

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

А. Романюк

Романюк Андрей Владимирович

**ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОРЕАКТОРЫ НА ОСНОВЕ
ПОЛИОКСАЛАТА: ПОЛУЧЕНИЕ, СВОЙСТВА И
БИМЕДИЦИНСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ**

02.00.06 – высокомолекулярные соединения, химические науки

03.01.04 – биохимия, химические науки

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научные руководители:

доктор химических наук,

ведущий научный сотрудник

Мелик-Нубаров Николай Сергеевич,

доктор биологических наук,

ведущий научный сотрудник

Гроздова Ирина Дмитриевна

Москва – 2017

СОДЕРЖАНИЕ

1	Введение.....	5
2	Обзор литературы.....	11
2.1	Полимерные нанореакторы	11
2.1.1	Единичные макромолекулы	12
2.1.2	Полимерные наногели	14
2.1.3	Нанореакторы типа «ядро-оболочка»	15
2.1.4	Нанореакторы типа «полость-оболочка».....	18
2.1.4.1	Полимерсомы.....	18
2.1.4.2	Везикулы на основе полиэлектролитных комплексов	19
2.1.5	Заключение главы 2.1	20
2.2	Амфифильные полимеры.....	20
2.2.1	Полоксамеры (плюроники)	24
2.2.2	Сополимеры ДМС-ЭО	32
2.2.3	Заключение главы 2.2	33
2.3	Фотодинамическая терапия	34
2.3.1	Фотодинамический эффект.....	34
2.3.2	Фотодинамическая терапия	39
2.3.3	Полимерные носители в фотодинамической терапии.....	41
2.3.4	Синглетный кислород.....	44
2.3.5	Детектирование синглетного кислорода	45
2.3.5.1	Флуоресцентные зонды для определения синглетного кислорода	49
2.3.5.2	Флуорогенные зонды для определения синглетного кислорода	49
2.3.5.3	Хромогенные ловушки	52
2.3.6	Заключение главы 2.3	53
2.4	Активные формы кислорода и окислительный стресс	54
2.4.1	Активные формы кислорода	54
2.4.1.1	Физико-химические аспекты.....	54
2.4.1.2	Биохимические механизмы образования активных форм кислорода.....	56
2.4.1.3	Биохимические системы нейтрализации АФК.....	58
2.4.1.4	Роль АФК клеточном метаболизме	59
2.4.2	Окислительный стресс в раковых клетках	61

2.4.3	Определение активных форм кислорода в биологических системах	65
2.4.3.1	Электронный парамагнитный резонанс	69
2.4.3.2	Спектрофотометрия	70
2.4.3.3	Флуориметрия.....	71
2.4.3.4	Выделение продуктов окисления и их анализ.....	79
2.4.4	Заключение главы 2.4	79
2.5	Хемилюминесценция и её применение в фармакологии, медицине и биологии	80
2.5.1	Явление хемилюминесценции	80
2.5.2	Хемилюминесцентные реакции, используемые в биологических системах	83
2.5.2.1	Хемилюминесценция реакция люминола	85
2.5.2.2	Хемилюминесцентная реакция люцигенина	88
2.5.2.3	Пероксиоксалатная хемилюминесцентная реакция (ПО-реакция)	88
2.5.2.4	Хемилюминесцентная реакция лофина	93
2.5.2.5	Биолюминесценцентные реакции люциферингов	94
2.5.3	Хемилюминесцентные индикаторы для определения синглетного кислорода	94
2.5.4	Хемилюминесцентные системы как источник возбуждения фотосенсибилизаторов для ФДТ	98
2.5.5	Полимерные нанореакторы для использования хемилюминесцентных реакций в биологических системах.....	101
2.5.6	Полимерные оксалаты	104
2.5.7	Заключение главы 2.5	106
3	Экспериментальная часть	107
3.1	Материалы и очистка реактивов	107
3.2	Синтетические методы.....	115
3.3	Физико-химические методы	118
3.4	Методы работы с клетками в культуре	124
4	Результаты и их обсуждение.....	131
4.1	Мицеллы амфифильных сополимеров как нанореакторы для проведения пероксиоксалатной реакции	132

4.1.1	Бис-(пентахлорфенил)оксалат в ассоциатах плуроника L61	132
4.1.2	Бис-(4-нитрофенил)оксалат в мицеллах амфифильных полимеров	135
4.1.3	Связь структуры амфифильных полимеров и эффективности пероксиоксалатной реакции.....	139
4.2	Полиоксалат	144
4.2.1	Синтез полиоксалата.....	144
4.2.2	Эмульсионные нанореакторы. Получение и коллоидные свойства.....	148
4.2.3	Пероксиоксалатная реакция и образование синглетного кислорода в эмульсионных нанореакторах.....	154
4.2.4	Оптимизация состава эмульсионных нанореакторов для повышения эффективности пероксиоксалатной реакции	158
4.2.5	Зависимость скорости пероксиоксалатной реакции и стабильности полиоксалата в эмульсионных нанореакторах от его молекулярной массы	161
4.2.6	Взаимодействие эмульсионных нанореакторов с раковыми клетками	164
4.2.6.1	Цитотоксичность хемилюминесцентных эмульсий	164
4.2.6.2	Влияние состава хемилюминесцентных эмульсий на цитотоксичность	168
4.2.6.3	Хемилюминесценция в клетках в состоянии окислительного стресса	170
4.2.6.4	Накопление хемилюминесцентных эмульсий в клетках и образование синглетного кислорода в результате внутриклеточной пероксиоксалатной реакции	172
4.2.6.5	Зависимость цитотоксичности, обусловленной протеканием пероксиоксалатной реакции, от уровня окислительного стресса.....	175
4.2.7	Полимер-коллоидные комплексы полиоксалата в эмульсии и поликатиона	178
5	Заключение	184
5.1	Итоги выполненного исследования	184
5.2	Выводы	185
5.3	Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы.....	185
6	Список сокращений и условных обозначений	187
7	Благодарности.....	189
8	Список литературы	190

1 ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В современной полимерной химии одной из ключевых задач является разработка полимерных нанореакторов — полимерных частиц, которые имеют пространственно изолированные наноразмерные области, содержащие активные молекулы. Эти молекулы способны вступать в химические реакции под действием внешних воздействий, например, при проникновении субстрата из внешней среды внутрь нанореакторов, при приложении магнитного поля, облучении светом, изменении pH среды, температуры окружения и т.д. Нанореакторы обеспечивают локальное окружение для активных молекул. Гетерогенность на микро- и наномасштабе обуславливает кардинальное изменение химических (реакционной способности) и физических свойств по сравнению с гомогенным раствором.

Полимерные нанореакторы активно используются для повышения эффективности доставки в клетки фотосенсибилизаторов (**ФС**) — веществ, способных в результате возбуждения внешним источником света генерировать высокотоксичный синглетный кислород. Наиболее ярко фотосенсибилизирующие свойства проявляют многие порфирины и фталоцианины. Это свойство порфиринов используется для подавления роста злокачественных опухолей. Существенным ограничением этого метода является низкая прозрачность биологических тканей для видимого света, поэтому данный способ применим для лечения лишь поверхностных опухолей. Преодоление этого ограничения требует поиска подходов для возбуждения ФС без использования внешнего источника света.

В качестве такого подхода было предложено использовать реакцию между ароматическими оксалатами и пероксидом водорода (пероксиоксалатная реакция, **ПО-реакция**), которая сопровождается расщеплением оксалатов с выделением энергии (Рис. 1, путь 1). Соединения, катализирующие распад высокоэнергетического интермедиата (**ВЭИ**) и переходящие в результате этого в возбужденное состояние с последующим испусканием фотона, называются активаторами (**АКТ**). Наиболее активными АКТ являются полиароматические соединения, такие как рубрен, пентацен, 9,10-дифенилантрацен, перилен.

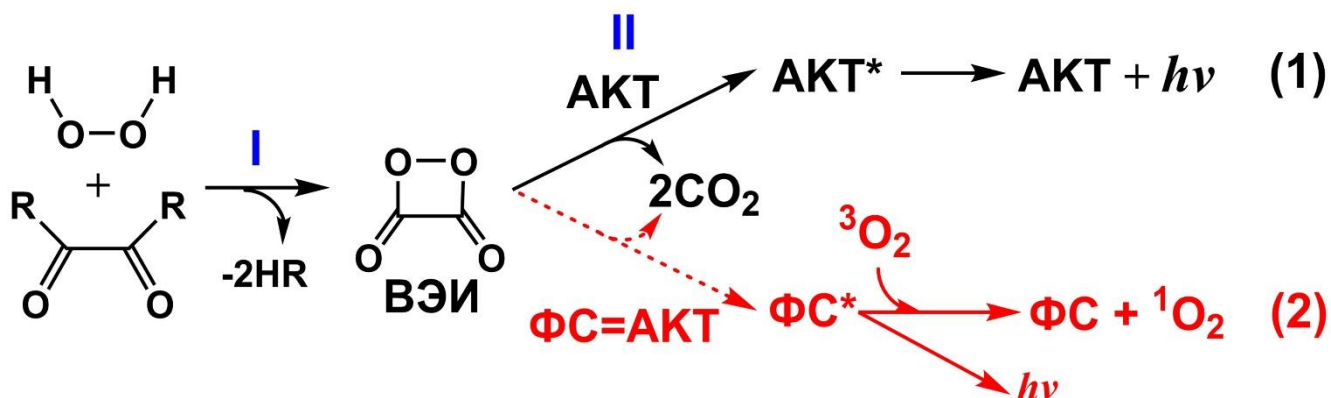


Рис. 1. Схема хемилюминесцентной ПО-реакции. R — электроноакцепторная группа, ВЭИ — высокоэнергетический интермедиат. ${}^1\text{O}_2$ и ${}^3\text{O}_2$ — синглетная и триплетная формы молекулы кислорода.

В настоящей работе предлагается использовать фотосенсибилизатор порфиринового ряда в качестве активатора (Рис. 1, путь 2), и тем самым создать наночастицы, способные генерировать высокотоксичный синглетный кислород при попадании в среду с повышенным содержанием пероксида водорода за счёт включения компонентов ПО-реакции в гидрофобную микрофазу полимерных нанореакторов типа «ядро-оболочка» (Рис. 2). ПО-реакция будет протекать наиболее активно в раковых клетках, особенностью метаболизма которых является повышенное на 1-2 порядка содержание пероксида водорода по сравнению с нормальными тканями.

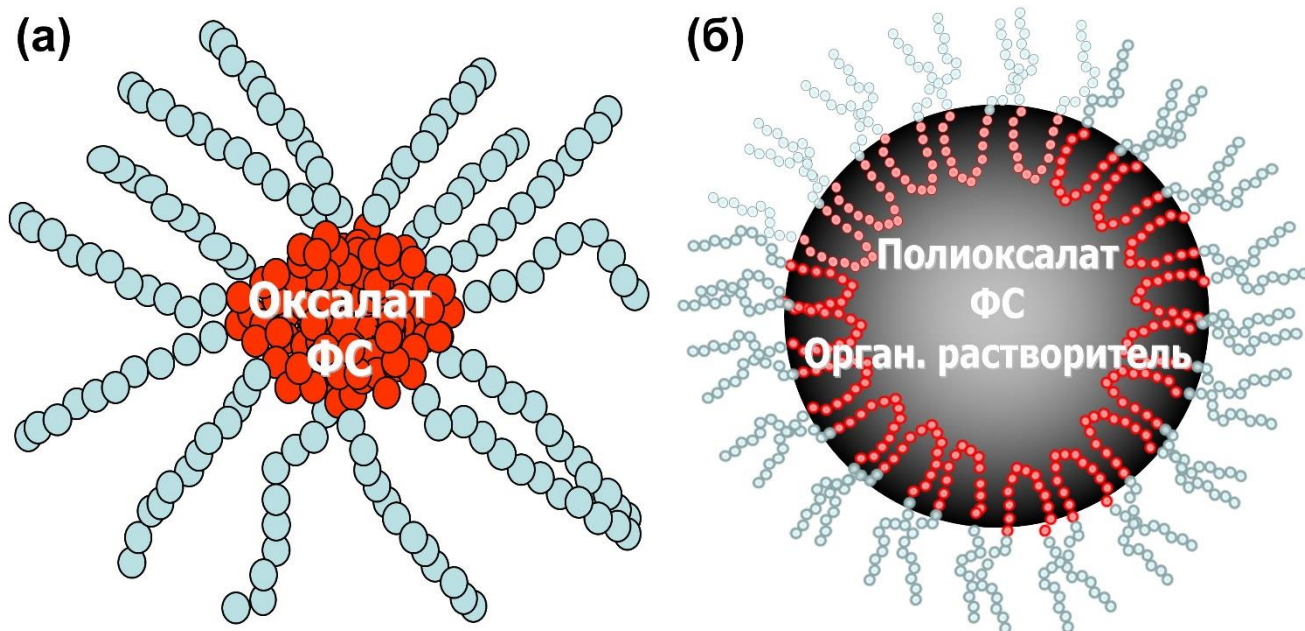


Рис. 2. Два типа полимерных нанореакторов с гидрофобным ядром и гидрофильной опушкой. (а) Мицеллы амфифильных полимеров. (б) Эмульсии раствора полимерного оксалата и ФС в органическом растворителе, стабилизированные амфифильным сополимером.

Степень разработанности темы. Анализ литературы показывает, что полимерные нанореакторы позволяют диспергировать малорастворимые вещества в водном растворе, совместить в пределах небольшого объема реагирующие вещества, защитить реагирующие вещества от воздействия соединений, находящихся во внешней среде. Эти свойства нанореакторов могли бы быть использованы для проведения ПО-реакции в водной среде. Однако вопрос о влиянии размеров нанореакторов на эффективность ПО-реакции в водной среде ранее не исследовался. Неисследованным также остается влияние полимерной природы и молекулярной массы субстрата ПО-реакции на ее эффективность. В литературе описано применение ПО-реакции для визуализации тканей с повышенной концентрацией H_2O_2 , однако остаётся вопрос о возможности использования ПО-реакции для генерации синглетного кислорода, если в качестве активатора использовать вещество, проявляющее свойства фотосенсибилизатора. Наконец, неизвестно, может ли ПО-реакция с биогенной перекисью водорода быть причиной гибели раковых клеток.

Целью работы явилось создание полимерных нанореакторов для проведения ПО-реакции с участием ФС в водной среде и использование таких систем для генерации высокотоксичного синглетного кислорода и подавления роста раковых клеток.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**: **(1)** создать полимерные нанореакторы для совместной локализации оксалата и ФС и обеспечения гидролитической стабильности оксалатов, достаточной для генерации синглетного кислорода и **(2)** исследовать влияние полимерной природы полиоксалата и его молекулярной массы на генерацию света и синглетного кислорода при его реакции с пероксидом водорода. Эти задачи потребовали **(а)** сформировать полимерные нанореакторы, содержащие компоненты ПО-реакции; **(б)** протестировать эффективность полученных систем генерировать свет в модельных бесклеточных экспериментах; **(в)** изучить возможность образования синглетного кислорода в ходе ПО-реакции; **(г)** исследовать влияние молекулярной массы полиоксалата на константы скорости его гидролиза и реакции с H_2O_2 , **(д)** изучить взаимодействие нанореакторов с клетками в культуре, т.е. исследовать внутриклеточную локализацию, образование синглетного кислорода в клетках и цитотоксичность, вызванную ПО-реакцией.

Научная новизна работы. Впервые обнаружено повышение эффективности ПО-реакции в водной среде при помещении оксалата и порфирина в гидрофобное ядро крупных полимерных мицелл с гидродинамическим радиусом 100 нм и более.

Впервые синтезирован и охарактеризован полиоксалат на основе бисфенола А и гептапропиленоксида. Впервые показано, что полимерная природа субстрата пероксиоксалатной хемилюминесцентной реакции приводит к значительному (более, чем на порядок) увеличению его стабильности в водно-эмульсионной системе и повышению эффективности ПО-реакции.

Впервые показано, что эмульсия раствора полиоксалата и порфирина в диметилфталате, стабилизированная плуроником L64, способна генерировать синглетный кислород в результате реакции с H_2O_2 . Проведение этой реакции в клетках, содержащих повышенные количества биогенной H_2O_2 , приводит к их гибели вследствие образования синглетного кислорода. Образование избыточного положительного заряда на поверхности частиц эмульсий за счет адсорбции катионного полимера позволяет усилить указанный эффект.

Теоретическая значимость работы. Впервые показано, что полимерные оксалаты более чем на порядок более эффективны, чем их низкомолекулярные аналоги, в качестве субстратов ПО-реакции. Увеличение размеров полимерных дисперсий, используемых в качестве среды для проведения ПО-реакции, способствует увеличению интегральной эффективности хемилюминесценции. Впервые показано, что фотосенсибилизатор тетраметилгематопорфирин при возбуждении в результате ПО-реакции может генерировать синглетный кислород.

Практическая значимость работы. Полученные в работе полимерные нанореакторы способны уничтожать раковые клетки с повышенным содержанием H_2O_2 . Обнаруженные в работе закономерности и эффекты могут быть в дальнейшем использованы для конструирования высокоэффективных средств диагностики и терапии злокачественных опухолей.

Методология и методы диссертационного исследования основаны на использовании комплексного подхода к решению поставленных в диссертации задач. Данный подход заключается в применении набора современных методов синтеза и фракционирования полимеров, их анализа и исследования коллоидных частиц на их основе, в том числе размера и заряда частиц, кинетики хемилюминесценции и генерации

синглетного кислорода, изучения физико-химических свойств полимер-коллоидных комплексов с поликатионом, взаимодействия эмульсий с клетками, образования синглетного кислорода в клетках.

В работе применяли следующие методы исследования: гель-проникающая хроматография (ГПХ), динамическое светорассеяние (ДСР), лазерный микроэлектрофорез, измерение кинетики хемилюминесценции, флуоресцентная и УФ-видимая спектроскопия, конфокальная флуоресцентная микроскопия, а так же ИК- и ЯМР-спектроскопия.

Положения, выносимые на защиту:

1) Гидрофобность амфифильного полимера определяет эффективность хемилюминесцентной ПО-реакции с участием оксалатов, солюбилизованных в ассоциатах, образуемых этим полимером в водном растворе.

2) Полиоксалат является значительно более эффективным субстратом ПО-реакции, чем его низкомолекулярный аналог, при проведении реакции в нанореакторах в водной среде.

3) Увеличение молекулярной массы полиоксалата приводит к повышению эффективности хемилюминесцентной ПО-реакции и более чем 10-кратному повышению его стабильности по отношению к гидролизу в водном окружении.

