

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

Физический факультет

На правах рукописи

КОНСТАНТИНОВА АННА НИКОЛАЕВНА

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

Специальность 03.01.02 – «Биофизика»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Москва – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН

- Научный руководитель (консультант)** – *Соколов Валерий Сергеевич, доктор физ.-мат. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биоэлектрохимии ИФХЭ РАН*
- Официальные оппоненты** – *Аносов Андрей Анатольевич, доктор физ.-мат. наук, профессор ФГАОУ ВО первого МГМУ им. И.М. Сеченова, заведующий кафедрой медицинской и биологической физики*
Башикиров Павел Викторович, кандидат физ.-мат. наук, ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, заведующий лабораторией электрофизиологии
Тихонов Александр Николаевич, доктор физ.-мат. наук, профессор МГУ им. М.В. Ломоносова кафедры биофизики, профессор

Защита диссертации состоится «17» июня 2021 г. в 16.00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.01.04 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2, Физический факультет МГУ, 5.68

E-mail: info@physics.msu.ru

Диссертация находится на хранении в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27). С информацией о регистрации участия в защите и с диссертацией в электронном виде можно ознакомиться на сайте ИАС «ИСТИНА»: появится

<https://istina.msu.ru/dissertations/368974832/>

Автореферат разослан «___» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат технических наук

А.Э. Сидорова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 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, выводов и списка литературы. Работа изложена на 101 странице, содержит 32 рисунка и 5 таблиц. Библиография включает 120 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении раскрыта актуальность темы диссертационной работы, сформулированы цели и задачи диссертационного исследования, научная новизна и практическая значимость выполненной работы.

Первая глава состоит из трех разделов. В первом разделе изложены основы метода фотодинамической терапии рака. Второй раздел представляет литературный обзор, в котором рассмотрены имеющиеся в литературе данные о структуре и свойствах сульфированных алюмофталоцианинов ($AlPcS_n$) и тетрасульфированного порфирина ($TPPS_4$). Проведен анализ влияния этих свойств

на взаимодействие данных соединений с искусственными мембранами и на их фотодинамическую активность. В третьем разделе проанализированы имеющиеся данные по изучению электростатических потенциалов, возникающих при связывании нейтральных и заряженных молекул на поверхности бислойной липидной мембраны (БЛМ), на примере соединений, используемых в данной работе: AlPcS_n и стирловых красителей.

Во второй главе описаны методика и техника экспериментов, позволяющие проводить исследования фотодинамических свойств ФС. Описан оригинальный метод компенсации внутримембранного поля (КВП) для измерения разности граничных потенциалов $\Delta\phi_b$, который позволяет изучать адсорбцию молекул на поверхности БЛМ. Описаны конфигурация ячейки для формирования БЛМ, требуемые источники света, способы анализа изменения разности граничных потенциалов.

В третьей главе диссертации приводятся результаты экспериментального исследования. Глава состоит из четырех разделов.

В первом разделе третьей главы описана методика определения фотодинамической активности различных ФС на модельной липидной мембране. Эта мембрана сформирована из неокисляемых (насыщенных) липидов. На ней адсорбируются молекулы ФС и специальные соединения - мишени, которые окисляются синглетным кислородом ($^1\text{O}_2$). Адсорбция на БЛМ молекул ФС и мишеней $^1\text{O}_2$ регистрируется по изменению $\Delta\phi_b$ с помощью метода КВП. Освещение этой системы также приводит к изменению $\Delta\phi_b$, вследствие окисления мишеней на поверхности БЛМ и появления продуктов реакции, которые либо десорбируются с БЛМ, либо создают $\Delta\phi_b$ отличные от первоначального. Эффективность ФС на БЛМ оценивают по кинетике $\Delta\phi_b$ во время и после отключения освещения.

В качестве ФС выбраны сульфированный алюмофталоцианины AlPcS_n (рис. 1), адсорбция которых на БЛМ была изучена ранее [4]. Определено, что AlPcS_1 и AlPcS_2 при адсорбции встраиваются в БЛМ, в то время как AlPcS_3 и AlPcS_4 адсорбируется на поверхность мембраны без погружения.

В качестве молекул-мишеней выбраны стирильные красители di-4-ANEPPS, di-8-ANEPPS, RH-421 и RH-237 (рис.1). Взаимодействие с мембраной молекул RH серии было также изучено методом КВП ранее [1]. В данной работе приведены данные об адсорбции на БЛМ красителей серии ANEPPS. Показано, что выбранные красители (серии RH и ANEPPS), связываясь с мембраной, ориентируются вдоль нормали к мембране, погружая положительно заряженную часть в гидрофобную область БЛМ и обращая к водному раствору отрицательно заряженную сульфогруппу. Регистрируемая разность потенциалов в результате адсорбции красителей $\Delta\varphi_{\text{ads}}$ прямо пропорциональна поверхностной плотности этих молекул на БЛМ.

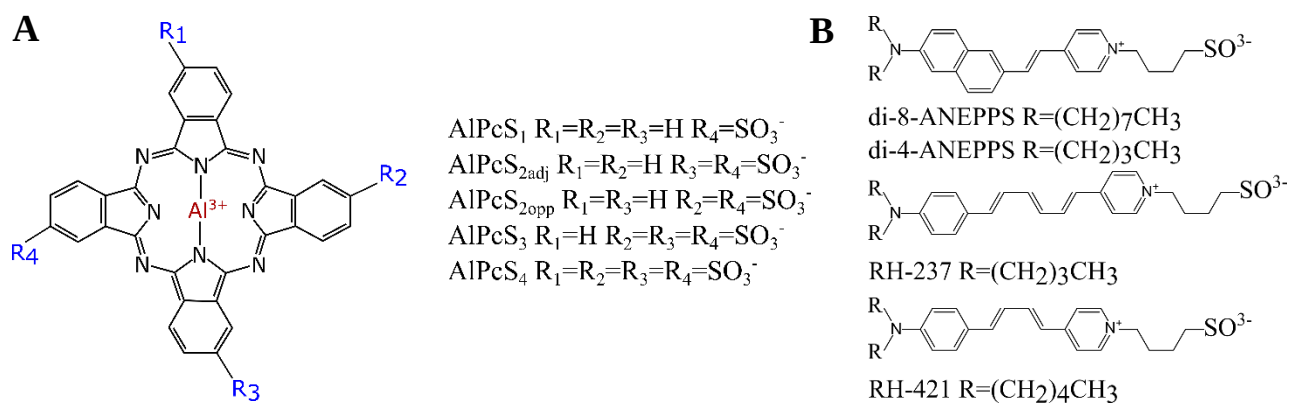


Рис. 1. Структура A) сульфированных алюмофталочиаинов AlPcS_n и B) стирильных красителей серии RH и ANEPPS.

