембраны с водными растворами, называемые граничными потенциалами φ_{b1} и φ_{b2} , то есть $\varphi_m = \varphi_{in} + \varphi_{b1} - \varphi_{b2}$. Граничный потенциал φ_b определяется разностью потенциалов между референтной точкой в растворе, расположенной достаточно далеко от границы мембраны, и средним значением потенциала в плоскости, расположенной в гидрофобной области мембраны и параллельной границе раздела фаз. Поскольку φ_b представляет собой разность потенциалов между разными фазами (Гальвани - потенциал), то невозможно определение его абсолютного значения. Однако, возможно измерить изменения потенциала $\Delta\varphi_b$, вызванное внешними факторами. В практике в большинстве случаев представляет интерес именно изменение потенциала при адсорбции молекул из водного раствора, структурной реорганизация липидов и т.д.

Каждый из граничных потенциалов $\varphi_{b,2}$ включает в себя поверхностный потенциал φ_s и падение потенциала непосредственно в области границы мембраны с раствором в области липидных головок φ_δ . Первая компонента, φ_s , определяется как падение потенциала в водном растворе до границы мембраны с водой. Данный потенциал отсчитывается от уровня потенциала раствора и зависит от общего заряда поверхности. Его поведение вблизи заряженной поверхности, как было показано в работах С. Маклафлина [80], достаточно хорошо описывается уравнениями модели Гуи-Чепмена (теории диффузного двойного слоя). Поверхностный потенциал может быть вычислен по измеренному электрокинетическому ζ -потенциалу, который представляет падение потенциала до границы скольжения, также отсчитываемый от уровня потенциала раствора. Вычисления производятся с помощью уравнений, учитывающих падение потенциала в диффузном слое в области между поверхностью мембраны и плоскостью скольжения.

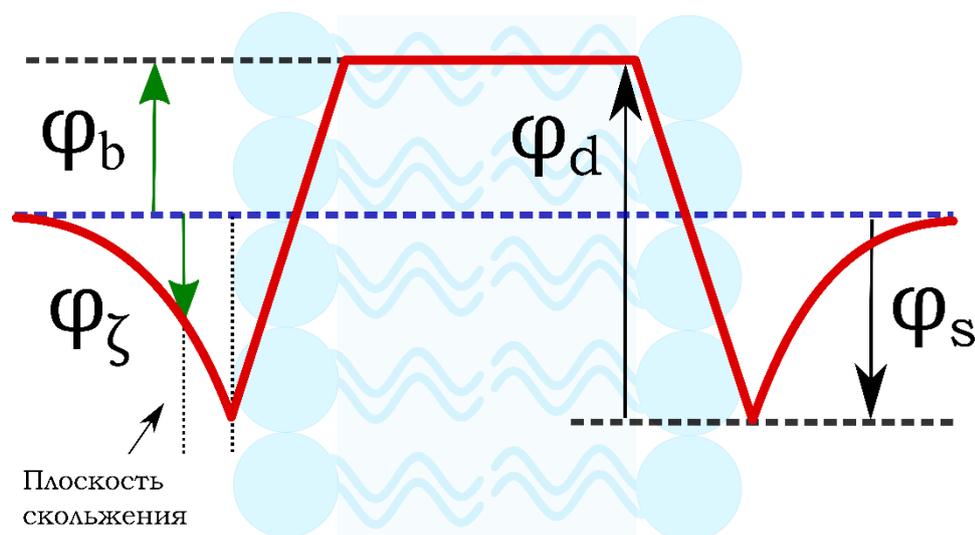


Рисунок 7. Профиль потенциала на мембране.

Для многих фосфолипидных мембран расстояние между плоскостью скольжения и границей раздела было оценено порядка 0,2 нм [81]. Следует отметить, что значительное различие между поверхностным и ζ - потенциалами наблюдается лишь в концентрированных растворах при высоких значениях поверхностной плотности заряда на мембране.

Другая компонента, называемая “дипольной” компонентой потенциала ϕ_δ , отражает структуру границы и зависит от ориентации дипольных моментов полярных групп липидов и ассоциированных с ними молекул воды или других соединений, адсорбированных или встроенных в поверхность липидного бислоя. В отличие от поверхностного потенциала этот межфазный перепад потенциала недоступен для экспериментальной оценки. Точное распределение потенциала в этой области мембраны неизвестно, и в большинстве обзоров условно представляют, как линейное (рис. 7). Согласно оценкам, внутренняя часть мембраны более положительна, чем окружающая водная фаза примерно на 200-300 мВ [82]. Несмотря на невозможность определить абсолютное значение дипольной составляющей, можно измерить его изменение вследствие связывания с поверхностью мембраны различных соединений. Для выделения из общего скачка граничного потенциала дипольной компоненты можно использовать результаты измерения ζ -потенциала [82, 85].

1.3.2. Межфазные потенциалы, возникающие при адсорбции алюмофталоцианинов и стироловых красителей

В литературе в последние годы появилось много работ, посвященных исследованию распределения электрических потенциалов на БЛМ при связывании с её поверхностью неограниченных, амфифильных и гидрофобных ионов, заряженных и нейтральных молекул [68, 81, 83-86]. Данные работы продемонстрировали возможность обнаружения на поверхности мембраны заряженных молекул, поскольку при адсорбции они изменяют поверхностный заряд, что приводит к изменению скачка потенциала на границе. Для некоторых молекул, обладающих суммарным нулевым зарядом, также можно зарегистрировать изменение потенциала на границе раздела фаз. Такое возможно, если адсорбированная молекула обладает дипольным моментом, который ориентирован так, чтобы нормальная составляющая p была отлична от нуля. В

этом случае на границе раздела фаз появляется скачок потенциала - «дипольный потенциал».

В данной работе в качестве объектов исследования были выбраны, как Заряженные молекулы AlPcS_2 , AlPcS_3 и AlPcS_4 , так и нейтральные, но имеющие дипольный потенциал, - AlPcS_1 и стироловые красители (рис. 10). Адсорбция этих соединений на БЛМ уже была изучена ранее в [57, 68, 77, 87], по измерению граничного потенциала методом компенсации внутримембранного поля и ζ -потенциала липосом с адсорбированными на них молекулами красителя. Полученные в данных работах зависимости представлены на рис. 8 (для AlPcS_n) и рис. 10 (для стироловых красителей).

В связи с тем, что измеренные значения $\Delta\phi_b$ и ζ – потенциалов представляют собой падения потенциалов до плоскостей, параллельных границе раздела мембрана/вода, расположенных в гидрофобной области мембраны и в водном растворе, соответственно, то совокупность этих методов дает возможность не только установить факт адсорбции, но и оценить глубину погружения молекул в БЛМ, либо их прохождение через мембрану [77, 83, 85].

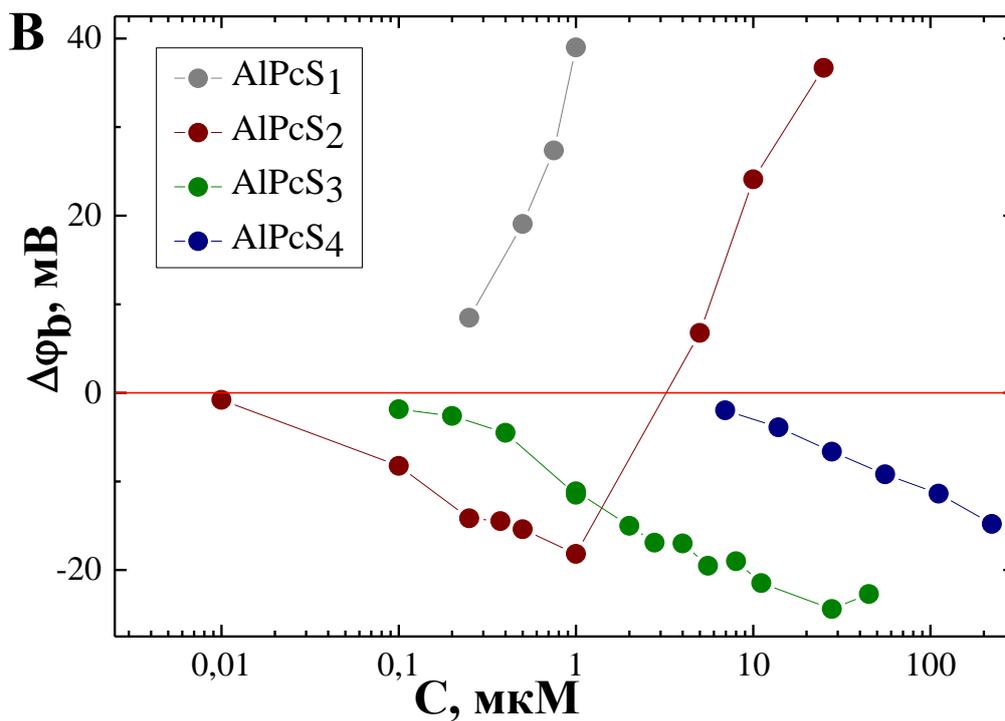
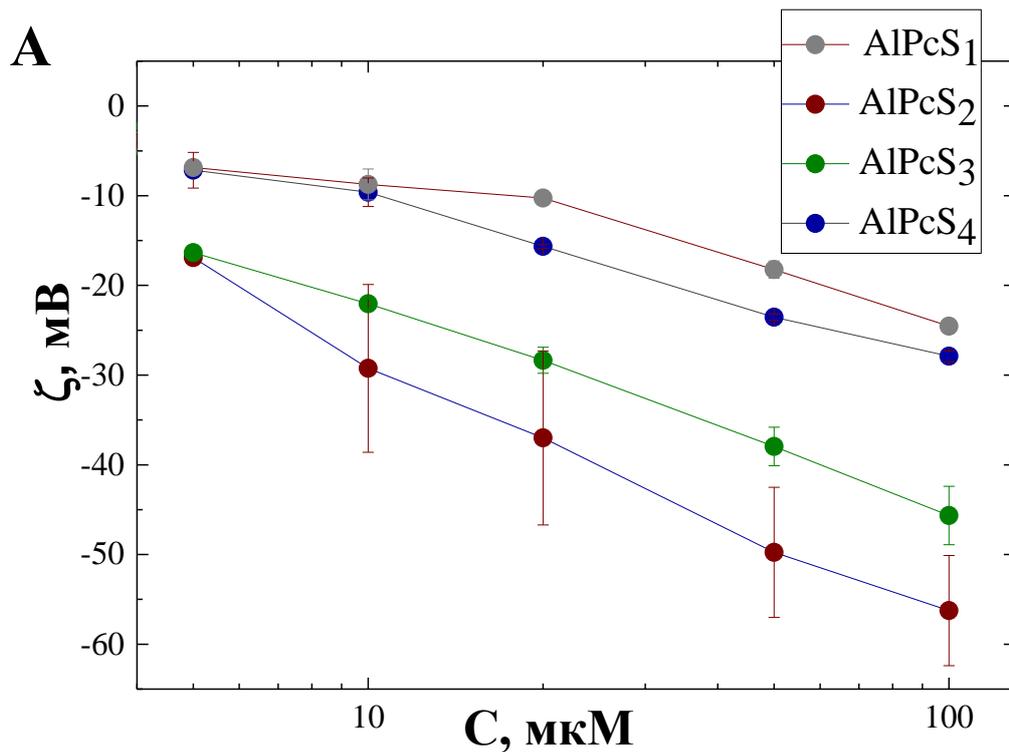


Рис. 8 А) ζ -потенциал крупных однослойных везикул *DPhPC* как функция концентрации *AlPcS*₁; *AlPcS*₂; *AlPcS*₃; *AlPcS*₄ в 20 мМ *KCl* в буферном растворе. ζ -потенциал рассчитывали по электрофоретической подвижности везикул [57]. В) Зависимость изменения граничного потенциала на поверхности мембраны от концентрации *AlPcS*_{*n*} в растворе [68].

Поскольку $\Delta\phi_b$ для трижды-четырежды-сульфированных фталоцианинов приближенно равны ζ -потенциалу, то предполагается их расположение на поверхности практически без погружения в бислой (все заряды располагаются на поверхности мембраны). В случае моно и дважды сульфированных фталоцианинов значения ζ -потенциалов и $\Delta\phi_b$ сильно различаются, что означает, что изменяется дипольная компонента потенциала ϕ_d . Это обусловлено появлением зарядов (диполей) в области липидных головок, то есть наблюдается встраивание моно и дважды сульфированных фталоцианинов в БЛМ (рис. 9). Положительное значение потенциала ϕ_d (для $AlPcS_1$), сформированного в следствии разделения положительно заряженного катиона алюминия (Al^{3+}) в центре молекулы и отрицательно заряженной сульфогруппы на периферии, указывает на то, что положительно заряженный центр погружен в бислой, в то время как SO_3^- расположена на границе с водным раствором. Характер изменения граничного потенциала для смеси ($AlPcS_2$) изомеров с заместителями, расположенными на смежных $AlPcS_{2adj}$ и противоположных $AlPcS_{2opp}$ сторонах молекулы обоснован предположением, что изомеры $AlPcS_{2opp}$ адсорбируются на мембрану без погружения, и $AlPcS_{2adj}$ встраиваются в бислой. В результате разного характера связывания фталоцианина с мембраной, данные изомеры имеют различные знаки потенциалов адсорбции. В связи с чем наблюдаемое изменение граничного потенциала объясняется тем, что при малых концентрациях суммарный знак изменения граничного потенциала обусловлен превалированием составляющая потенциала, появляющейся при адсорбции $AlPcS_{2opp}$, при больших концентрациях – $AlPcS_{2adj}$.

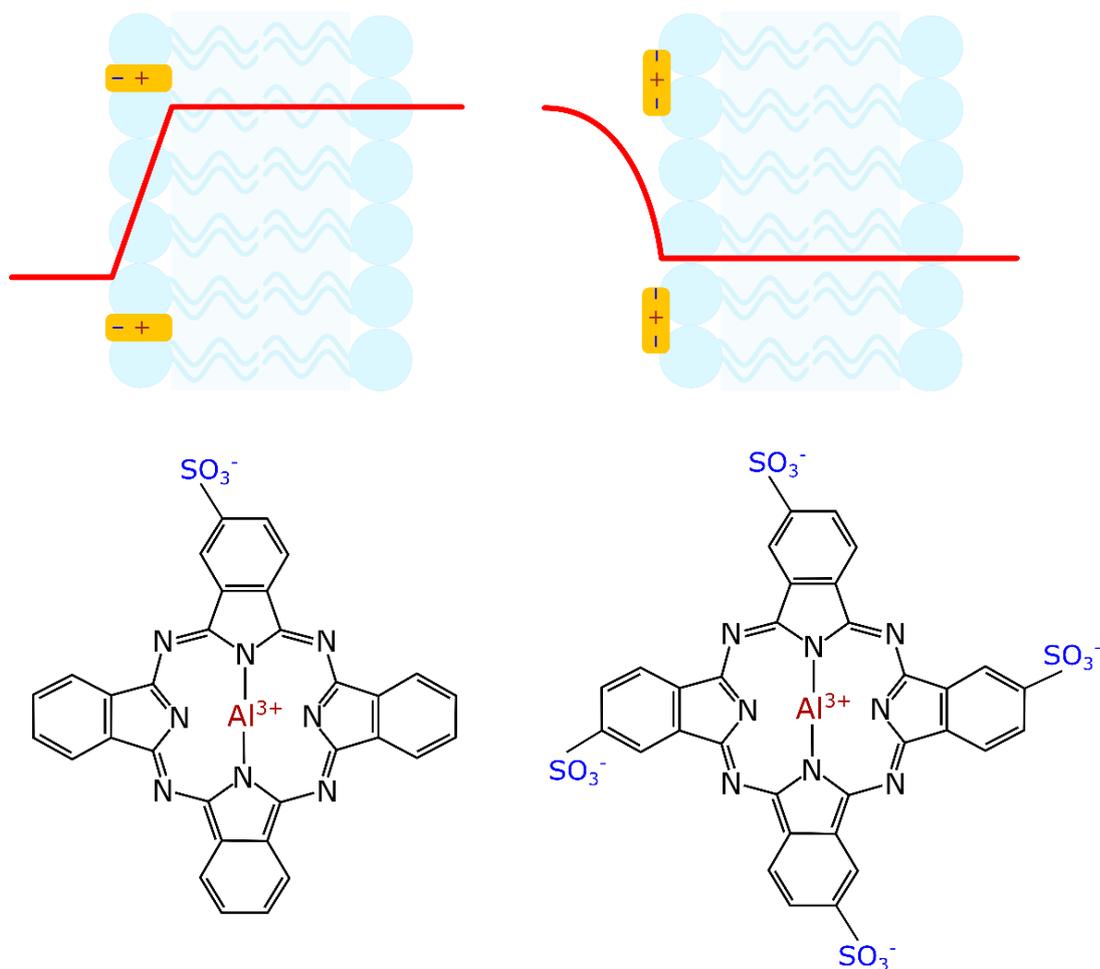


Рис. 9 Положение и ориентация молекул $AlPcS_n$ в мембране в зависимости от количества боковых групп SO_3^- .

Следующая группа соединений, которые будут исследоваться в данной работе, - это потенциалочувствительные флуоресцентные стироловые красители. Данные соединения широко используются для оптической регистрации изменения электрических потенциалов в мембранах нейронов, клеток мышц [87, 88] и при функционировании Na^+, K^+ -АТФазы [89, 90]. Встраиваясь в липидную мембрану, краситель располагает хромофорную группу в регионе липидных головок, которая чувствительна к локальному электрическому полю, вызванному дипольным потенциалом, приводя к электрохромному сдвигу спектров флуоресценции и поглощения [91].

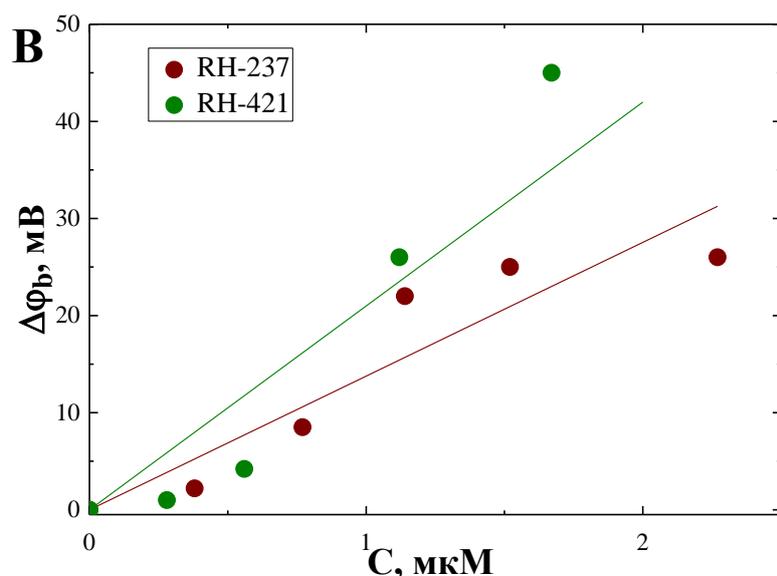
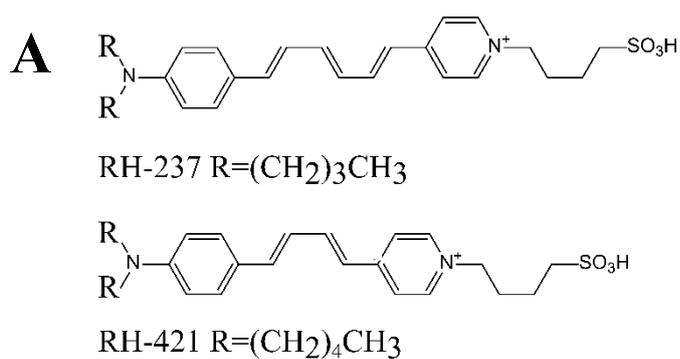


Рисунок 10. А) Структуры стириловых красителей группы RH. В) Зависимость потенциала адсорбции стириловых красителей группы RH от концентрации в растворе.

Детальное изучение связывания стириловых красителей группы RH (рис. 10А) с мембраной [83, 85, 86], показало, что данные соединения связываются с поверхностью мембраны в нейтральном виде, не изменяя поверхностный заряд (ζ -потенциал) мембран и не проникая через мембрану [83]. Однако, обладая значительным по величине дипольным моментом (~ 10 Д), образованным отрицательно заряженной сульфогруппой и положительно заряженной областью в районе пиридинового кольца и сопряженных двойных связей, стириловые красители, встраиваясь в мембрану, изменяют граничный потенциал мембраны (рис.10), а именно её «дипольную» компоненту φ_d . Знак потенциала адсорбции соответствует связыванию дипольной молекулы ориентированной положительной частью к гидрофобной части мембраны с обращенной к водному раствору

отрицательной сульфогруппой. Результаты исследований показывают, что данные зонды выравниваются практически параллельно нормали [92]. Тот факт, что полученная зависимость регистрируемого изменения граничного потенциала – линейна, позволяет предполагать, что взаимодействие на поверхности адсорбированных молекул незначительно и насыщение мест связывания не происходит.