4) Использование фотосенсибилизатора в качестве активатора ПО-реакции приводит к генерации синглетного кислорода.

5) Эмульсии, содержащие полиоксалат, способны проникать в клетки и вступать в ПО-реакцию с внутриклеточной биогенной перекисью водорода, что позволяет убивать клетки, содержащие повышенные количества перекиси.

6) Внутриклеточная ПО-реакция, активируемая фотосенсибилизатором, приводит к генерированию синглетного кислорода.

7) Вследствие диссоциации концевых групп гидрофобного полиоксалата при его солюбилизации в эмульсии происходит экспонирование зарядов на поверхности частиц и появление отрицательного электрокинетического потенциала.

8) Образование положительно заряженных полимер-коллоидных комплексов поликатиона с отрицательно заряженными эмульсиями, содержащими полиоксалат, приводит к значительному повышению цитотоксичности, обусловленной протеканием ПО-реакции с внутриклеточной биогенной перекисью водорода.

Личный вклад автора заключается в участии автора во всех этапах диссертационного исследования: в планировании и постановке задач; в сборе и анализе литературных данных; в непосредственном участии в научных экспериментах, в обработке, анализе и обсуждении полученных результатов; в подготовке публикаций по теме выполненного исследования и участии в тематических конференциях.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов подтверждена тем, что работа выполнена на высоком экспериментальном уровне с использованием современных подходов и методов: аналитической и полупрепаративной ГПХ, флуоресцентной спектроскопии, ДСР, лазерного микроэлектрофореза, конфокальной микроскопии, методов работы с клеточными культурами. Основные результаты диссертационной работы были доложены на VI Съезде Российского фотобиологического общества, пос. Шепси, Краснодарский край, Россия (2011), 14-ом конгрессе Европейского общества фотобиологов, Женева, Швейцария (2011), VI Всероссийской Каргинской Конференции «Полимеры-2014», Москва, Россия (2014), Международном конгрессе по живой полимеризации и полимерам, Будапешт, Венгрия (2016), 6-ой международной конференции по коллоидной химии, Берлин, Германия (2016), 11-ом международном симпозиуме по полиэлектролитам, Москва, Россия (2016), 80-ом Пражском съезде по полимерам «Самоорганизация в мире полимеров», Прага, Чехия (2016), VII Всероссийской Каргинской Конференции «Полимеры-2017», Москва, Россия (2017), XI Международной конференции «Биокатализ-2017. Фундаментальные основы и применение», Москва, Россия (2017).

Публикации. Основные результаты диссертации изложены в 22 печатных работах, из них 2 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и 1 статья в изданиях из перечня, рекомендованных Минобрнауки РФ, и 19 публикаций в сборниках тезисов докладов на российских и международных конференциях.

Объём и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы (363 наименования). Работа изложена на 209 страницах, содержит 73 рисунка, 12 таблиц.

2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1 ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОРЕАКТОРЫ

Под полимерными нанореакторами понимают любые частицы на основе полимеров, которые имеют пространственно изолированные наноразмерные области, содержащие активные молекулы. Эти молекулы способны вступать в химические реакции под действием внешних воздействий, например, при проникновении субстрата из внешней среды внутрь нанореакторов, при приложении магнитного поля, облучении светом, изменении pH среды, температуры окружения и т.д. Нанореакторы обеспечивают локальное окружение для активных молекул. Гетерогенность на микро- и наномасштабе обуславливает кардинальное изменение химических (реакционной способности) и физических свойств [1] по сравнению с гомогенным раствором, например, активности воды [2], спектров флуоресценции и комбинационного рассеяния [3], констант диссоциации комплексов лиганд-рецептор [4] и т.п.

Если нанореактор содержит вещества, которые должны проявлять свою активность в живом организме, справедливо утверждать, что одновременно он выполняет и функцию наноконтейнера. Таким образом, одной из сфер применения нанореакторов является доставка лекарств и других молекул. Двойная функция таких нанореакторов накладывает на них и на составляющие их полимеры дополнительные требования. Прежде всего, это биосовместимость, а более предпочтительно — биоразлагаемость.

Часто создание и использование нанореакторов представляет собой имитацию объектов живой природы. Нано- и микроразмерные «капсулы», отделенные оболочкой от внешней среды, положили начало формированию клеточных и субклеточных структур. Образование нано- и микрореакторов заложило основу для появления самых первых организмов и используется всеми живыми существами без исключения на протяжении всего времени с момента возникновения жизни.

Самые разнообразные полимерные реакторы находят применение как в научных исследованиях, так и в различных прикладных сферах. Классифицируя описанные в литературе нанореакторы по их строению, можно вычленить, по крайней мере 4 основных типа: единичные макромолекулы, способные связывать ионы металлов или оксидов металлов, наногели, нанореакторы, содержащие гидрофобное ядро и гидрофильную оболочку и нанореакторы везикулярного типа («полость-оболочка») (Рис. 3).

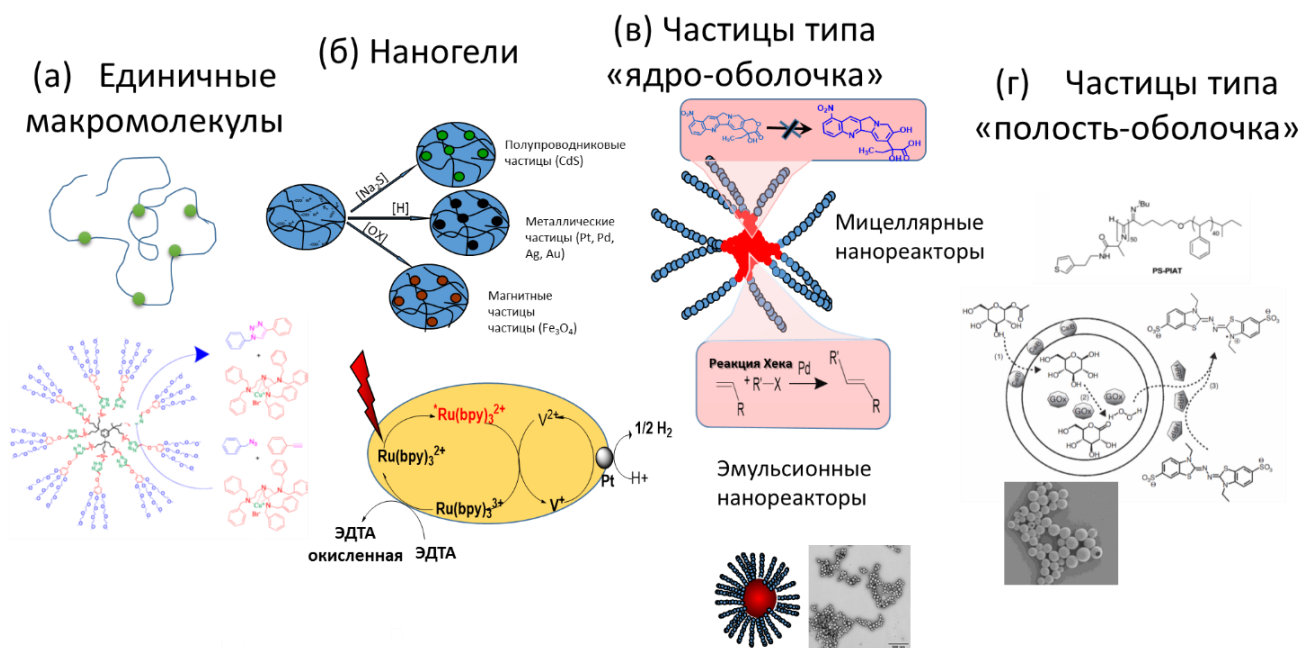


Рис. 3. Классификация нанореакторов по их строению. (а) Единичные макромолекулы (линейного строения, дендримеры и др.), формирующие комплексы с частицами металлов или оксидов, являющихся эффективными катализаторами. (б) Наногели также формируют комплексы с неорганическими (металлическими, ферромагнитными или полупроводниковыми) частицами. В нижней части рисунка (б) показана схема частиц, генерирующих водород на платиновом катализаторе, регенерация которого осуществляется метилвиологеном, восстановленная форма которого, в свою очередь, регенерируется за счет окисления возбужденного под действием света бипиридилного комплекса Ru²⁺ [5]. (в) Мицеллярные нанореакторы, построенные из амфифильных полимеров могут замедлять гидролиз лактонового цикла в 9-нитрокамптотецине [6]. В средней части панели (в) показана реакция Хека, катализируемая платиновыми наночастицами, включенными в полимерные мицеллярные нанореакторы. В нижней части панели (в) показана иллюстрация эмульсионных нанореакторов на основе лавандового масла и блок-сополимера полилактид-ПЭГ. (г) Иллюстрация везикулярных нанореакторов, содержащих 3-ферментную систему, катализирующую окисление 2,2'-азино-бис(3-этилтиазолин-6-сульфокислоты) 6-ацетилглюкозой.

2.1.1 Единичные макромолекулы

Отдельные макромолекулы с развитой архитектурой, достаточной для появления неоднородности окружения, могут проявлять свойства нанореакторов. В частности, амфифильные дендримеры использовали в качестве нанореактора для катализа клик-реакции — алкин-азидного циклоприсоединения в присутствии иодида меди (I) [7]. Захват субстратов и их активация, обусловленные устройством нанореактора, позволили добиться чрезвычайно высокой эффективности катализа (количество катализатора в миллион раз меньше, чем субстрата) и числа оборотов равного 510000.

Варьирование плотности хелатирующих центров в линейном сополимере N-изопропилакриламида и циклам-содержащего мономера акриламид-трис-

нитрилотриуксусной кислоты позволило в широких пределах регулировать сродство сополимера к гексагистидиновому фрагменту, входящему в состав низкомолекулярных соединений или белковых макромолекул в присутствии ионов Cu^{2+} . Такой сополимер выполнял роль матрицы для связывания металла, причем варьирование среднего расстояния между сайтами связывания от 4.3 до 31.5 нм позволило выявить зависимость связывания от размеров гексагистидин-содержащей макромолекулы. Оказалось, что крупные белковые макромолекулы связывались с со всеми Cu^{2+} -содержащими сайтами на полимере лишь в том случае, если среднее расстояние между ними было больше, чем гидродинамический диаметр белковой макромолекулы [8].

Единичные макромолекулы щеточного строения были использованы как матрица для получения нанотрубок из оксида титана (анатаза). Для этого был синтезирован полигидроксиэтилметакрилат к которому прививали поликапролактан с помощью анионной полимеризации, а также поли-(2-диметиламиноэтилметакрилат и поли-(олигоэтиленгликоль метакрилат) с помощью ATRP. Третичные аминогруппы в полученном сополимере связывали дигидроксид титан (IV) бис(аммоний лактата), Полученные наночастицы далее работали как нанореактор для проведения гидролиза и конденсации производного титана с образованием кристаллического TiO_2 [9].

Иммобилизация катализатора на полимере находит широкое применение в катализе окислительно-восстановительных процессов с участием водорода и кислорода, т.к. решает проблему агрегирования нанокластеров металлов и «утечки» металла и позволяет повторно использовать нанокластеры металлов [10]. На поверхности нанокластеров Pd, Ru, Os и др. металлов можно сформировать оболочку из полистирола и его производных, а для придания ей устойчивости к различным растворителям формируют сшивки, создавая тем самым полимерную сетку.

Полимерные нанореакторы с варьируемым размером были созданы на основе статистического сополимера бензилакрилата и акрилового мономера с ендииновой группой. Циклизация Бергмана, происходящая при повышенной температуре с одновременным снятием бензильных групп за счет каталитического гидрогенолиза О-бензилакрилата, приводила к полиакриловой кислоте с привитыми β -гидроксиэтилнафталиновыми звеньями. Линейные макромолекулы коллапсировали, что позволило их использовать для формирования и инкапсулирования квантовых точек. Размер нанореактора зависел от молекулярной массы полимерного предшественника и

определял число центров роста нанокристаллов и, соответственно, образующихся квантовых точек [11].

2.1.2 Полимерные наногели

Другим важным классом макромолекулярных нанореакторов являются полимерные наногели.

Авторам работы [12] удалось сконструировать внутриклеточный термометр путем включения в наногель из N-изопропилакриламида флуоресцентного красителя, (N-(2-(7-N,N-(диметиламиносульфонил-2,3-бендоксадиазол-4-ил)метиламино)этил-метилакриламида), эмиссия которого сильно уменьшается в водной среде. Сетчатая структура нанореактора в окружении флуорофора позволяет избегать тушения флуоресценции из-за взаимодействия флуорофора с клеточными компонентами. При низкой температуре, когда наногель насыщен водой, флуоресценция данного флуорофора затухает. При повышении температуры в узком интервале (от 29° до 35°C) флуоресценция возрастает в 5 раз из-за исключения воды из внутреннего пространства наногеля. В результате удалось выявить в клетке области с повышенной температурой (предположительно митохондрии).

Включение различных наночастиц в полимерные наногели может использоваться для получения фотонных кристаллов, которые необходимы для создания низкопороговых и беспороговых лазеров, новых устройств передачи и записи информации, и позволяют добиться сверхвысокого разрешения оптических приборов [13–15].

Наногели, содержащие металлические наночастицы, были использованы для создания системы генерации кислорода под действием света, основанной на сборке в одной наногелевой частице фотосенсибилизатора (комплекс рутения с бипиридилом $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$), платиновых наночастиц и электронного переносчика метилвиологена (Рис. 3б). Под действием света двухвалентный рутений переходит в возбужденное состояние, которое может быть окислено метилвиологеном V^{2+} . Восстановленный катион-радикал метилвиологена (V^+) после этого способен передать электрон платине, которая катализирует восстановление протонов воды до атомов водорода. После этого окисленная форма рутениевого фотосенсибилизатора регенерируется за счет окисления растворенной в воде ЭДТА [5].

Резюмируя, можно сказать, что полимерные нанореакторы, основанные на единичных макромолекулах и наногелях чаще всего используются для иммобилизации

металлов. Описанные в литературе структуры очень удобны для получения металлических или металлооксидных катализаторов, а также полимер-неорганических гибридов, однако малопригодны для проведения реакций с участием гидрофобных или разлагающихся водой соединений.

2.1.3 Нанореакторы типа «ядро-оболочка»

Мицеллы амфифильных блок-сополимеров играют важную роль при создании нанореакторов типа «ядро-оболочка». Такие системы позволяют эффективно экранировать содержащееся в ядре мицеллы соединение от внешней среды, проводя в водной среде реакции с участием чувствительных к действию воды реагентов. Например, было обнаружено, что солюбилизация 9-нитрокамптотецин лактона в мицеллах амфифильных сополимеров этиленоксида и пропиленоксида (плюроники) приводит к существенной стабилизации лактонового цикла по отношению к кислотному гидролизу. При этом практически нерастворимое в воде вещество удавалось диспергировать в водной среде в виде мицеллярного раствора. Сравнение плюроники P123, F127 и F68 показало, что наилучший протективный эффект оказывал плюроник F127, содержащий наиболее длинные гидрофобный и гидрофильные блоки в данном ряду сополимеров [6]. Аналогичного эффекта удалось добиться при ковалентном присоединении резвератрола к сополимерам полиэтиленоксида и полилактида [16]. Было также показано, что блок-сополимеры полиэтиленоксида с полистиролоксидом (ПЭО-ПСО) или полибутиленоксидом (ПЭО-ПБО) защищают от гидролиза доцетаксель. При этом сополимер ПЭО-ПБО проявлял значительно более выраженные протективные свойства [17].

Мицеллы блок-сополимеров также используют в качестве матриц для получения неорганических наночастиц. Например, мицеллы плюроники (ПЭО-ППО-ПЭО) и тетроники (представляют собой 4-рукую звезду с гидрофобным ядром состава ППО-ПЭО) были использованы для получения наночастиц золота и их последующей доставки в живые клетки. Эти семейства сополимеров коммерчески доступны и включают ряды, в которых монотонно меняются состав и физикохимические свойства. Это позволяет в широких пределах варьировать размер, форму, гидратированность и другие свойства мицеллярных нанореакторов. Более того, эти классы полимеров обладают хорошей биосовместимостью и активно используются в различных конструкциях для биомедицинских исследований и применений [18].

Способность мицеллообразующих блок-сополимеров стабилизировать коллоидные частицы металлов была использована для получения высокоактивных металлических катализаторов [19]. Блок-сополимер полистирола и поли-4-винилпиридина был использован для получения металлических наночастиц (1–2 нм) внутри полимерных ассоциатов с размером около 30 нм. Эти ассоциаты можно рассматривать в качестве нанореакторов. Отмечалось, что такие частицы совмещают в себе преимущества гетерогенного и гомогенного катализа за счет растворимости в органических растворителях и возможности регенерации катализатора путем ультрафильтрации или седиментации. Такие металл-полимерные гибридные материалы были использованы для проведения реакций гидрирования, окисления или восстановления [20]. Металло-полимерные наночастицы были также исследованы в качестве нанореакторов для образования связи C-C, за счет катализируемой Pd реакции Хека [21, 22] (Рис. 3в). Авторы предполагают, что уникальная структура таких катализаторов позволяет увеличить время жизни катализаторов и достичь каталитической активности сравнимой с низкомолекулярными комплексами Pd.

Мицеллярные нанореакторы являются важнейшими средствами доставки фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии. Так, гидрофильные плуроники многократно усиливали фототоксичность фотосенсибилизатора хлорина еб *in vitro* за счёт образования прочных комплексов на водородных связях и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействиях, препятствуя перераспределению молекул хлорина в белки сыворотки [23].

Амфифильные блок-сополимеры являются удобным инструментом проведения химических реакций между термодинамически несовместимыми реагентами. Образуемые ими мицеллы могут использоваться в качестве нанореакторов для стабилизации эмульсионной полимеризации стирола [24], метилметакрилата [25] и винилацетата [26]. Обращенные мицеллы полиэтоксигированных ПАВ применяют при синтезе однородных гидрогелевых наночастиц [27]. В мицеллярных нанореакторах проводят реакции водонерастворимых субстратов в водной среде, например, при модификации белков водонерастворимыми реагентами, когда один из компонентов (белок) находится в водной фазе, другой солюбилизирован в мицеллах, а реакция протекает на поверхности раздела фаз [28].