Поскольку на мембране адсорбируются молекулы двух видов, то существуют две возможные конфигурации их взаимного расположения: *cis* (ФС и мишени адсорбированы на одной стороне мембраны) и *trans* (ФС и мишени адсорбированы на разных сторонах мембраны). Независимо от взаимного расположения ФС и мишени, освещение БЛМ приводит к изменению $\Delta\varphi_b$ знак которого соответствует уменьшению потенциала, вызванного адсорбцией мишени (рис. 2). Тот факт, что изменение $\Delta\varphi_b$ при освещении происходило и в *cis*-, и в *trans*-конфигурациях, позволяет сделать вывод, что реализуются фотодинамические реакции, в которых участвуют молекулы ¹O₂, которые могут проникать через мембрану и взаимодействовать с мишенями. Окисленные формы выбранных мишеней десорбируются с поверхности БЛМ, а изменение $\Delta\varphi_b$ во

время и после освещения соответствует изменению поверхностной плотности неокисленных мишеней на поверхности.

Для количественной оценки фотодинамической активности ФС на БЛМ разработана теоретическая модель, описывающая изменение концентрации мишеней на поверхности (и соответствующее ему изменение $\Delta\phi_b$) при освещении и после его отключения. В качестве скорости фотоэффекта предложено использовать параметр R , который пропорционален стационарной концентрации 1O_2 , образующегося при непрерывном освещении мембраны с адсорбированными на ней молекулами ФС: $R = k_p[^1O_2]$, где k_p - константа скорости фотосенсибилизированного окисления мишени. Данный параметр может быть экспериментально определен путем аппроксимации изменения $\Delta\phi_b$ при освещении и его восстановления в темноте экспоненциальными функциями с временными константами τ_L и τ_D соответственно (рис. 2): $R = \frac{1}{\tau_L} - \frac{1}{\tau_D}$.

При варьировании размера БЛМ путем использования экспериментальных ячеек с отверстиями разного диаметра в перегородках было установлено влияние площади БЛМ на кинетику фотоэффекта [2]. Данная зависимость была объяснена латеральной диффузией молекул мишеней между бислоем и мениском БЛМ, который образуется при формировании мембраны на границе отверстия в перегородке ячейки. Показано, что, несмотря на поправки в кинетической модели, вызванные учетом латеральной диффузии, значение параметра скорости фотоэффекта R не зависит от диаметра БЛМ.

Для изучения механизма фотодинамических реакций были проведены сравнительные исследования скорости фотоэффектов с различными мишенями: di-4-ANEPPS, di-8-ANEPPS, RH-421 и RH-237 (рис. 1). Скорость разрушения красителей серии ANEPPS оказалась значительно выше, чем у красителей RH-серии, что было объяснено различием структуры ароматических колец данных соединений, а именно тем, что нафталиновая группа молекул ANEPPS имеет более высокую чувствительность к окислению, чем бензольное кольцо молекул RH.