1.3.3. Использование БЛМ для моделирования фотодинамических реакций

Изучение фотосенсибилизированного окисления мембранных систем *in vivo*, а также интерпретация полученных результатов имеет определенные трудности в виду структурной сложности этих биологических объектов. Вследствие этого были разработаны многие различные модельные системы для упрощения исследуемых процессов, путем их разделения на отдельные стадии взаимодействия фотосенсибилизаторов с клеткой. Эти модельные мембраны варьируются от гигантских однослойных везикул до плоских липидных бислоев. Одной из наиболее полезных систем является бислойная липидная мембрана (БЛМ), впервые описанная Мюллером [93], которая представляет собой достаточно близкое подобие реальной клеточной мембраны, поскольку обеспечивает одновременный доступ к раствору с обеих сторон бислоя, что позволяет имитировать физиологические условия. Данная модельная система была использована не только при исследовании процессов связывания с ней различных фотосенсибилизаторов [94, 95], но и для изучения её фотосенсибилизированного разрушения вследствие окисления ненасыщенных липидов активными формами кислорода (АФК) [95, 96, 97]. Поскольку мишенью синглетного кислорода являются двойные связи в углеводородных хвостах липидов, то нарушение стабильности при освещении БЛМ, составленной лишь из насыщенных липидов, не происходит [98]. Если же дополнительно ввести в мембрану компонент, являющийся мишенью для синглетного кислорода, то на таких мембранах можно изучать фотодинамические реакции.

Эта идея была реализована в экспериментах, в которых в качестве молекулы-мишени были выбраны: грамицидин А [57, 61, 65, 78], протонофор СССР [98] и флорицин [83, 99], наличие которых на поверхности мембраны регистрировалось по проводимости БЛМ в случае грамицидина и протонофора или по изменению граничного потенциала в случае флорицина. Благодаря данным экспериментам доказана необходимость адсорбции на поверхность БЛМ молекул ФС для фотодинамического воздействия на мишени и влияние сродства ФС к мембране на их фотодинамическую активность: чем выше сродство, тем более активен ФС [57]. Показана асимметрия фотодинамической реакции: разрушение мишени происходит активнее с той стороны мембраны, на которой адсорбирован фотосенсибилизатор [98]. Сравнение скоростей разрушения мишеней на двух сторонах мембраны, позволило оценить проницаемость БЛМ для $^1\text{O}_2$ [99].

1.4. Постановка задачи

В настоящее время существует огромное количество исследований, направленных на улучшения метода фотодинамической терапии рака: изучают механизмы разрушения опухолей, определяют основные закономерности взаимодействия ФС с компонентами клеточных мембран, синтезируют огромное количество новых ФС, разрабатывают новые способы тестирования как новых, так и клинически используемых ФС. Практически все эти исследования в конечном итоге направлены на определение структурных особенностей ФС, позволяющих оптимизировать действие ФДТ.

Одним из значимых фактов, полученных при изучении свойств различных фотосенсибилизаторов (ФС), является необходимость их близкого расположения и/или связывания с клеточной мембраной для окисления мембранных компонентов [57, 58]. Более того, доказана корреляция между сродством ФС с мембраной и фотодинамической активностью ФС на мембране. Так же показано влияние вертикальной локализации фотосенсибилизатора в липидной мембране на наблюдаемую эффективность фотосенсибилизированного окисления

локализованной на мембране мишени [73, 74]. В связи с этим была предложена идея определить эффективность связанных с мембраной ФС в зависимости от взаимной локализации ФС и мишени $^1\text{O}_2$, адсорбционных свойств и положение ФС на мембране. Несмотря на то, что существуют различные модельные системы для моделирования фотодинамических реакций [65, 98, 99], при их разработке были поставлены иные цели. В связи с этим появилась необходимость разработать новую тест-систему. В качестве объектов исследования были выбраны ФС, используемые в клинической практике – разносульфированные алюмофталоцианины.

Для создания тест-системы были поставлены и решены следующие задачи:

1. Исследование влияния положения и ориентации ФС на мембране на их фотодинамическую эффективность на примере разносульфированных алюмофталоцианинов и тетрасульфированного порфирина.
2. Изучение влияния строения молекул-мишеней на их способность к окислению синглетным кислородом на примере стироловых красителей серий ANEPPS и RH.
3. Изучение влияния взаимной локализации фотосенсибилизатора и мишени относительно мембраны на фотодинамическую эффективность.
4. Определение механизмов тушения синглетного кислорода в мембране молекулами-мишенями.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

1. Водные растворы

Растворы буферов были приготовлены на бидистиллированной воде. Для приготовления растворов были использованы KCl (х.ч. «Реахим», Россия) и HEPES («Calbiochem», США), MES («Calbiochem», США), лимонная кислота («Реахим», Россия). Для корректировки pH использовали KOH (х.ч., «Реахим», Россия) и HCl (х.ч., «Реахим», Россия).

2. Фотосенсибилизаторы, красители

В работе использовались спиртовые и водные растворы разнесульфированные алюмофталоцианинов $AlPcS_{1-4}$ (Porphyrin products, США) и 5,10,15,20-тетракис (п-сульфонатофенил) порфирина TPPS₄ (PorphyrChem.). Концентрация соединений в растворах контролировалась спектрофотометрическими экспериментами. Получаемые типичные спектры поглощения для этих соединений представлены на рис. 11.

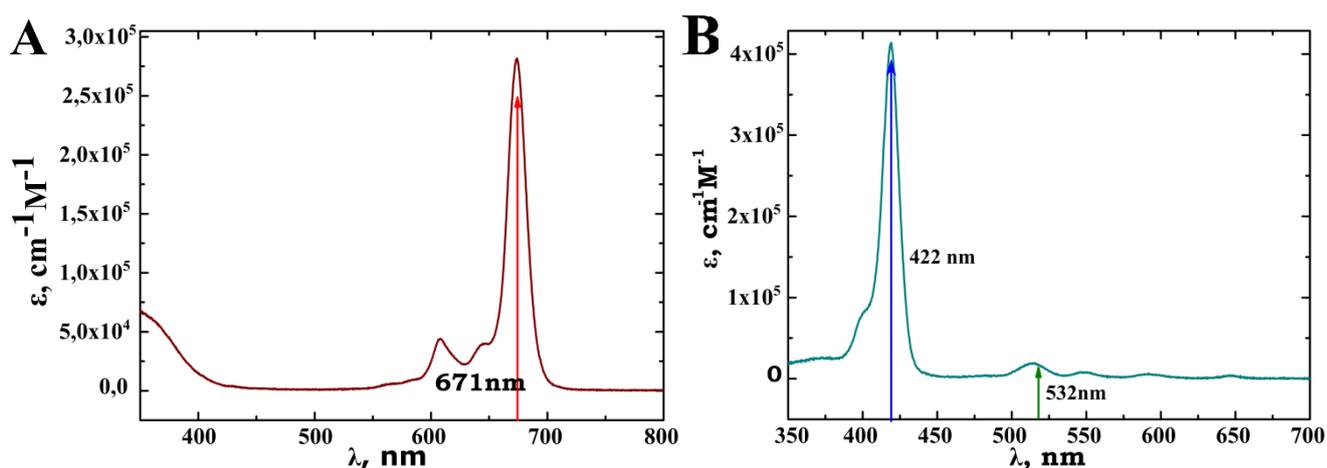


Рисунок 11. Характерные спектры поглощения для А) $AlPcS_n$ В) $TPPS_4$.

В качестве молекул-мишеней синглетного кислорода использовались стироловые красители - 4-(2-(6-(дибутиламино)-2-нафталенил)этиленил)-1-(3-

sulfopropyl)-pyridinium (di-4-ANEPPS), 4-(2-(6-(Diocetylamino)-2-naphthalenyl)ethenyl)-1-(3-sulfopropyl)-pyridinium(di-8-ANEPPS), 4-(6-(4-(Dibutylamino)phenyl)hexatrienyl)-(N-(4-sulfobutyl)-pyridinium (RH-237) и 4-(4-(4-(Dipentylamino)phenyl)-1,3-butadienyl)-1-(4-sulfobutyl)-pyridinium (RH-421), которые были приобретены у Sigma-Aldrich, USA. Данные соединения были растворены в спирте, за их концентрацией следили по изменениям спектров поглощения.

3. Бислойные липидные мембраны

Для формирования БЛМ использовались фосфолипиды: 1,2-дифтитоил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DPhPC) и глицеролмоноолеат (GMO), приобретенные у Avanti Polar Lipids, USA и Sigma-Aldrich, США. В качестве растворителя был использован н-декан (Sigma-Aldrich, USA). Концентрация липида в растворе составляла 15 мг/мл. Мембрана была сформирована методом Мюллера-Рудина на круглом отверстии диаметра около 1 мм. в перегородке тefлоновой ячейки (рис. 12), разделяющей ячейку на два равных отсека, в каждый из которых был заполнен 2 см³ буферного раствора, которые непрерывно перемешивались магнитными мешалками.

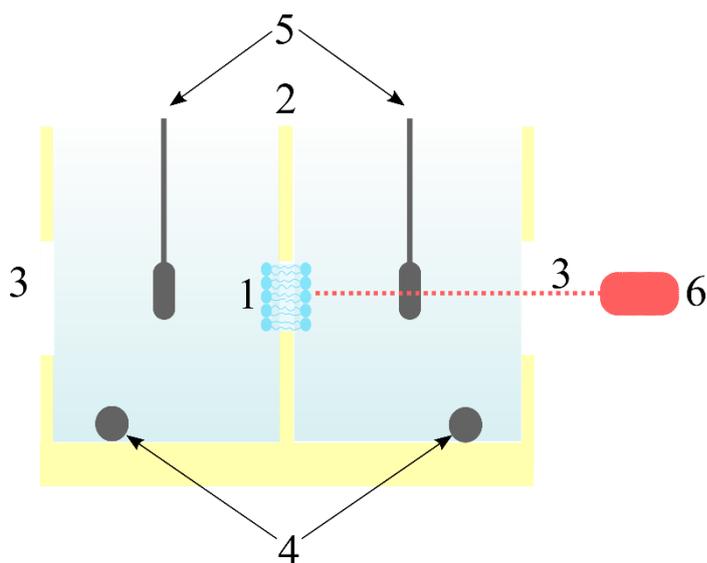


Рисунок 12. Схема ячейки для формирования плоских БЛМ. 1 – мембрана, 2- тefлоновая перегородка с отверстием, на котором мембрана сформирована, 3 – окошки, 4 – магнитные мешалки, 5 – электроды, 6 – лазер.

4. Источники света

Для исследования фотоэффектов, происходящих на поверхность мембраны, были выбраны два полупроводниковых лазера с длинами волн 670 нм и мощностью 1мВ и 405нм. с оптической мощностью 10мВ, которую ослабляли в 10 раз с помощью стеклянных фильтров. Фокусировка лазера обеспечивала освещение всей поверхности мембраны.

2.2. Предлагаемые методы и подходы

2.2.1. Измерение граничного потенциала с помощью метода компенсации внутримембранного поля (КВП)

Одними из наиболее перспективных методов оценки изменения граничного являются методы, основанные на явлении электрострикции: электрические поля вызывают геометрические изменения в мембранах, приводя к изменению её емкости. Зависимость емкости от приложенного напряжения имеет параболический вид: $C = C_0 + \alpha U^2$, где α – коэффициент электрострикции, зависящий от структуры бислоя, от приложенного переменного напряжения, U – приложенное напряжение [100-102]. Механизм, приводящий к нелинейной емкости, долгое время представлял собой предмет дискуссий. Были выдвинуты предположения, что данный процесс вызывается либо вытеснением (перераспределением) растворителя между мембраной и окружающей ее тором или микролинзой, либо утоньшением мембраны, которое происходит либо при постоянстве объема (уменьшение толщины сопровождается увеличением площади), либо при её сжатии (объем уменьшается) [100] или вследствие спонтанных флуктуаций, амплитуда которых зависит от напряжения [103]. Однако экспериментальные данные не смогли дать однозначного ответа, какой же механизм данного эффекта. Несмотря на это, данное явление нашло применение для измерения граничных потенциалов.

При одинаковых составах раствора с обеих сторон мембраны в полностью симметричной системе, значение разности граничных потенциалов должно быть равно нулю (рис. 13). Однако, если молекулы, обладающие зарядом или дипольным моментом, адсорбируются на одну из поверхностей мембраны и не проходят сквозь нее, создавая, таким образом, асимметрию распределения зарядов между двумя его сторонами, то возникает ненулевая разность граничных потенциалов $\Delta\varphi_b = \varphi_{b2} - \varphi_{b1}$. В этом случае зависимость емкости от напряжения приобретает следующий вид:

$$C = C_0(1 + \alpha(U - \Delta\varphi)^2), \quad (2.1)$$

где $\Delta\varphi$ – разность граничных потенциалов. При приложении суммы синусоидального и постоянного напряжения $U = U_0 + U_1 \sin \omega t$ к мембране, где U_1 и ω — амплитуда и частота синусоидального напряжения на мембрану, ток во внешней цепи может быть определен как

$$i = \frac{dq}{dt} = \frac{d(CU)}{dt} = U_1\omega \left[C_0 + 3\alpha(U_0 - \Delta\varphi)^2 + \frac{3\alpha U_1^2}{4} \right] \cos \omega t + 3\alpha\omega U_1^2(U_0 - \Delta\varphi) \sin 2\omega t - \frac{3}{4}\alpha U_1^3 \sin 3\omega t. \quad (2.2)$$

Как видно из формулы, амплитуда второй гармоники оказывается пропорциональной разности постоянной составляющей приложенного напряжения и разности граничных потенциалов $I_{2\omega} = 3\alpha\omega U_1^2(U_0 - \Delta\varphi)$. Таким образом, если приложить на мембрану такое напряжение, чтобы измеряемая вторая гармоника обратилась в 0, то значение поля внутри мембраны φ_{in} , определяемое с помощью уравнения $\varphi_m = \varphi_{in} - \Delta\varphi_b + U$, в условиях короткого замыкания также обращается в ноль. То есть прикладываемое внешнее напряжение, минимизируя значение емкости, компенсирует поле внутри мембраны.

Таким образом, равенство нулю второй гармоники является индикатором компенсации поля внутри мембраны, минимизацией емкости и равенства разности граничного потенциала и постоянной составляющей приложенного

напряжения $\Delta\varphi_b = U_0$. Именно эта идея легла в основу метода компенсации внутримембранного поля по второй гармонике емкостного тока [104].

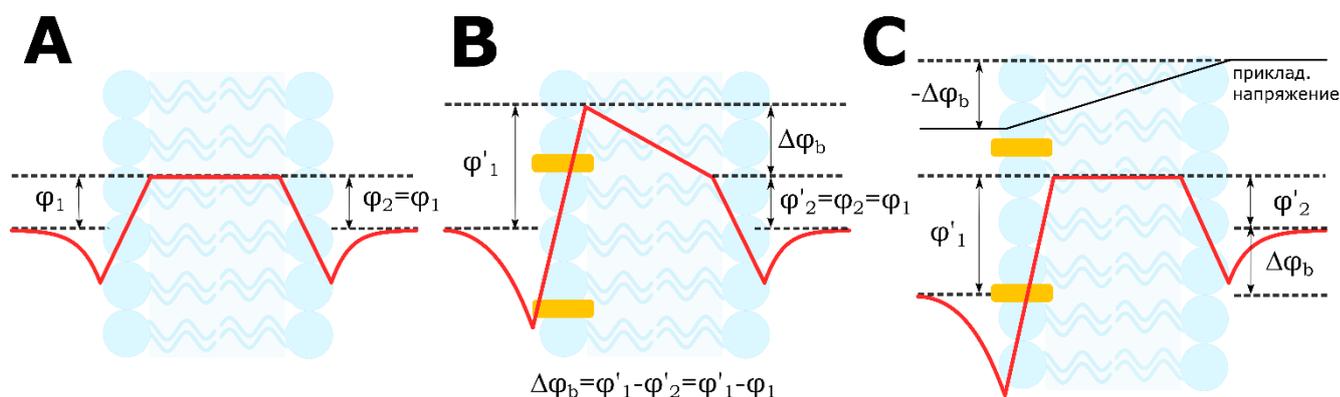


Рисунок 13. Метод компенсации внутримембранного поля (КВП).

2.2.2. Описание установки, используемой в методе КВП

Электрические измерения на БЛМ проводили на автоматической установке, аналогичной описанной ранее [64, 83, 104]. Для контроля формирования мембраны регистрировались её ёмкость и проводимость. Для измерения этой величины к одному электроду подключали генератор переменного треугольного напряжения амплитудой 50 мВ и частотой 100 Гц (выход АЦП платы L780, Lcard, Россия), а ко второму – усилитель Keithley-427 (США), выход которого был соединен с входом АЦП той же платы. Ёмкость БЛМ рассчитывалась как отношение амплитуды скачка тока к скорости изменения приложенного к мембране потенциала, проводимость – как наклон вольтамперной характеристики в точке нулевого напряжения. Значения емкости и проводимости вычислялись автоматически с помощью программы, разработанной В.С. Соколовым, и их изменения во времени записывались в файл компьютера. Увеличение мембранной емкости до стационарного значения 1-2 нФ указывало на тот факт, что формирование мембраны завершено.

Для измерения разности граничных потенциалов на мембрану подается сумма постоянного и синусоидального напряжений амплитудой 30-100мВ и частотой 300-700Гц. Возникающий при приложенном напряжении емкостный ток, пройдя через усилитель Keithley-427 и режекторный фильтр, убирающий первую

гармонику емкостного тока, подается на вход синхронного усилителя DSP 7265. Этот усилитель измеряет амплитуду второй гармоники и передает её значение с помощью приборного интерфейса GPIB на компьютер. С помощью программного обеспечения, разработанного В.С. Соколовым, компьютер трансформирует значение сигнала второй гармоники в значение постоянной составляющей прикладываемого внешнего напряжения. Это значение приборный интерфейс подавал на выход того же усилителя DSP 7265, то есть усилитель измеряет амплитуду второй гармоники, и он же является источником постоянной составляющей напряжения, осуществляя, таким образом, обратную связь. В результате этого, путем регулирования величины постоянной составляющей напряжении нулевой уровень второй гармоники поддерживается равным нулю, и записывается кинетика изменения постоянной составляющей напряжения в файл.

2.2.3. Измерение ζ -потенциала по электрофоретической подвижности липосом.

Описание установки

Липосомы, используемые в экспериментах, получали после сушки раствора липида в хлороформе в вакууме в круглодонной стеклянной колбе в роторном испарителе около 50 мин с последующим добавлением водного раствора и встряхиванием полученного образца с помощью BioVortexVI. Конечная концентрация липидов в растворе составляла 1 мг/мл.

Измерения проводились с помощью прибора Zetasizer II (Malvern Instruments, Великобритания) с помощью метода фотодинамического рассеяния света. Исследуемые липосомы помещались в ячейку, в которой расположены пара электродов. При приложенном на ячейку постоянном напряжении заряженные липосомы движутся к электроду противоположного знака с определенной скоростью. При прохождении лазерных лучей через такую среду часть света будет рассеиваться, измерение автокорреляционной функции интенсивности светорассеивания проводилось с помощью коррелятора PhotoCorSP (США), поставляемого с прибором. С использованием программного обеспечения путем

Фурье-преобразования автокорреляционной функции получены значения характерных частот флуктуации рассеянного лазерного излучения, которые прямопропорциональны электрофоретической подвижности u и напряженности приложенного поля E . Измеренная таким способом электрофоретическая подвижность частиц пересчитывается в ζ -потенциал по формуле Гельмгольца-Смолуховского: $\zeta = u\eta / \epsilon\epsilon_0$, где, η и ϵ – вязкость и диэлектрическая проницаемость среды, u -электрофоретическая подвижность липосом.

ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1. Тест-система для моделирования фотодинамических реакций

3.1.1. Модель фотодинамических реакций

Для изучения фотодинамических свойств фотосенсибилизаторов (ФС) на бислойную липидную мембрану адсорбировали исследуемые молекулы-мишени синглетного кислорода (стириловые красители) и ФС. Добавление раствора красителя с одной стороны от мембраны приводило к изменению разности граничных потенциалов, зависимость которой от концентрации совпадала с измеренными ранее [86]. Поскольку в экспериментах измеряется разница граничных потенциалов, то знак изменения данной величины зависит от того, с какой стороны было адсорбированное вещество. При освещении мембраны при адсорбции только молекулы-мишени не происходило заметного изменения граничного потенциала. Добавление фотосенсибилизатора также только с одной стороны мембраны приводило к появлению разности граничных потенциалов. Следует отметить, что фотосенсибилизаторы практически во всех экспериментах были адсорбированы в отсек, удаленный от источника света.