Концепция нанореакторов может быть использована для получения полимеров со сверхвысокой молекулярной массой, например, полистирола при его сополимеризации с 4-винилпиридином в метаноле, выступающим в качестве селективного растворителя. В случае большого избытка стирола в полимеризационной смеси происходит формирование мицелл, ядро которых содержит полистирол, а опушка – выстлана поли-4-винилпиридином. В результате микрофазового разделения радикал роста оказывается экранирован в пределах одной полимерной микрочастицы (мицеллы), вследствие чего значительно понижается вероятность квадратичного обрыва цепного процесса. Этот подход позволил достичь молекулярной массы более одного миллиона для полистирола при сохранении узкого молекулярно-массового распределения ($M_w/M_n=1.22$) [29].

Несколько особняком стоят нанореакторы, гидрофобное ядро которых содержит органический растворитель. Амфифильные полимеры являются значительно более эффективными ПАВами, чем малые гидрофобно-гидрофильные молекулы, и это свойство позволяет их использовать для создания эмульсионных нанореакторов. Примеров эмульсионных нанореакторов в литературе значительно меньше. В основном такие системы используются для контролируемой доставки жирорастворимых соединений в клетки.

Так, например, блок-сополимер полилактида и полиэтиленоксида был использован для солюбилизации лавандового масла, обладающего биологической активностью. Такие системы характеризовались сферической формой, высокой стабильностью и обеспечивали медленное высвобождение масла из нанореактора (Рис. 3в, нижняя часть). При этом наблюдалось также защита лавандового масла от действия ферментов [30].

Нанореакторы на основе микроэмульсии соевого масла, стабилизированные плуроником F127 и содержащие производное BODIPY в качестве флуорофора-активатора и активный гидрофобный низкомолекулярный оксалат, использовали как нанореактор для проведения двухстадийной пероксиоксалатной хемилюминесцентной реакции между солюбилизованным оксалатом, внутриклеточным пероксидом водорода и флуорофором. Испускаемую в результате реакции хемилюминесценцию применяли для визуализации очагов воспаления *in vivo* [31]. Нанореактор играет ключевую роль, т.к. обеспечивает целостность системы и в малом объёме собирает все компоненты реакции, что является необходимым критерием её протекания.

Сжигание эмульсий, содержащих неорганические соединения, используют для получения их наночастиц. Этот подход был значительно усовершенствован на примере сшитых эмульсий акриловых полимеров в воде. Наличие заряженных функциональных групп на полимере способствует образованию ионных комплексов с ионами противоположного заряда. Такие комплексы при сжигании на воздухе при 150°C позволяют получить наночастицы оксидов церия, циркония и многие другие [32].

2.1.4 Нанореакторы типа «полость-оболочка»

2.1.4.1 Полимерсомы

Одним из наиболее важных классов нанореакторов, находящих применение в медико-биологической области, являются везикулы, сформированные синтетическими полимерами, т.е. полимерсомы. По сравнению с липидными везикулами полимерсомы проявляют значительно большую стабильность и жесткость мембраны. Варьирование длины блоков в блок-сополимере позволяет контролировать свойства получаемых нанореакторов, например, размер, полярность, стабильность, токсичность и др. [33].

Наночастицы церия проявляют суперантиоксидантные свойства, однако их применение в медицине и биологии лимитируется их высокой токсичностью и низкой стабильностью. Инкапсулирование наночастиц церия во внутреннюю полость полимерсом, сформированных триблок-сополимером поли-N-винилпирролидон-блок-полидиметил-силоксан-блок-поли-N-винилпирролидон позволило сделать их малотоксичными, сохранив при это их уникальные каталитические свойства, которые можно использовать для борьбы с окислительным стрессом [34]. Использование таких нанореакторов препятствует агрегации наночастиц и изолирует их от пероксида водорода, который может реагировать с частицами церия с образованием активных форм кислорода, проявляющими высокую токсичность.

На основе полимерсом были получены нанореакторы, содержащие фотосенсибилизатор, для генерирования синглетного кислорода под действием света и использования в фотодинамической терапии [35]. Стабильная полимерная оболочка нанореакторов, состоящая из сополимеров поли-N-винилпирролидон-блок-полидиметилсилоксан-блок-поли-N-винилпирролидон или поли-2-метил-2-оксазолин-блок-полидиметилсилоксан-блок-поли-2-метилоксазолин, предотвращала взаимодействие инкапсулированного конъюгата фотосенсибилизатора бенгальского розового и бычьего сывороточного альбумина (БСА) с биологическим окружением. В то

же время полимерный слой проникаем по отношению к кислороду и АФК, поэтому при накоплении полимером внутри клеток синглетный кислород, сгенерированный внутри везикул, диффундировал наружу и приводил к гибели клеток из-за разрушения клеточных компонентов.

Использование полимером на основе диблок-сополимера полистирол--блок-поли-L-изоцианоаланин(2-тиофен-3-ил-этил)амид позволило реализовать каскад из трёх реакций, катализируемых тремя различными ферментами, что было бы абсолютно недостижимо в гомогенной системе [36]. Ферменты были локализованы во внутренней полости везикул (глюкозооксидаза), в мембране полимером (липаза В) и на внешней стороне полимерной оболочки (пероксидаза хрена). Моноацетилглюкоза из внешнего раствора под действием липазы превращалась в глюкозу и попадала внутрь нанореакторов, где она окислялась глюкозооксидазой с образованием пероксида водорода, который в свою очередь диффундировал через оболочку везикул и ферментативно окислял субстрат пероксидазы хрена [37] (Рис. 3г).

На основе полимером могут быть созданы искусственные клетки, когда полимерные везикулы меньшего размера помещаются внутрь больших полимерных везикул. Полимерное строение оболочек везикул, а также их различная химическая природа обуславливают стабильность такой системы. Инкапсулирование различных ферментов в везикулы малого размера аналогично формированию нескольких типов искусственных органелл, каждая из которых выполняет свою функцию. Такая организация нанореактора позволила реализовать каскад из трёх ферментативных реакций [38].

2.1.4.2 Везикулы на основе полиэлектролитных комплексов

Еще один пример полимерных нанореакторов типа «полость – оболочка» - везикулы на основе полиионных комплексов (polyion complex vesicles, PICsomes). Самоорганизация таких нанореакторов происходит при смешении поликатиона и полианиона в эквимольном количестве по зарядам, если один из них содержит достаточно длинный неионогенный гидрофильный блок. По сравнению с полимерными важным отличие данных систем заключается в том, что на этапе приготовления везикул полиэлектролиты могут взаимодействовать с веществом, которое необходимо заключить во внутреннюю полость нанореактора. Такие системы используют для повышения стабильности ферментов в микроокружении нанореактора и их локального

концентрирования [39]. Сшитые везикулы поддерживают длительную активность β -галактозидазы при введении в опухоли мышей [40].

Полые полимерные сферические частицы также могут быть получены по технологии LBL (layer-by-layer), подразумевающей поочередное нанесение полиэлектролитов противоположного заряда на твёрдую поверхность, например, нано- или микрочастиц, после чего основу растворяют. Такие нанокапсулы служили реактором для полимеризации стиролсульфоната натрия и последующей кристаллизации катионного красителя на матрице ПСС [41].

Проницаемость мембран таких многослойных полимерных сфер можно контролировать с помощью pH, обратимо открывая и закрывая полимерную оболочку, что используют для загрузки молекул, в том числе белков, во внутреннюю полость везикул [33]. Этот эффект использовали для полимеризации гидрохлорида 4-(2-аминоэтил)фенола, катализируемой пероксидазой хрена в присутствии пероксида водорода [42].

2.1.5 Заключение главы 2.1

Итак, анализ литературы показывает, что полимерные нанореакторы позволяют диспергировать мало растворимые вещества в водном растворе, совместить в пределах небольшого объема реагирующие вещества, позволяют защитить реагирующие вещества от гидролиза. Наиболее пригодны для этих целей нанореакторы типа «ядро-оболочка». В то же время в литературе отсутствуют данные о взаимосвязи между размерами нанореактора и его способностью оказывать протективное действие на чувствительные к гидролизу соединения. В настоящей работе этот вопрос будет исследован на примере мицелл плуроников.

2.2 АМФИФИЛЬНЫЕ ПОЛИМЕРЫ

Многие нанореакторы (мицеллы, эмульсии, полимерсомы), содержащие и гидрофильные, и гидрофобные области, требуют использования амфифильных сополимеров. Известно большое количество амфифильных сополимеров, полимерная природа которых обуславливает огромное разнообразие их свойств.

Поверхностно-активные свойства амфифильных сополимеров определяются характером расположения звеньев (сополимеры блочного, чередующегося и, привитого строения и др.), топологией макромолекул (линейные, разветвленные, гребнеобразные и др.), природой мономерных звеньев (наличием функциональных групп, жесткостью

звеньев и связей между ними), молекулярной массой (в том числе молекулярной массой блоков в случае блок- и привитых сополимеров), геометрией макромолекулы, соотношением гидрофильных и гидрофобных фрагментов.

Наиболее часто носителями гидрофильных свойств макромолекул являются звенья этиленоксида (ЭО) [43], углеводов (в декстрани, хитозани, поллюланах и других полисахаридах) [44], гидрофильных аминокислот [45], N-винилпирролидона [46], 2-метил-2-оксазолина [35], винилового спирта [47] или гидроксиэтилметакрилата [48], [49, 50].

Роль гидрофобных мономерных звеньев как правило выполняют стирол, пропиленоксид, ϵ -капролактон [43], п-диоксанон, и другие лактоны, лактид [44], гликолид и другие, ω -гидроксиалканоаты, гидрофобные аминокислоты [51], диметилсилоксан и другие замещенные силоксаны, ортоэфиры, оксалаты, акрилаты и метакрилаты, акриламиды и метакриламиды [49, 50].

С ростом гидрофобности растет способность амфифильного полимера образовывать мицеллы, и уменьшается ККМ. Увеличение длины гидрофильных блоков действует обратным образом — ККМ растет. Размер мицелл, образуемых полимерными ПАВ, непосредственно зависит от геометрии макромолекулы: увеличение размеров полярной головки способствует уменьшению размеров образующихся мицелл и снижению числа агрегации, а повышение длины гидрофобного блока — наоборот, приводит к росту числа агрегации и значительному росту размеров мицелл.

Для оценки гидрофобности ПАВ и амфифильных полимеров принята шкала гидрофильно-липофильного баланса (ГЛБ) [52]. Согласно методу Гриффина, числа ГЛБ для нормальных неионогенных ПАВ определяются следующим образом:

Согласно методу Гриффина, числа ГЛБ для нормальных неионогенных ПАВ определяются следующим образом:

Для этоксилированных спиртов и этоксилированных алкилфенолов:

$$ГЛБ = 20 \times M_{ЭО} / M, \quad (1)$$

где $M_{ЭО} / M$ — массовая доля этиленоксида.

Для этоксилированных многоатомных спиртов:

$$ГЛБ = 20 \times (M_{ЭО} / M + M_{МС} / M), \quad (2)$$

где $M_{ЭО} / M$ — массовая доля этиленоксида, $M_{МС} / M$ — массовая доля многоатомного спирта.

Для сложных эфиров жирных кислот и немногoатомных спиртов:

$$ГЛБ = 20 \times \left(1 - \frac{\text{число омыления}}{\text{кислотное число}} \right) \quad (3)$$

Очевидно, данный метод очень охватывает лишь небольшое количество ПАВ определенного состава и в последствии он был развит Дэвисом, который ввел схему, позволяющую приписывать групповые числа ГЛБ химическим группам, составляющим молекулу ПАВ.

В концепции Дэвиса ГЛБ молекулы рассчитывается по следующей формуле [53]:

$$ГЛБ = 7 + \sum_i B_i, \quad (4)$$

где B_i — групповые числа всех групп, составляющих молекулу. Групповые числа некоторых групп приведены в Таблица 1 [54].

Таблица 1. Групповые числа ГЛБ для некоторых групп, согласно методу Дэвиса.

Группа	Число ГЛБ
<i>Гидрофильные</i>	
–SO ₄ Na	35.7
–CO ₂ K	21.1
–CO ₂ Na	19.1
–N (третичный амин)	9.4
Сложноэфирная группа (сорбитановый цикл)	6.3
Сложноэфирная группа	2.4
–CO ₂ H	2.1
–ОН (свободный)	1.9
–О–	1.3
–ОН (сорбитановый цикл)	0.5
<i>Липофильные</i>	
–CF ₃	-0.870
–CF ₂ –	-0.870
–CH ₃	-0.475
–CH ₂ –	-0.475
–CH– 	-0.475

Связь ГЛБ с коэффициентом распределения ПАВ между водной и углеводородной фазами определяется по Дэвису соотношением:

$$ГЛБ = 7 + 0.36 \times \ln \left(\frac{C_B}{C_M} \right) \quad (5)$$

Как показано Русановым [55], эмпирическая шкала ГЛБ получает термодинамическое обоснование при анализе работы переноса молекул ПАВ из водной в

углеводородную фазу, при этом групповые числа V_i пропорциональны работам переноса отдельных групп, а работа переноса молекулы есть результат аддитивного сложения работ переноса входящих в нее групп.

Несмотря на существенные различия в подходах Гриффина и Дэвиса, результаты расчета, получаемые этими методами, как правило, очень близки между собой.

Варьирование длины и соотношения блоков в амфифильных блок-сополимерах позволяет контролируемым образом менять морфологию и свойства образуемых ими ассоциатов. Самоорганизация блок-сополимеров в растворе может приводить к разным морфологиям, например, сферическим и цилиндрическим мицеллам или везикулам. Тип морфологии связывают с параметром упаковки макромолекулы и, соответственно, кривизной поверхности ассоциата:

$$p = \frac{v}{a \times l} = 1 + H \times l + \frac{K \times l^2}{3}, \quad (6)$$

где H — средняя кривизна, а K — Гауссова кривизна границы раздела фаз, p — параметр упаковки, v — объём гидрофобной части полимера, a — площадь границы раздела фаз в расчёте на одну молекулу, l — длина цепи гидрофобной части макромолекулы (Рис. 4) [56].

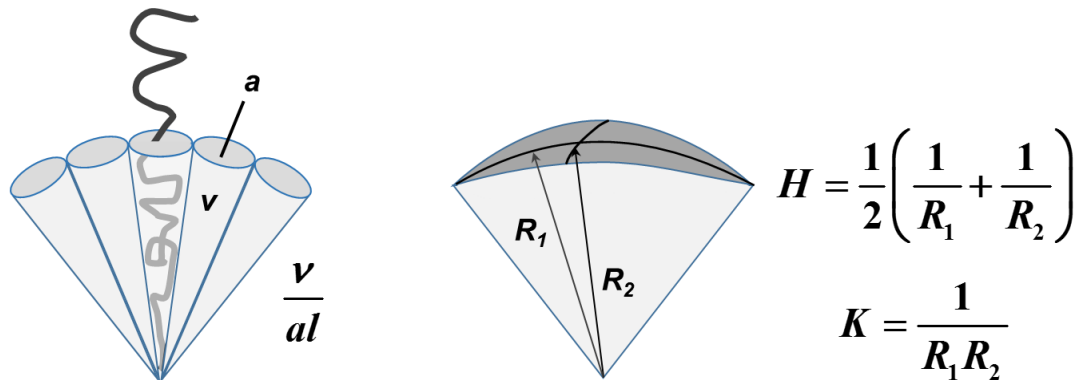


Рис. 4. Связь морфологии ассоциатов амфифильных блок-сополимеров в растворе с геометрическими параметрами макромолекулы.

Каждый тип морфологии характеризуется диапазоном значений p , например, $p \leq 1/3$ для сферических мицелл, $1/3 \leq p \leq 1/2$ для цилиндрических мицелл и $1/2 \leq p \leq 1$ для везикул. Другими важными параметрами, определяющими морфологию самоорганизованной структуры, являются массовая или объёмная доля гидрофильного блока (f) и связанный с ней параметр ГЛБ, а также χ — параметр взаимодействия гидрофобного блока с водой [57].

Для блок-сополимеров ПЭГа с высокими значениями χ везикулярные структуры образуются, когда доля ПЭГа составляет 10-40%. При 45-55% преобладает тенденция к образованию цилиндрических мицелл, а сферические мицеллы образуются при доли ПЭГа 55-70% [58].

2.2.1 Полоксамеры (плюроники)

Полоксамеры представляют собой симметричные триблоксополимеры, в которых средний гидрофобный блок, состоящий из звеньев пропиленоксида, окружен блоками гидрофильного полиэтиленоксида. Термин «полоксамер» ввел Irving Schmolka, который получил патент на создание таких полимеров в 1973 году. Полоксамеры также известны под торговыми названиями Synperonics, Pluronic и Kolliphor. Названия полоксамеров имеют следующий вид: буква Р от «poloxamer», за которой следует трехзначное число. Число, составленное из первых двух цифр, умноженное на 100 составляет приблизительную молекулярную массу полипропиленоксидного блока, а последняя цифра при умножении на 10 дает процентное содержание блоков полиэтиленоксида по массе. Для торгового названия Pluronic, под которым выпускаются такие полимеры компанией BASF, используется иная номенклатура. Буква в названии обозначает физическую форму при комнатной температуре: L — жидкая (liquid), P — пастообразная (paste), F — твердая (flakes, firm). Первая цифра (или первые две цифры в трехзначном обозначении) указывает длину гидрофобного блока, деленную на 5, а последняя — массовую долю звеньев ПЭО в процентах, деленную на 10.

Рассмотрим фазовые диаграммы некоторых плюроников (Рис. 5). Видно, что с ростом концентрации и температуры все плюроники агрегируют в водных растворах с образованием мицелл.

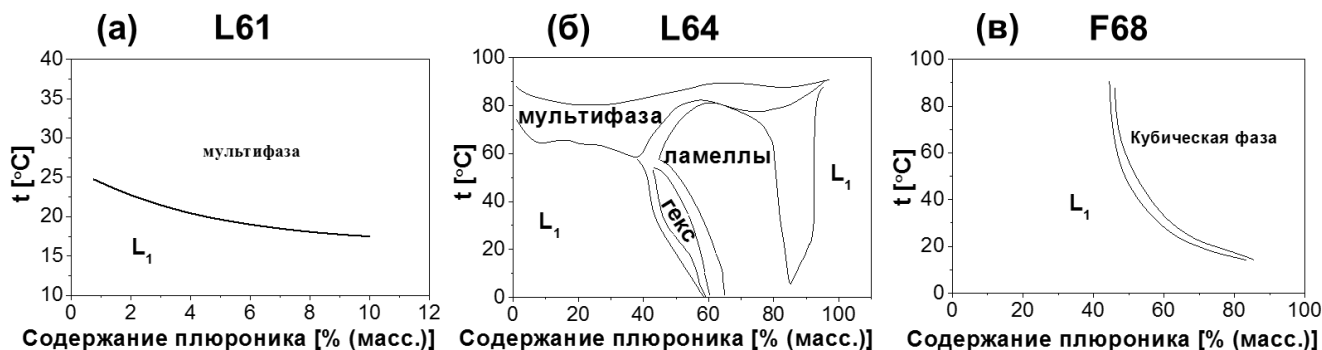


Рис. 5 Фазовые диаграммы плюроников L61, L64 и F68. Мицеллярная фаза обозначена как L₁.