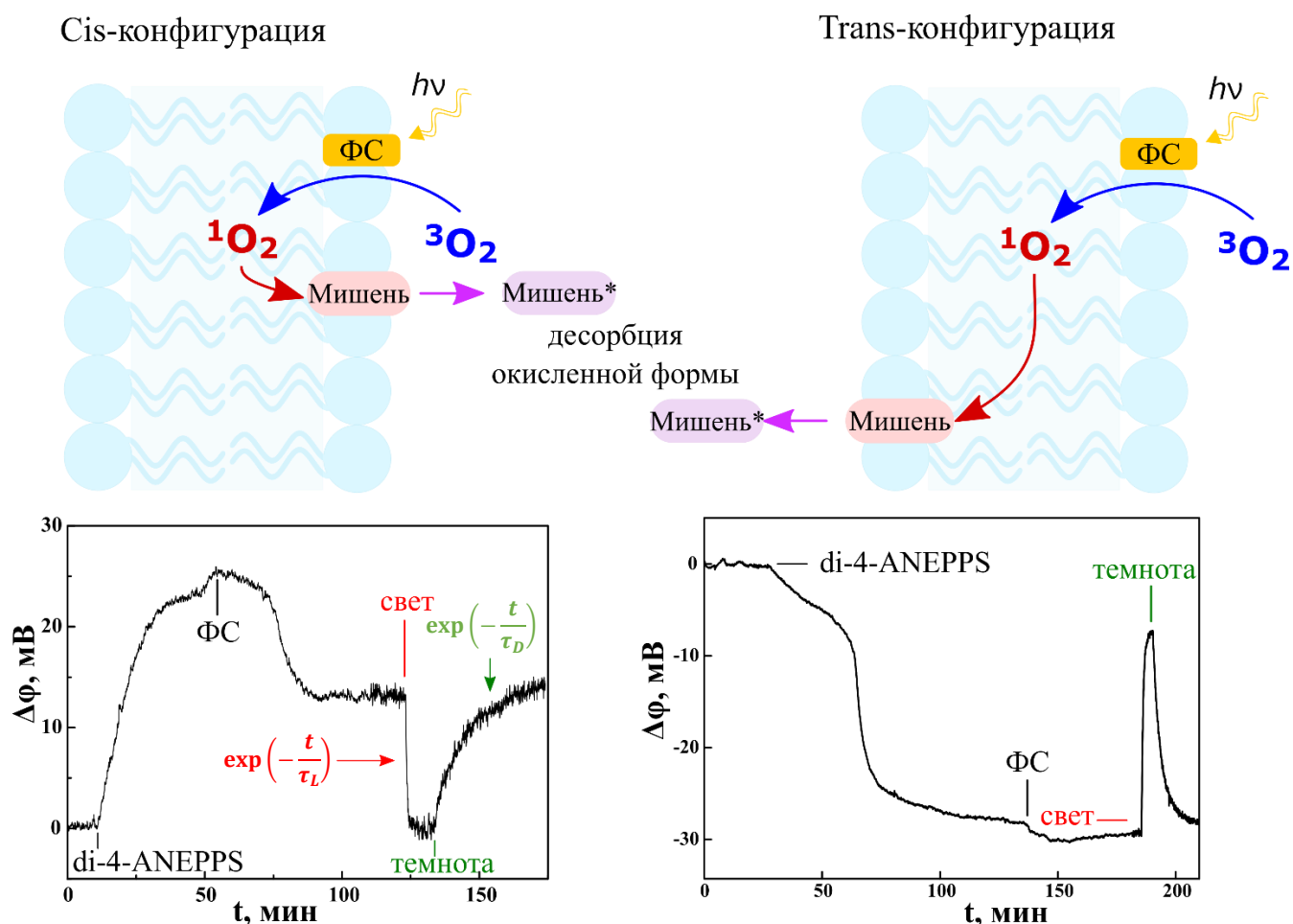


Рис. 2. Кинетика изменения граничного потенциала на БЛМ при адсорбции молекулы-мишени di-4-ANEPPS и ФС, добавленных (cis) в один отсек ячейки, (trans) в противоположные отсеки ячейки. На графиках обозначены моменты добавок, а также включения и выключения света.

Сравнение красителей RH серии с разной длиной ненасыщенной углеводородной цепи в середине молекулы показало, что длина алкильной цепи влияет на скорость фотоэффекта R гораздо слабее, чем структура ароматических колец, т.е. углеводородная цепь способна окисляться 1O_2 , но вклад этого процесса в наблюдаемый фотоэффект невелик. Одной из причин, обуславливающих более высокую способность к окислению 1O_2 , ароматических колец красителей является то, что они погружены в липидный бислой глубже, чем алкильные цепи. Вследствие того, что концентрация кислорода возрастает по мере погружения вглубь от внешних границ мембраны, ароматические кольца оказывают в области с более высокой концентрацией O_2 .

При сравнении красителей di-4-ANEPPS и di-8-ANEPPS, различающихся длиной углеводородного хвоста на конце молекул, оказалось, что скорости их фотодинамического разрушения были близки. Эти красители различались только скоростью адсорбции на БЛМ, которая у di-4-ANEPPS происходила значительно быстрее, чем у di-8-ANEPPS. По-видимому, это вызвано образованием агрегатов молекул красителей в растворе, которые в случае di-8-ANEPPS оказываются более стабильными по сравнению с di-4-ANEPPS. Проведенные исследования позволили выбрать оптимальные молекулы - мишени для дальнейшего изучения фотодинамической эффективности ФС. Ими оказались di-4-ANEPPS, которые показали наиболее высокие значения скоростей фотоэффекта и адсорбции на БЛМ по сравнению с другими исследуемыми красителями.

Во втором разделе третьей главы работы были изучены фотодинамические свойства $AlPcS_n$ (рис.1), адсорбированных на поверхности БЛМ. Полученные зависимости скорости фотоэффекта R от концентрации $AlPcS_n$ представлены на рис. 3А. Сравнение параметров R для этих ФС показало, что их эффективность (скорость фотоэффекта R) увеличивается при уменьшении числа сульфогрупп. Для корректного сравнения эффективности различных фталоцианинов необходимо учесть, что фталоцианины имеют различное адсорбционное сродство к мембране. Поэтому была определена зависимость скорости фотоэффекта от поверхностной плотности молекул фталоцианинов в мембране (рис. 3В). Для расчета поверхностной плотности были использованы ранее опубликованные данные об адсорбции фталоцианинов на поверхности мембраны, регистрируемой по изменению ζ -потенциала [3] и граничного потенциала методом КВП [4]. В случае трижды и четырежды сульфированных фталоцианинов граничные и ζ -потенциалы имеют близкие значения, а зависимости потенциалов от их концентрации и ионной силы раствора удовлетворяют теории Гуи-Чепмена. Поверхностную плотность этих молекул рассчитывали с помощью уравнения теории Гуи-Чепмена

$$\frac{\sigma}{\sqrt{8\epsilon\epsilon_0 RT C_{KCl}}} = sh\left(\frac{F\varphi_s}{2RT}\right) \quad (1),$$

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.

Однако, данный способ определения поверхностной плотности не применим для электронейтральных молекул, адсорбция которых не может быть обнаружена по изменению ζ -потенциала. К таким соединениям относятся стирильные красители и фталоцианины с одной или двумя сульфогруппами. В этом случае поверхностная плотность молекул определялась методами флуоресцентной корреляционной спектроскопии. Эти эксперименты были проведены Д. Князовым в лаборатории мембранного транспорта института биофизики университета им. И. Кеплера, г. Линц (Австрия) [5].

Зависимости скорости фотоэффекта от поверхностной плотности $AlPcS_2$, $AlPcS_3$ и $AlPcS_4$ показаны на рис. 3В. В таких координатах данные зависимости практически линейны в области менее $0,01$ молекулы/ nm^2 , и для $AlPcS_2$ и $AlPcS_3$ они выходят на плато при более высоких значениях плотности. Наличие плато на графике связано с тушением 1O_2 молекулами фталоцианина в мембране, что подтверждается ранее проведенными исследованиями [3]. Отсутствие плато в случае $AlPcS_4$ объяснено низким сродством данного ФС с мембраной: при концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М в растворе поверхностная плотность составила всего $0,02$ nm^{-2} .

Одним из неожиданных результатов исследования является то, что скорость *cis*-фотоэффекта R_{cis} оказалась ниже скорости *trans*-фотоэффекта R_{trans} , и эта разница была больше у $AlPcS_1$ и $AlPcS_2$, чем у $AlPcS_3$ и $AlPcS_4$. Полученное различие в скоростях противоречит следующему естественному предположению: концентрация 1O_2 должна быть больше с той стороны мембраны, где он образуется, и разрушение мишеней, адсорбированных на эту сторону, должно происходить быстрее. Было предложено несколько объяснений полученного результата: 1) взаимодействие адсорбированных на одной стороне БЛМ молекул ФС и мишеней, приводящее к уменьшению концентрации 1O_2 ; 2) тушение 1O_2

молекулами ФС; 3) различное взаимодействие $^1\text{O}_2$ с молекулами di-4-ANEPPS в зависимости от взаимного расположения области генерации $^1\text{O}_2$ и мишени (с одной стороны БЛМ или с противоположных).