Поскольку на мембране адсорбируются молекулы двух видов, фотосенсибилизатор и молекула-мишень, то существуют две возможные конфигурации их взаимного расположения. В первом случае фотосенсибилизаторы и мишень добавляют в один отсек ячейки, что приводит к их адсорбции на поверхность мембраны с одной стороны (*cis*-положение). Во втором их вводят в разные отсеки, в этом случае адсорбция молекул происходит на разные стороны мембраны (*trans*-положение). В независимости от взаимного расположения ФС и мишени освещение мембраны приводит к изменению потенциала (фотоэффект), знак которого соответствует уменьшению потенциала, вызванного адсорбцией мишени. После выключения света происходило восстановление потенциала до первоначального уровня, что говорит об

обратимости данного процесса. Это означает, что разрушению подвергаются только те молекулы-мишени, которые адсорбированы на поверхность мембраны, в то время как находящиеся в растворе остаются в неразрушенном состоянии. Выключение света приводит к адсорбции молекул красителя из раствора, тем самым возвращая потенциал до первоначального значения, т.е. фотоэффект был полностью обратим. На рис. 14 приведены типичные кинетики изменения граничного потенциала, которые были получены в экспериментах, когда в качестве молекулы-мишени был выбран di-4-ANEPPS, а ФС – четырехжды сульфированный алюмофталоцианин ($AlPcS_4$).

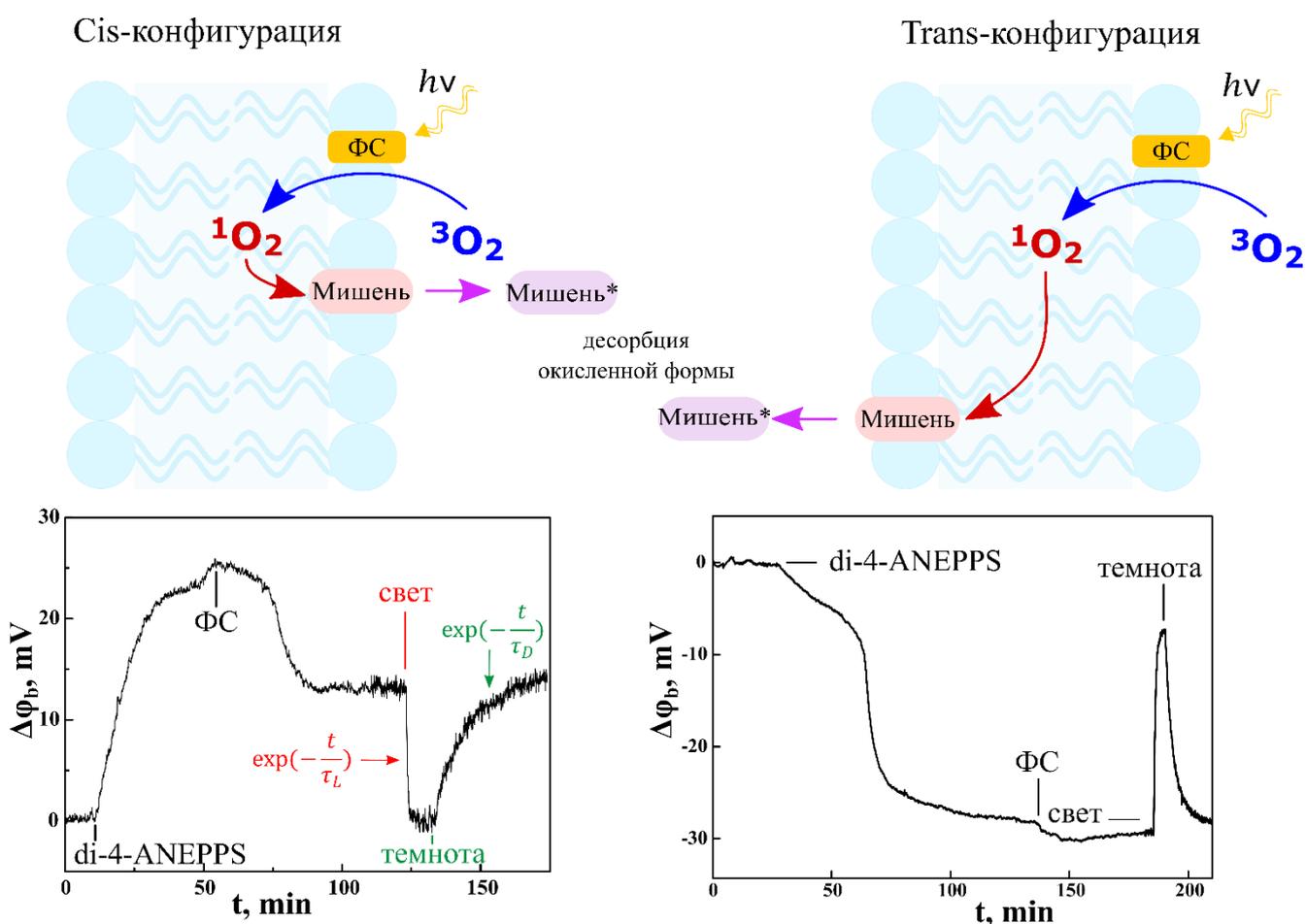


Рисунок 14. Кинетика изменения граничного потенциала на БЛМ при адсорбции молекулы-мишени di-4-ANEPPS и $AlPcS_4$, добавленных (А) в один отсек ячейки, (В) в противоположные отсеки ячейки. На графиках обозначены моменты добавок, а также включения и выключения света.

Предположение о том, что при освещении происходит окисление молекул стироловых красителей, адсорбированных на БЛМ, подтверждается результатами измерения флуоресценции [105]. Они показывают, что флуоресценция di-4-ANEPPS, адсорбированных на липосомах, на которых также был адсорбирован фотосенсибилизатор AlPcS₄, после освещения постоянным белым светом уменьшалась. Так же, как и в опытах на БЛМ, где происходило восстановление потенциала в темноте, наблюдалось частичное восстановление флуоресценции липосом после их выдерживания в темноте, что, по-видимому, связано с адсорбцией на липосомах свежих молекул di-4-ANEPPS из раствора.

Поскольку в случае расположения ФС и мишени по разные стороны мембраны нет непосредственного взаимодействия между адсорбированными молекулами, и они не способны проникать через мембрану, то фотоиндуцированное изменение потенциала можно объяснить только участием в данной реакции некой молекулы, которая способна диффундировать сквозь мембрану. Такой молекулой является молекула синглетного кислорода. Данный факт подтверждается экспериментами с тушителем синглетного кислорода азидом натрия [83, 99], присутствие которого в аналогичной системе подавляло разрушение молекул-мишеней (в экспериментах в качестве молекул-мишеней выбран di-8-ANEPPS и флорицин). Продиффундировавшая молекула синглетного кислорода вступает в реакцию с молекулой-мишенью, что приводит к появлению некоторого продукта реакции, который либо десорбируется с поверхности, либо дает значение потенциала отличное от первоначального, вызывая при этом уменьшение потенциала адсорбции.

3.1.2. Адсорбция стироловых красителей на поверхность мембраны

В данной работе в качестве молекул-мишеней синглетного кислорода были выбраны соединения, принадлежащие классу стироловых красителей: молекулы серии RH и ANEPPS. Адсорбция используемых в данной работе красителей серии

RH (RH-421 и RH-237) на поверхность мембраны была изучена ранее [83, 85, 86] и описана в литературном обзоре.

Молекулы группы ANEPPS (рис. 15) имеют схожую структуру с красителями RH серии (рис. 9). Основным различием между молекулами серии ANEPPS и RH является структура ароматического кольца, входящая в их состав: молекулы группы ANEPPS имеют нафталиновое кольцо, а молекулы группы RH – фенильное.

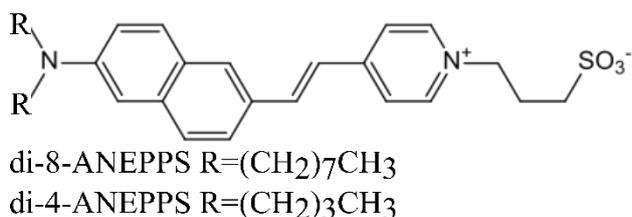


Рисунок 15. Структура стироловых красителей серии ANEPPS.

Для изучения адсорбции красителей были измерены концентрационные зависимости изменения граничного (рис. 16) и ζ - потенциалов. Как и случае красителей серии RH, молекулы ANEPPS адсорбируются на поверхность мембраны в нейтральном виде, не изменяя ζ - потенциал. Зависимость изменения граничного потенциала линейна во всем диапазоне концентраций. Это доказывает, что нет ни взаимодействия молекул на поверхности мембраны, ни насыщения мест связывания. Положительный знак $\Delta\phi_b$ для электронейтральной молекулы соответствует её ориентации на поверхности мембраны с погруженной положительной частью в гидрофобную область бислоя и обращенной отрицательной сульфогруппой к водному раствору.

Поскольку изменение граничного потенциала при неизменности ζ - потенциала связано с изменением только «дипольной» компоненты, то величина скачка потенциала характеризует количество адсорбированных молекул на поверхности БЛМ. Данная зависимость описывается следующей формулой: $\varphi_d = \frac{pn}{\varepsilon\varepsilon_0}$, где p – проекция дипольного момента на нормаль, n – поверхностная плотность дипольных молекул [82, 85, 86]. Вследствие этого количество молекул

стирилового красителя на поверхности мембраны можно регистрировать по измерению $\Delta\phi_b$.

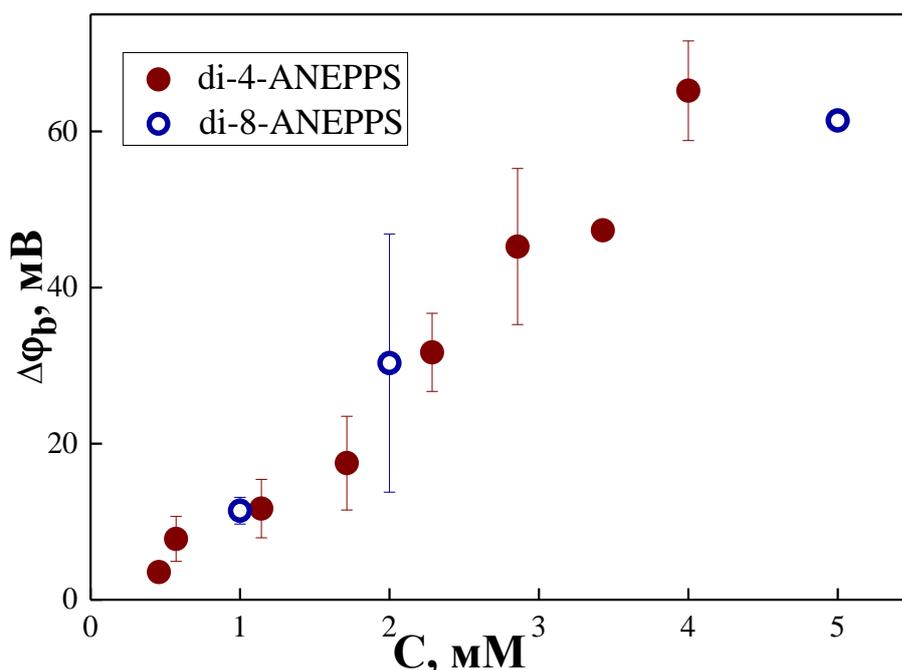


Рисунок 16. Зависимость потенциала адсорбции стироловых красителей группы ANEPPS от концентрации в растворе.

3.1.3. Кинетическая модель разрушения стироловых красителей

Механизм окисления стироловых красителей еще не исследован и продукты этой реакции неизвестны. На основе литературных данных о механизмах окисления другим молекул можно предположить два возможных механизма: может происходить окисление либо ароматического кольца, либо двойной связи алкена. Однако для оценки скорости разрушения молекулы мишени нет необходимости в детальном понимании данного процесса.

Поскольку при окислении мишеней происходит уменьшение потенциала адсорбции, то для формулировки модели, описывающей данный процесс, необходимо знать десорбируются ли окисленные формы мишеней, либо дают вклад в регистрируемый граничный потенциал. Для полученной данной информации были проведены эксперименты по измерению амплитуды

фотоэффекта от интенсивности облучаемого света. На рис.17 представлены зависимости относительного изменения потенциала от интенсивности облучаемого света стирилового красителя di-4-ANEPPS. Показано, что при облучении чрезвычайно высокой интенсивности относительное изменение потенциала достигает предельного значения 1, что соответствует полному исчезновению потенциала адсорбции. Это означает, что реакция красителя с синглетным кислородом приводит к полному исчезновению окисленных молекул с поверхности мембраны, а регистрируемый в экспериментах граничный потенциал соответствует потенциалу адсорбированных неокисленных форм мишеней.

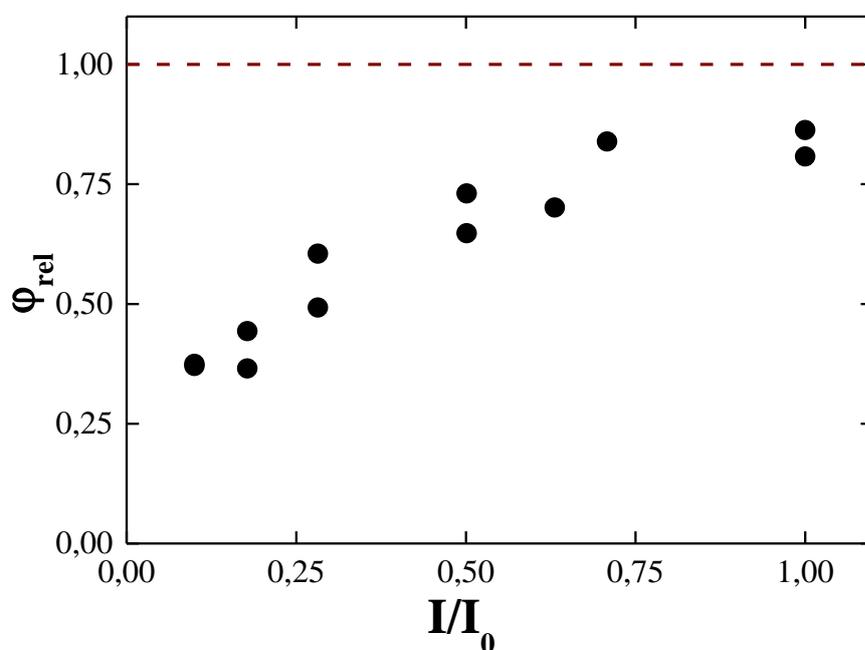


Рисунок 17. Относительное изменение амплитуды граничного потенциала, вызванное освещением di-4-ANEPPS в присутствии 20мкМ ALPcS₄ в trans-конфигурации.

Поскольку регистрируемое при освещении значение потенциала соответствует только неокисленным формам мишеней, то относительно изменение потенциала определяет степень разрушения молекул мишеней:

$$\varphi_{relative} = \frac{\varphi(t)}{\varphi_{ads}} = \frac{A_m(t)}{A_{m0}}, \quad (3.1)$$

где A_{m0} и φ_{ads} – стационарные значения поверхностных плотностей и потенциала адсорбции для мишени, а $A_m(t)$ и $\varphi(t)$ – значения параметров в момент времени t . В свою очередь относительное изменение поверхностной плотности после включения и выключения освещения может быть описана моделью, представленной на рис. 18.

Данная модель основана на следующих предположениях: 1) независимо от взаимного расположения фотосенсибилизатора и мишени на поверхностях мембраны происходит генерация 1O_2 на той стороне мембраны, на которой адсорбирован ФС; 2) независимо от области генерации 1O_2 взаимодействует с мишенью либо сразу, либо после диффузии через мембрану, в результате чего получается некий продукт. Поскольку в обоих случаях механизм реакций одинаков, то мы не будем разделять данные два случая.

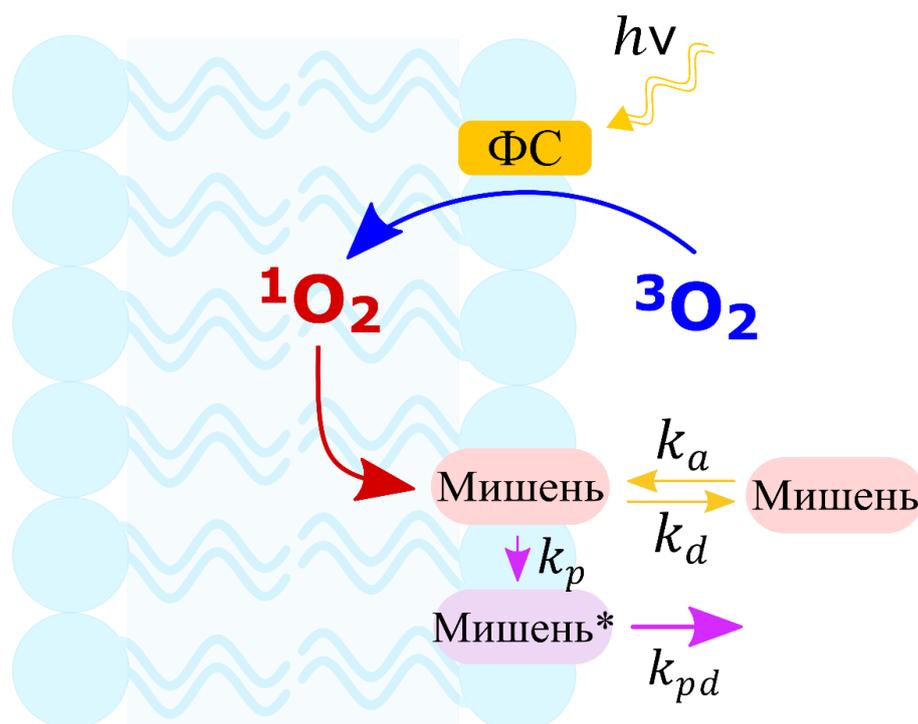


Рисунок 18. Кинетическая модель разрушения молекулы-мишени.

Пусть на поверхность мембраны адсорбированы молекулы стирилового красителя, поверхностную концентрацию которых обозначим как A_m , а

концентрацию в растворе как A_w . В результате фотодинамической реакции происходит окисление мишени, убывание которых на мембране компенсируется притоком нативного красителя из раствора. Пусть k_a и k_d – константы скоростей адсорбции и десорбции соответственно, а k_p – константа скорости окисления мишени. Предполагая необратимость реакции окисления (общий случай с обратимой реакцией рассмотрен для системы, мишенью синглетного кислорода которого был выбран флоризин [83]), кинетика изменения количества имеет вид:

$$\frac{dA_m}{dt} = -k_p[{}^1O_2]A_m - k_dA_m + k_aA_w, \quad (3.2)$$

где $[{}^1O_2]$ – стационарная концентрация синглетного кислорода. Поскольку в первоначальный момент процесса окисления не происходит, то концентрация мишеней в мембране соответствует равновесию красителя между поверхностью мембраны и водным раствором:

$$A_m|_{t=0}^{light} = A_{m0} = \frac{k_a}{k_d}A_w. \quad (3.3)$$

Решение уравнения (2) с начальным условием (3) представляет собой моноэкспоненциальную функцию

$$\frac{A_m(t)}{A_{m0}} = \frac{k_d}{k_d + k_p[{}^1O_2]} + \left(1 - \frac{k_d}{k_d + k_p[{}^1O_2]}\right)e^{-(k_d + k_p[{}^1O_2])t}, \quad (3.4)$$

со стационарным значением поверхностной плотности мишени в мембране

$$A_m|_{t=\infty}^{light} = \frac{k_aA_w}{k_d + k_p[{}^1O_2]}. \quad (3.5)$$

После выключения света происходит релаксация изменения поверхностной плотности в исходное состояние. Уравнение, описывающее данный процесс, имеет следующий вид:

$$\frac{dA_m}{dt} = k_aA_w - k_dA_m. \quad (3.6)$$

С начальным условием, соответствующим стационарной концентрации (5), решение уравнения (6) имеет вид:

$$\frac{A_m(t)}{A_{m0}} = 1 + \left(\frac{k_d}{k_d + k_p[{}^1O_2]} - 1\right)e^{-k_d t} \quad (3.7).$$

На рис. 19 представлены типичные кинетики относительного изменения граничного потенциала, полученные в экспериментах. Как и предсказывает модель, данные зависимости хорошо аппроксимируются моноэкспоненциальными кривыми вида (3.4) и (3.7). Как видно из уравнений временные константы экспонент, описывающих кинетику при освещении и восстановлении в темноте соответственно равны $\tau_L = \frac{1}{k_d + k_p[{}^1O_2]}$, а $\tau_D = \frac{1}{k_d}$. В этом случае может быть введен удобный для экспериментального измерения параметр, пропорциональный стационарной концентрации синглетного кислорода,

$$k_p[{}^1O_2] = \frac{1}{\tau_L} - \frac{1}{\tau_D} = R \quad (3.8).$$

Данный параметр R мы будем обозначать за скорость фотоэффекта.