Более гидрофобные плюроники, такие как L62 и L63, склонны к формированию вытянутых цилиндрических мицелл [59], а плюроник L121 даже образует везикулы [60].

В концентрированных системах плуроники образуют гексагональные, ламеллярные и кубические мезофазы, причем с ростом содержания этиленоксида в составе сополимера температура, при которой наблюдается формирование жидкокристаллических мезофаз, повышается.

В разбавленных растворах плуроники образуют мицеллы, которые находятся в равновесии с единичными молекулами. Число агрегации мицелл растет с повышением температуры [59] и концентрации полимера в растворе [61]. Так, например, число агрегации плуроников P85 и F68 увеличивается соответственно от 30 и 2 до 52 и 5 при возрастании температуры от 30 до 40°C ([62, 63], Рис. 6). Дальнейшее нагревание концентрированного раствора P85 приводит к формированию гелей, а число агрегации мицелл плуроника F68 увеличивается до 60 при 70°C [63].

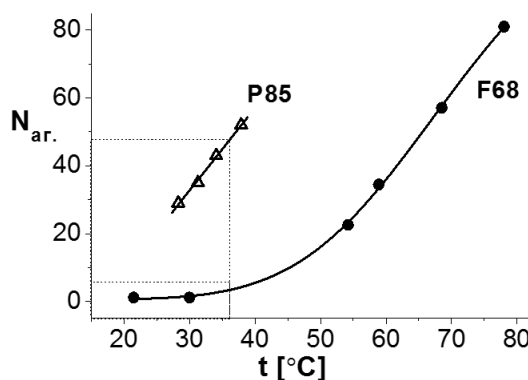


Рис. 6. Увеличение числа агрегации мицелл плуроников F68 и P85 с увеличением температуры (построено по данным работ [62] и [63]).

ККМ плуроников закономерно уменьшается при увеличении длины блока ППО, при этом уменьшение длины гидрофильных блоков влияет значительно менее резко (Таблица 2). Зависимость ККМ плуроников от их состава описывается эмпирическим корреляционным уравнением, полученным в работах Loh с сотр. для 15 плуроников [64]:

$$RT \ln KKM = -7.68 - 0.016n - 0.15m. \quad (7)$$

Согласно этому уравнению (7), увеличение степени полимеризации и гидрофобного (m), и гидрофильного (n) блоков способствует понижению ККМ, т.е. благоприятствует образованию мицелл. Так же, как и ККМ, критическая температура мицеллообразования плуроников уменьшается с увеличением количества звеньев ПО (Таблица 2), что говорит о том, что плуроники с более длинным гидрофобным фрагментом образуют мицеллы при более низких температурах. В то же время влияние длины гидрофильного полиэтиленоксидного блока на критические параметры мицеллообразования оказалось менее выражено.

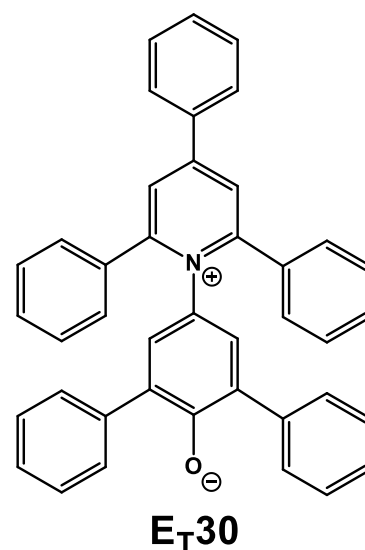
Таблица 2. Свойства некоторых плуроников.

Плюро- ник	ММ	n(PO)	n(EO)	% ПЭО (масс.)	ККМ, М [65]	Число агрегации (температура)	ГЛБ по BASF	ГЛБ по Гриффину
L61	2090	30	4	10	1.2×10^{-4}	-	1-7	2
L64	2900	30	26	40	1.0×10^{-3}	57 (35°C) [59]	12-18	8
F68	8400	30	153	80	8.0×10^{-3}	5 (37°C) [62]	>24	16
P85	4500	40	52	50	7.2×10^{-4}	52 (38°C) [63]	12-18	10
F127	12600	65	200	70	6.3×10^{-3}	20 (35°C) [66]	18-23	14
P123	5750	70	40	30	4.0×10^{-7}	159-165 (50°C) [67]	7-12	6

При постоянной длине полипропиленоксидного блока увеличение длины блоков полиэтиленоксида приводит к незначительному возрастанию ККМ и КТМ. Это означает, что длина полипропиленоксида является решающим фактором в процессе мицеллообразования. Показано также [68, 69] что при постоянном соотношении пропиленоксид/этиленоксид в составе сополимера, увеличение молекулярной массы плуроника приводит к уменьшению ККМ и КТМ, т.е. плуроники с большей молекулярной массой более склонны к образованию мицелл в водных растворах.

В работах Scheutjens и Fleer была составлена теоретическая модель мицелл плуроника. Теоретический подход, примененный для такого моделирования, носит в литературе название теории Флори-Хаггинса-Шоттенса-Флира [70, 71]. Для описания полимерной мицеллы была создана сферическая решеточная модель, аналогичная решеточной модели Флори-Хаггинса, и взаимодействиям пропиленоксидных и этиленоксидных звеньев с водой приписывались параметры χ , экспериментально определяемые на основании закона Рауля.

Расчеты термодинамических функций, проведенные с учетом этих параметров, показали, что граница гидрофобной и гидрофильной областей в мицеллах плуроников размыта. При этом в гидрофильной опушке оказывается некоторое количество пропиленоксидных звеньев, а в гидрофобном ядре — содержатся этиленоксидные звенья. При этом содержание воды в гидрофобном ядре постепенно снижается от опушки к центру, причем в глубине ядра содержание воды практически равно нулю. Однако общее содержание воды в гидрофобном ядре мицеллы может быть довольно велико (10-15 мол. %), т.е.



даже при температуре выше КТМ при комнатной температуре не происходит полной дегидратации полипропиленоксида [70].

Полярность внутренней среды мицелл плуроников была изучена с помощью исследования флуоресценции гидрофобного пиридиний-N-феноксид-бетаинового красителя Е_т30 (краситель Рейнхардта) [64]. Длина волны флуоресценции этого красителя сильно зависит от полярности его микроокружения и изменяется от 453 нм в водном окружении до 853 нм в дифениловом эфире.

При включении в липидный бислой максимум флуоресценции Е_т30 составляет около 530 нм. Исследование полярности внутренней среды мицелл плуроников с помощью этого красителя показало, что полимеры этого семейства могут быть разделены на 3 группы. В первую группу, в которой гидрофобность внутренней среды мицелл относительно невелика ($\lambda_{\text{макс}} \sim 480\text{-}510$ нм) попадают либо те плуроники, у которых длина полипропиленоксидного блока невелика (15-20 звеньев пропиленоксида), либо они содержат большой этиленоксидный блок (L31, F68). Во вторую группу, соответствующую $\lambda_{\text{макс}} \sim 530\text{-}540$ нм, попадают плуроники, содержащие 30-40 звеньев пропиленоксида и различное количество полиэтиленоксида. В третью группу ($\lambda_{\text{макс}} \sim 550\text{-}560$ нм) попадают плуроники, содержащие 45-50 звеньев полипропиленоксида (P94, P103). Таким образом, полярность внутренней среды мицелл сильно зависит от длины и гидрофобного, и гидрофильного блоков. Этот результат прекрасно согласуется с упоминавшимися выше [70, 71] результатами моделирования мицелл с помощью теории Флори-Хаггинса-Шоттенса-Флира, согласно которым и полиэтиленоксид, и даже вода могут находиться в гидрофобном ядре мицелл, повышая при этом его полярность. Наличие воды в гидрофобном ядре мицеллы было недавно подтверждено с помощью Фурье-ИК-спектроскопии. Положение полосы поглощения, отвечающей симметричным деформационным колебаниям метильной группы полипропиленоксида, зависит от гидратированности этой группы: в гидратированном состоянии она находится при 1375 см^{-1} , а при дегидратации – смещается до 1381 см^{-1} . При температуре ниже точки помутнения плуроника P104 в спектре регистрируется полоса поглощения, соответствующая некоторой доле метильных групп, находящихся в гидратированном состоянии, хотя эта доля уменьшается с ростом температуры [72].

Таким образом, анализ литературы показывает, что в семействе плуроников поверхностно-активные свойства меняются в очень широких пределах, что дает возможность выбрать полимеры, обладающие почти любыми заданными свойствами.

На основе плуроников создано огромное множество средств доставки лекарств и нанореакторов. Мицеллы амфифильных сополимеров широко исследуются как потенциальные носители для доставки лекарств [73]. Цитотоксичность плуроников относительно невелика и резко снижается с уменьшением их гидрофобности (Рис. 7) [65]. При этом разница между токсической концентрацией и ККМ может достигать 10-100 раз для гидрофильных плуроников, таких как F127 и F68. Это свойство отличает плуроники и многие другие амфифильные полимеры на основе простых и сложных полиэфиров от низкомолекулярных неионогенных ПАВ, содержащих углеводородные радикалы в качестве гидрофобной части. Как показано в той же работе, такие соединения могут проявлять цитотоксичность в форме отдельных макромолекул [65], что делает их мало применимыми для использования в качестве контейнеров для доставки лекарств.

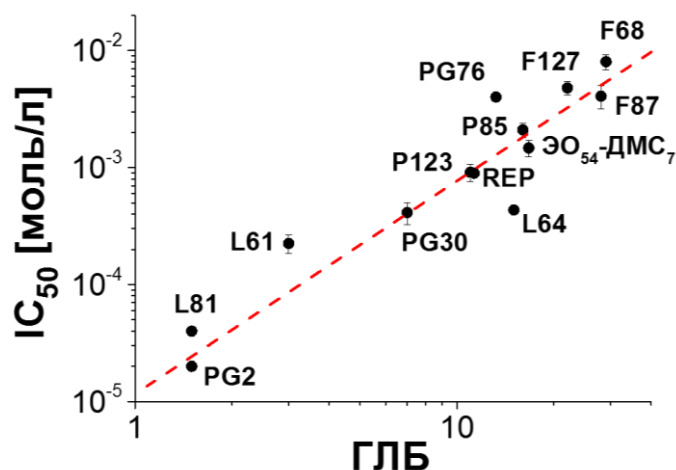


Рис. 7. Логарифмическая зависимость концентрации полимеров, при которой наблюдается гибель 50% клеток (IC_{50}), от ГЛБ. Значения ГЛБ приведены по данным фирмы-производителя (по данным [65]). PGn — блок-сополимеры состава $PO_{30}EO_6GL_n$, где GL — разветвленный блок полиглицерина.

Мицеллы плуроников были использованы для солюбилизации целого ряда водонерастворимых лекарств и биологически активных соединений. Так, смешанные мицеллы плуроников F127 и P123 использовали для повышения эффективности действия паклитакселя (таксола) [74, 75]. Мицеллы плуроника P105 использовались для солюбилизации доксорубина, причем обработка ультразвуком резко увеличивала высвобождение лекарства [76]. Мицеллы плуроника F87 использовались для доставки

противовоспалительного препарата ациклофенака [77]. Солюбилизация флавоноида куркумина в мицеллах высокомолекулярных плуроников P105 и F127 повышала его собственную цитотоксичность и увеличивала его активность в фотодинамической терапии [78]. Как нанореакторы мицеллы плуроников используются для синтеза наночастиц [18], доставки фотосенсибилизаторов в фотодинамической терапии [23, 78], создания флуорогенных зондов, чувствительных к H_2O_2 [79] и т.п. Адсорбция плуроника F127 стабилизировала твердые органические наночастицы, способные вступать в ПО-реакцию с пероксидом водорода. Такие частицы использовали для визуализации очагов воспаления у мышей [80–83]. Плуроники как полимерные ПАВ востребованы при создании эмульсионных нанореакторов и наноконтейнеров.

С точки зрения термодинамики, следует различать микро- и макроэмульсии. Микроэмульсии представляют собой термодинамически устойчивые, изотропные, гомогенные на макроскопическом уровне смеси масла, воды и ПАВ, которые на микроскопическом уровне состоят из отдельных доменов масла и воды, разделенных монослоем поверхностно-активного вещества. Микроэмульсии нельзя рассматривать как эмульсии с каплями очень малого размера, т.к. микро- и макроэмульсии имеют фундаментальные различия (Таблица 3) [54].

Таблица 3. Сравнение свойств эмульсий и микроэмульсий по данным [54].

Свойство	Эмульсии	Микроэмульсии
Стабильность	Неустойчивы, расслаиваются с течением времени	Термодинамически устойчивые системы
Размеры	Капли относительно большие (1-20 мкм)	Небольшие агрегаты (10-200 нм)
Молекулярная подвижность	Относительно статические системы	Высокодинамичные системы
Размер межфазной поверхности	Внутренняя поверхность относительно невелика, стабилизируется умеренным количеством ПАВ	Внутренняя поверхность очень большая, образуются при высоком содержании ПАВ
Кривизна межфазной поверхности	Кривизна межфазной поверхности масло-вода небольшая	Межфазные пленки масло-вода могут иметь большую кривизну

В то время как макроэмульсии (эмульсии) принципиально нестабильные дисперсные системы, в которых капли неминуемо будут коалесцировать и которые обладают лишь кинетической устойчивостью, микроэмульсии термодинамически устойчивы и характеризуются интенсивной динамикой внутренней структуры. Поскольку возникновение термодинамически стабильной фазы основано на принципах

самоорганизации ПАВ, микроэмульсионные фазы во многом сходны с другими фазами ПАВ, например, мицеллярными растворами и жидкокристаллическими фазами. Микроэмульсии могут образовываться в смесях индивидуального ПАВ, масла и воды, но во многих случаях для их образования требуется введение второго поверхностно-активного вещества, так называемого ко-ПАВ, например, спирта в гидрофобным радикалом среднего размера. В некоторых случаях для получения микроэмульсии в систему, кроме основного ПАВ, необходимо вводить соли и сорастворители.

Также выделяют ещё одну категорию эмульсий — наноэмульсии, стабильность которых имеет кинетическую природу, как и у макроэмульсий, однако по размеру (20-100 нм) они близки к микроэмульсиям [84].

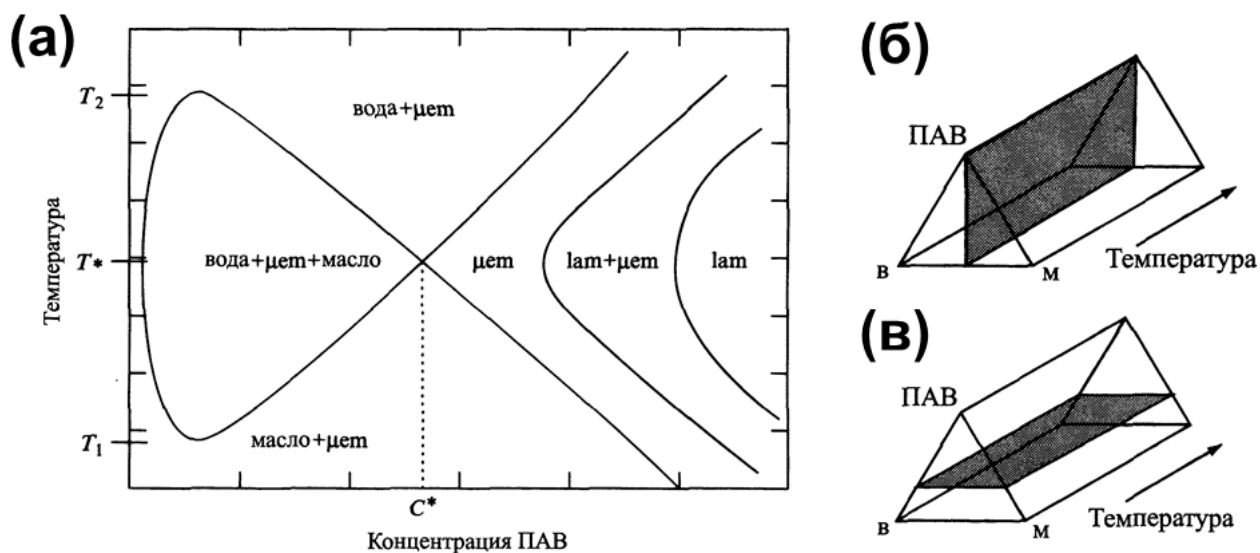


Рис. 8. (а) Схема фазовой диаграммы тройной системы вода-масло-неионогенный ПАВ. ‘lam’ обозначает жидкокристаллическую ламеллярную фазу, мет — микроэмульсию.

Соотношение количеств масла и воды поддерживается постоянным, а концентрация ПАВ варьируется [85]. Фазовые призмы: сечения при постоянном соотношении объемов масла и воды (б) и при постоянной концентрации ПАВ (в).

На Рис. 8а показано сечение фазовой призмы для системы, состоящей из масла, воды и неионогенного ПАВ при соотношении объемов масла и воды 1:1, эквивалентное сечению на Рис. 8б. Трехфазная область, которая состоит из микроэмульсии, находящейся в равновесии с избытками воды и масла, устойчива в интервале температур от T_1 до T_2 . Температурная область существования этой микроэмульсии сильно зависит от концентрации ПАВ. При концентрации ПАВ, равной C^* , и сбалансированной температуре T^* трехфазная область соприкасается с однофазной микроэмульсией

(микроэмульсионная вершина треугольника трехфазной области). При более высокой концентрации ПАВ микроэмульсия находится в равновесии с ламелярной фазой [85].

Кривизна межфазной границы микроэмульсии может варьироваться: межфазная поверхность может быть сильно искривленной в сторону масла, иметь нулевую среднюю кривизну или быть сильно искривленной в сторону воды. В противоположность эмульсиям, кривизна межфазной поверхности микроэмульсий по сравнению с размером молекул ПАВ весьма существенна. Это означает, что не только гидрофильно-липофильный баланс, но и геометрия молекулы ПАВ становится важным фактором, определяющим выбор ПАВ для получения оптимальной микроэмульсии [54].