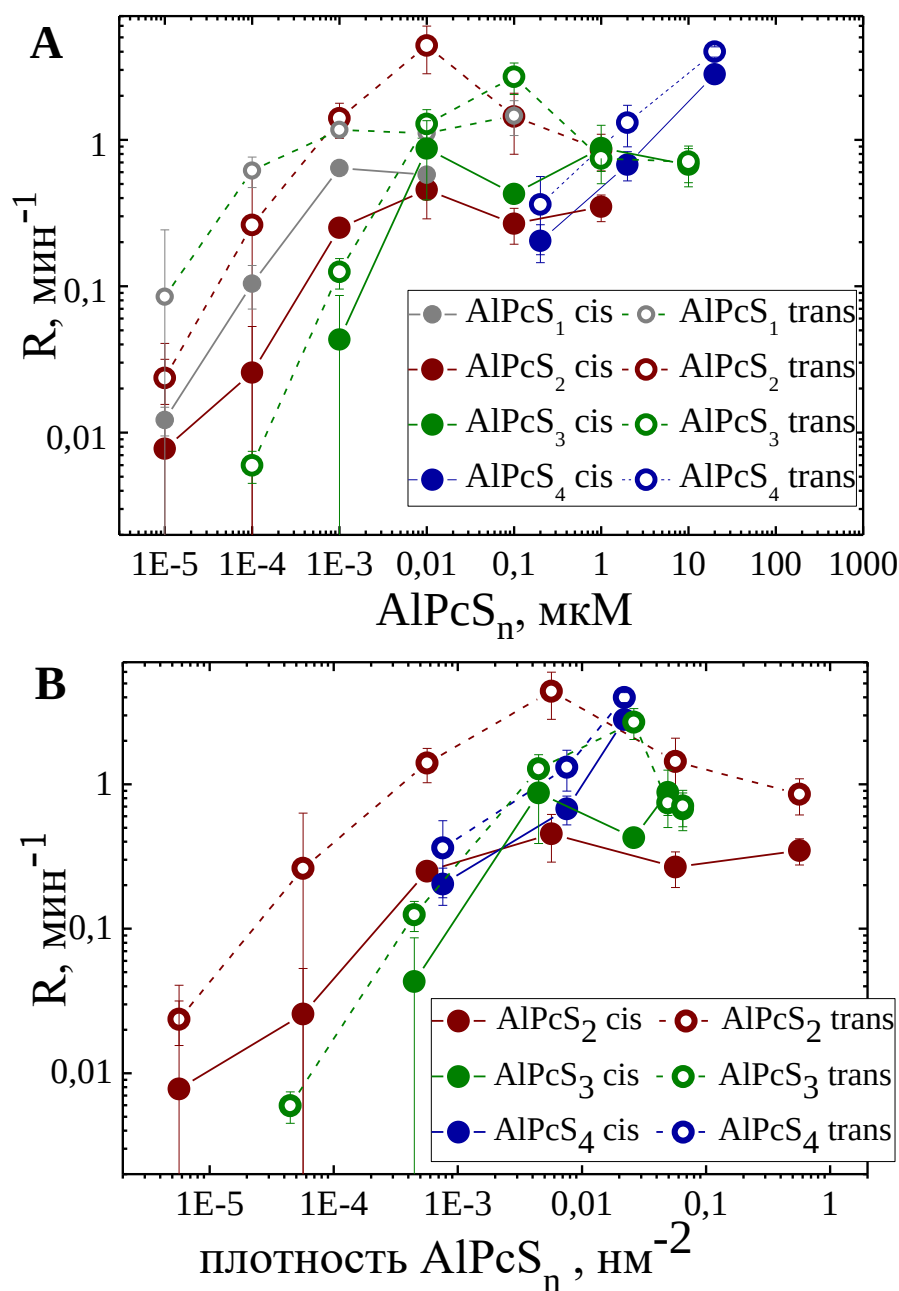


Рис. 3. А) Зависимость скорости фотоэффекта от концентрации AlPcS_n в растворе. В) Зависимость скорости фотоэффекта от поверхностной плотности AlPcS_n на мембране.

Прямое взаимодействие ФС со стироловым красителем представляется маловероятным, поскольку присутствие di-4-ANEPPS не влияло на спектры флуоресценции липосом с AlPcS₂ [5]. Для оценки тушения $^1\text{O}_2$ молекулами ФС

была определена зависимости скоростей фотоэффекта в *cis*-и *trans*-конфигурациях от концентрации ФС. В низких концентрациях скорость R была пропорциональна поверхностной плотности, так что отношение $\frac{R_{cis}}{R_{trans}}$ оставалось постоянным, что исключает различие в степенях тушения синглетного кислорода ФС в *cis*- и *trans*-конфигурациях.

Аналогичные зависимости были построены для молекул di-4-ANEPPS (рис. 4). Скорость фотоэффекта R уменьшалась при возрастании поверхностной плотности мишеней на мембране, которую определяли по скачку потенциала, возникающего при их адсорбции. Методом корреляционной флуоресцентной спектроскопии [5] была определена поверхностная плотность мишеней. Это позволило определить коэффициент пропорциональности между ней и потенциалом. Угол наклона графика зависимости обратной скорости R от поверхностной плотности молекул di-4-ANEPPS в *cis*-конфигурации был выше, чем в *trans*. Это свидетельствует о тушении 1O_2 молекулами di-4-ANEPPS более эффективном в *cis*-конфигурации по сравнению с *trans*-конфигурацией. В случае *cis*-конфигурации нафталиновое кольцо di-4-ANEPPS располагается на 1 нм дальше от молекулы ФС, чем двойная связь красителя, в связи с чем двойная связь «защищает» нафталиновое кольцо от окисления. В *trans*-конфигурации нафталиновое кольцо расположено ближе к области генерации синглетного кислорода по сравнению с ненасыщенной цепочкой, это делает его (кольцо) основной целью атаки 1O_2 . Поскольку ранее показано, что вклад в фотоэффект окисления ненасыщенной углеводородной цепи невелик по сравнению с окислением кольца, то было предположено, что снижение скорости фотоэффекта R в *cis*-конфигурации связано с тушением 1O_2 , которое происходит вследствие реакции 1O_2 с ненасыщенной цепочкой.