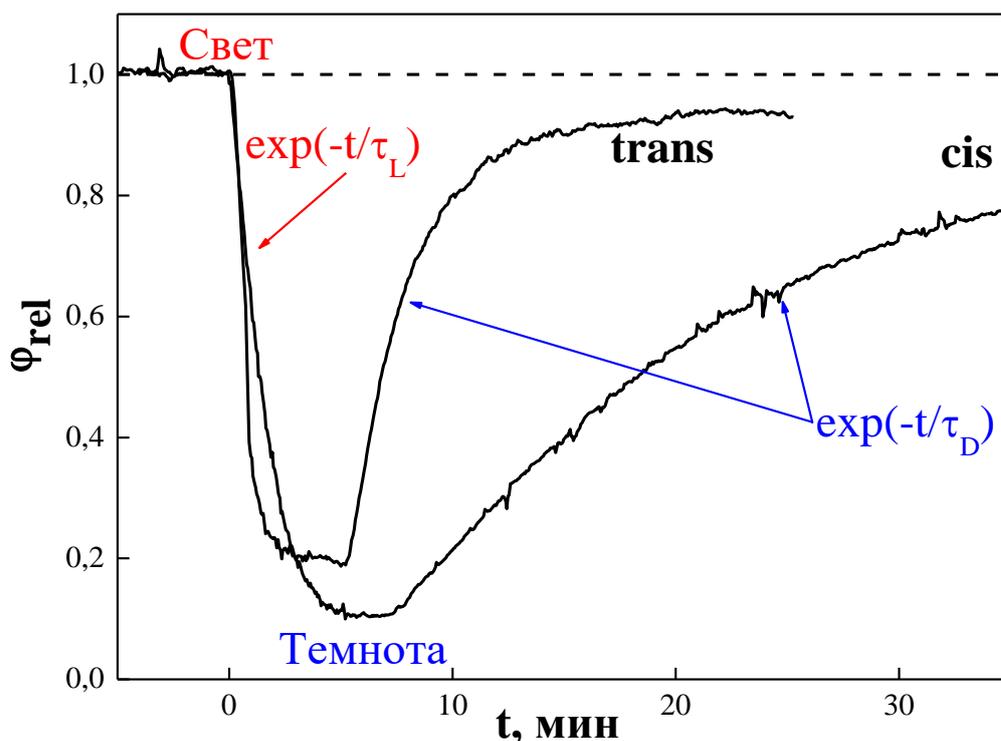


Рисунок 19. Кинетики относительного изменения граничного потенциала, вызванного адсорбцией 2 мкМ di-4-ANEPPS в присутствии 20мкМ AlPcS₄ в cis- и trans- конфигурациях.

Для подтверждения того факта, что данная модель адекватно описывает экспериментальные данные и скорость разрушения молекулы мишени R может

рассматриваться в качестве параметра, характеризующего стационарную концентрацию синглетного кислорода в мембране, была измерена зависимость скорости R от интенсивности облучаемого света I (I/I_0). Поскольку концентрация сгенерированного 1O_2 в мембране пропорционально интенсивности облучаемого света, то полученная линейная зависимость $R(I)$ (рис. 20) демонстрирует тот факт, что параметр R может служить количественной характеристикой стационарной концентрации 1O_2 .

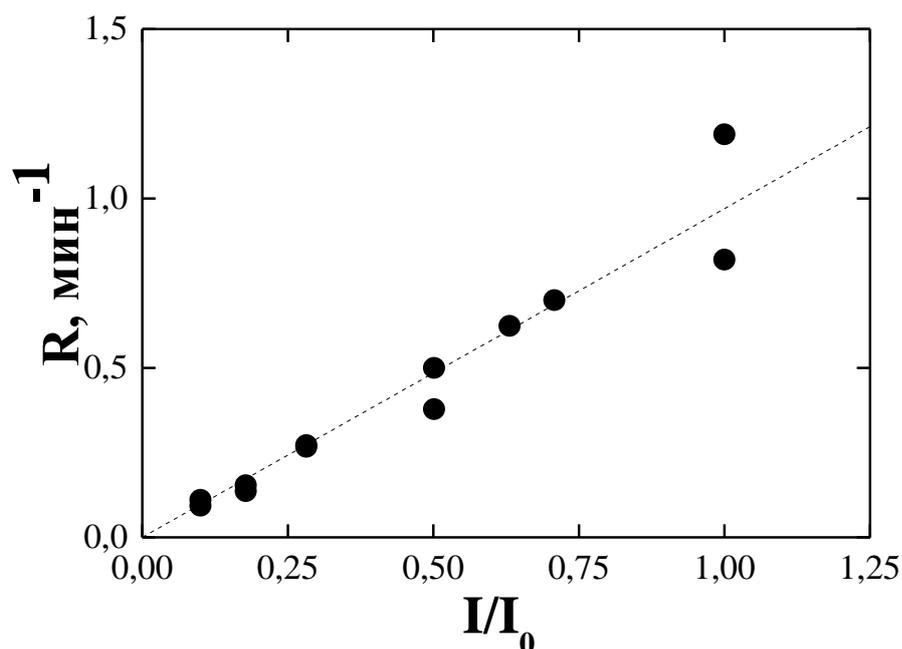


Рисунок 20. Влияние интенсивности света на скорость разрушения *di*-4-*ANEPPS*, вызванное освещением в присутствии 20мкМ *AlPcS₄* в *trans*-конфигурации.

Сравнение кинетик относительного изменения потенциала в *cis*- и *trans* – конфигурациях (рис. 19) показало, что и спад, и восстановление потенциала в случае *cis*-фотоэффекта происходит медленнее, чем в случае *trans*-фотоэффекта. Численно данный факт выражается в более высоких значениях временных констант экспонент, аппроксимирующих эти кинетики: временные константы экспонент при разрушении и восстановлении в *trans*-конфигурации ниже, чем в *cis*-конфигурации. Различие постоянных времени спада при разрушении можно

объяснить либо тушением кислорода молекулами мишенями, либо взаимодействием мишеней и фотосенсибилизаторов. Более подробно эти процессы будут рассмотрены в пункте 3.1.4.

Неожиданным результатом является то, что восстановление потенциала для trans-фотоэффекта происходит быстрее, чем для cis-фотоэффекта. Более того, восстановление происходит быстрее, чем изменение потенциала, вызванное адсорбцией di-4-ANEPPS после его добавления в раствор. Данный факт можно объяснить лишь наличием еще одного механизма восстановления потенциала (поверхностной плотности молекул di-4-ANEPPS) в случае trans-фотоэффекта. Таким механизмом может быть латеральный обмен между бислоем и мениском БЛМ, который образуется на границе отверстия в перегородке ячейки при ее формировании.

Адсорбции di-4-ANEPPS может происходить на поверхность как бислоя, так и мениска. При освещении мембраны в cis-конфигурации образовавшийся $^1\text{O}_2$ разрушает молекулы мишени на поверхности и мембраны, и мениска, поэтому латеральный обмен между ними не влияет на скорость восстановления потенциала. В случае trans-конфигурации образовавшийся $^1\text{O}_2$ должен продиффундировать через мембрану для разрушения мишени. Однако, толщина мениска намного превышает длину свободного пробега $^1\text{O}_2$, поэтому адсорбированные на поверхность мениска молекулы остаются неразрушенными. В связи с этим восстановление потенциала происходит не только за счет адсорбции новых молекул мишеней из раствора, но и за счет латерального обмена между мениском и бислоем, что приводит к ускорению процесса.

Для того, чтобы проверить предположение о влиянии латерального обмена на скорость разрушения мишени были проведены эксперименты на мембранах, сформированных на отверстиях в перегородках разного диаметра (0.3, 0.8 и 1,6 м). Результаты, полученные сотрудниками нашей лаборатории, представлены в таб. 4 и в работе [106]. Показано, что изменение размера отверстия (с 0.8 мм до 1.6 мм) существенно замедлило кинетику trans-фотоэффекта, в то время как кинетики cis-фотоэффекта зависят от размера мембраны незначительно.

Полученные экспериментальные данные были подтверждены теоретической моделью фотодинамического разрушения, учитывающей латеральный обмен. Данная модель описана в статье [106]. Показано, что учет данного процесса приводит к поправкам в выше приведенной кинетической модели, из-за которых значения временных констант экспонент разрушения и восстановления зависит от размеров мембраны и коэффициента латеральной диффузии D молекул мишеней в мембране r_m :

$$\frac{1}{\tau_L} = D \left(\frac{2.4}{r_m} \right)^2 + k_p [^1O_2] + k_d \quad (3.9);$$

$$\frac{1}{\tau_D} = D \left(\frac{2.4}{r_m} \right)^2 + k_d \quad (3.10).$$

Параметр скорости окисление мишени R , определяемый как $\frac{1}{\tau_L} - \frac{1}{\tau_D}$, от размеров мембраны не зависит, что подтверждается экспериментальными данными (таб. 4). Таким образом, несмотря на то, что кинетика фотоэффекта зависит от размера БЛМ, вследствие влияния процесса латеральной диффузии между бислоем и мениском, размер мембраны не влияет на значения скорости фотоэффекта.

Диаметр	τ_L^{cis} , мин	τ_D^{cis} , мин	τ_L^{trans} , мин	τ_D^{trans} , мин	R^{cis} , мин ⁻¹	R^{trans} , мин ⁻¹
0.8 мм	1.4±0.3	18±7	0.62±0.15	3.1±2.4	0.68±0.15	1.3±0.4
1,6 мм	1.1±0.3	26±7	0.82±0.10	8.2±3.1	0.80±0.16	1.2±0.5

Таблица 4. Кинетические параметры изменения потенциала адсорбции молекулы-мишени *di-4-ANEPPS*, сформированных на отверстиях разного размера. Раствор содержал 2мкМ *di-4-ANEPPS* и 20мкМ *AlPcS₄*.

3.1.4. Выбор молекулы мишени

Используя количественную характеристику, скорость *trans*-фотоэффекта R , был проведен сравнительный анализ четырех стироловых красителей *di-4-ANEPPS*, *di-8-ANEPPS*, *RH-421* и *RH-237*, структуры которых представлены на рис. 9 и рис. 15. В качестве фотосенсибилизатора был выбран четырежды сульфированный алюмофталоцианин (*AlPcS₄*), который ранее был использован

для изучения фотодинамического разрушения флоретина [99]. Концентрация ФС в растворе составила 20мкМ. Вычисленные скорости представлены в таб. 5.

Как следует из таблицы, чувствительность к окислению соединений группы ANEPPS более высокая, чем у красителей RH-серии. Сравнивая структурные формулы данных мишеней, можно предположить, что именно различие в структуре колец определяет разницу в полученных результатах. Таким образом, более высокая скорость фотоэффекта молекул ANEPPS, вероятнее всего, связана с более высокой восстановительной способностью нафталинового кольца по сравнению с таковой бензольного. Данный факт может быть объяснен неравномерным распределением π -электронов в нафталиновом кольце в отличие от бензольного [107].

	τ_L^{trans} , мин	τ_D^{trans} , мин	R^{trans} , мин ⁻¹
di-4-ANEPPS	0.62±0.15	3.1±2.4	1.3±0.4
di-8-ANEPPS	0.61±0.23	16±15	1.8±0.7
RH-421	7.6±3.5	79±5.3	0.03±0.005
RH-237	2.1±0.3	3.6±1	0.17±0.02

Таблица 5. Кинетические параметры изменения дипольного потенциала, вызванного фотодинамическим разрушением стироловых красителей на мембране.

Сравнение скоростей разрушения молекул-мишеней с разной длиной ненасыщенной углеводородной цепи между двумя ароматическими кольцами в молекулах серии RH, показало, что краситель с более длинной цепью (RH-237) дает более высокую скорость фотоэффекта. Однако, это различие в скоростях намного меньше, чем разница в скоростях фотоэффекта молекул ANEPPS и RH. Это означает, что углеводородная цепь способна окисляться синглетным кислородом, но вклад этого процесса в фотоэффект невелик. Возможно, более высокая способность к окислению ароматических колец красителей к синглетному кислороду обусловлена положением этих групп в мембране.

Молекулы красителей встраиваются в липидную мембрану таким образом, что сульфогруппа обращена к водному раствору, а хромофорная часть погружается в гидрофобную область липидного бислоя. В таком положении ароматические кольца погружены в липидный бислой, где концентрация синглетного кислорода, а также кислорода в основном состоянии выше [76].

Сравнение параметров фотоэффекта для молекул группы ANEPPS показало различие в значениях временных констант экспонент, аппроксимирующих кинетики восстановления потенциала: постоянная времени восстановления для di-8-ANEPPS выше, чем для di-4-ANEPPS. Данный параметр отражает скорость адсорбции молекул на поверхность мембраны, т.е. di-8-ANEPPS встраивается медленнее, чем di-4-ANEPPS. К аналогичным результатам пришли авторы статьи [92], в которой изучалась адсорбция этих соединений на поверхность огромных липидных везикул. Поскольку доказано существование агрегатов красителей di-4-ANEPPS, di-8-ANEPPS (как и для RH-421) в водных растворах [92, 108], то процесс адсорбции включает не только встраивание молекул в мембрану, но и процесс дезагрегации олигомеров. Низкая скорость адсорбции для di-8-ANEPPS может быть объяснена существованием более стабильных форм агрегатов по сравнению с другими красителями.

Ввиду вышеприведенных результатов, в качестве молекулы-мишени синглетного кислорода была выбрана di-4-ANEPPS, которая продемонстрировала высокие скорости фотоэффекта и адсорбции.

3.2. Фотодинамические свойства разносульфированных алюмофталоцианинов

На рис. 21А представлены зависимости скоростей фотоэффекта R от концентрации присутствующих в растворе алюмофталоцианинов с различным количеством сульфогрупп, в качестве молекулы-мишени синглетного кислорода был выбран краситель di-4-ANEPPS. Видно, что параметр R увеличивается с увеличением концентрации фталоцианинов в растворе, причем в случае фталоцианинов с числом групп меньше четырех скорость достигает насыщения

при высоких концентрациях. Стоит отметить, что в случае адсорбции фотосенсибилизатора и мишени по разные стороны мембраны (trans-фотоэффект) зависимость скорости от концентрации немонотонна: сначала скорость увеличивается, затем начинает уменьшаться, пока не устанавливается устойчивое значение. Подобные концентрационные зависимости были обнаружены при исследовании инактивации грамицидиновых каналов синглетным кислородом, генерируемым этими фталоцианинами [57]. Такое насыщение скорости концентрацией можно быть связано с тушением синглетного кислорода молекулами фталоцианина в мембране, который ранее был обнаружен методом хемоллюминесценции [72].

Для сравнения эффективности различных фталоцианинов необходимо учитывать, что фталоцианины имеют различное адсорбционное сродство к мембране. Более правильным решением в данном случае было бы построение графика зависимости скорости окисления от поверхностной плотности молекул фталоцианина. Ранее адсорбция разнесульфированных алюмофталоцианинов была исследована электрокинетическим методом на липосомах [57], с помощью измерений вольта-потенциалов на монослоях [67] и методом КВП [68]. Поскольку в случае трижды и четырежды сульфированных фталоцианинов граничные и ζ -потенциалы имеют похожие значения, а зависимости потенциалов от концентрации могут быть описаны уравнениями теории Гуи-Чепмена, то поверхностная плотность молекул может быть рассчитана с помощью уравнения

$$\frac{\sigma}{\sqrt{8\varepsilon\varepsilon_0RT C_{KCl}}} = sh\left(\frac{F\varphi_s}{2RT}\right) \quad (3.11),$$

где ε и ε_0 – электрические постоянные в растворе и вакууме, F – постоянная Фарадея, R – газовая постоянная, $T=300^\circ$ – абсолютная температура, C_{KCl} – концентрация KCl , а φ_s – поверхностный потенциал, значение которого в данных экспериментах совпадает с ζ -потенциалом [57].

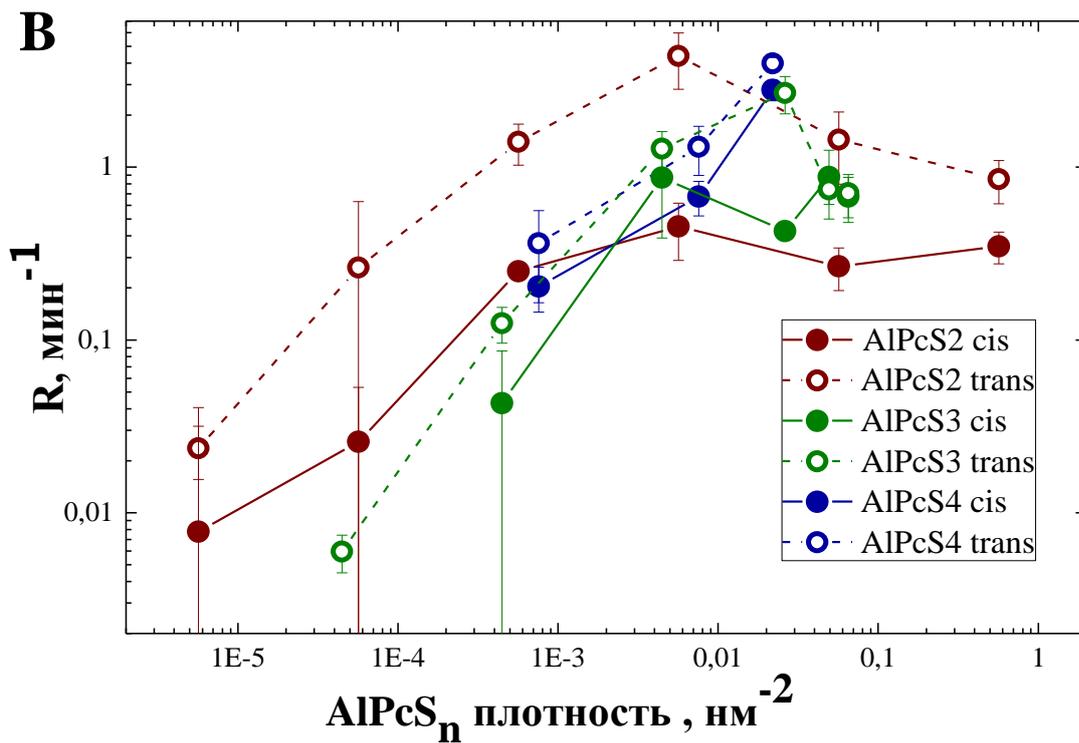
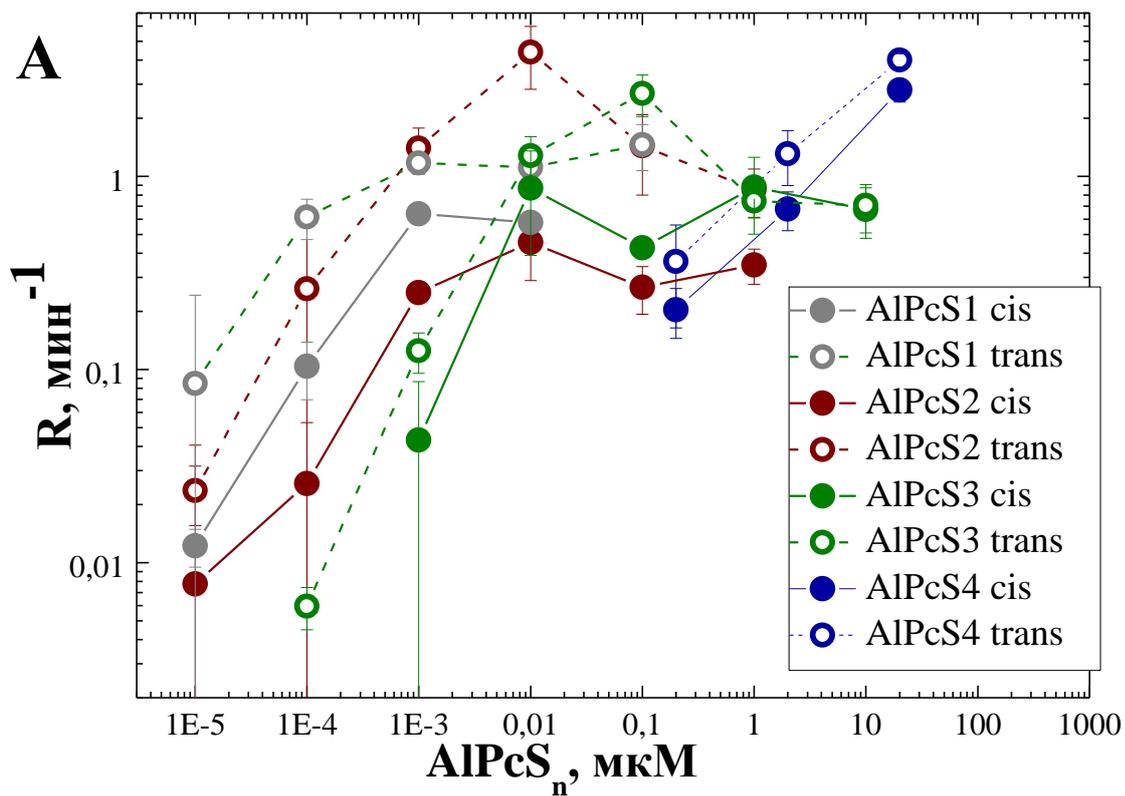


Рисунок 21. А) Зависимость скорости повреждения мишени *di-4-ANEPPS* от концентрации $AlPcS_n$ в растворе в *cis*- и *trans*- положениях. В) Зависимость скорости повреждения *di-4-ANEPPS* от поверхностной плотности $AlPcS_n$ в растворе в *cis*- и *trans*- положениях.