Микроэмульсии обладают важными достоинствами, которые обеспечивают интерес к таким системам как средствам доставки: они термодинамически стабильны, устойчивы во времени, их размер можно варьировать путем изменения отношения масло/ПАВ от 10 до 500 нм, они являются эффективной системой для солюбилизации органической фазы. Использование полимеров в качестве ПАВ, стабилизирующих микроэмульсии, оправдано их более высокой эффективностью, т.е. необходимо вводить меньшее по массе количество полимера, чем низкомолекулярного ПАВ. На практике зачастую сложно провести чёткую границу между микро- и макроэмульсиями, т.к. строгое отнесение к одной из категорий требует специальных исследований.

В химиотерапии рака широкое распространение получили препараты на основе таксола (Taxol, Paclitaxel), продуцируемого некоторыми видами растений и грибов. L. Не с сотрудниками [86] предложил микроэмульсию таксола, стабилизированную плуроником F68, яичным фосфатидилхолином и полиэтоксифицированным касторовым маслом Cremophor EL. Размер полученных частиц составил 17.2 нм, а эффективность загрузки вещества 98.9%. Результаты, полученные в работе, дают основание предполагать, что данная микроэмульсия должна обладать пролонгированной циркуляцией в кровотоке.

Микроэмульсии позволяют также добиться замедления деградации лабильных лекарственных соединений. Так, недавно было показано, что раствор противовоспалительного и противоопухолевого препарата куркумина в глицерин моноолеате можно диспергировать в воде с помощью различных ПАВ. При этом стабильность и эффективность действия препарата существенно зависят от природы эмульгатора. Оказалось, что эмульсии раствора, полученные с использованием

полоксамера 407 (аналог плуроника F87) обеспечивают более высокую стабильность и биодоступность препарата, чем эмульсии, полученные с помощью смеси казеината натрия и дезоксихолата натрия [87].

Плюроник F127 использовали для стабилизации эмульсионного нанореактора на основе соевого масла, содержащий компоненты ПО-реакции, для визуализации пероксида водорода *in vivo* [31]. Диаметр 50-60 нм даёт основания полагать, что данная система также является микроэмульсией. Плюроник F68 используется при создании большого числа заменителей крови на основе эмульсий фторированных углеводов, обладающих высокой растворимостью кислорода и углекислого газа. [88]

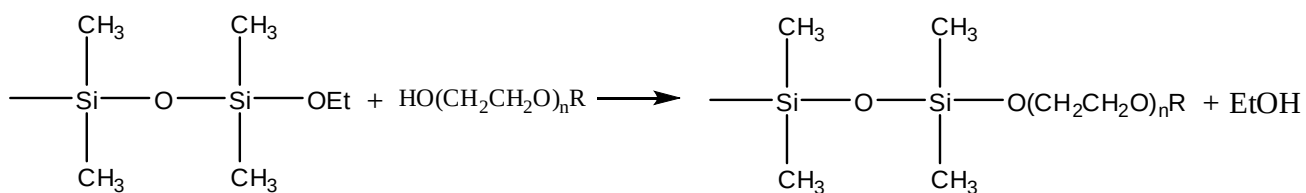
Плюроники являются эффективными полимерными ПАВ для солубилизации и эмульгирования ароматических соединений [84]. Для плуроника L64 описаны стабильные эмульсии ксилола [89] и сложных эфиров, например, трибутилфосфата [90].

Полиалкиленоксиды, хоть и считаются биосовместимыми полимерами, все же не способны расщепляться под действием ферментов в организме, что ограничивает их применение в медицине.

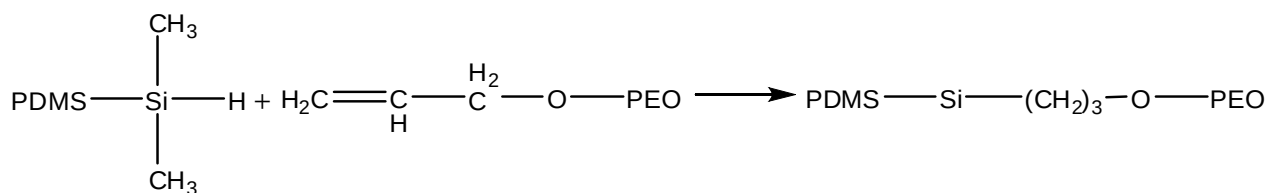
В следующем разделе будут рассмотрены амфифильные полимеры иной природы, содержащие кремнийорганический гидрофобный блок.

2.2.2 Сополимеры ДМС-ЭО

Поверхностно-активные вещества на основе полидиметилсилоксана и полиэтиленоксида были впервые синтезированы в 50-х годах из циклического диметилсилоксана и гидроксил-содержащего полиэтиленоксида [91].

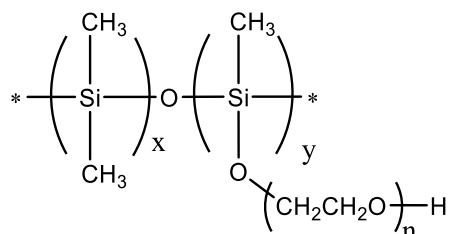


Вскоре выяснилось, что связи Si-O-C нестабильны в водной среде, поэтому был предложен иной путь синтеза, предполагающий конденсацию аллил-терминированного полиэтиленоксида с полидиметилсилоксаном, терминированным силановой группой в присутствии платинового катализатора [92]:



Было показано, что введение в молекулу такого сополимера даже небольшого числа (2-3) диметилсилоксановых звеньев придает ему способность адсорбироваться на поверхности раздела вода-воздух.

Позже аналогичным образом с использованием сополимеров, содержащих силановые звенья были синтезированы привитые сополимеры диметилсилоксана и этиленоксида следующего строения [93]:



Оказалось, что такие сополимеры также обладают ярко выраженными поверхностноактивными свойствами и склонны к образованию мицеллярных, гексагональных и ламеллярных фаз, причем с увеличением содержания диметилсилоксановых звеньев в составе сополимера увеличивается его способность агрегировать в водном растворе и образовывать в концентрированных системах ориентированные мезофазы [94–96].

Таким образом, анализ литературы показывает, что сополимеры, содержащие в качестве гидрофобного блока полидиметилсилоксан могут использоваться в качестве мицеллообразующих ПАВ.

Другим важным применением амфифильных блок-сополимеров ДМС является создание полимерсом. Триблок-сополимеры, у которых центральный блок представлен ПДМС, например, поли-N-винилпирролидон-блок-ПДМС-блок-поли-N-винилпирролидон или поли-2-метил-2-оксазолин-блок-ПДМС-поли-2-метилоксазолин очень широко используется в качестве материала для полимерных везикул [35, 58].

2.2.3 Заключение главы 2.2

Имеющиеся в литературе обширные данные по мицеллообразованию в растворах амфифильных сополимеров показывают, что, свойства полимерных мицелл определяются длиной и природой гидрофильных и гидрофобных блоков, входящих в состав макромолекулы. При этом свойства гидрофобного ядра мицелл во многом схожи со свойствами гомополимеров, входящими в состав гидрофобного блока. В то же время длина и свойства гидрофильного блока определяют такие важнейшие свойства мицелл, как их размер и полярность гидрофобного ядра.

Анализ литературы по свойствам блок-сополимеров этиленоксида и пропиленоксида (плюроники) показывает, что, переходя от сополимеров с низким (около 10%) содержанием этиленоксида к более гидрофильным сополимерам, можно получать как везикулярные частицы или системы, находящиеся на грани фазового расслоения, так и мицеллы малого размера. При этом, согласно литературным данным, в таких частицах закономерно меняется полярность гидрофобного ядра и содержание в нем воды. Высокая склонность плюроники к адсорбции на поверхности раздела фаз, а также их высокая гибкость делает их весьма удобными для получения эмульсий различных типов.

2.3 ФОТОДИНАМИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ

Фотодинамическая терапия – перспективный подход к лечению поверхностных раковых опухолей и гнойных инфекций, связанный с использованием фотосенсибилизаторов, т.е. веществ, способных генерировать высокоактивные формы кислорода при возбуждении светом. Поскольку большинство фотосенсибилизаторов являются гидрофобными соединениями, амфифильные сополимеры существенно увеличивают эффективность ФДТ. В данной главе даётся обзор фотохимических процессов, лежащих в основе ФДТ, продемонстрирована исключительно важная роль полимеров как средств доставки активных соединений в клетки и ткани живых организмов, а также приводятся физико-химические особенности строения синглетного кислорода и даётся обзор способов его детекции.

2.3.1 Фотодинамический эффект

Более века назад аспирант биолога Г. Фон Таппайнера, О. Рааб, при окрашивании инфузорий флуоресцентными красителями акридинового ряда заметил, что при достаточно долгом облучении светом инфузории перестают двигаться и погибают. Исследователи наблюдали, что эти красители под действием света проявляют бóльшую токсичность, чем в темноте, и отсюда был предложен термин "фотодинамический эффект", т.е. действие света на динамику клеток, их подвижность, а красители названы фотосенсибилизаторами, т.к. вызывают у клеток или организмов чувствительность к свету. Позже Леду-Лебарте показал, что помимо красителя и света, необходим третий обязательный компонент — кислород. Таким образом, в основе данного явления лежат три компонента: свет, краситель и кислород. Г. Фон Таппейнер понял терапевтический потенциал этого эффекта и вместе с А. Джезиоником первым провел опыты по фотодинамической терапии заболеваний кожи ракового, сифилитического и туберкулезного происхождения с

помощью окрашивания эозином и облучения ярким солнечным светом, и им впервые удалось добиться успеха в лечении рака кожи. Г. Дрейер открыл бактерицидный эффект при действии света на окрашенные бактерии, а также показал, что свет может повреждать окрашенную кожу человека, и обнаружил болевой эффект при фотоповреждении кожи. Развитие ФДТ приостановилось из-за этого и других побочных эффектов, а также нестабильного лечебного действия. Открытие высокой фототоксичности производного гематопорфирина HpD и его избирательного накопления опухолями открыло перспективы использования этого фотосенсибилизатора для флуоресцентной визуализации опухолей и фототерапии рака. Однако фотодинамическая терапия не получила широкого распространения до середины 70-тых годов, пока Догерти с соавторами не добились полной или частичной ремиссии 111 из 113 кожных и подкожных опухолей и метастазов у 25 пациентов при использовании HpD. После этих работ началось интенсивное изучение фотодинамической терапии для лечения рака и некоторых других заболеваний [97–100].

В основе фотодинамического (ФД) эффекта лежат реакции с участием флуорофора и кислорода, вызванные светом. При поглощении фотона (Рис. 9, 1) флуорофор переходит в синглетное возбужденное состояние с временем жизни около 10^{-8} – 10^{-9} с. За это время флуорофор претерпевает дезактивацию: излучательную — испускает квант света (флуоресценция, 2), или безызлучательную — избыточная энергия диссипирует в виде тепла (3), или флуорофор в результате интеркомбинационной конверсии (4) может перейти в триплетное состояние с временем жизни 10^{-5} – 10^{-2} с.

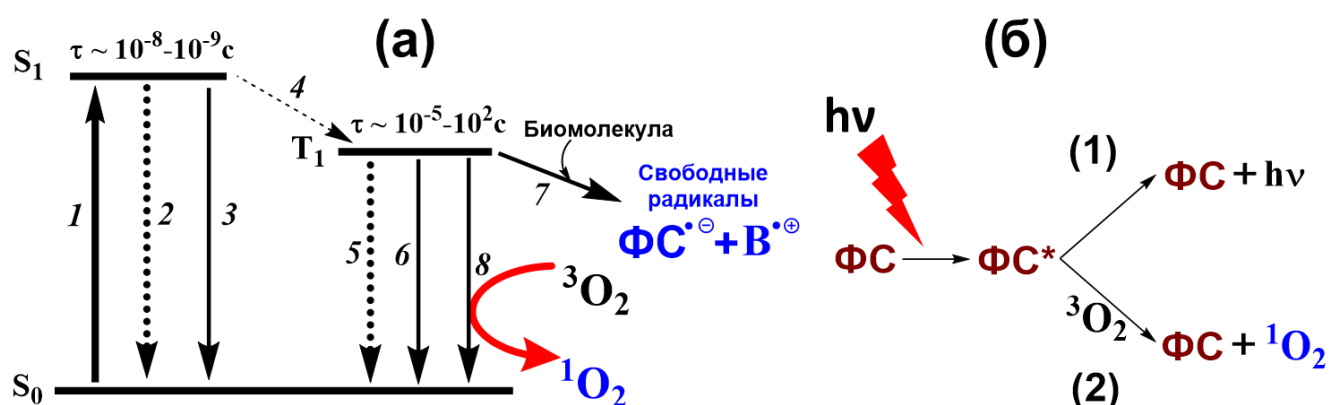


Рис. 9. Упрощенная схема электронных энергетических уровней и переходы между ними, характерные для молекул фотосенсибилизаторов.

В триплетном состоянии флуорофор, как и в синглетном состоянии, может испускать энергию в виде кванта света (фосфоресценция, 5) или релаксировать

безызлучательно (6). Однако благодаря достаточно долгому времени жизни резко повышается вероятность передачи энергии другим молекулам (7, 8). Поэтому в фотохимических реакциях в основном участвуют флуорофоры в возбужденном триплетном состоянии [98, 101, 102].

В настоящее время используют природные, синтетические и искусственные фотосенсибилизаторы, которые сильно различаются по химической природе, квантовому выходу образования синглетного кислорода, спектрам поглощения и коэффициентам экстинкции, эффективности накопления в опухолях, темновой токсичности, стабильности, растворимости в воде и многим другим параметрам. Так, к числу широко используемых фотосенсибилизаторов относятся порфирины (HrD, производное гематопорфирина IX, 1), хлорины (Ce6, 2), фталоцианины (AlPcS4, 3), антрахиноны (гиперицин, 4), трифенилметановые красители (бенгальский розовый, 5), мероцианины (мероцианиновый 540, 6), фенотиазиновые красители (метиленовый синий, 7), куркумин (8), фуллерен C60 (9) и его производные и др. (Рис. 10) [103–105].

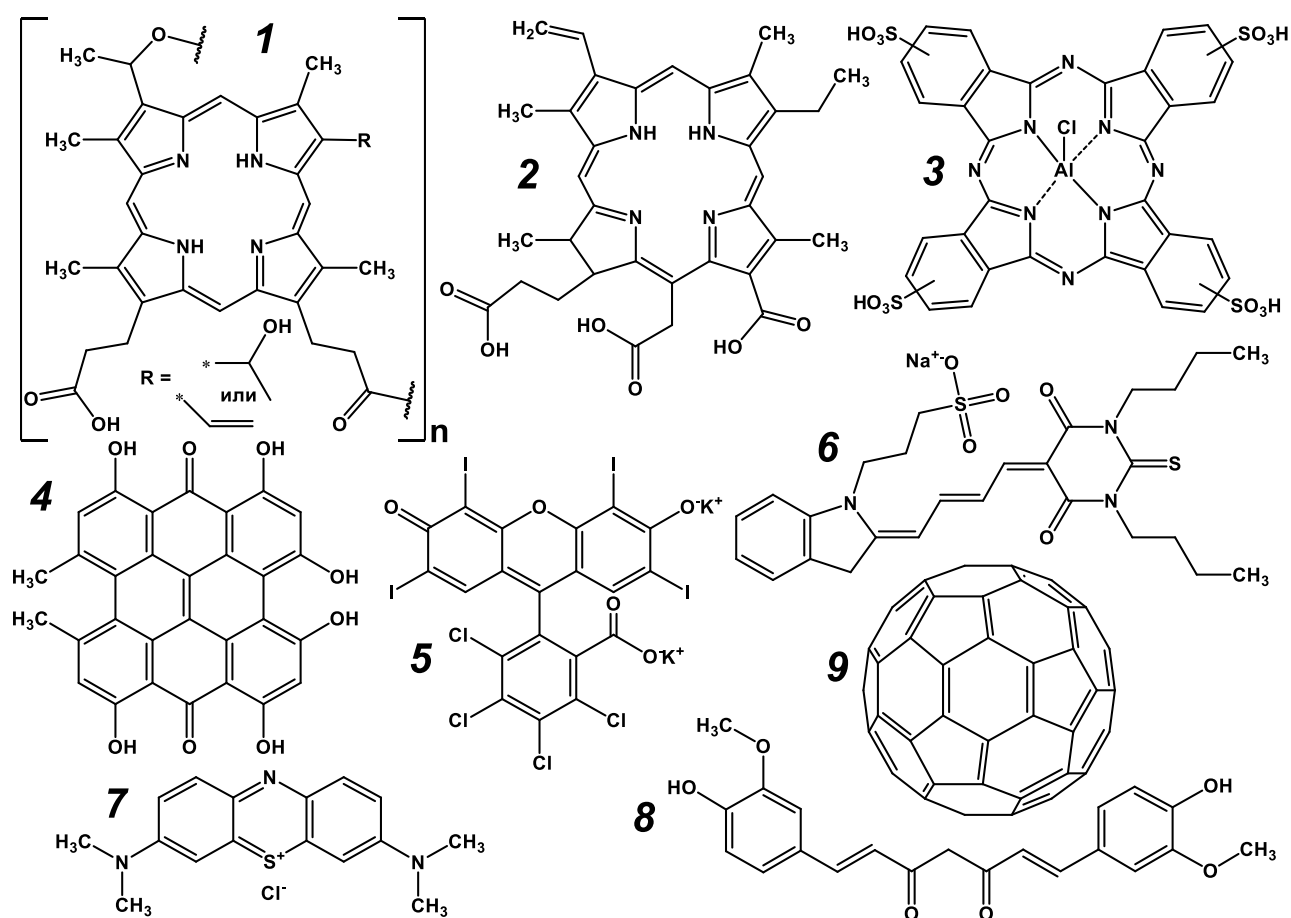


Рис. 10. Структуры некоторых фотосенсибилизаторов: 1) HrD, производное гематопорфирина IX; 2) хлорин е6 (Ce6); 3) алюминий-тетрасульфофталоцианин AlPcS4; 4) гиперин; 5) бенгальский розовый; 6) мероцианиновый 540; 7) метиленовый синий; 8) куркумин; 9) фуллерен C60.