Различие скоростей фотоэффектов в *cis*- и *trans*-конфигурациях оказалось гораздо более сильным в случае AlPcS₁ и AlPcS₂ по сравнению с AlPcS₃ и AlPcS₄. Было выдвинуто предположение об усиленном эффекте тушения для AlPcS₁ и AlPcS₂, которое связано с погружением этих молекул в мембрану при их адсорбции. Поскольку встраивание ФС приводит к уменьшению расстояния

между областью генерации $^1\text{O}_2$ и ненасыщенной углеводородной цепью молекулы мишени, то данное расстояние определяет степень тушения $^1\text{O}_2$ мишенью.

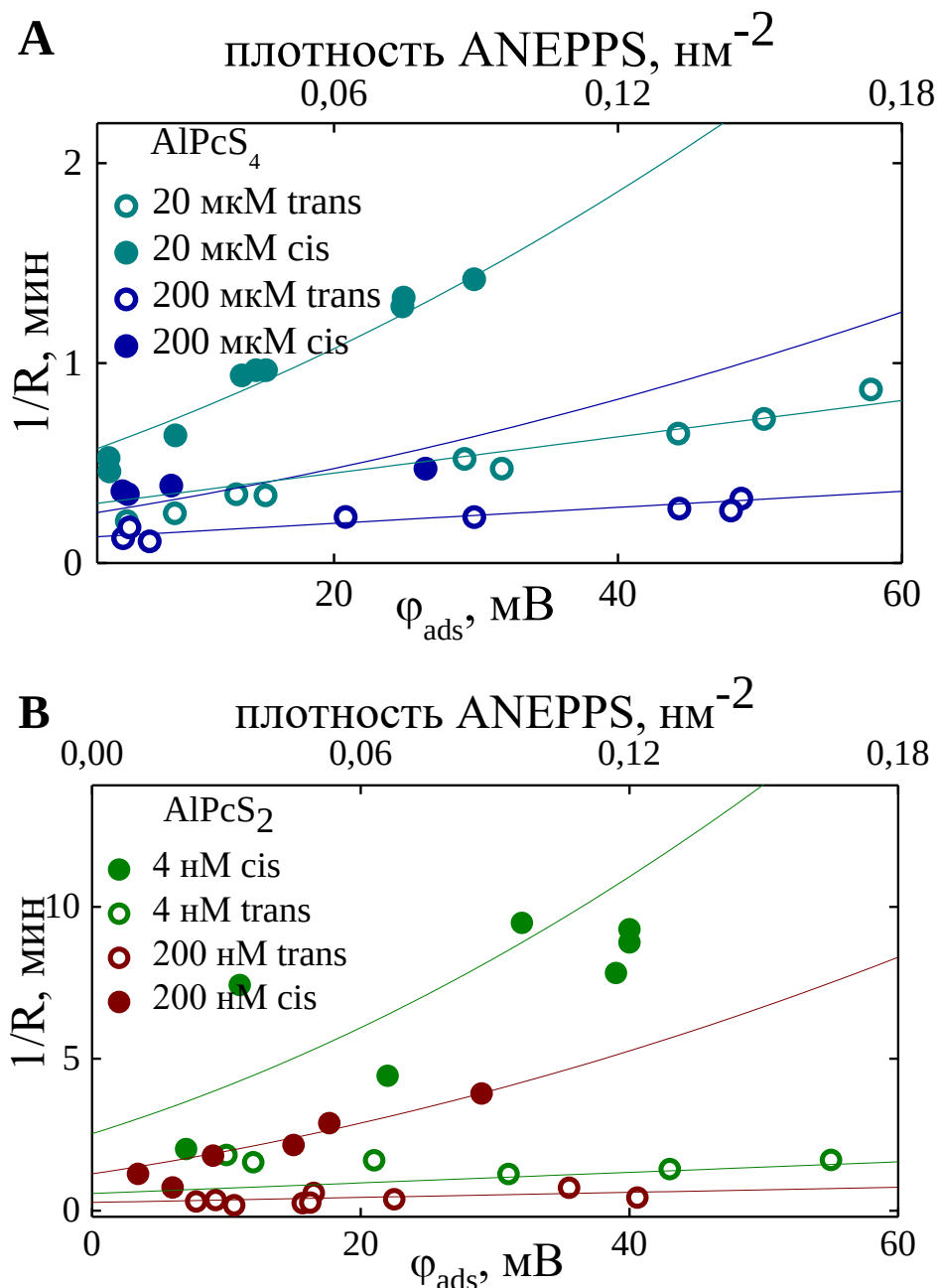


Рис. 4. Зависимость обратной скорости cis- и trans-фотоэффектов от потенциала, обусловленного адсорбцией di-4-ANEPPS, для (А) AlPcS_4 и (В) AlPcS_2 . Сплошные линии – аппроксимирующие кривые теоретической модели [5].

Эти соображения были сформулированы в теоретической модели [5], позволяющей количественно объяснить экспериментальные данные. Модель позволила оценить константы скоростей генерации $^1\text{O}_2$. Показано, что константа скорости генерации для AlPcS_2 в 4 раза выше, чем для AlPcS_4 . Поскольку

квантовые выходы $^1\text{O}_2$ мономеров данных соединений в растворе примерно равны, то различие в константах можно объяснить погружением хромофора амфифильного AlPcS_2 в бислой – в область, насыщенную O_2 .

Однако, данная модель не объясняет различие скоростей разрушения в *cis*- и *trans*-конфигурациях, полученное для AlPcS_4 , молекулы которого не погружаются в мембрану, а адсорбируются на ее поверхности на границе с водным раствором. Было выдвинуто предположение, что небольшое различие в скоростях фотоэффектов в случае AlPcS_4 вызвано наличием в препарате следов низкосульфированных фталоцианинов, которые могут присутствовать в образцах AlPcS_n из-за несовершенства метода их синтеза. В связи с этим, было проведено исследование *cis*- и *trans*-фотоэффектов с другим фотосенсибилизатором – тетрасульфированным порфирином TPPS_4 (рис. 5А), в коммерческом препарате которого отсутствуют примеси малосульфированных соединений.