Однако, данный способ определения поверхностной плотности применим не всегда. Существует ряд соединений, адсорбция которых не описывается теорией Гуи-Чепмена, а в случае электронейтральных молекул их адсорбция вообще может быть обнаружена методом электрофоретической подвижности. К таким соединениям относятся стироловые красители и фталоцианины с одной или двумя сульфогруппами. В этом случае поверхностная плотность молекул определялась методами флуоресцентной корреляционной микроскопии. Эти эксперименты были проведены Д. Князевым. Зависимости скоростей окисления di-4-ANEPPS от поверхностной плотности AlPcS₂, AlPcS₃ и AlPcS₄ показаны на рис. 21В. Можно увидеть, что в таких координатах данные зависимости практически линейны в области менее 0,01 молекулы/ нм² для большинства фталоцианинов, имеют близкие друг к другу значения (за исключением AlPcS_{2trans}), а при более высоких значениях плотностей зависимости выходят на плато. Исключением из этой тенденции является AlPcS₄, для которого не наблюдалось насыщение зависимости скорости от плотности. Данный факт объясняется низкой константой связывания этого фталоцианина: при концентрации в 2*10⁻⁴М поверхностная плотность составила примерно 0,02 нм⁻².

Другим неожиданным фактом является то, что скорость cis-фотоэффекта всегда ниже, чем trans, и эта разница больше у моно и дважды сульфированных фталоцианинов, чем у трижды и четырежды сульфированных. Поскольку концентрация синглетного кислорода больше с той стороны мембраны, с которой он образуется, логично предположить, что разрушение мишеней в этой области должно происходить быстрее. Однако наблюдаемый эффект противоположен. Может показаться, что концентрация ¹O₂ в области, где он образуется, ниже, чем в области, куда он диффундирует. Но эксперименты с мишенями, адсорбированными сразу на обеих сторонах мембраны, доказывают обратное: концентрация ¹O₂ выше в той области, где он сгенерирован.

Существует несколько предположений, объясняющих данный феномен: молекулы ФС и мишени могут взаимодействовать с собой, уменьшая тем самым выход синглетного кислорода; либо молекулы ФС способны тушить синглетный

кислород; либо синглетный кислород способен «по-разному» взаимодействовать с di-4-ANEPPS в зависимости от положения его генерации (мишень способна тушить $^1\text{O}_2$).

Для того, чтобы проверить возможность взаимодействия ФС со стироловым красителем Д. Князевым были проведены флуоресцентные исследования в лаборатории Линца (Австрия) [109]. Были сняты спектры флуоресценции липосом с AlPcS₂ в присутствии и отсутствии di-4-ANEPPS. Поскольку влияния молекулы-мишени на спектры AlPcS₂ на липосомах не обнаружено, то их взаимодействие маловероятно.

Для оценки способности фотосенсибилизатора тушить синглетный кислород определено отношение скоростей фотоэффекта в cis- и trans-положения $\frac{R_{cis}}{R_{trans}}$ от концентрации ФС. Неизменность этого соотношения при низких концентрациях ФС исключает вклад тушения синглетного кислорода фотосенсибилизатором в различие между скоростями фотоэффектов.

Для оценки «тушения» синглетного кислорода мишенью были построены зависимости скоростей фотоэффекта от потенциала адсорбции di-4-ANEPPS (рис. 22) для AlPcS₂ и AlPcS₄, ФС отличающихся глубиной адсорбции с бислой. То, что для обоих ФС наклоны зависимостей скоростей в cis-конфигурации больше, чем в trans-конфигурации, доказывает существование тушения синглетного кислорода молекулами di-4-ANEPPS.

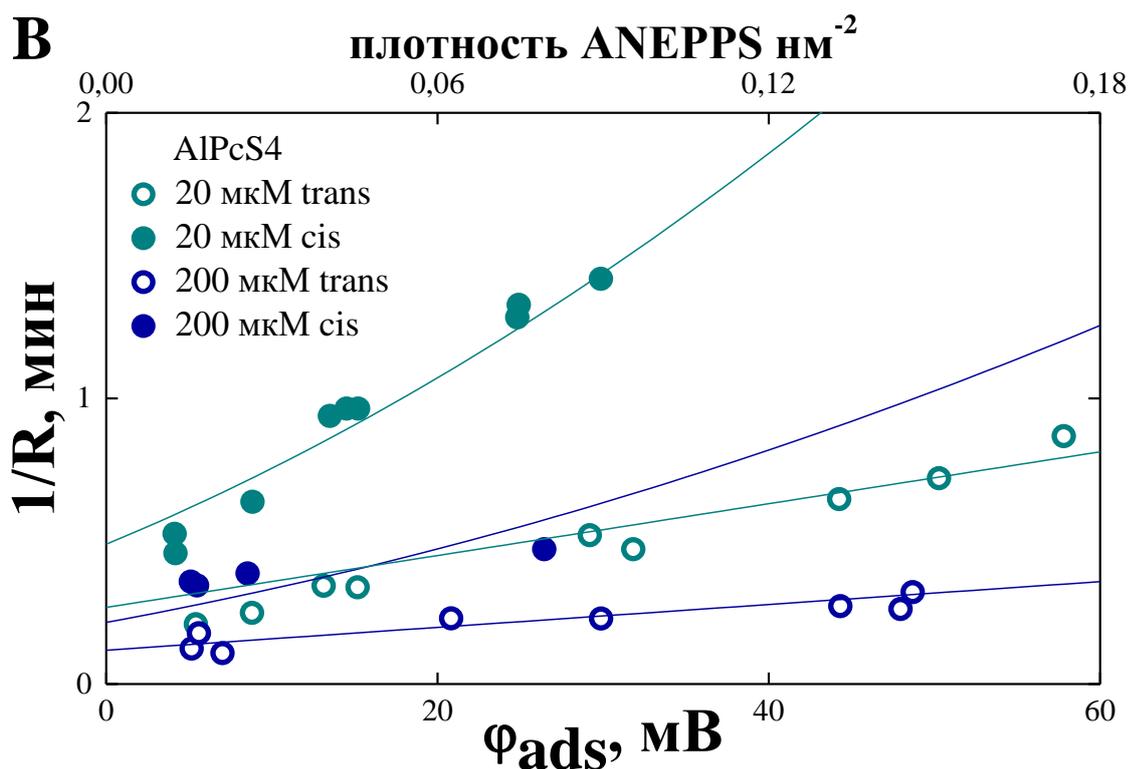
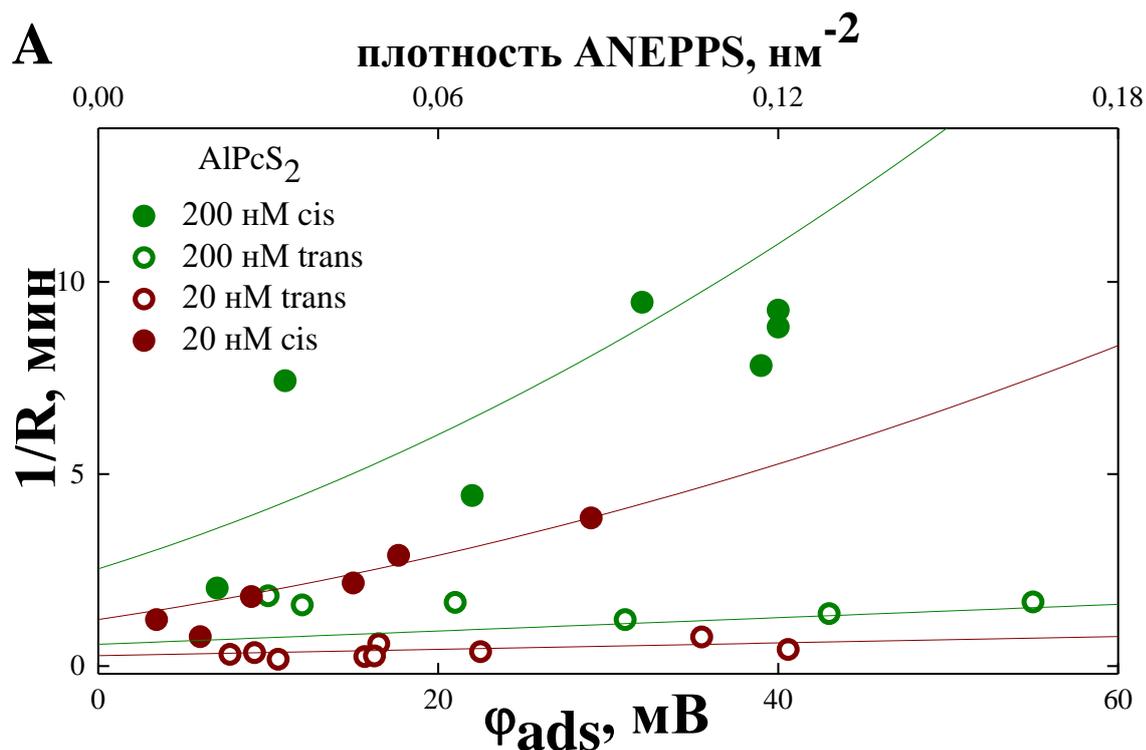


Рисунок 22. Зависимость обратной скорости *cis*- и *trans*-фотоэффектов от потенциала, обусловленного адсорбцией. *di*-4-ANEPPS, для (A) AlPcS₂ и (B) AlPcS₄ в водном растворе. Сплошные линии – аппроксимирующие кривые теоретической модели [109].

Ранее было показано, что стироловые красители имеют две области, служащие целью атаки синглетного кислорода: ароматическое кольцо и ненасыщенная углеводородная связь в центре молекулы, причем вклад окисления углеводородной цепи в фотоэффект невелик по сравнению с окислением кольца. В *cis*-конфигурации нафталиновое кольцо di-4-ANEPsS располагается примерно на 1 нм. дальше от молекулы ФС, чем двойная связь красителя. Следовательно, эта двойная связь способна “защищать” нафталиновое кольцо от окисления $^1\text{O}_2$. В *trans*-конфигурации нафталиновое кольцо расположено ближе к области генерации синглетного кислорода по сравнению с ненасыщенной цепочкой, что делает ее более доступной для синглетного кислорода, делая её основной целью для $^1\text{O}_2$. Поскольку разница между двумя конфигурациями была более заметной для моно и дважды сульфированных фталоцианинов по сравнению с трижды и четырежды сульфированными, было выдвинуто предположение, что положение и ориентация ФС на мембране влияет на тушение молекулами-мишенями синглетного кислорода. Усиленный эффект «тушения» для малосульфированных соединений, по-видимому, связан с погружением при адсорбции этих соединений в мембрану, что приводит к уменьшению расстояния между местом генерации синглетного кислорода и ненасыщенной углеводородной цепи в молекуле мишени. Эти соображения были сформулированы в теоретической модели [109], позволяющей количественно объяснить экспериментальные данные (рис. 23).

Теоретическая модель позволила оценить константы скоростей генерации $^1\text{O}_2$ для фталоцианинов. Показано, что константа скорости для AlPcS_2 в 4 раза выше, чем для AlPcS_4 . Поскольку квантовые выходы для мономеров AlPcS_n в растворах приблизительно равны, то данный факт можно объяснить погружением хромофора AlPcS_2 в мембрану - область, обогащенную синглетным кислородом.

Следовательно, при погружении адсорбированных молекул ФС в мембрану увеличивается их фотодинамическая активность. Данный вывод согласуется с полученными ранее данными об увеличении эффективности фотосенсибилизатора с увеличением его гидрофобности [73, 74]. Это объясняет

высокие значения скоростей разрушения мишеней для AlPcS₂ в trans-конфигурации. В cis-конфигурации значения скоростей занижены, поскольку высокая скорость генерации синглетного кислорода компенсируется его «тушением».

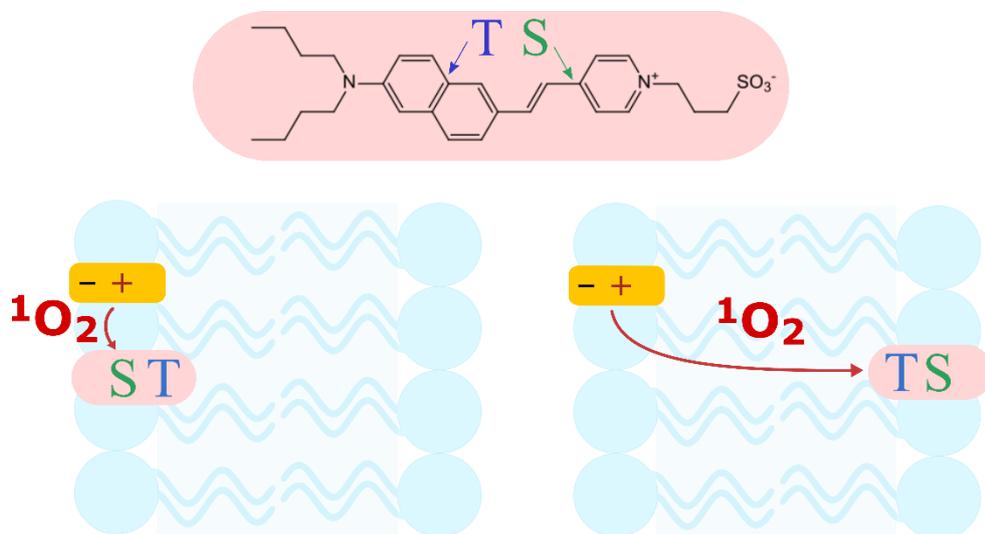


Рисунок 23. Модель генерации $^1\text{O}_2$, тушения и транспорта синглетного кислорода. В структуре ANEPPS есть два фрагмента, на которые может воздействовать $^1\text{O}_2$: ароматическое кольцо (T) и ненасыщенные углеводородная часть (S) [109].

Однако, предложенная теоретическая модель не смогла объяснить результаты, полученные с AlPcS₄, молекулы которого не погружаются в мембрану, а адсорбируются на ее поверхность на границе с водным раствором. Поскольку все коммерческие препараты алюмофталоцианинов представляют собой смеси разносульфированных соединений преимущественно нужной степени сульфирования, то было выдвинуто предположение, что небольшое различие в скоростях cis- и trans- эффектов связано с наличием следов низкосульфированных фталоцианинов, которые могут присутствовать в образцах AlPcS_n из-за несовершенства метода их синтеза. В связи с этим, было проведено исследование фотосенсибилизирующих свойств соединения TPPS₄ (рис. 1), в коммерческом препарате которого отсутствуют примеси малосульфированных соединений.

3.3. Изучение адсорбционных и фотодинамических свойств тетрасульфированного безметального порфирина

3.3.1 Адсорбционные свойства порфирина при нейтральном рН

Первым шагом в исследовании фотодинамической активности порфирина TPPS₄ является изучение его связывания с мембраной, поскольку фотодинамическая эффективность, связанных с мембранными структурами, ФС зависит от их позиции и ориентации на границе мембрана/вода. В связи с этим были сняты зависимости изменения разности граничных потенциалов и ζ-потенциала от концентрации TPPS₄ при нейтральном рН, которые представлены на рис. 24. В предположении, что значения ζ – потенциалов не сильно отличаются от поверхностного потенциала, описываемого уравнением Гуи-Чепмена, совпадение граничного потенциала, измеряемого методом КВП, с ζ – потенциалом означает, что молекула порфирина адсорбируется на поверхность мембраны без проникновения заряженных групп в бислой. Как видно из рис. 24 при увеличении концентрации потенциал возрастает, выходя на линейную зависимость от логарифма концентрации, наклон которой близок к величине 13мВ на порядок концентрации.

Предполагая, что начальный заряд мембраны до адсорбции TPPS₄ равен нулю, изменение заряда мембраны определяется равновесным распределением Больцмана молекул порфирина между поверхностью мембраны и раствором

$$\sigma = zKC_{TPPS_4}e^{-\frac{zF\varphi_s}{RT}}, \quad (3.12)$$

где C_{TPPS_4} - концентрация TPPS₄ в растворе, z - заряд молекулы TPPS₄, K – константа адсорбции. Подставляя данное выражение в формулу модели Гуи-Чепмана (8), получаем зависимость потенциала от концентрации порфирина и KCl в растворе:

$$\varphi \approx \frac{2RT}{(2z+1)F} \ln(C_{TPPS_4}) - \frac{2RT}{(2z+1)F} \ln(C_{KCl}) + \frac{2RT}{(2z+1)F} \ln\left(\frac{zK}{\sqrt{2\varepsilon\varepsilon_0RT}}\right) \quad (3.13).$$

Полученные экспериментальные данные были аппроксимированы данной зависимостью со следующими параметрами $z = -4$ и $K=0,76 \text{ C*cm}^{-2}\text{M}^{-1}$, изображенными пунктирными линиями на рис. 22. При увеличении концентрации KCl в растворе потенциал уменьшался, при этом наклон зависимости потенциала от концентрации TPPS₄ сохранялся. Таким образом, скачок потенциала на поверхности вызван адсорбцией четырехзарядных анионов, что соответствует количеству отрицательно заряженных сульфогрупп в молекуле порфирина.

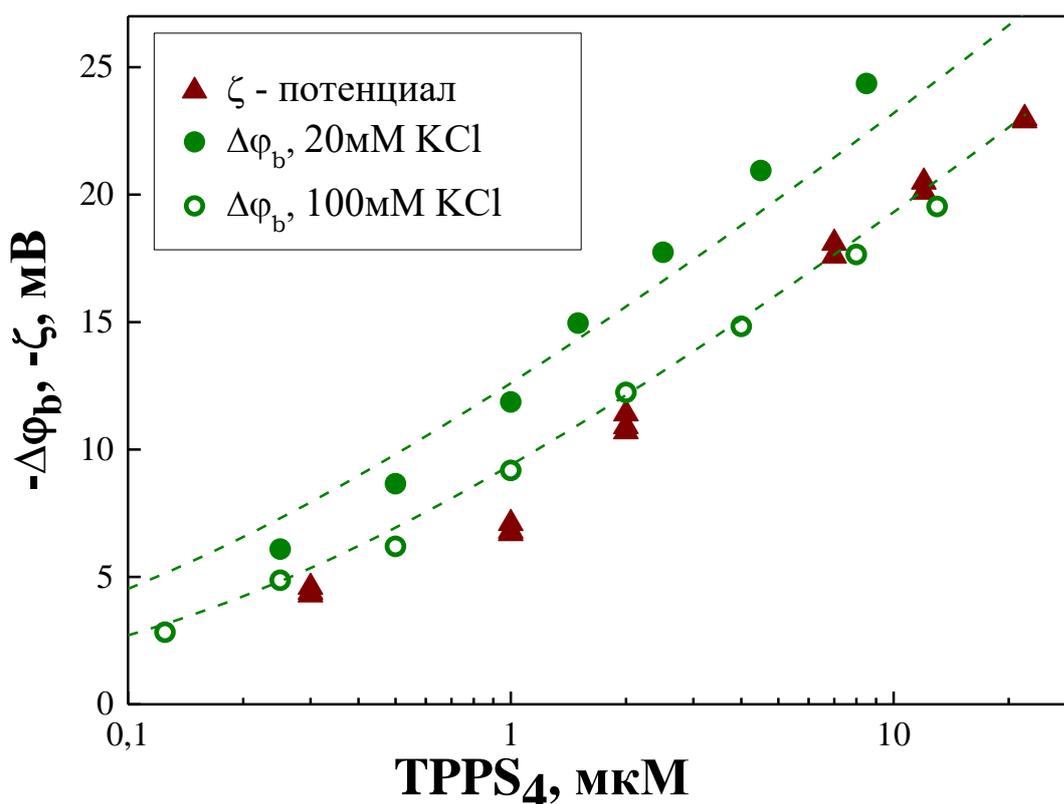


Рисунок 24. Зависимость изменения граничного потенциала на поверхности мембраны от концентрации TPPS₄ в растворе. Раствор содержал 20 мМ KCl, 2 мМ HEPES pH 7,0, 100 мМ KCl, 10 мМ HEPES pH 7,0. Пунктирные линии – аппроксимация данных зависимостью вида (3.13) с параметрами: $z = 4$, $K = 0,76 \text{ Кл см}^{-2} \text{ M}^{-1}$.