На сегодняшний день выделяют 2 типа фотохимических реакций (Рис. 11) [106]. В первом случае возбужденные светом молекулы фотосенсибилизатора переходят в триплетное состояние и непосредственно вступают в окислительно-восстановительные реакции с субстратом (связь С-Н, N-Н) или с молекулами среды, в частности водой, где фотосенсибилизатор выполняет роль акцептора электронов, а молекулы субстрата — доноров (Рис. 11, тип 1) [107, 108]. Далее образовавшийся анион-радикал фотосенсибилизатора переносит электрон на кислород, генерируя тем самым супероксидный анион-радикал, который может сам вступать в реакции с субстратом или превращаться в другие активные формы кислорода (АФК: супероксид-анион $O_2^{\cdot-}$, гидроксил-радикал $OH^{\cdot}$, перекиси и т.п. (см. раздел 2.4.1). Окисленная молекула субстрата-донора также является радикалом и при взаимодействии с кислородом образуются АФК. Таким образом, в результате указанных процессов происходит образование различных АФК, проявляющих высокую активность и вступающих в реакции с клеточными субстратами. АФК при взаимодействии с ненасыщенными жирными кислотами образуют радикалы липидов и алкоксильные радикалы, перекисные радикалы или гидроперекиси липидов, входящие в состав биомембран. Полученные радикалы инициируют цепное перекисное окисление липидов, повреждение биомембран и нарушение их функций [98]. Некоторые флуорофоры, такие как флавины или кетоны, участвуют в ФД реакциях 1-ого типа [98, 106]. Так, флавины являются эффективными генераторами супероксид-аниона [109].

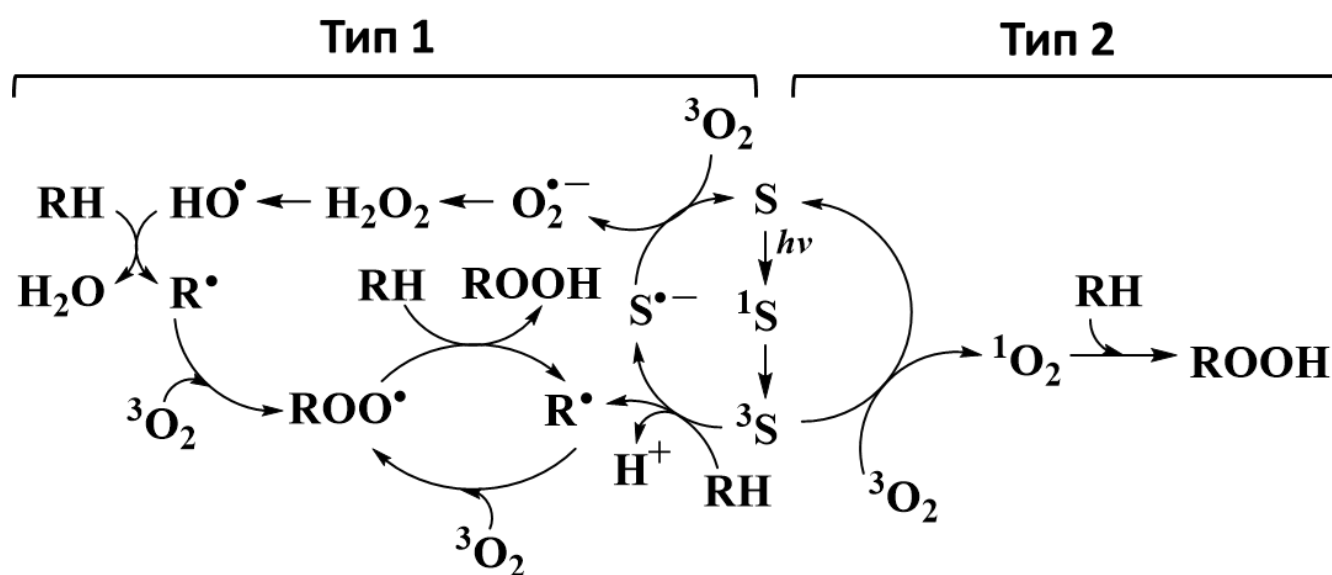


Рис. 11. Типы фотодинамических реакций [106].

К ФД реакциям 2-ого типа относят перенос энергии с молекулы красителя в возбужденном состоянии на кислород. При этом кислород переходит из триплетного состояния ($^3\text{O}_2$), когда 2 неспаренных электрона локализованы на разных орбиталях, в синглетное состояние $^1\Delta_g$ ($^1\text{O}_2$), в котором одна орбиталь содержит спаренные электроны, а вторая — свободна и способна принять пару электронов, что и обуславливает высокую реакционную способность $^1\text{O}_2$ [98, 107, 108]. Время жизни синглетного кислорода (τ_Δ) сильно зависит от окружения: в воде время жизни составляет примерно 3 мкс, в органических растворителях 10–250 мкс. В биологических системах существуют различные тушители как физические, так и химические, что приводит к уменьшению времени жизни синглетного кислорода. Так, в цитоплазме клеток $\tau_\Delta = 170\text{--}320$ нс [110], а в липидной фазе биомембран — 24–130 нс [111]. По данным Й. Моана и К. Берга, в клетках, содержащих множество тушителей, диффузионная длина $^1\text{O}_2$ не превышает 10–20 нм [112, 113], что хорошо согласуется с оценкой А. А. Красновского: 9 нм в цитоплазме и 4.5–13 нм в биомембранах [107].

Отсюда следует важный вывод: при ФД терапии повреждаются только клеточные структуры, находящиеся в непосредственной близости от фотосенсибилизатора вне зависимости от типа фотореакции. Поэтому ФД повреждение клетки во многом зависит от внутриклеточной локализации фотосенсибилизатора [98].

Синглетный кислород обладает более высокой активностью, чем триплетный кислород, и способен окислять многие компоненты клетки. В нуклеиновых кислотах легко подвергаются окислению тимин и урацил [114], а также могут образовываться однонитевые разрывы [115]. Однако, ДНК не является первоочередной мишенью при ФД терапии, т.к. фотосенсибилизаторы в основном локализуются в цитоплазме, нежели в ядре, что подтверждается отсутствием заметного мутагенного действия ФД терапии [1]. В белках субстратами фотоокисления являются цистеин, гистидин, тирозин, триптофан и фенилаланин. Так как эти аминокислоты обычно располагаются в активном центра белка, то при ФД воздействии многие ферменты теряют свою активность. Также могут образовываться различные сшивки между белками, белками и липидами, белками и ДНК или РНК [98].

Фотореакции 2-ого типа доминируют над 1-ым типом, вследствие большого коэффициента диффузии $^1\text{O}_2$ и более высоких констант скоростей реакций. Поэтому такие фотосенсибилизаторы, как порфирины, хлорины, фталоцианины и т.п.,

генерирующие под действием света в основном $^1\text{O}_2$, наиболее широко используются в фотодинамической терапии. Однако не следует пренебрегать и фотореакциями 1-ого типа, играющими в некоторых случаях ключевую роль в фотоокислении клеток [98]. Кроме того, при взаимодействии $^1\text{O}_2$ с другими молекулами могут образовываться различные АФК. Например, была показана генерация гидроксил-радикала при взаимодействии фенольных соединений с $^1\text{O}_2$ [116]. Jinming Gao с сотрудниками показал, что типом фотосенсибилизатора можно управлять, изменяя его окружение, например, солюбилизацией в мицеллах блок-сополимеров, отличающихся природой блоков, формирующих ядро [117].

Таким образом, при ФД воздействии образуются различные радикалы, АФК и $^1\text{O}_2$, которые активно разрушают внутриклеточные компоненты и приводят к гибели клетки.

2.3.2 Фотодинамическая терапия

Фотодинамический эффект лежит в основе фотодинамической терапии (ФДТ), которая наиболее активно применяется для терапии поверхностных и полостных поражённых тканей, включая раковые опухоли и гнойные раны. Если рассматривать данный подход на примере рака, первый этап ФДТ заключается во введении фотосенсибилизатора в организм и накоплении его в опухоли. На втором этапе происходит облучение участка ткани, обычно при помощи лазера. Третий этап представляет собой реакцию на многочисленные фотохимические превращения, в ходе которых происходило образование АФК и их деструктивное взаимодействие с клеточными компонентами. Эти процессы происходят как непосредственно в опухолевых клетках, так и в окружающих тканях, и селективность подхода определяется двумя основными параметрами: 1) селективностью накопления фотосенсибилизатора в клетках; 2) фокусировкой внешнего источника облучения на определенном участке ткани. Для развития раковых опухолей ключевым фактором является интенсивное снабжение питательными веществами. Для обеспечения этого требования раковые клетки секретируют повышенные концентрации факторов роста сосудов, приводящие к формированию очень развитой сети тонких дефектных сосудов. ФДТ рака во многом направлена на разрушение этой сети сосудов и перекрытие источника питания опухоли. Более того, фотосенсибилизаторы порфиринового ряда имеют повышенное сродство к сосудистой сети опухолей, накапливаясь в ней, однако механизм этого пока не установлен. Из представленного описания становится понятно, что прозрачность

биологических тканей в отношении внешнего источника облучения является фактором, ограничивающим применимость ФДТ. Поэтому активно развиваются различные подходы увеличения эффективности этого метода [118, 119]. Прежде всего, спектр поглощения всех современных фотосенсибилизаторов имеет максимум поглощения от красной области видимого спектра до ближнего ИК-диапазона, где проникаемость тканей к электромагнитному излучению значительно выше, и глубина прохождения света достигает нескольких сантиметров. Из-за сложности синтеза и дороговизны фотосенсибилизаторов, поглощающих в ближнем ИК-диапазоне, ограниченного пропускания возбуждающего излучения и невысоких квантовых выходов генерации синглетного кислорода, для возбуждения фотосенсибилизаторов используется рентгеновское излучение. Однако прямая активация фотосенсибилизаторов, использованных в клинической практике, рентгеновским излучением невозможна из-за низкой эффективности поглощения такого излучения. Для решения этой проблемы используются наночастицы-посредники, выполняющие роль антенн для рентгеновского излучения и далее передающие энергию на молекулы фотосенсибилизаторов. Такие наночастицы проявляют свойство радиолуминесценции, т.е. являются сцинтилляторами, и передают энергию фотосенсибилизатору по механизму ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET). Примером таких систем типа антенна/ФС являются пары $\text{LaF}_3\text{:Ce}$ + протопорфирин IX (PPIX) и $\text{GdO}_2\text{S:Tb}$ + Photofrin II [118, 119]. Развитием упомянутых подходов является сонодинамическая терапия (СДТ), которая сейчас выделилась в отдельное самостоятельное направление благодаря огромному потенциалу. СДТ подразумевает возбуждение фотосенсибилизатора сфокусированным ультразвуковым излучением. Данный метод выделяется двумя основными преимуществами: 1) ультразвук хорошо проникает вглубь биологических тканей; 2) возбуждению ультразвуком подвержены фотосенсибилизаторы различной природы: органические (красители [120], порфирины [121], хлорины, включая хлорин е6 [122–124], и другие), квантовые точки (например, TiO_2 [125]), фуллерены и т.д. [119] Ограничениями этого подхода являются необходимость в специализированном оборудовании, способном генерировать и фокусировать ультразвук, а также сильное деструктивное воздействие ультразвука на живые ткани.

Ограничения существующих методов делают актуальным поиск новых подходов для терапии глубоких опухолей и метастазов, действие которых было бы основано на иных принципах.

2.3.3 Полимерные носители в фотодинамической терапии

Несмотря на то, что многие используемые фотосенсибилизаторы избирательно локализуются в опухолях в организме [126], есть потребность в использовании носителей для доставки фотосенсибилизаторов по ряду причин. Гидрофобные фотосенсибилизаторы плохо растворяются в воде, кроме того они агрегируют в растворе, что уменьшает их фотодинамическую активность. Благодаря взаимодействию с сывороточными белками, происходит накопление фотосенсибилизатора в различных органах, таких как печень, надпочечники и т.п. Кроме того, накопление фотосенсибилизатора в коже приводит к фоточувствительности организма, поэтому пациент, подвергнутый фотодинамической терапии, должен находиться в изоляции от солнечного света [127].

В связи с этими проблемами в последние 20 лет большие усилия направлены на создание полимерных носителей для доставки фотосенсибилизаторов. Такие носители призваны улучшать физико-химические и медико-биологические свойства фотосенсибилизаторов. К первой категории относятся увеличение растворимости и уменьшение агрегации амфифильных и гидрофобных фотосенсибилизаторов и улучшение фотохимических характеристик фотосенсибилизаторов, например, квантового выхода генерации синглетного кислорода, а также контролируемое переключение механизма фотокаталитической активности [117]. К второй категории принадлежат такие свойства как фототоксичность, селективность, фармакокинетика и фармакодинамика, внутриклеточная и тканевая локализация фотосенсибилизаторов, биодоступность, устойчивость лекарственной формы, эффективность накопления клетками.

Для улучшения этих характеристик используют как ковалентное присоединение фотосенсибилизатора [128], [129], так и нековалентное взаимодействие с носителем [130].

Для увеличения растворимости и уменьшения агрегации амфифильных и гидрофобных фотосенсибилизаторов используют различные носители, содержащие гидрофобную микрофазу, однако полимерные нанореакторы по сравнению с липосомами и эмульсиями проявляют большую стабильность в кровотоке, обеспечивая высокую

биодоступность, а также устойчивость самой лекарственной формы, что обуславливает их более широкое применение. Кроме того, активно разрабатываются различные полимерные носители, в том числе полимерные мицеллы, наночастицы [131], отдельные макромолекулы (линейные, дендримеры [128], гребнеобразные [129]), везикулы на основе полиэлектролитных комплексов.

Например, использование мицелл блок-сополимера этиленгликоля и капролактона (PEG-PCL) увеличило растворимость и биодоступность гидрофобных фотосенсибилизаторов кремний-содержащего фталоцианина $Pc4$ [132] и феофорбида [133]. Такие же результаты были получены для Zn-фталоцианина загруженного в биodeградируемые наночастицы сополимера лактида и гликолида [134]. Очень подробно изучены полимерные наночастицы на основе гомополимеров лактида (PLA) и его сополимеров с гликолидом (PLGA) в качестве носителей для различных фотосенсибилизаторов как *in vitro*, так и *in vivo* [131].

В экспериментах *in vivo* использование носителей приводило к увеличению селективности к опухоли и уменьшению времени жизни фотосенсибилизатора в организме. Так, значительное уменьшение фоточувствительности кожи наблюдалось при солюбилизации мета-тетра(гидрофенил)хлорина в мицеллах поли(2-этил-2-оксазолин)-блок-поли-(D,L)-лактида [135]. Использование мицеллообразующего блок-сополимера этиленгликоля и 2-гексил-лактида увеличивало локализацию гидрофобного флуоресцентного маркера опухоли гиперцина в 17 раз [136]. Восприимчивость гидрофобного поликапролактона к ферментативному гидролизу дало возможность создать мицеллярные частицы, которые высвобождает мета-тетра(гидроксифенил)хлорин в присутствии липаз [137]. Благодаря более низкому значению рН в опухоли, использование рН чувствительных мицелл, способных дезагрегировать в слабокислой среде, привело к высокой селективности протопорфирина IX, причем в этом случае было обнаружено понижение накопления фотосенсибилизатора в печени [138]

Солюбилизация фотосенсибилизатора в мицеллах и наночастицах полимеров приводила к увеличению квантового выхода генерации синглетного кислорода и увеличивала фототоксичность фотосенсибилизатора. Мицеллы сополимера полиэтиленгликоля и поликапролактона увеличивали фототоксичность протопорфирина IX [139] и феофорбида [133] в 10 и 2 раза, соответственно. Почти 10-кратное увеличение

фототоксичности цинк-фталоцианина [134] и индий (III) — тетрафенилпорфириний хлорида [140] наблюдалось при их ассоциации в сложные полиэфирные биodeградируемые наночастицы.

Накопление хлорина, ковалентно связанного с полистирольными микросферами с размером 1 мкм в клетках мочевого пузыря MGH-U1 было в 20 раз выше, по сравнению со свободным хлорином, а токсичность в 10 раз выше [141, 142]. Помимо этого, авторы обнаружили, что микросферы меняют внутриклеточную локализацию хлорина. Конъюгат путем фагоцитоза попадал внутрь цитоплазматических компартментов, в то время свободный хлорин в основном локализовался в клеточных мембранах, что согласуется с предыдущей работой [143].

Помимо полимерных мицелл и наночастиц полимерные макромолекулы также могут влиять на селективность фотосенсибилизатора. Образование комплексом хлорина с поли-N-винилпирролидоном увеличивает селективность хлорина к опухоли [144].

В настоящее время исследуется возможность использования плуроников, триблок-сополимеров полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля, в фотодинамической терапии. Так, мицеллы плуроника P123, нагруженные производными бензопорфирина, увеличивали фотодинамический эффект *in vivo* на трансплантатах рабдомиосаркомы M1 по сравнению со свободными фотосенсибилизатором [145]

Мицеллы плуроника F127 и ПЭГ-дистеароил фосфатидилэтаноламина, нагруженные мезо-тетрафенилпорфирином, обладали хорошей биоадгезивными свойствами в модели мышинного кишечника [146]. Преимуществом полимерных мицелл по сравнению с липосомальными и эмульсионными носителями является их стабильность в кровотоке, обеспечивающая высокую биодоступность, а также устойчивость самой лекарственной формы. Другим немаловажным качеством мицелл плуроника P123 является их устойчивость к гидролитической и окислительной или фотоокислительной деградации [136].

Получены гребнеобразные сополимеры 2-гидроксиэтилметакрилата, некоторые звенья которого были модифицированы ковалентным связыванием кремний-фталоцианиновым фотосенсибилизатором, с диэтиленоксидметакрилатом и ПЭО-метакрилатом, чувствительные к температуре и образующие наночастицы выше НКТР [129].

Таким образом, мицеллы полимеров могут быть эффективными контейнерами для доставки фотосенсибилизаторов.

2.3.4 Синглетный кислород

Синглетный кислород — общее название для двух возбужденных состояний молекулярного кислорода, для которых характерна мультиплетность, равная 1 (суммарный спин 0) (Рис. 12, а и б). Молекулярный кислород (Рис. 12в) отличается от большинства молекул наличием триплетного основного состояния, $O_2(X^3\Sigma_g^-)$, с суммарным спином, равным 1. Теория молекулярных орбиталей предсказывает три низколежащих возбуждённых синглетных состояния $O_2(a^1\Delta_g)$, $O_2(a'^1\Delta'_g)$ и $O_2(b^1\Sigma_g^+)$. Эти электронные состояния отличаются только спином и занятостью вырожденных разрыхляющих π -орбиталей. Состояния $O_2(a^1\Delta_g)$ и $O_2(a'^1\Delta'_g)$ — вырождены и имеют энергию перехода в основное состояние 94.29 кДж/моль [147, 148]. Состояние $O_2(b^1\Sigma_g^+)$ (Рис. 12б) — очень короткоживущее и быстро релаксирующее в более низколежащее возбуждённое состояние $O_2(a^1\Delta_g)$, и разница с основным состоянием составляет 157.0 кДж/моль (1.6268 эВ) [147, 148] (Рис. 12а). Поэтому обычно именно $O_2(a^1\Delta_g)$ называют синглетным кислородом. Для него характерно наличие как вакантной орбитали, так и неподеленной электронной пары, что обуславливает чрезвычайно высокую реакционную способность синглетного кислорода в реакциях с самыми различными субстратами [98, 147–150]. Синглетный кислород может принимать участие в сложных органических реакциях, например, в реакциях Дильса-Альдера и еновых реакциях.