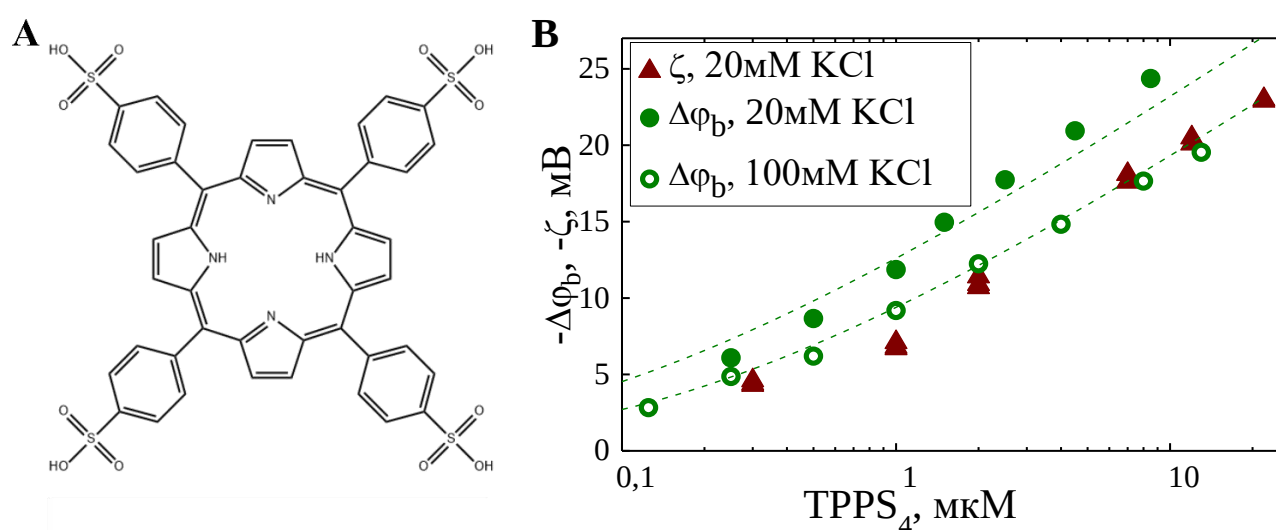


Рис. 5. А) Структура TPPS_4 . В) Зависимость $\Delta\phi_b$ и ζ -потенциала от концентрации TPPS_4 в растворе. Раствор содержал 20 мМ KCl , 2 мМ HEPES pH 7,0, либо 100 мМ KCl , 10 мМ HEPES , pH 7,0.

Результаты исследования фотодинамической активности TPPS_4 представлены в третьем разделе экспериментальной части. Первым шагом в данном исследовании являлось изучение связывания данной молекулы с мембраной. Были измерены зависимости $\Delta\phi_b$ и ζ - потенциалов от концентрации TPPS_4 в растворе при нейтральном pH при разных значениях ионной силы (рис. 5В). Поскольку

зависимости удовлетворяют теории Гуи-Чепмена, то сделан вывод, что данный порфирин, как и AlPcS_4 , адсорбируется на поверхности мембраны без погружения в виде четырехзарядных анионов. Такой заряд молекулы TPPS_4 соответствует количеству отрицательно заряженных сульфогрупп.

Для оценки фотодинамической эффективности TPPS_4 были построены зависимости скоростей фотоэффекта R от концентрации TPPS_4 в растворе. Полученные зависимости являются нелинейными (рис. 6А), однако становятся линейными в координатах скорость разрушения/поверхностная плотность молекул порфирина (рис. 6В). Поверхностная плотность определялась, как и в случае AlPcS_4 , по измеренному значению ζ -потенциала (рис. 5В).

Поскольку не наблюдается насыщение графика зависимости R от концентрации TPPS_4 , сделан вывод, что молекулы TPPS_4 , адсорбированные на поверхности БЛМ, не способны тушить $^1\text{O}_2$. Сравнение скоростей фотоэффекта на разных сторонах мембраны показало, что скорость *cis*-фотоэффекта выше или равна скорости *trans*-фотоэффекта. Поскольку молекулы TPPS_4 при адсорбции на мембране располагаются на ее поверхности аналогично молекулам AlPcS_4 , сделан вывод, что противоположное соотношение скоростей фотоэффекта в *cis*- и *trans*-конфигурациях, наблюдавшееся в случае AlPcS_4 , вызвано наличием в данном препарате примесей низкосульфированных соединений. Данный факт подтвердил предположение о необходимости встраивания ФС в мембрану (близкого расположения области генерации $^1\text{O}_2$ и двойной связи di-4-ANEPPS) для тушения $^1\text{O}_2$ мишенями в *cis*-конфигурации.

Известно, что при изменении pH среды происходит изменение конформации порфиринового кольца TPPS_4 из-за присоединения двух протонов к атомам азота [6]. В связи с чем представляло интерес изучение влияния протонирования TPPS_4 на его адсорбцию и фотодинамическую активность. Поскольку на адсорбцию заряженных молекул влияет поверхностный заряд мембраны, то первым этапом в исследовании было определение зависимости поверхностного заряда БЛМ от pH.