Полученные результаты позволяют сделать заключение, что молекулы TPPS₄ адсорбируются в виде четырехзарядных анионов, причем все заряды молекулы

лежат на поверхности мембраны и создают скачок потенциала в диффузной части двойного электрического слоя.

3.3.2. Зависимость заряда мембраны от pH

Поскольку при изменении pH среды происходит протонирование порфиринового кольца TPPS₄, изменяющее его конформацию из-за присоединения двух протонов к атомам азота в центральном кольце [44], то была поставлена задача по определению зависимости адсорбционных свойств TPPS₄ от pH.

При проведении подобного исследования необходимо знать, как изменялся заряд мембраны при изменении pH. Теоретически заряд мембраны, сформированной из фосфатидилхолина (DPhPC), должен оставаться нейтральным в нейтральной области pH, и становиться положительным при уменьшении pH до 3 и ниже из-за протонирования фосфата молекулы липида. Однако экспериментальные данные показывают отличные от теоретических предсказаний результаты: мембрана из DPhPC в нейтральной области pH может иметь небольшой по величине отрицательный поверхностный заряд [63].

На рис. 25 представлены зависимости ζ - и граничного потенциалов мембраны от pH раствора. ζ - потенциал липосом в области нейтральных pH имеет небольшое по величине отрицательное значение, а при уменьшении pH изменяется в положительную сторону, становясь положительным в области pH ниже 3. Зависимость граничного потенциала $\Delta\phi_b$ от pH в растворе была аналогичной зависимости от pH ζ - потенциала с точностью до сдвига на постоянную величину. Этот сдвиг происходит потому, что метод КВП не позволяет измерить абсолютное значение граничного потенциала, и при одинаковых значениях pH в растворах с двух сторон БЛМ значение $\Delta\phi_b$ равно нулю. Для корректного сравнения потенциалов, измеренных двумя методами, зависимость $\Delta\phi_b$ от pH раствора была сдвинута в вертикальном направлении так, чтобы значение $\Delta\phi_b$ при одинаковых pH в растворах совпало с соответствующим

этому рН значением ζ - потенциала. Тогда зависимости, измеренные двумя методами, оказываются близки друг к другу. Тем не менее, в области рН между 7 и 3, где поверхностный заряд липида должен быть нейтральным, величина поверхностного заряда отрицательна и существенно не изменяется.

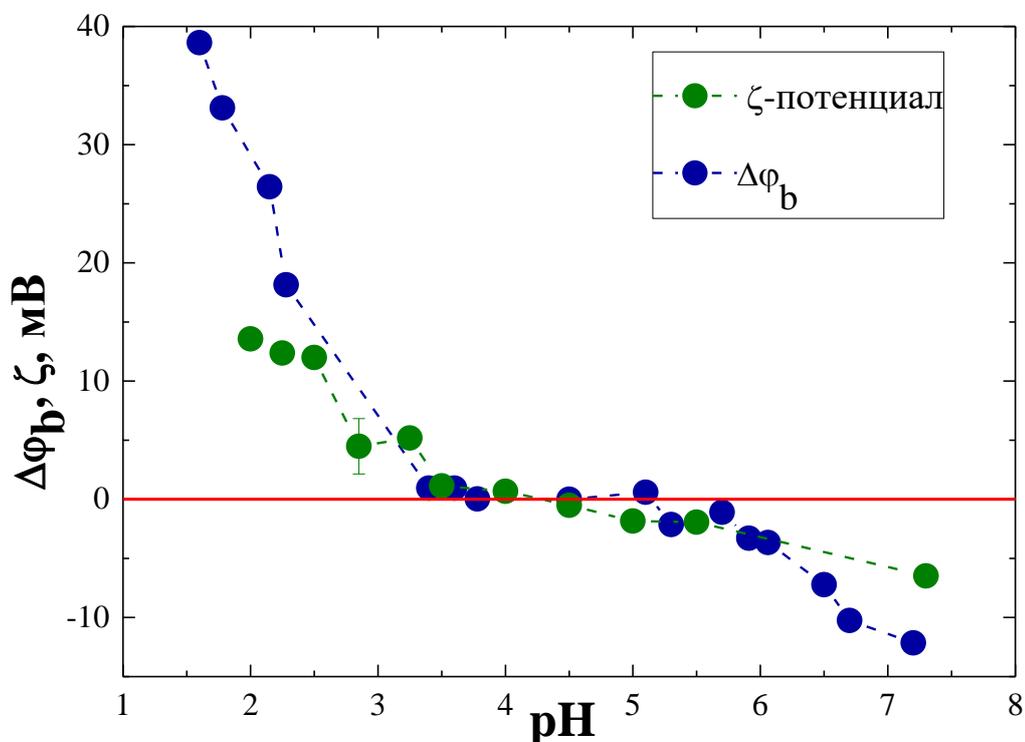


Рисунок 25. Зависимость величин $\Delta\phi_b$ БЛМ и ζ -потенциала липосом от рН раствора при изменении раствора с одной стороны мембраны. Исходный раствор содержал 20 мМ КСl, 2 мМ лимонной кислоты, 2 мМ HEPES, 2 мМ MES, 1 мМ EDTA, рН 7,4. рН изменяли добавлением HCl или KOH.

Стоит отметить, что в работах [110, 111], в которых измерялся потенциал очищенных фосфолипидов, значение подвижности липосом оставалось приблизительно равным нулю (до -1 мВ) в диапазоне рН от 3 до 9. Возможно такое расхождение данных связано с наличием отрицательно заряженных примесей или продуктов повреждения в липидах, используемых в экспериментах [64].

Изоэлектрическая точка для РС в наших экспериментах приближенна равна 3,5, что согласуется с данными [111], в которых данная величина была равна 3,1. Положительные значения потенциалов при низких значениях рН (менее 3)

появляются в связи с протонированием фосфатной группы, рКа которого меньше 1 [112].

3.3.3. Адсорбция тетрасульфированного порфирина при разных рН

Для исследования влияния рН на адсорбцию TPPS₄ на поверхность БЛМ были проведены две серии экспериментов. В первой серии исследовалась зависимость потенциала адсорбции порфирина от рН раствора, которую варьировали путем добавления HCl или KOH в оба отсека ячейки при условии неизменной концентрации порфирина (2,5 мкМ). Изменение рН производили после адсорбции порфирина на поверхность мембраны. Контроль рН среды в ячейке осуществляли электродом. Показано, что при уменьшении рН раствора происходит уменьшение граничного потенциала, приближающееся к нулю при рН менее трех. Полученная S-образная кривая зависимости представлена на рис. 26.

Во второй серии исследовалось влияние концентрации порфирина в растворе на потенциал адсорбции при различных фиксированных значениях рН (3, 4 и 7). Полученные кривые представлены на рис. 27. Зависимости граничного потенциала от логарифма концентрации TPPS₄ имеют одинаковый наклон при различных рН, что указывает на то, что заряд адсорбированных на БЛМ молекул порфирина остается равным -4 и не зависит от рН раствора. Полученные результаты согласуются с первой серией экспериментов. Это означает, что значения $\Delta\phi_b$ одинаковые независимо от того, изменился ли рН до или после адсорбции TPPS₄ на BLM.

Влияние рН на потенциал адсорбции можно объяснить двумя причинами. Во-первых, как было продемонстрировано в предыдущем пункте, от рН зависит поверхностный заряд фосфолипидной мембраны, что влияет на адсорбцию на ней анионов TPPS₄. Во-вторых, при уменьшении рН происходят изменения в молекуле TPPS₄ из-за присоединения к ее центру двух протонов [32, 33].

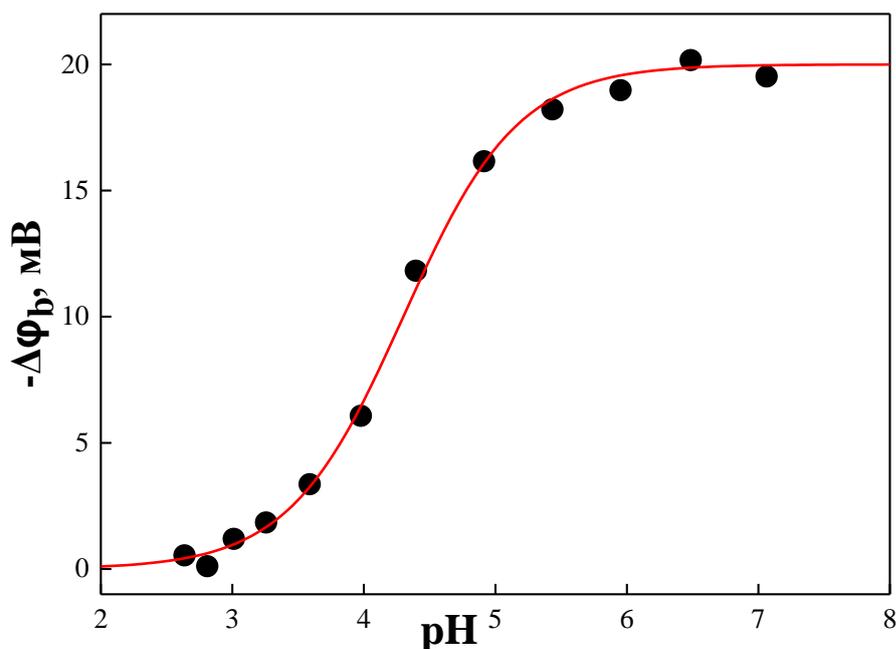


Рисунок 26. Зависимость $\Delta\Phi_b$ после добавления 2,5 мкМ TPPS₄ в водный раствор с одной стороны БЛМ от рН. Исходный раствор содержал 20 мМ KCl, 2 мМ лимонной кислоты, 2 мМ HEPES рН 7,0. рН изменяли добавлением в ячейку HCl.

Наблюдаемое падение потенциала не может быть связана с влиянием рН на поверхностный заряд, поскольку эффект поверхностного заряда направлен в противоположную сторону: адсорбция анионов при появлении положительного заряда мембраны должна усиливаться. Поскольку протонированная форма имеет отрицательный заряд -2, то стремление к нулю и исчезновение потенциала адсорбции TPPS₄ при рН < 3 нельзя объяснить только изменением заряда молекулы. Данный факт может быть объяснен тем, что протонированная форма не может адсорбироваться на БЛМ. Причиной может быть низкое сродство к фосфолипидной мембране протонированной формы TPPS₄. Это может быть вызвано либо изменением конформации молекулы при присоединении протонов [32], либо образованием агрегатов протонированных молекул при уменьшении рН [52, 113], не способных адсорбироваться на мембране.

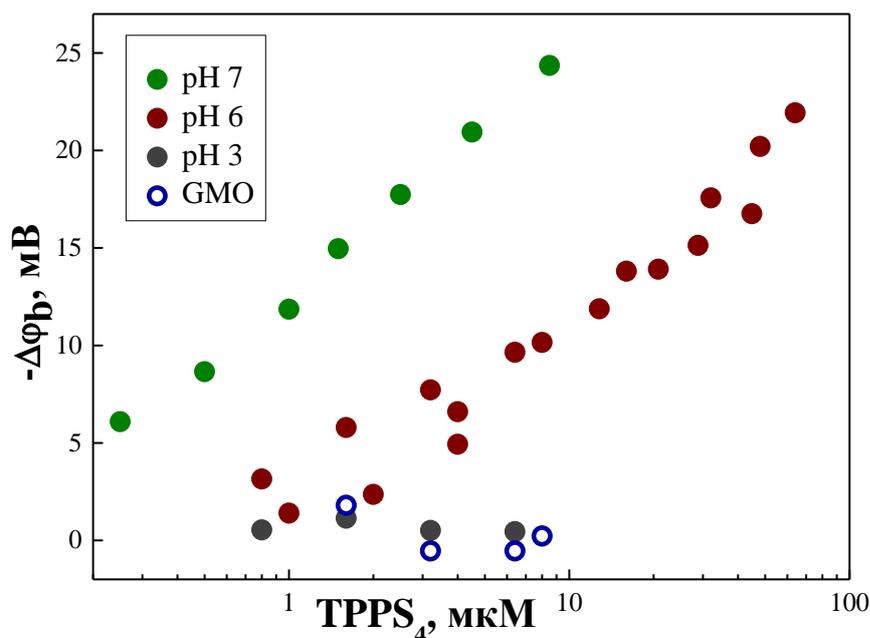


Рисунок 27. Зависимость изменения граничного потенциала на поверхности мембраны от концентрации TPPS₄ в растворе. Раствор содержал 20 мМ KCl, 2 мМ HEPES pH 7,0, pH 4,0 или pH 3,0. БЛМ была сформирована из DPhPC (закрашенные кружки) или из GMO (светлые кружки).

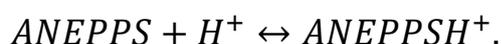
Ранее в работах было показано, что связывание фталоцианинов с БЛМ происходит благодаря образованию координационной связи между атомом металла и фосфатными группами мембранообразующих липидов [65]. Для проверки роли фосфатной группы в адсорбции TPPS₄ на поверхность мембраны были проведены эксперименты по изучению адсорбционных свойств порфирина на БЛМ, сформированную из липида, не содержащую фосфатную группу. В качестве такого липида был выбран глицеролмоноолеат (GMO). Как видно из рис. 27, граничный потенциал не изменялся при добавлении порфирина в ячейку, что говорит об отсутствии адсорбции TPPS₄ на данной БЛМ. Это подтверждает то, что фосфатная группа участвует в адсорбции порфирина. Возможно, в адсорбции TPPS₄ на мембрану участвуют водородные связи между пиррольными атомами водорода порфирина и кислородом в фосфатной группе.

Таким образом, для адсорбции тетрасульфированного порфирина на БЛМ необходимо, чтобы он был в депротонированной форме, и чтобы БЛМ была сформирована из липидов, имеющих фосфатную группу.

3.3.4. Адсорбция di-4-ANEPPS при разных pH

Для изучения фотодинамических свойств TPPS₄ при различных pH необходимо не только знать, изменяются ли адсорбционные свойства ФС при изменении pH, но и влияет ли pH на адсорбционные свойства молекул-мишеней. Для исследования этого влияния была проведена серия экспериментов, аналогичная проведенной для TPPS₄: регистрировалась зависимость потенциала адсорбции di-4-ANEPPS от pH раствора, которую варьировали путем добавления HCl или KOH в оба отсека ячейки при условии неизменной концентрации красителя (1.5 мкМ). Изменение pH производили после завершения адсорбции di-4-ANEPPS на поверхность мембраны. Полученная зависимость граничного потенциала от pH показана на рис. 28: величина Δφ_b не изменяется в диапазоне от 5 до 7, но уменьшается при более низком pH, приближаясь к нулю при pH менее 3.

Стириловый краситель di-4-ANEPPS в своем составе имеет два атома азота, один из которых всегда протонирован, благодаря чему суммарный заряд равен нулю. Второй атом тоже может протонироваться при уменьшении pH, поэтому в растворе существует две формы молекулы: протонированная и депротонирования:



Существование двух форм обнаружено спектральными методами для похожего по структуре красителя RH-421 [114].

Уменьшение граничного потенциала при уменьшении pH можно объяснить тем, что на БЛМ способна адсорбироваться только депротонированная форма di-4-ANEPPS. В предположении, что граничный потенциал прямопропорционален концентрации этих форм в растворе, можно оценить pK протонирования di-4-

ANEPPS, аппроксимировав зависимость граничного потенциала от рН (рис. 28) уравнением типа:

$$\Delta\varphi_b = \frac{\varphi_{max}}{1+10^{pK-pH}} \quad (3.14).$$

Это позволяет оценить константу рК диссоциации молекулы, которая составила 4,5. Полученное значение близко к измеренным ранее по спектрам поглощения значениям $pK=4,9\pm 0.1$ для RH-421 в водной среде [114]. Таким образом, адсорбция di-4-ANEPPS зависит от рН лишь в области рН выше 5.

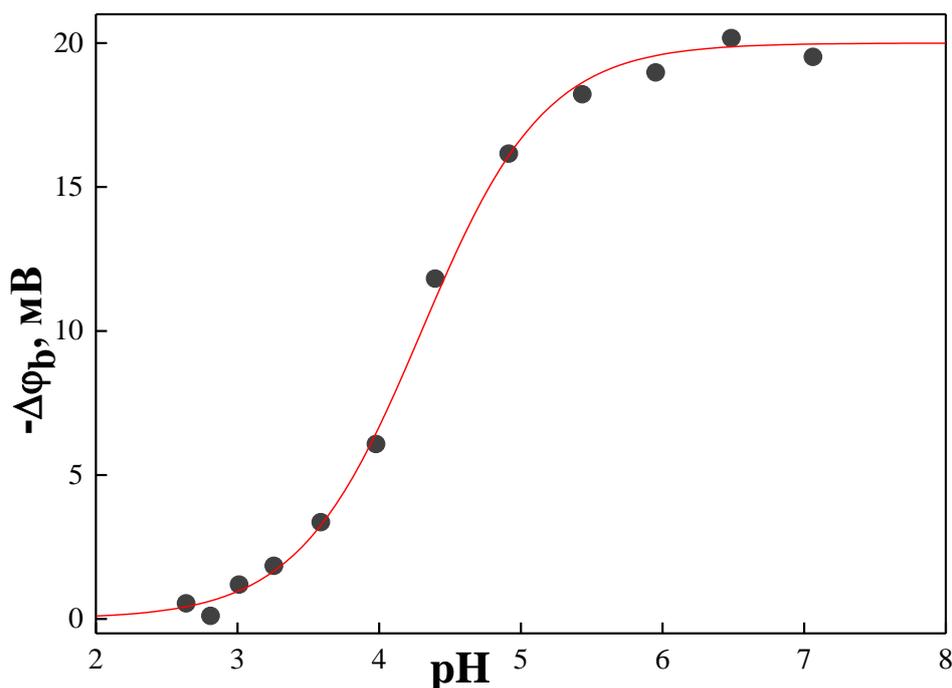


Рисунок 28. Зависимость от рН $\Delta\varphi_b$, создаваемой адсорбцией di-4-ANEPPS на мембране. Исходный раствор содержал 20 мМ КСl, 2 мМ цитрат, 2 мМ НЕРЕС, рН изменяли добавлением НСl или КОН. Концентрация ANEPPS составляла 1,5 мкМ.

3.3.5. Фотодинамические свойства порфирина при различных рН

Фотодинамическая эффективность для $TPPS_4$ была оценена аналогично представленной выше для $AlPcS_n$ по скорости R повреждения молекул-мишеней - стирилового красителя di-4-ANEPPS, инициированной освещением БЛМ, содержащим как молекулы-мишени, так и фотосенсибилизатор. Как и случае

фталоцианинов, проведены эксперименты для двух разных конфигураций: *cis* и *trans*. Освещение ячейки проводили полупроводниковым лазером на 405 нм.

Зависимости R от концентрации $TPPS_4$ в растворе являются нелинейными (рис.29А), однако, становятся линейными в координатах скорость разрушения/поверхностная плотность молекул порфирина (рис.29В). Поверхностная плотность $TPPS_4$ на мембране определялась, как и в случае $AlPcS_4$, по измеренному ζ -потенциалу с помощью уравнений Гуи-Чепмена. Полученный график линеен и существенно не меняется при увеличении концентрации KCl в растворе с 20 до 100. Сравнение скоростей разрушения *di-4-ANEPPS* на разных сторонах мембраны показало, что скорости *cis* - фотоэффекта выше или равна скорости *trans*-фотоэффекта. Для случая $AlPcS_4$ наблюдался противоположный эффект.

Данное различие между $TPPS_4$ и $AlPcS_4$ ожидаемо и соответствует предложенной выше теории, описывающей механизмы взаимодействия синглетного кислорода со стироловыми красителями: эффект «тушение» препарата $AlPcS_4$ связан с наличием примесей низкосульфированных соединений.