Разница энергий между основным состоянием и синглетным кислородом ($O_2(a^1\Delta_g)$) составляет 94.29 кДж/моль (0.9773 эВ на молекулу) и соответствует переходу в близком ИК-диапазоне (около 1270 нм). В изолированной молекуле переход запрещён по правилам отбора: спину, симметрии и по чётности [148, 149]. Поэтому прямое возбуждение кислорода в основном состоянии светом для образования синглетного кислорода крайне маловероятно, хотя и возможно [147]. Как следствие, синглетный кислород в газовой фазе экстремально долгоживущий (период полураспада состояния при нормальных условиях — 72 минуты). Взаимодействия с растворителями, однако, уменьшают время жизни до микросекунд или даже до наносекунд.

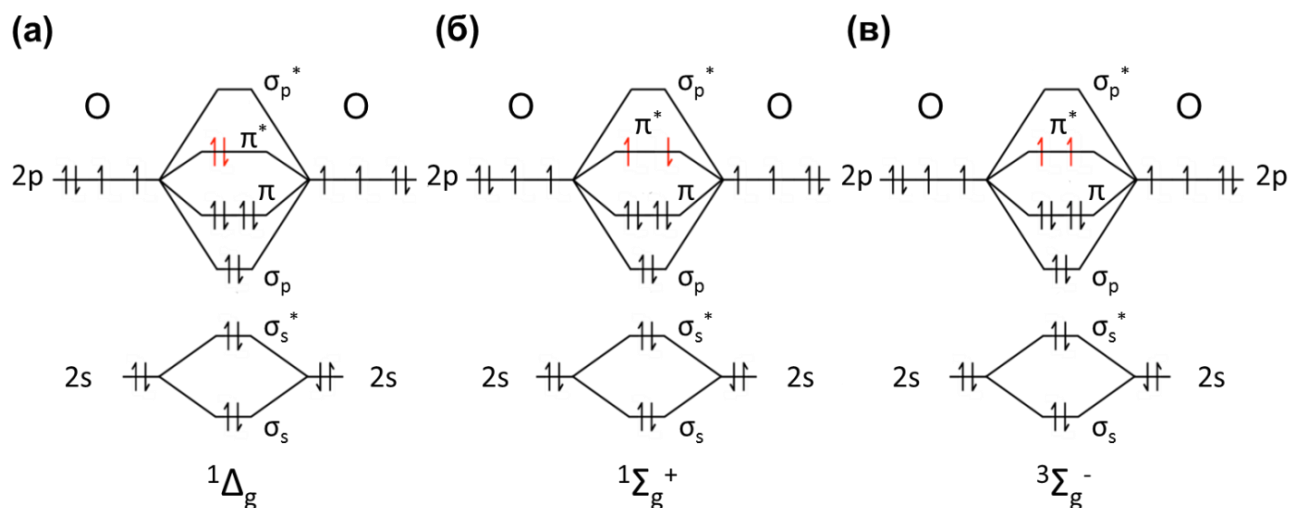


Рис. 12. Строение молекулярных орбиталей (а-б) синглетных возбужденных состояний и (в) триплетного основного состояния молекулярного кислорода.

Помимо фотосенсибилизации некоторыми красителями, синглетный кислород образуется при разложении озона в воде или в реакции гипохлорита с пероксидом водорода.

2.3.5 Детектирование синглетного кислорода

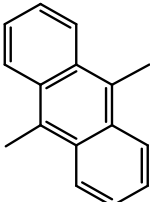
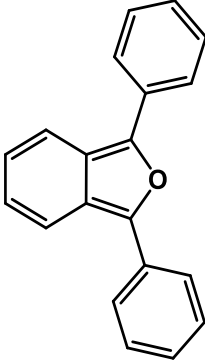
Все основные методы определения синглетного кислорода можно разделить на две категории: 1) прямое измерение фосфоресценции синглетного кислорода и 2) измерение флуоресценции или хемилюминесценции продуктов взаимодействия, соответственно, флуорогенных или хемилюминесцентных зондов с синглетным кислородом.

Синглетный кислород может претерпевать излучательную дезактивацию до основного триплетного состояния — фосфоресценцию. Этот переход является запрещённым с позиций квантовой химии, его вероятность мала, поэтому интенсивность света очень низкая. Более того, энергия перехода лежит в ИК-области: максимум испускания — 1270 нм. Учитывая чрезвычайно высокую реакционную способность синглетного кислорода, время его жизни в биологических системах чрезвычайно мало (20-300 нс, см. главу 2.3.1). По указанным причинам прямое детектирование синглетного кислорода представляет собой крайне сложную задачу. Для измерения интенсивности фосфоресценции синглетного кислорода требуются специальные фотоэлектронные умножители (ФЭУ) с очень большим коэффициентом усиления и, соответственно, чрезвычайно высокой чувствительностью. С развитием технологий в последние несколько десятков лет такие приборы получили большее распространение.

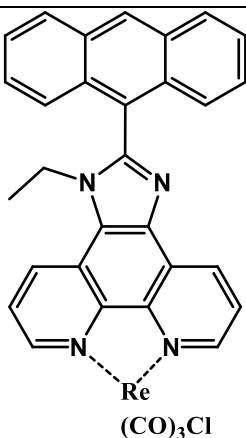
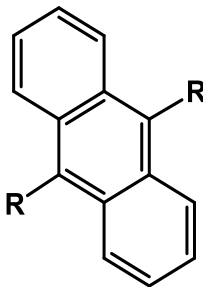
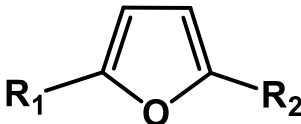
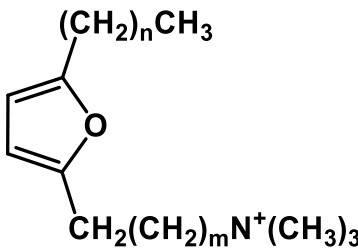
При столкновении двух молекул синглетного кислорода происходит испускание флуоресценции таких димолей с удвоенной энергией перехода, т.е. максимум испускания лежит в видимой области спектра и составляет 634 нм. Образование димолей и измерение флуоресценции возможно только при высоких концентрациях синглетного кислорода в отсутствие его эффективных ловушек и реализуется только в модельных экспериментах и не наблюдается при исследовании биологических систем.

Чрезвычайно высокая реакционная способность синглетного кислорода позволяет определять его в достаточно низких концентрациях с использованием хемилюминесцентных, флуоресцентных, флуорогенных и хромогенных зондов. В настоящей главе в сжатой форме представлено большое разнообразие описанных в литературе подходов к определению синглетного кислорода с помощью химических зондов (Таблица 4). Ниже мы остановимся на механизмах действия и особенностях применения нескольких наиболее часто используемых зондов (Рис. 13). Хемилюминесцентные методы определения синглетного кислорода будут рассмотрены в разделе 2.5.3.

Таблица 4. Молекулярные зонды для определения синглетного кислорода.

№	Название зонда	Хим. структура зонда	Особенности
Флуоресцентные зонды			
1	9,10-диметилантрацен (DMA)		Локализуется в гидрофобной области мембран [151, 152]
2	1,3-дифенилизобензофуран (DPBF)		Также реагирует с $O_2^{\bullet-}$ [151–154]
Флуорогенные зонды			
3	DPAX ($R_1=H, F, Cl$; $R_2=Ph$) 9-[2-(3-карбокси-9,10-дифенил)антрил]-6-гидрокси-3Н-ксантен-3-он		Нечувствительны к пероксиду водорода, NO и супероксиду, проникают в клетки, для использования в кислой среде

4	DMAX ($R_1=H$; $R_2=Me$) 9-[2-(3-карбокси-9,10-диметил)антрил]-6-гидрокси-3Н-ксантен-3-он		необходимы производные с электроноакцепторным и заместителями R_1 . DMAX более чувствителен, быстрее реагирует с синглетным кислородом [151, 152, 155, 156].
5	Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG)		Высокоселективен к 1O_2 [157], [130], продукт окисления является фотосенсибилизатором [158, 159], накапливается в клетках [159–163]
6	Aarhus Sensor Green (ASG)		Ни ASG, ни ASG-EP не проявляют свойств ФС, зонд проникает в клетки [158]
Комплексы переходных металлов			
7	ATTA ($M=Eu$; $R_1=H$; $X_1-X_2 = C=CH_2-CH$)		Стабильны в широком диапазоне pH, большое время затухания флуоресценции (можно использовать в импульсном режиме), водорастворимы, возбуждаются ультрафиолетом, предел обнаружения ~2-11 нМ [151, 164–166]
8	PATA ($M=Tb$; $R_1=H$; $X_1-X_2 = N-CH$)		
9	MTTA ($M=Eu$; $R_1=Me$; $X_1-X_2 = C=CH_2-CH$)		

10	Re(CO) ₃ Cl(aeip)	 Re (CO)₃Cl	Имеет высокий коэффициент экстинкции при 410 нм, предел обнаружения ~5-10 нМ [151, 167]
Хромогенные зонды			
Производные антрацена			
11	Дифенилантрацен (DPA) (R=Ph)		Поглощает при 355 нм [151, 152]
12	Антрацен-9,10-диилдиэтил дисульфат (EAS) (R=CH ₂ CH ₂ -OSO ₃ ⁻)		Водорастворимы, могут взаимодействовать с катионными фотосенсибилизаторам и [151] Подробнее: [168–170]
13	Антрацен -9,10-бисэтансульфоновая кислота (AES) (R=CH ₂ CH ₂ -SO ₃ ⁻)		
14	Антрацен-9,10-дивинилсульфонат (AVS) (R=CH=CH-SO ₃ ⁻)		
15	Бис-9,10-антрацен-(4-триметил-фениламмоний) дихлорид ВРАА (R=p-Ph-N ⁺ (CH ₃) ₃)		Водорастворимые ловушки [151, 169]
16	N,N'-ди-(2,3-дигидроксипропил)-9,10-антрацен-Дипропанамид (DHRA) (R=CH ₂ CH ₂ C(O)NHCH ₂ CH(OH)CH ₂ OH)		
Производные 2,5-диметилфурана			
17	2-(n-(N,N,N-триметил)-n-алкил)-5-алкилфурил бромид/иодид (DFTA) (R ₁ =C ₁₂ H ₂₅ ; R ₂ =C ₄ H ₉ N ⁺ (CH ₃) ₃)		Липофильные, наличие катионной головки улучшает встраивание в липидные бислои [151], [171]
18	2-(n-(N,N,N-триметил)-n-алкил)-5-алкилфурил бромид/иодид (HFDA) (R ₁ =C ₆ H ₁₃ ; R ₂ =C ₁₂ H ₂₄ N ⁺ (CH ₃) ₃)		
19	2-(n-(N,N,N-триметил)-n-алкил)-5-алкилфурил бромид/иодид (MFMA) (R ₁ =CH ₃ ; R ₂ =CH ₂ N ⁺ (CH ₃) ₃)		

2.3.5.1 Флуоресцентные зонды для определения синглетного кислорода

9,10-диметилантрацен (1) селективно реагирует с синглетным кислородом, образуя нефлуоресцентный 9,10-эндопероксид с высокой константой скорости реакции (2×10^7 – $9 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) во многих органических растворителях и в водном окружении. При распределении в клеточных мембранах не имеет предпочтительной локализации, по сравнению с 9-антраценпропионовой кислотой, которая локализуется на границе раздела фаз липид/вода [152].

Другим гидрофобным зондом является 1,3-дифенилизобензофуран (2), однако он также реагирует с супероксидом, что ограничивает его использование для определения синглетного кислорода или супероксида в системах, в которых присутствует обе АФК, но делает возможным определять любую из этих АФК в отсутствие другой [151].

2.3.5.2 Флуорогенные зонды для определения синглетного кислорода

Некоторые флуорогенные зонды построены из двух фрагментов, один из которых является флуорофором, а второй — его тушителем. Так устроены ловушки группы DPAX (3), сходные с флуоресцеином и представляющие собой производное дифенилантрацена, ковалентно связанное с ксантоновым фрагментом. Образование 9,10-эндопероксида в антраценовой части приводит к нарушению цепи сопряжения электронов и «выключает» тушение, тем самым значительно увеличивая интенсивность флуоресценции зонда. Введение атомов фтора и хлора в положения 2 и 7 ксантена понижает рКа фенольных групп, тем самым расширяя диапазон pH, в котором ксантоновый фрагмент находится в анионной форме, проявляющей флуоресцентные свойства. Эти зонды не чувствительны к пероксиду водорода, NO и супероксиду. Для определения синглетного кислорода в биологических образцах было получено диацетилованное по фенольным группам производное хлорзамещенного DPAX, однако эффективность проникновения в клетки при этом не увеличилась по сравнению с неацелированным зондом [151, 152, 155].

Аналогичным образом устроены зонды DMAX (4) на основе диметилантрацена, которые обладают рядом преимуществ по сравнению с дифенилзамещенным производным, описанным выше. Квантовый выход флуоресценции эндопероксида в 1.5 раза выше, чем у соответствующего эндопероксида DPAX-EP. Ловушка нечувствительна к пероксиду, супероксиду и NO., проникает в клетки. DMAX значительно быстрее реагирует с синглетным кислородом, чем DPAX, а также проявляет в 53 раза большую чувствительность. [151, 152, 156].

Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG, 5) является коммерчески доступным флуорогенным зондом. Согласно данным компании-производителя Invitrogen, по сравнению с другими флуоресцентными и хемилюминесцентными реагентами для определения синглетного кислорода SOSG отличается высокой селективностью по отношению к синглетному кислороду и не проявляет заметной активности в отношении других АФК, включая гидроксильный радикал, супероксидный анион-радикал и оксид азота [157].

Молекула SOSG состоит из фрагментов 2'-хлорфлуоресцеина и 10-метилатрацена (Рис. 13а). Флуоресценция флуоресцеинового фрагмента в данной молекуле значительно снижена вследствие внутримолекулярного переноса электрона с антраценового фрагмента на флуоресцеиновый. При реакции зонда с синглетным кислородом образуется продукт окисления антрацена, эндопероксид SOSG-EP, сопряжение нарушается, и флуоресценция флуоресцеинового фрагмента сильно возрастает (Рис. 13б).

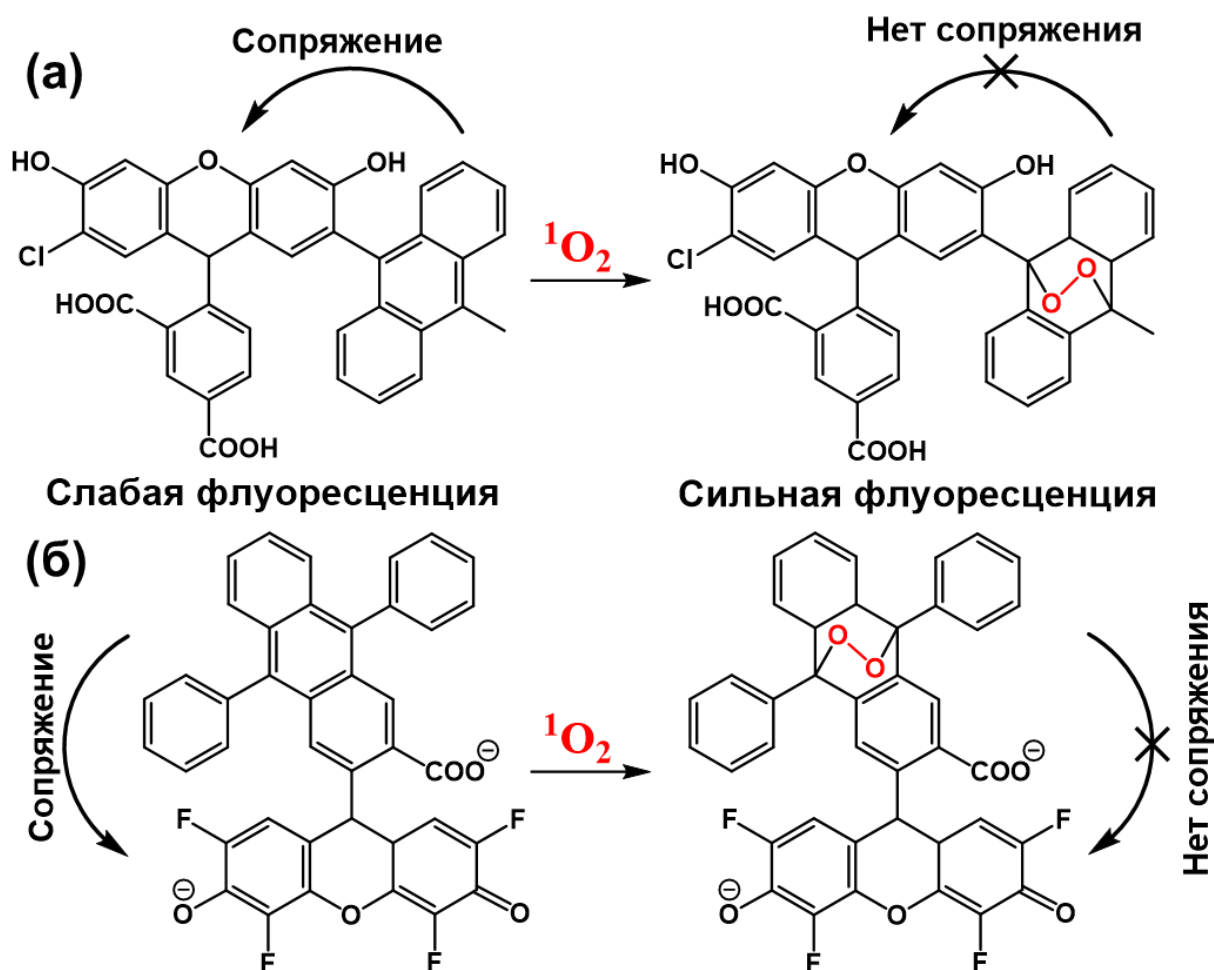


Рис. 13. Химическое строение и схемы действия флуорогенных зондов для детектирования синглетного кислорода: 1) Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG) и 2) Aarhus Sensor Green (ASG), которые приобретают способность флуоресцировать при окислении синглетным кислородом.