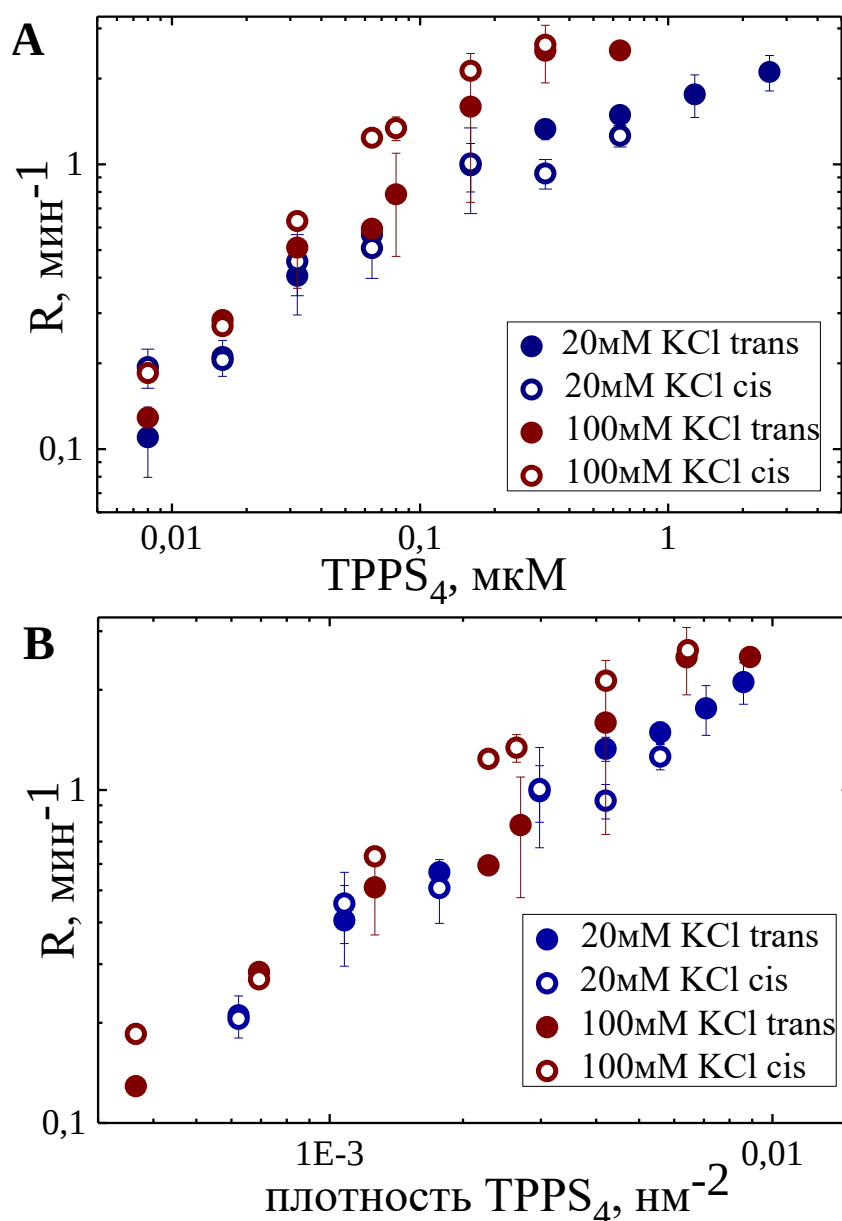


Рис. 6. А) Зависимость скорости фотоэффекта от концентрации TPPS_4 в растворе при освещении лазером с длиной волны света 405 нм. В) Зависимость скорости фотоэффекта от поверхностной плотности TPPS_4 на мембране. Растворы содержали либо 20 мМ KCl, 2 мМ HEPES, pH 7,0 либо 100 мМ KCl, 10 мМ HEPES pH 7,0.

В экспериментах в качестве липида, формирующего БЛМ, использовался фосфатидилхолин (DPhPC), заряд которого теоретически должен оставаться нейтральным в нейтральной области pH. Однако, как показали эксперименты, мембрана из DPhPC в нейтральной области pH имеет небольшой по величине отрицательный поверхностный заряд (рис. 7), что, по-видимому, связано с

наличием отрицательно заряженных примесей или продуктов повреждения липидов. При уменьшении рН $\Delta\phi_b$ изменялся, становясь положительным в области рН ниже 3. Положительный заряд мембраны вызван протонированием фосфатной группы DPhPC (рКа около 2,2). Изоэлектрическая точка для DPhPC в наших экспериментах оказалась равна около 3,5, что согласуется с опубликованными ранее данными [7].

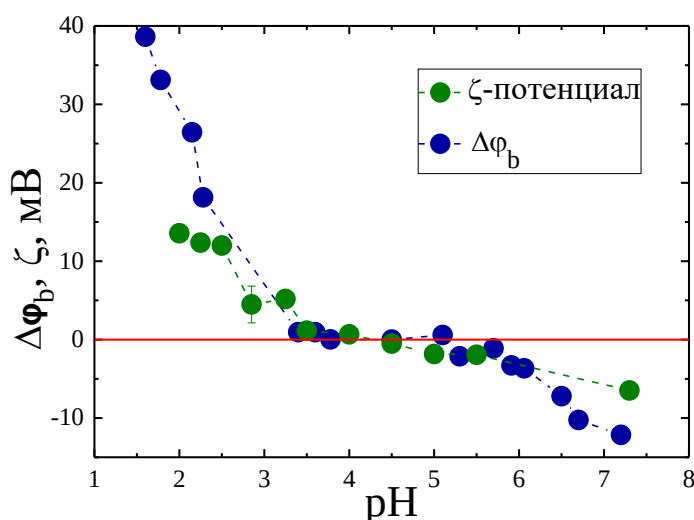


Рис. 7. Зависимость $\Delta\phi_b$ и ζ -потенциала липосом от рН раствора. Исходный раствор содержал 20 мМ KCl, 2 мМ лимонной кислоты, 2 мМ HEPES, 2 мМ MES, 1 мМ EDTA, рН 7,4. рН изменяли добавлением HCl или KOH.

Для изучения влияния рН на адсорбцию TPPS₄ были проведены две серии экспериментов: измерялась зависимость $\Delta\phi_b$ от рН раствора при постоянной концентрации TPPS₄ (рис. 8А) и зависимость $\Delta\phi_b$ от концентрации TPPS₄ при разных значениях рН (рис. 8В). Обе серии экспериментов показали одинаковые результаты: при уменьшении рН раствора происходит уменьшение $\Delta\phi_b$ до нуля при рН менее трех.

Это падение потенциала не может быть связано с влиянием рН на поверхностный заряд, поскольку эффект поверхностного заряда направлен в противоположную сторону: адсорбция анионов должна усиливаться при появлении положительного заряда мембраны. С другой стороны, стремление к нулю $\Delta\phi_b$ при рН < 3 не может быть объяснено только изменением заряда при протонировании TPPS₄ (при протонировании заряд молекулы не исчезает до нуля,

а только уменьшается до -2). Исчезновение потенциала может быть связано с тем, что протонированные формы TPPS₄ не могут адсорбироваться на БЛМ. Это может быть вызвано либо изменением конформации молекулы при присоединении протонов, либо образованием агрегатов протонированных молекул в растворе при уменьшении pH, не способных адсорбироваться на мембране.