Стоит отметить, что зависимость R от концентрации $TPPS_4$ не приближалась к насыщению. Это объясняется тем, что молекулы $TPPS_4$, адсорбированные на поверхности БЛМ не способны тушить синглетный кислород.

Для проверки влияния pH на фотодинамические свойства $TPPS_4$ были сняты зависимости скорости разрушения от pH среды в диапазоне pH от 5 до 7, где адсорбция *di-4-ANEPPS* от pH не зависит. На рис. 30 приведены зависимости, полученные при концентрации порфирина в ячейке, равной 10^{-7} М. pH раствора в этих экспериментах изменяли путем добавления HCl или KOH в оба отсека ячейки. Как видно из графиков, изменение pH не влияет на значение скорости фотоэффекта в диапазоне pH от 5 до 7. Вероятнее всего, это связано с тем, что в данном диапазоне pH не наблюдается изменения адсорбционных свойств ни молекулы $ФС$, ни молекулы-мишени.

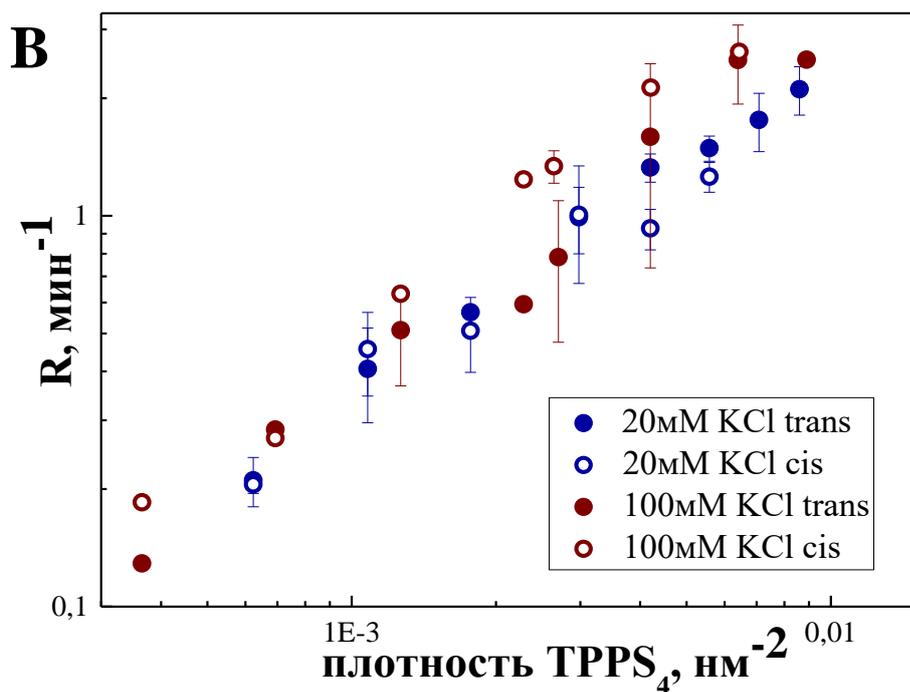
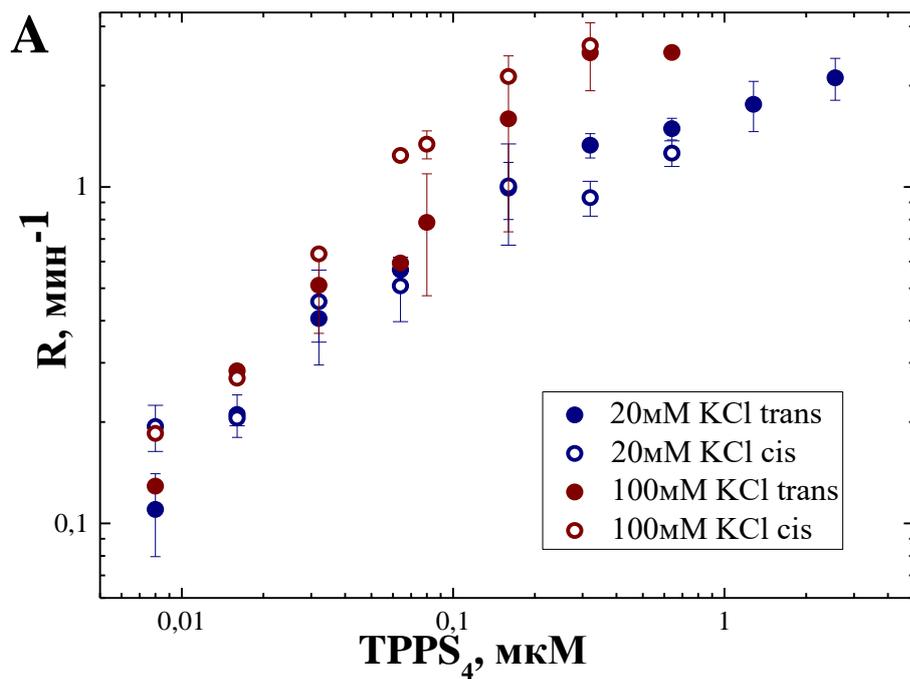


Рисунок 29. А) Зависимость скорости повреждения *di-4-ANEPPS* от концентрации $TPPS_4$ в растворе при освещении лазером с длиной волны света 405 нм. В) Зависимость скорости повреждения *di-4-ANEPPS* от поверхностной плотности $TPPS_4$. Растворы содержали либо 20 мМ KCl, 2 мМ HEPES, pH 7,0 либо 100 мМ KCl, 10 мМ HEPES pH 7,0.

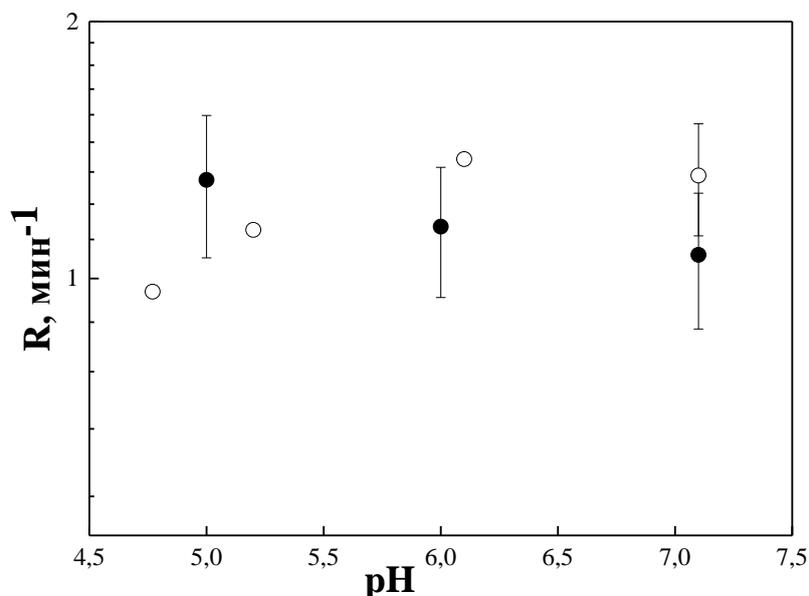


Рисунок 30. Зависимость скорости повреждения di-4-ANEPPS от pH раствора. Раствор содержал 20 мМ KCl, 2 мМ HEPES, 2 мМ цитрат, pH 7,0. Мембрану освещали лазером с длиной волны 405 нм.

3.4. Фотодинамическая активность метиленового синего

Метод измерения скорости повреждения молекул-мишеней позволяет исследовать и такие фотосенсибилизаторы, адсорбцию которых на БЛМ не удавалось зарегистрировать с помощью измерений граничного потенциала. Примером таких соединений является метиленовый синий (МС), структура которого представлена на рис. 31. При изучении адсорбции МС на бислойной липидной мембране изменения $\Delta\phi_b$ не наблюдались. Это может свидетельствовать либо о том, что количество адсорбированных на БЛМ молекул МС слишком мало (адсорбция не происходит), либо о том, что молекулы МС, адсорбирующиеся на БЛМ, не заряжены и ни обладают заметным по величине дипольным моментом, ориентированным в направлении нормали к поверхности мембраны.

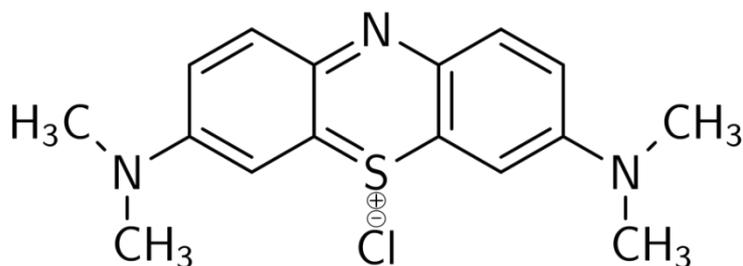


Рисунок 31. Структура метиленового синего (МС).

При изучении фотодинамической эффективности МС было обнаружено, что в присутствии МС происходило разрушение молекул di-4-ANEPPS, адсорбированных на БЛМ, при освещении (рис. 32). При этом молекулы di-4-ANEPPS и МС находились в растворах по разную сторону от мембраны, что исключало их прямое взаимодействие в воде. Из этих экспериментов можно сделать вывод, что молекулы МС адсорбируются на БЛМ, хотя это и не приводит к изменению $\Delta\phi_b$. Зависимость скорости разрушения R от концентрации МС в растворе была близка к линейной.

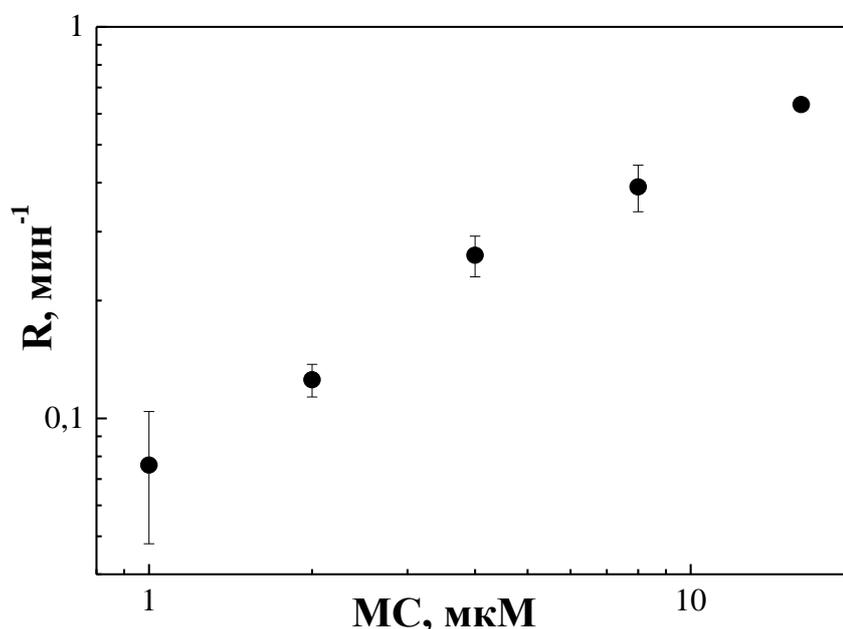


Рисунок 32. Зависимость скорости повреждения di-4-ANEPPS от концентрации метиленового синего в растворе при освещении лазером с длиной волны света 405 нм. Раствор содержал 20 мМ KCl, 2 мМ HEPES, pH 7,0.

Данный эксперимент наглядно демонстрирует тот факт, что метод регистрации окисления молекул-мишеней на БЛМ может быть распространен и на такие соединения, присутствие которых на БЛМ не может быть обнаружено имеющимися экспериментальными методами, основанными на измерении граничных потенциалов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании разработана тест-система для изучения адсорбции и фотодинамической активности ФС на БЛМ с помощью оригинального метода измерения скачков потенциала на границе мембрана/вода. Данная тест-система может быть применена в совокупности с другими методами для проверки фотодинамической активности перспективных ФС. Кроме того, разработанная система позволила исследовать влияние особенностей структуры ФС на их фотодинамическую активность. При сравнении фталоцианинов разной степени сульфирования было установлено, что фотодинамическая активность $AlPcS_n$ возрастает при уменьшении количества сульфогрупп. Это связано с погружением при адсорбции менее сульфированных алюмофталоцианинов в мембрану, в область с более высокой концентрацией кислорода в основном состоянии.

В качестве мишеней синглетного кислорода в данном исследовании были выбраны стироловые красители, которые имеют в своей структуре как ароматические кольца, так и ненасыщенные углеводородные цепи в центре молекул, которые имитируют ароматические аминокислоты (тирозин и триптофан) в белках и ненасыщенные липиды в мембране. Было показано, что 1O_2 более эффективно реагирует с ароматическим кольцом мишени, чем с ненасыщенной цепочкой в центре молекулы (данный процесс был назван «тушением»). «Тушение» 1O_2 возможно лишь при условии, что область генерации 1O_2 и двойная связь находятся на близком расстоянии, что провоцирует атаку именно по ненасыщенной цепи. Установлено, что данное условие может быть достигнуто только для амфифильных молекул ФС и мишени, которые погружаются в бислою.

На основании полученных результатов можно предположить, что белки с ароматическими кольцами обладают более высокой способностью к окислению синглетным кислородом, чем ненасыщенные фосфолипиды. С другой стороны, ненасыщенные углеводородные цепи могут снижать концентрацию синглетного кислорода в мембране за счет тушения и, таким образом, защищать белки.

Недавно такое поведение было обнаружено для ненасыщенных углеводородных цепей фосфолипидов при изучении фотодинамического разрушения грамицидина [119].

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ РАБОТЫ

1. Разработана тест-система для изучения взаимодействия ФС с БЛМ с помощью измерений скачков потенциалов на границе мембрана/вода. Продемонстрирована возможность моделирования фотодинамических реакций в данной системе при введении в нее специальных молекул-мишеней для синглетного кислорода.
2. Разработана методика оценки фотодинамической эффективности фотосенсибилизаторов, основанная на измерении зависимости скорости окисления мишеней от поверхностной плотности молекул ФС в мембране. Она позволяет сравнивать эффективность ФС разной структуры, различающихся средством к мембране.
3. На основе сравнительного изучения скорости разрушения различных стироловых красителей - мишеней синглетного кислорода в мембране установлено, что более высокой способностью к окислению $^1\text{O}_2$ обладают входящие в состав мишеней ароматические кольца по сравнению с ненасыщенными двойными связями углеводородных цепей в средней части молекулы.
4. Установлено влияние на фотодинамическую активность положения и ориентации ФС на мембране: увеличение глубины погружения ФС в мембрану приводит к увеличению эффективности генерации $^1\text{O}_2$ (скорости разрушения мишени). Согласно расчетам теоретической модели, константа скорости генерации $^1\text{O}_2$ погруженного в мембрану AlPcS_2 в 4 раза выше, чем для AlPcS_4 , адсорбированного на поверхности.
5. Обнаружен и охарактеризован процесс тушения $^1\text{O}_2$ молекулами di-4-ANEPPS. Установлено, что «тушение» $^1\text{O}_2$ мишенями возможно лишь при условии близкого

расположения области генерации $^1\text{O}_2$ (хромофора фталоцианина) и двойной связи в молекуле di-4-ANEPPS.

б. Установлено, что молекулы TPPS_4 адсорбируются на мембране только в депротонированном виде как анионы с четырьмя заряженными сульфогруппами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Raab O. Uber die wirkung fluorescirender stoffe auf infusorien //Z. biol. – 1900. – Т. 39. – С. 524-546.
2. Lipson R. L. et al. Hematoporphyrin derivative for detection of cervical cancer //Obstetrics & Gynecology. – 1964. – Т. 24. – №. 1. – С. 78-84.
3. Dougherty T. J. et al. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors //Cancer research. – 1978. – Т. 38. – №. 8. – С. 2628-2635.
4. Kuznetsova N. A. et al. Sulfonated phthalocyanines: aggregation and singlet oxygen quantum yield in aqueous solutions //Journal of Porphyrins and Phthalocyanines. – 2003. – Т. 7. – №. 03. – С. 147-154.12
5. Kuznetsova N. Sensitization of Singlet Oxygen Formation in Aqueous Media //Photosensitizers in Medicine, Environment, and Security. – Springer, Dordrecht, 2011. – С. 267-313.
6. Sharma S. K. et al. Photodynamic therapy for cancer and for infections: what is the difference? //Israel journal of chemistry. – 2012. – Т. 52. – №. 8-9. – С. 691-705.
7. Tejero I. et al. Theoretical modeling of hydroxyl-radical-induced lipid peroxidation reactions //The Journal of Physical Chemistry B. – 2007. – Т. 111. – №. 20. – С. 5684-5693.
8. Benov L. Photodynamic therapy: current status and future directions //Medical Principles and Practice. – 2015. – Т. 24. – №. Suppl. 1. – С. 14-28.
9. Singleton D. A. et al. Mechanism of ene reactions of singlet oxygen. A two-step no-intermediate mechanism //Journal of the American Chemical Society. – 2003. – Т. 125. – №. 5. – С. 1319-1328.
10. Frankel E. N. Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids //Progress in lipid research. – 1984. – Т. 23. – №. 4. – С. 197-221.
11. Juarranz Á. et al. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications //Clinical and Translational Oncology. – 2008. – Т. 10. – №. 3. – С. 148-154.

12. Moan J., BERG K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen //Photochemistry and photobiology. – 1991. – T. 53. – №. 4. – C. 549-553.
13. Moan J., Berg K. Photochemotherapy of cancer: experimental research //Photochemistry and Photobiology. – 1992. – T. 55. – №. 6. – C. 931-948.
14. Mroz P. et al. Photodynamic therapy with fullerenes //Photochemical & Photobiological Sciences. – 2007. – T. 6. – №. 11. – C. 1139-1149.
15. Peng Q., Moan J. Correlation of distribution of sulphonated aluminium phthalocyanines with their photodynamic effect in tumour and skin of mice bearing CaD2 mammary carcinoma //British journal of cancer. – 1995. – T. 72. – №. 3. – C. 565.
16. Moan J., Pettersen E. O., Christensen T. The mechanism of photodynamic inactivation of human cells in vitro in the presence of haematoporphyrin //British journal of cancer. – 1979. – T. 39. – №. 4. – C. 398-407.
17. Dougherty T. J. et al. Photodynamic therapy //JNCI: Journal of the national cancer institute. – 1998. – T. 90. – №. 12. – C. 889-905.
18. Volden G., Christensen T., Moan J. E. Photodynamic membrane damage of hematoporphyrin derivative-treated NHIK 3025 cells in vitro //Photobiochemistry and Photobiophysics. – 1981. – T. 3. – №. 2. – C. 105-111.
19. Specht K. G., Rodgers M. A. J. Depolarization of mouse myeloma cell membranes during photodynamic action //Photochemistry and photobiology. – 1990. – T. 51. – №. 3. – C. 319-324.
20. Gibson S. L., Murant R. S., Hilf R. Photosensitizing effects of hematoporphyrin derivative and photofrin II on the plasma membrane enzymes 5'-nucleotidase, Na⁺ K⁺-ATPase, and Mg²⁺-ATPase in R3230AC mammary adenocarcinomas //Cancer research. – 1988. – T. 48. – №. 12. – C. 3360-3366.
21. Thomas J. P., Girotti A. W. Role of lipid peroxidation in hematoporphyrin derivative-sensitized photokilling of tumor cells: protective effects of glutathione peroxidase //Cancer research. – 1989. – T. 49. – №. 7. – C. 1682-1686.

22. Peng Q., Moan J., Nesland J. M. Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy // *Ultrastructural pathology*. – 1996. – Т. 20. – №. 2. – С. 109-129.
23. Tsubone T. M. et al. Cellular compartments challenged by membrane photo-oxidation // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2020. – С. 108665.
24. Lang K., Mosinger J., Wagnerová D. M. Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy // *Coordination chemistry reviews*. – 2004. – Т. 248. – №. 3-4. – С. 321-350.
25. Mroz P. et al. Photodynamic therapy with fullerenes // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2007. – Т. 6. – №. 11. – С. 1139-1149.
26. Taquet J. et al. Phthalocyanines covalently bound to biomolecules for a targeted photodynamic therapy // *Current medicinal chemistry*. – 2007. – Т. 14. – №. 15. – С. 1673-1687.
27. Sharman W. M., van Lier J. E., Allen C. M. Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems // *Advanced drug delivery reviews*. – 2004. – Т. 56. – №. 1. – С. 53-76.
28. Brown E. M. B. et al. Advancements in using TiO₂ bionanoconjugates for precision degradation of intracellular biological structures // *Journal of biomedical nanotechnology*. – 2013. – Т. 9. – №. 4. – С. 539-550.
29. Abrahamse H., Hamblin M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy // *Biochemical Journal*. – 2016. – Т. 473. – №. 4. – С. 347-364.
30. Edrei R. et al. Sulfonated phthalocyanines: photophysical properties, in vitro cell uptake and structure–activity relationships // *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. – 1998. – Т. 2. – №. 3. – С. 191-199.
31. Шапошников Г. П., Кулинич В. П., Майзлиш В. Е. Модифицированные фталоцианины и их структурные аналоги // М.: Красанд. – 2012.

32. Ma S. Y. Theoretical studies on the structural change in the N-protonated meso-tetrakis (p-sulfonatophenyl) porphyrin // *Chemical Physics Letters*. – 2000. – T. 332. – №. 5-6. – C. 603-610.
33. Aggarwal L. P. F., Borissevitch I. E. On the dynamics of the TPPS4 aggregation in aqueous solutions: Successive formation of H and J aggregates // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2006. – T. 63. – №. 1. – C. 227-233.
34. Rosenthal I. et al. The role of molecular oxygen in the photodynamic effect of phthalocyanines // *Radiation research*. – 1986. – T. 107. – №. 1. – C. 136-142.
35. Ozoemena K., Kuznetsova N., Nyokong T. Comparative photosensitised transformation of polychlorophenols with different sulphonated metallophthalocyanine complexes in aqueous medium // *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*. – 2001. – T. 176. – №. 1-2. – C. 29-40.
36. Van Lier J. E. et al. Phthalocyanines as sensitizers for photodynamic therapy of cancer // *Photosensitisation*. – Springer, Berlin, Heidelberg, 1988. – C. 435-444.
37. Nyokong T., Antunes E. Photochemical and photophysical properties of metallophthalocyanines // *Handbook of Porphyrin Science (Volume 7) With Applications to Chemistry, Physics, Materials Science, Engineering, Biology and Medicine*. – 2010. – C. 247-357.
38. Aggarwal L. P. F., Baptista M. S., Borissevitch I. E. Effects of NaCl upon TPPS4 triplet state characteristics and singlet oxygen formation // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2007. – T. 186. – №. 2-3. – C. 187-193.
39. Lang K., Mosinger J., Wagnerová D. M. Photophysical properties of porphyrinoid sensitizers non-covalently bound to host molecules; models for photodynamic therapy // *Coordination chemistry reviews*. – 2004. – T. 248. – №. 3-4. – C. 321-350.
40. Parra G. G. et al. Quantum dot effects upon the interaction between porphyrins and phospholipids in cell membrane models // *European Biophysics Journal*. – 2016. – T. 45. – №. 3. – C. 219-227.

41. Zafar I. et al. Aluminum phthalocyanine derivatives: potential in antimicrobial PDT and photodiagnosis // *Austin Biomol Open Access*. – 2016. – T. 1. – №. 2. – C. 1010.
42. Muehlmann L. A. et al. Aluminum–phthalocyanine chloride associated to poly (methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy // *International journal of nanomedicine*. – 2014. – T. 9. – C. 1199.
43. Ma J. et al. Generation of singlet oxygen via the composites of water-soluble thiol-capped CdTe quantum dots sulfonated aluminum phthalocyanines // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2008. – T. 112. – №. 15. – C. 4465-4469.
44. Ma H. L., Jin W. J. Studies on the effects of metal ions and counter anions on the aggregate behaviors of meso-tetrakis (p-sulfonatophenyl) porphyrin by absorption and fluorescence spectroscopy // *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. – 2008. – T. 71. – №. 1. – C. 153-160.
45. Berg K., Bommer J. C., Moan J. Evaluation of sulfonated aluminum phthalocyanines for use in photochemotherapy. Cellular uptake studies // *Cancer letters*. – 1989. – T. 44. – №. 1. – C. 7-15.
46. Edrei R., Kimel S. Oxygen depletion during in vitro photodynamic therapy: structure-activity relationships of sulfonated aluminum phthalocyanines // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 1999. – T. 50. – №. 2-3. – C. 197-203.
47. BERG K., BOMMER J. C., MOAN J. Evaluation of sulfonated aluminum phthalocyanines for use in photochemotherapy. A study on the relative efficiencies of photoinactivation // *Photochemistry and photobiology*. – 1989. – T. 49. – №. 5. – C. 587-594.
48. Gottfried V. et al. Photosensitizers in organized media: singlet oxygen production and spectral properties // *Photochemistry and photobiology*. – 1988. – T. 48. – №. 2. – C. 157-163.

49. Fernandez J. M., Bilgin M. D., Grossweiner L. I. Singlet oxygen generation by photodynamic agents //Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 1997. – T. 37. – №. 1-2. – C. 131-140.
50. Ogunsipe A., Nyokong T. Photophysical and photochemical studies of sulphonated non-transition metal phthalocyanines in aqueous and non-aqueous media //Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. – 2005. – T. 173. – №. 2. – C. 211-220.
51. Ostler R. B. et al. The Effect of pH on the Photophysics and Photochemistry of Di-sulphonated Aluminum Phthalocyanine //Photochemistry and photobiology. – 2000. – T. 71. – №. 4. – C. 397-404.
52. Augulis R. et al. Theoretical modeling of TPPS4 J-aggregates //Solid State Phenomena. – Trans Tech Publications, 2004. – T. 97. – C. 225-228.
53. Telfer A. et al. Isolated photosynthetic reaction center of photosystem II as a sensitizer for the formation of singlet oxygen. Detection and quantum yield determination using a chemical trapping technique //Journal of Biological Chemistry. – 1994. – T. 269. – №. 18. – C. 13244-13253.
54. Spiller W. et al. Singlet oxygen quantum yields of different photosensitizers in polar solvents and micellar solutions //Journal of Porphyrins and Phthalocyanines. – 1998. – T. 2. – №. 2. – C. 145-158.
55. Krasnovsky J. A. A. Singlet molecular oxygen in photobiochemical systems: IR phosphorescence studies //Membrane & cell biology. – 1998. – T. 12. – №. 5. – C. 665-690.
56. Ehrenberg B., Anderson J. L., Foote C. S. Kinetics and yield of singlet oxygen photosensitized by hypericin in organic and biological media //Photochemistry and photobiology. – 1998. – T. 68. – №. 2. – C. 135-140.
57. Rokitskaya T. I. et al. Photosensitizer binding to lipid bilayers as a precondition for the photoinactivation of membrane channels //Biophysical journal. – 2000. – T. 78. – №. 5. – C. 2572-2580.

58. Kawai C. et al. Photodamage in a Mitochondrial Membrane Model Modulated by the Topology of Cationic and Anionic Meso-Tetrakis Porphyrin Free Bases //Photochemistry and photobiology. – 2014. – T. 90. – №. 3. – C. 596-608.
59. Savitsky A. P. et al. pH dependence of fluorescence and absorbance spectra of free sulphonated aluminium phthalocyanine and its conjugate with monoclonal antibodies //Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 1992. – T. 13. – №. 3-4. – C. 327-333.
60. Maman N. et al. Kinetic and equilibrium studies of incorporation of di-sulfonated aluminum phthalocyanine into unilamellar vesicles //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 1999. – T. 1420. – №. 1. – C. 168-178.
61. Pashkovskaya A. A. et al. Interaction of tetrasubstituted cationic aluminum phthalocyanine with artificial and natural membranes //Biochemistry (Moscow). – 2009. – T. 74. – №. 9. – C. 1021-1026.
62. Martinez De Pinillos Bayona A. et al. Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers //Chemical biology & drug design. – 2017. – T. 89. – №. 2. – C. 192-206.
63. Makino K. et al. Temperature-and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta potential data //Biophysical chemistry. – 1991. – T. 41. – №. 2. – C. 175-183.
64. V.V.Cherny, V.S.Sokolov, and I.G.Abidor, Determination of surface charge of bilayer lipid membranes, Bioelectrochemistry and Bioenergetics 7 (1980) 413-420.
65. Pashkovskaya A. A. et al. Photodynamic activity and binding of sulfonated metallophthalocyanines to phospholipid membranes: Contribution of metal-phosphate coordination //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 2007. – T. 1768. – №. 10. – C. 2459-2465.
66. Ramos A. P. et al. Porphyrin–phospholipid interaction and ring metallation depending on the phospholipid polar head type //Journal of colloid and interface science. – 2010. – T. 350. – №. 1. – C. 148-154.

67. Shapovalov V. L. et al. Effect of Fluoride Anions on Gramicidin Photoinactivation Sensitized by Sulfonated Aluminum Phthalocyanines // *Photochemistry and photobiology*. – 2001. – Т. 74. – №. 1. – С. 1-7.
68. Соколенко Е.А. Межфазные потенциалы, возникающие при фотосенсибилизированных окислительных реакциях на поверхности БЛМ: дисс. канд. физ.-мат. наук: 02.00.05; защищена 03.03.2009 – М. 2009. – 118с.
69. Cordeiro R. M., Miotto R., Baptista M. S. Photodynamic efficiency of cationic meso-porphyrins at lipid bilayers: insights from molecular dynamics simulations // *The Journal of Physical Chemistry B*. – 2012. – Т. 116. – №. 50. – С. 14618-14627.
70. Martin M. T., Möbius D. Enhanced binding of porphyrin by a laterally organized monolayer // *Thin Solid Films*. – 1996. – Т. 284. – С. 663-666.
71. Tsuchiya Y. et al. Adsorption of tetrakis (4-sulfophenyl) porphyrin onto liposomal surfaces composed of neutral diacylphosphatidylcholine and release by cyclodextrin // *RSC Advances*. – 2018. – Т. 8. – №. 22. – С. 11930-11934.
72. Krasnovsky Jr A. A. et al. Quenching of singlet molecular oxygen by phthalocyanines and naphthalocyanines // *Photochemistry and photobiology*. – 1992. – Т. 55. – №. 5. – С. 691-696.
73. Lavi A. et al. The depth of porphyrin in a membrane and the membrane's physical properties affect the photosensitizing efficiency // *Biophysical journal*. – 2002. – Т. 82. – №. 4. – С. 2101-2110.
74. Bronshtein I. et al. Porphyrin depth in lipid bilayers as determined by iodide and parallax fluorescence quenching methods and its effect on photosensitizing efficiency // *Biophysical journal*. – 2004. – Т. 87. – №. 2. – С. 1155-1164.
75. Subczynski W. K., Hyde J. S. Concentration of oxygen in lipid bilayers using a spin-label method // *Biophysical journal*. – 1983. – Т. 41. – №. 3. – С. 283-286.
76. Cordeiro R. M. Reactive oxygen species at phospholipid bilayers: distribution, mobility and permeation // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. – 2014. – Т. 1838. – №. 1. – С. 438-444.

77. Sokolov V. S. et al. Electrical potential distribution over the bilayer lipid membrane due to amphiphilic ion adsorption // *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*. – 1990. – Т. 298. – №. 1. – С. 27-44.
78. Rokitskaya T. I., Antonenko Y. N., Kotova E. A. The interaction of phthalocyanine with planar lipid bilayers: photodynamic inactivation of gramicidin channels // *FEBS letters*. – 1993. – Т. 329. – №. 3. – С. 332-335.
79. Stozhkova I. N., Cherny V. V., Sokolov V. S. Haematoporphyrin Dimethyl Ether Transport across Bilayer Lipid Membrane // *MEMBRANE AND CELL BIOLOGY C/C OF BIOLOGICHESKIE MEMBRANY*. – 1995. – Т. 9. – С. 215-215.
80. McLaughlin S. The electrostatic properties of membranes // *Annual review of biophysics and biophysical chemistry*. – 1989. – Т. 18. – №. 1. – С. 113-136.
81. McLaughlin S. Electrostatic potentials at membrane-solution interfaces // *Current topics in membranes and transport*. – Academic Press, 1977. – Т. 9. – С. 71-144.
82. Ermakov Y. A., Sokolov V. S. Boundary potentials of bilayer lipid membranes: methods and interpretations // *Membrane Science and Technology*. – 2003. – Т. 7. – №. С. – С. 109-141.
83. Соколов В.С. Локальное разделение зарядов в мембране при адсорбции и ионном транспорте: дисс. доктор физ.-мат. наук: 03.01.02; – защищена 18.10.2012 - М. 2012. – 216 с.
84. Cevc G. Membrane electrostatics // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes*. – 1990. – Т. 1031. – №. 3. – С. 311-382
85. Sokolov V., Mirsky V. Electrostatic potentials of bilayer lipid membranes: basic principles and analytical applications // *Ultrathin Electrochemical Chemo-and Biosensors*. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2004. – С. 255-291.
86. Malkov D.Y. and Sokolov V.S. 1996. Fluorescent styryl dyes of the RH series affect a potential drop on the membrane/solution boundary. *Biochim. Biophys. Acta* 1278:197-204.

87. Loew L. M. et al. A naphthyl analog of the aminostyryl pyridinium class of potentiometric membrane dyes shows consistent sensitivity in a variety of tissue, cell, and model membrane preparations //The Journal of membrane biology. – 1992. – T. 130. – №. 1. – С. 1-10.
88. Müller W., Windisch H., Tritthart H. A. Fluorescent styryl dyes applied as fast optical probes of cardiac action potential //European Biophysics Journal. – 1986. – T. 14. – №. 2. – С. 103-111.
89. Clarke R. J. The dipole potential of phospholipid membranes and methods for its detection //Advances in colloid and interface science. – 2001. – T. 89. – С. 263-281.
90. Bühler R. et al. Charge translocation by the Na, K-pump: I. Kinetics of local field changes studied by time-resolved fluorescence measurements //The Journal of membrane biology. – 1991. – T. 121. – №. 2. – С. 141-161.
91. Loew L. M. Design and characterization of electrochromic membrane probes //Journal of biochemical and biophysical methods. – 1982. – T. 6. – №. 3. – С. 243-260.
92. Matson M. et al. Spectral properties and orientation of voltage-sensitive dyes in lipid membranes //Langmuir. – 2012. – T. 28. – №. 29. – С. 10808-10817.
93. Mueller P. et al. Methods for the formation of single bimolecular lipid membranes in aqueous solution //The journal of physical chemistry. – 1963. – T. 67. – №. 2. – С. 534-535.
94. Stozhkova I. N. et al. Adsorption of haematoporphyrins on the planar bilayer membrane //Membrane & cell biology. – 1997. – T. 11. – №. 3. – С. 381-399.
95. Sokolov V. S. et al. Interaction of pyridinium bis-retinoid (A2E) with bilayer lipid membranes //Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2007. – T. 86. – №. 2. – С. 177-185.
96. Стожкова И.Н., Мирский В.М., Соколов В.С. Стехиометрия фотохимической реакции, индуцирующей повреждение липидного бислоя в присутствии фотосенсибилизатора // Биол. мембраны - 1993. - Т. 10. - С. 44-49.

97. Mirsky V. M., Stozhkova I. N., Szito T. V. Photosensitized damage of bilayer lipid membrane in the presence of haematoporphyrin dimethylether //Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 1991. – Т. 8. – №. 3. – С. 315-324.
98. Sokolov V. S. et al. Membrane photopotential generation by interfacial differences in the turnover of a photodynamic reaction //Biophysical journal. – 2000. – Т. 79. – №. 4. – С. 2121-2131.
99. Sokolov V. S., Pohl P. Membrane transport of singlet oxygen monitored by dipole potential measurements //Biophysical journal. – 2009. – Т. 96. – №. 1. – С. 77-85.
100. Wobschall D. Voltage dependence of bilayer membrane capacitance //Journal of Colloid and Interface Science. – 1972. – Т. 40. – №. 3. – С. 417-423.
101. Alvarez O., Latorre R. Voltage-dependent capacitance in lipid bilayers made from monolayers //Biophysical journal. – 1978. – Т. 21. – №. 1. – С. 1-17.
102. Babakov A. V., Ermishkin L. N., Liberman E. A. Influence of electric field on the capacity of phospholipid membranes //Nature. – 1966. – Т. 210. – №. 5039. – С. 953-955.
103. Абидор, И.Г., И.Ю.Глазунов, С.Л.Лейкин, Ю.А.Чизмаджев. 1986. Экспериментальное и теоретическое изучение природы быстрого изменения емкости бислойных липидных мембран в электрическом поле.
104. Sokolov V. S., Kuzmin V. G. Measurement of surface potential difference of bilayers by second harmonique of capacitive current //Biofisika. – 1980. – Т. 25. – С. 170.
105. Sokolov V. S. et al. Voltage-sensitive styryl dyes as singlet oxygen targets on the surface of bilayer lipid membrane //Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2016. – Т. 161. – С. 162-169.
106. Соколов В. С. и др. Окисление и латеральная диффузия стириловых красителей на поверхности бислойной липидной мембраны //Электрохимия. – 2017. – Т. 53. – №. 10. – С. 1321-1333.

107. Robinson D. et al. Di-8-ANEPPS emission spectra in phospholipid/cholesterol membranes: a theoretical study //The Journal of Physical Chemistry B. – 2011. – T. 115. – №. 14. – C. 4160-4167.
108. Zouni A., Clarke R. J., Holzwarth J. F. Kinetics of the solubilization of styryl dye aggregates by lipid vesicles //The Journal of Physical Chemistry. – 1994. – T. 98. – №. 6. – C. 1732-1738.
109. Sokolov V. S. et al. Residence time of singlet oxygen in membranes //Scientific reports. – 2018. – T. 8. – №. 1. – C. 1-11.
110. Papahadjopoulos D. Surface properties of acidic phospholipids: interaction of monolayers and hydrated liquid crystals with uni-and bi-valent metal ions //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 1968. – T. 163. – №. 2. – C. 240-254.
111. Bangham A. D. Membrane models with phospholipids //Progress in biophysics and molecular biology. – 1968. – T. 18. – C. 29-95.
112. Moncelli M. R., Becucci L., Guidelli R. The intrinsic pKa values for phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylserine in monolayers deposited on mercury electrodes //Biophysical journal. – 1994. – T. 66. – №. 6. – C. 1969-1980.
113. Ribó J. M. et al. Aggregation in water solutions of tetrasodium diprotonated meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrin //Journal of the Chemical Society, Chemical Communications. – 1994. – №. 6. – C. 681-682.
114. Clarke R. J. Effect of lipid structure on the dipole potential of phosphatidylcholine bilayers //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes. – 1997. – T. 1327. – №. 2. – C. 269-278.
115. Peng Q., Nesland J. M. Effects of photodynamic therapy on tumor stroma //Ultrastructural pathology. – 2004. – T. 28. – №. 5-6. – C. 333-340.
116. Henderson B. W., Dougherty T. J. How does photodynamic therapy work? //Photochemistry and photobiology. – 1992. – T. 55. – №. 1. – C. 145-157.

117. Davies M. J. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences //Biochemical and biophysical research communications. – 2003. – Т. 305. – №. 3. – С. 761-770.
118. Болдырев А. А. и др. Введение в биомембранологию //М.: Изд-во МГУ. – 1990. – Т. 208. – С. 3.
119. Rokitskaya T. I. et al. Unsaturated lipids protect the integral membrane peptide gramicidin A from singlet oxygen //FEBS letters. – 2014. – Т. 588. – №. 9. – С. 1590-1595.
120. Kröger J. et al. Exploring the Organic–Inorganic Interface With a Scanning Tunneling Microscope. – 2018.

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

в журналах, индексируемых в базах данных

Web of Science, RSCI, Scopus, РИНЦ

1. Sokolov, V.S.; Gavrilchik, A. N.; Kulagina, A. O.; Meshkov, I. N.; Pohl, P.; Gorbunova, Y. G. Voltage-Sensitive Styryl Dyes As Singlet Oxygen Targets on the Surface of Bilayer Lipid Membrane. *J. Photochem. Photobiol. B* 2016, 161, 162-169. Импакт фактор 4.383 (Web of Science)
2. Konstantinova, A.N.; Sokolov, V. S.; Jimenez-Munguia, I.; Finogenova, O. A.; Ermakov, Y. A.; Gorbunova, Y. G. Adsorption and Photodynamic Efficiency of Meso-Tetrakis(p-Sulfonatophenyl)Porphyrin on the Surface of Bilayer Lipid Membranes. *J. Photochem. Photobiol. B* 2018, 189, 74-80. Импакт фактор 4.383 (Web of science)
3. Sokolov, V.S.; Batischev, O. V.; Akimov, S. A.; Galimzyanov, T. R.; Konstantinova, A. N.; Malingriaux, E.; Gorbunova, Y. G.; Knyazev, D. G.; Pohl, P. Residence Time of Singlet Oxygen in Membranes. *Scientific Reports* 2018, 8, 14000. Импакт фактор 3.998 (Web of science)
4. В. С. Соколов, А. А. Щербаков, В. Ю. Ташкин, А. Н. Гаврильчик, Ю. А. Чизмаджев, and П. Поль. Окисление и латеральная диффузия стироловых красителей на поверхности бислойной липидной мембраны. *Электрохимия* 53 (10):1321-1333, 2017. Импакт фактор 1,063 (Web of science)