На основании этих экспериментов был сделан вывод, что молекулы TPPS₄ адсорбируются на мембране в депротонированном виде как анионы с четырьмя заряженными сульфогруппами. Зависимость потенциала от pH определяется изменением концентрации этих депротонированных молекул в растворе, которая убывает при уменьшении pH, что и приводит к падению величины потенциала.

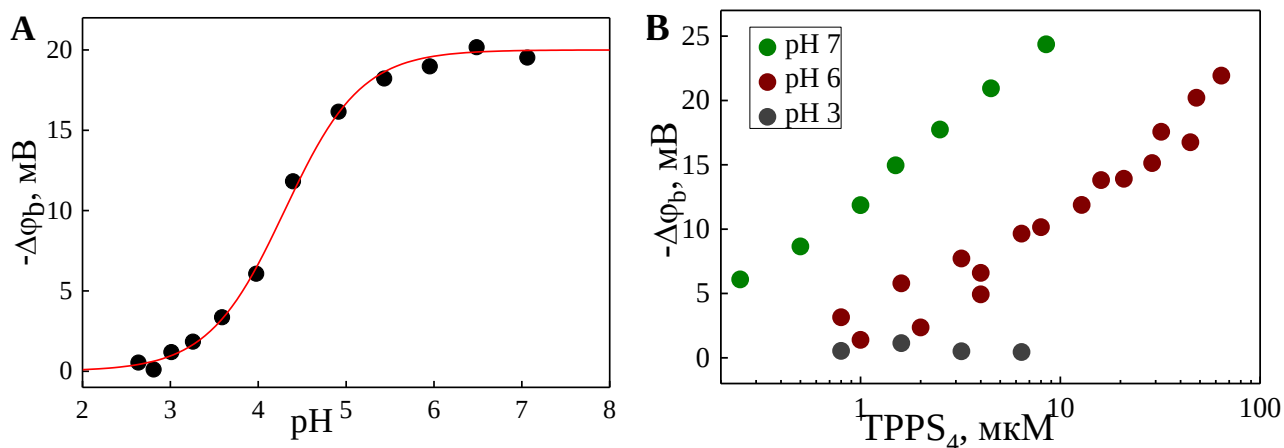


Рис. 8. А) Зависимость $\Delta\phi_b$ от pH при концентрации TPPS₄ 2,5 мкМ. Исходный раствор содержал 20 мМ KCl, 2 мМ лимонной кислоты, 2 мМ HEPES, pH 7,0. В) Зависимость $\Delta\phi_b$ от концентрации TPPS₄ в растворе при различных pH. Растворы содержали 20 мМ KCl, 2 мМ HEPES pH 7,0, pH 4,0 или pH 3,0. pH изменяли добавлением HCl.

Для изучения фотодинамических свойств TPPS₄ при различных pH необходимо учитывать влияние pH на адсорбционные свойства не только ФС, но и мишени. Для исследования влияния pH на адсорбцию di-4-ANEPPS измерялась зависимость $\Delta\phi_b$ от pH раствора при неизменной концентрации красителя. В работе показано, что величина $\Delta\phi_b$ не изменялась в диапазоне pH от 5 до 7, но уменьшалась при более низком pH, приближаясь к нулю при pH менее 3. Поскольку молекула di-4-ANEPPS имеет в своем составе два атома азота, один из

которых может быть протонирован при уменьшении pH, то полученная зависимость потенциала от pH может быть объяснена адсорбцией на поверхность БЛМ только депротонированной формы di-4-ANEPPS.

Для проверки влияния pH на фотодинамические свойства TPPS₄ были измерены зависимости скорости фотоэффекта R от pH среды. Показано, что pH не влияет на значение этого параметра в cis- и trans-конфигурациях в диапазоне pH от 5 до 7. Вероятнее всего, это связано с тем, что в данном диапазоне pH не наблюдается изменения адсорбционных свойств ни TPPS₄, ни di-4-ANEPPS.

В четвертом разделе третьей главы продемонстрировано использование разработанной модели для изучения фотодинамических свойств фотосенсибилизатора метиленового синего, адсорбцию которого на БЛМ не удалось зарегистрировать методом КВП. Показано, что вызванные разрушением di-4-ANEPPS фотоэффекты наблюдались, что свидетельствует о том, что адсорбция молекул этого ФС на БЛМ происходит. Такие эксперименты говорят о том, 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.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Разработана тест-система для изучения взаимодействия ФС с БЛМ с помощью измерения скачков потенциалов на границе мембрана/вода. Продemonстрирована 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 сродством к мембране.
3. На основе сравнительного изучения скорости разрушения различных стирильных 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 фотоэффекта). 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.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. Соколов В. С. и др. Окисление и латеральная диффузия стироловых красителей на поверхности бислойной липидной мембраны//*Электрохимия*. – 2017. – Т. 53. – №. 10. – С. 1321-1333.
3. Rokitskaya T. I. et al. Photosensitizer binding to lipid bilayers as a precondition for the photoinactivation of membrane channels // *Biophysical journal*. – 2000. – Т. 78. – №. 5. – С. 2572-2580.
4. 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.

5. Sokolov V. S. et al. Residence time of singlet oxygen in membranes //Scientific reports. – 2018. – Т. 8. – №. 1. – С. 1-11.
6. Ma S. Y. Theoretical studies on the structural change in the N-protonated meso-tetrakis (p-sulfonatophenyl) porphyrin //Chemical Physics Letters. – 2000. – Т. 332. – №. 5-6. – С. 603-610.
7. Bangham A. D., Pethica B. A., Seaman G. V. F. The charged groups at the interface of some blood cells //Biochemical Journal. – 1958. – Т. 69. – №. 1. – С. 12.

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

в журналах, индексируемых в базах данных

Web of Science, RSCI, Scopus, РИНЦ

1. Sokolov, V.S.; **Gavrilchik (Константинова), 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 (Константинова)**, Ю. А. Чизмаджев, и 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)