Восстановленная форма обладает слабой синей флуоресценцией с максимумами возбуждения 372 и 393 нм и полосой испускания с максимумами 395 и 416 нм. Продукт окисления синглетным кислородом характеризуется зеленой флуоресценцией, близкой испусканию флуоресцеина (полосы возбуждения/испускания 504/525 нм). SOSG деградирует со временем, а также становится флуоресцентным в щелочной среде в отсутствие синглетного кислорода. Тем не менее, при правильной постановке эксперимента с образцами сравнения интенсивность флуоресценции коррелирует с концентрацией синглетного кислорода без существенных помех со стороны других АФК [157, 172].

В описании зонда SOSG, представленном производителем [157], указано, что зонд не проникает в клетки, однако в литературе было показано, что в отсутствие сыворотки он накапливается в клетках [159] и может окисляться синглетным кислородом, продуцированным различными фотосенсибилизаторами [160–163].

Основным недостатком SOSG, ограничивающим его применение, является то, что эндопероксид SOSG-EP проявляет свойства фотосенсибилизатора, т.к. дихлорфлуоресцеиновый фрагмент имеет квантовый выход образования синглетного кислорода 0.2 [158, 159]. Таким образом, примесь окисленной формы в препарате SOSG при облучении светом может приводить к окислению зонда и наблюдению ложного положительного сигнала в отсутствие других источников синглетного кислорода или в ситуации, когда измеряемые количества $^1\text{O}_2$ малы. Использование SOSG предпочтительно в условиях, когда фотосенсибилизатор облучают светом в диапазоне длин волн, где не поглощает SOSG и SOSG-EP [159].

Aarhus Sensor Green (ASG, 6) — флуоресцентный зонд, разработанный группой профессора Ogilby (Рис. 13б), при создании которого авторы стремились получить молекулу, лишенную недостатков, характерных для SOSG. Принципиальным преимуществом ASG по сравнению с SOSG заключается в том, что ни ASG, ни продукт его окисления синглетным кислородом, внутримолекулярный эндопероксид ASG-EP, не проявляют свойств фотосенсибилизатора, т.е. под действием облучения светом, в том числе дневным комнатным освещением, эти молекулы не вызывают автоокисления. Авторы ASG показали, что зонд проникает в клетки, и его сигнал коррелирует с внутриклеточным содержанием синглетного кислорода [158].

Принципиально иной механизм лежит в основе определения синглетного кислорода с помощью комплексов редкоземельных металлов. Такие зонды отличаются продолжительным временем затухания флуоресценции, большим стоксовым сдвигом и узкой полосой испускания. Эффективны только комплексы лантанидов, для эндопероксидов которых характерны времена затухания флуоресценции порядка микросекунд. В режиме анализа времени затухания использование таких зондов позволяет избавиться от аутофлуоресценции биологических образцов. Для комплекса **7** квантовый выход флуоресценции эндопероксида в 17 раз выше, чем исходного зонда, т.к. образование эндопероксида способствует повышению заселенности возбужденного состояния катиона Eu^{3+} . Это позволило добиться предела обнаружения синглетного кислорода, равного 2.8 нМ [151, 164]. Комплекс **8** хорошо растворим в воде, действует в широком диапазоне pH и характеризуется очень высоким временем затухания флуоресценции (2.76 мс) [151, 165]. Константа скорости реакции комплекса **9** с синглетным кислородом чрезвычайно высока — 10^{10} л/моль·с [151, 166]. Недостатком этих зондов является необходимость УФ-облучения для возбуждения, что может вызывать побочные фотохимические реакции и биологические эффекты [151].

Для преодоления этого ограничения был получен нефлуоресцирующий комплекс **10**, который переходит в ярко флуоресцирующий эндопероксид при реакции синглетного кислорода с антраценовым фрагментом. Предел обнаружения синглетного кислорода для этого зонда сопоставимым со значениями для вышеупомянутых комплексов **7-9** [151, 167].

2.3.5.3 Хромогенные ловушки

Дифенилантрацен (DPA, **11**) является наиболее известным примером хромогенных ловушек. Наличие фенильных заместителей уменьшает константу скорости реакции с синглетным кислородом на 2-3 порядка по сравнению с диметилантраценом. Положение максимума полосы поглощения (355 нм) и нерастворимость зонда в воде ограничивает его использование. Для обеспечения растворимости зонда в воде получен ряд других 9,10-замещенных производных антрацена, содержащие сульфатные (**12**), сульфонатные (**13**, **14**), аммониевые (**15**), гидроксильные (**16**) и другие группы. Ограничение анионных ловушек заключается в возможном взаимодействии с катионными фотосенсибилизаторами, поэтому катионные и неионогенные зонды более

предпочтительны. В настоящее время такие ловушки используются только в модельных бесклеточных экспериментах, где не требуется высокая чувствительность [151, 152].

Другим типом липофильных ловушек являются производные 2,5-диметилфурана (17-19), которые обладают рядом преимуществ по сравнению с DPA: у них менее выражен эффект физического тушения, а среда в меньшей степени влияет на реакционную способность. Включение таких зондов в липидные бислои зависит от наличия функциональных групп в заместителях, однако все они являются липофильными [151].

2.3.6 Заключение главы 2.3

Анализ литературы показывает, что фотодинамическая терапия является чрезвычайно привлекательным способом лечения онкологических заболеваний, который основан на одновременном воздействии на опухоли света, кислорода и фотосенсибилизатора. Поглощение света фотосенсибилизатором переводит его в долгоживущее возбужденное состояние, которое может передавать избыточную энергию кислороду, который может в результате этого переходить в активный формы: радикальные супероксид-анион или гидроксил (фотосенсибилизаторы I типа) или синглетный кислород, имеющий неспаренную и вакантную электронные орбитали на внешней электронной оболочке фотосенсибилизаторы II типа). Синглетный кислород является сильнейшим окислителем, способным разрушать клеточные компоненты. Анализ всего разнообразия методов детекции синглетного кислорода показал, что в настоящее время наиболее селективными, и в тоже время коммерчески доступными являются флуорогенные зонды, основанные на производных антрацена. Один из таких зондов, Singlet Oxygen Sensor Green (SOSG), использован в настоящей работе для изучения генерации синглетного кислорода в ходе протекания хемилюминесцентной реакции.

Существенный недостаток фотодинамической терапии связан с низкой прозрачностью тканей для внешнего источника света. В настоящей работе делается попытка преодолеть этот недостаток за счет использования хемилюминесцентной реакции в качестве источника возбуждения фотосенсибилизатора.

2.4 АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА И ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

2.4.1 Активные формы кислорода

2.4.1.1 Физико-химические аспекты

Кислород является важнейшим условием существования современных форм жизни на Земле. Будучи сильным окислителем, кислород вступает в окислительные реакции со многими биологическими молекулами, обеспечивая клетку энергией. Большинство реакций молекулярного кислорода довольно медленные, однако катализ ферментами позволяет высвободить большое количество энергии, достаточное для поддержания жизни. Иными словами, реакции молекулярного кислорода благоприятны с точки зрения термодинамики, но кинетически заторможены. Вызвано это тем, что молекулярный кислород содержит неспаренные электроны, т.е. находится в триплетном состоянии, а мультиплетность большинства органических молекул равна единице. Поэтому большинство окислительных реакций требуют инверсии спина, что запрещено правилами квантовой механики. Электронная структура молекулярного кислорода способствует реакциям, сопровождающимся переносом одного электрона. Именно вследствие этого в процессе восстановления кислорода до воды, происходящего при клеточном дыхании, образуются продукты частичного восстановления кислорода – супероксид анион-радикал, перекись водорода и гидроксил-радикал [173, 174]. Эти частицы имеют большой восстановительный потенциал (Таблица 5), поэтому они могут легко окислять многие биологические молекулы. Такие частицы принято называть активными формами кислорода (АФК).

Таблица 5. Восстановительные потенциалы некоторых активных форм кислорода [174].

АФК	E, В
$O_2^{\bullet-}$	0.94
H_2O_2	1.77
$HO^{\bullet}$	2.31
$RS^{\bullet}$ (цистеин)	0.92
$NO^{\bullet}$	-0.8
$ClO^{\bullet-}$	1.28
$ONOO^{\bullet-}$	1.4
$CO_3^{\bullet-}$	1.78

Большинство АФК это радикальные частицы, т.е. ионы или молекулы, имеющие неспаренный электрон во внешней электронной оболочке, что обуславливает их высокую реакционную способность. Другая группа АФК представляет собой молекулы, не являющиеся радикалами. К числу свободных радикалов относятся следующие молекулы: супероксидный анион-радикал $O_2^{\bullet-}$ (супероксид), гидроксильный радикал $HO^{\bullet}$, оксид азота $NO^{\bullet}$, органические радикалы $R^{\bullet}$, пероксил-радикал $ROO^{\bullet}$, алкоксил-радикал $RO^{\bullet}$, тиил-радикал $RS^{\bullet}$, сульфонил-радикал $ROS^{\bullet}$, тиил-пероксильный радикал $RSOO^{\bullet}$, дисульфиды $RSSR$ и др. Нерадикальные АФК включают H_2O_2 , синглетный кислород 1O_2 , озон O_3 , органические гидропероксиды $ROOH$, гипохлорит ClO^- , пероксинитритный анион $ONOO^-$, нитрозопероксикарбонатный анион $O=NOOCO_2^-$, нитрокарбонат-анион $O_2NOCO_2^-$, димер оксида азота N_2O_2 , катион нитрония и высокоактивные карбонильные производные липидов и углеводов. Наибольшую роль в биохимии клетки играют супероксид, пероксид водорода и гидроксильный радикал [175, 176].

Основные активные формы кислорода могут превращаться друг в друга, принимая или отдавая электроны (Рис. 14). Они отличаются между собой по электронному строению, что обуславливает их различную реакционную способность, прежде всего в отношении реакций окисления.

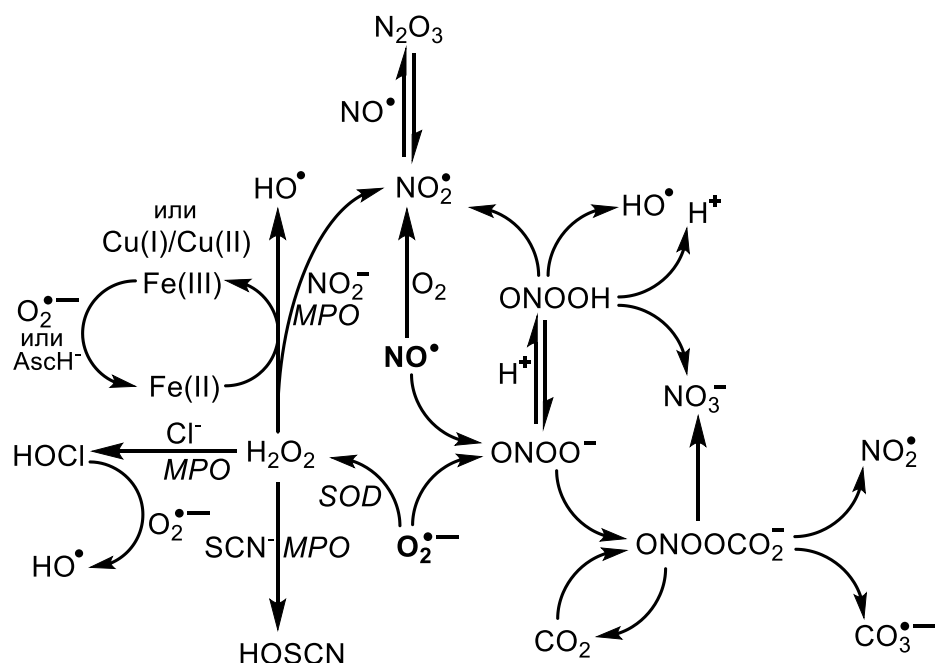


Рис. 14. Связь различных АФК. МРО — миелопероксидаза, SOD — супероксиддисмутаза, $AsCH_2$ — аскорбиновая кислота [177].

Перекись водорода, продукт полувосстановления кислорода, не является свободным радикалом, поэтому она сравнительно малоактивна среди различных АФК.

По этой причине основная часть АФК представлена именно пероксидом водорода, тогда как более активные частицы расходятся в многочисленных реакциях.

Раньше считалось, что в биологических системах активные формы кислорода выполняют только одну функцию — наносят вред, повреждая молекулы нуклеиновых кислот, жирных кислот и ферментов, что приводит к старению и различным заболеваниям, в том числе раку, сердечнососудистым болезням, нейродегенеративным заболеваниям (болезни Паркинсона и Альцгеймера) и многим другим. В настоящее время существует большой массив результатов, указывающих на более сложную роль АФК [178–180].

2.4.1.2 Биохимические механизмы образования активных форм кислорода

Окислительно-восстановительный гомеостаз в клетках подразумевает контролируемый синтез АФК и системы нейтрализации активных молекул.

Наиболее важное значение в продукции АФК имеет каскад реакций окислительного фосфорилирования, происходящий в митохондриях. В процессе митохондриального дыхания возникает поток электронов по цепи ферментов, локализованных в межмембранном пространстве митохондрий. Это поток сопровождается формированием градиента рН на внутренней мембране митохондрий, который используется как источник энергии для синтеза АТФ. Под действием ферментных комплексов I–IV электроны от восстановителей переносятся на молекулярный кислород. Последний участник цепи переноса электронов – цитохром с оксидаза (комплекс IV) обеспечивает полное восстановление кислорода до воды без образования радикалов (Рис. 15). Однако некоторые электроны, транспортирующиеся по цепи переноса, могут уходить на растворенный в окружающей среде кислород, образуя АФК (в первую очередь, супероксид). Чаще всего это происходит при взаимодействии кислорода с восстановленными формами комплексов I и III [181].

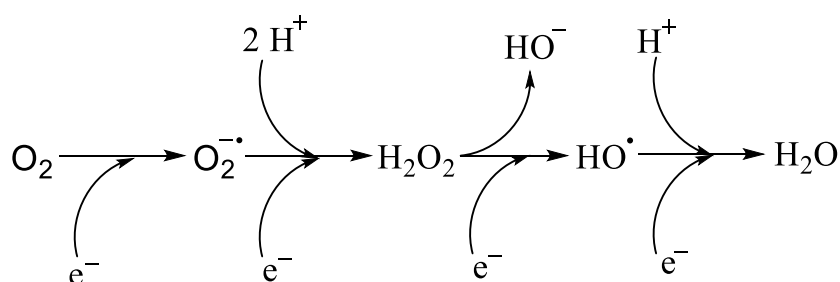


Рис. 15. Схема восстановления молекулярного кислорода до воды путём последовательного присоединения электронов с образованием промежуточных активных форм кислорода.

Помимо электрон-транспортной цепи митохондрий, известен целый ряд биохимических систем, продуцирующих АФК (Рис. 16).

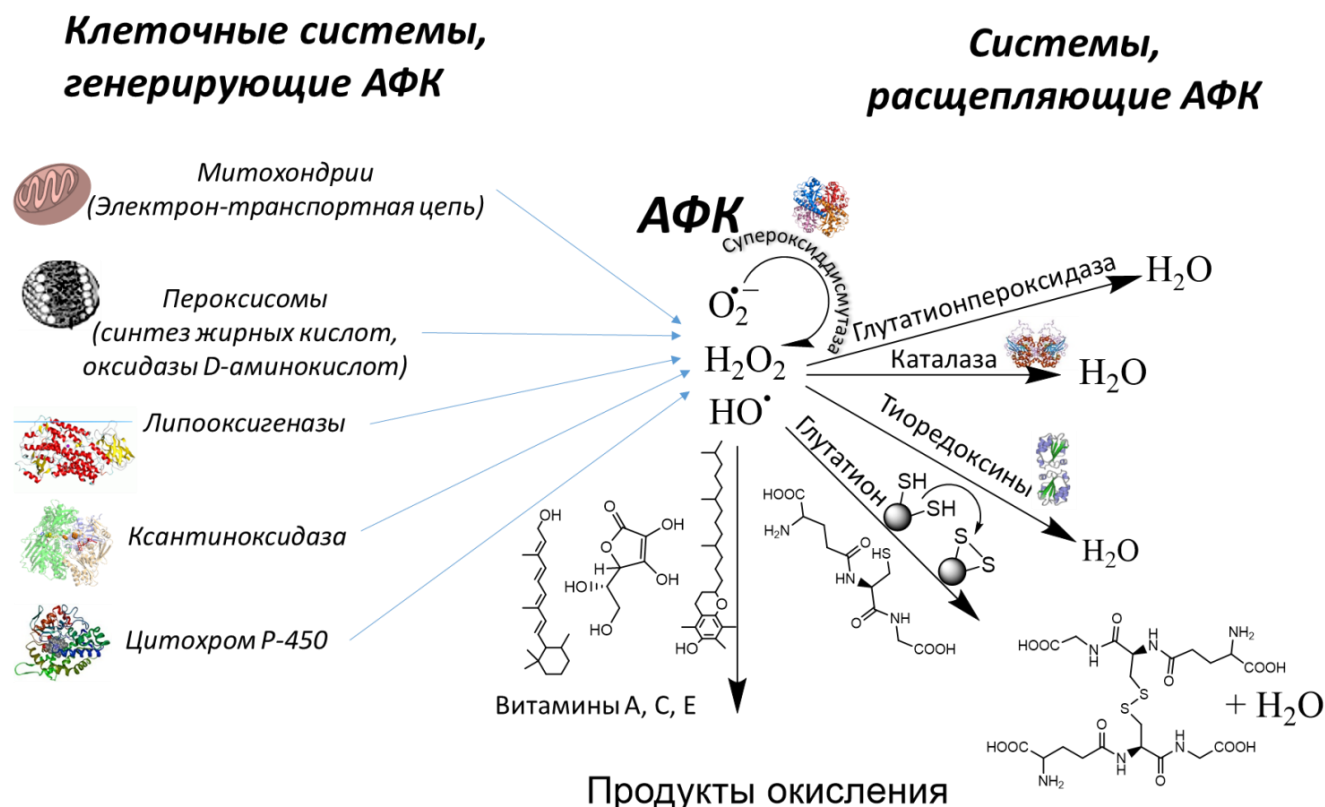


Рис. 16. Биохимические механизмы синтеза и дезактивации АФК в клетках.

Эндогенными источниками являются пероксисомы, липооксигеназы, NADPH-оксидазы, цитохром P450. Также образование АФК могут вызывать многочисленные экзогенные факторы, например, ультрафиолетовое или ионизирующее излучение, магнитные поля [182], действие химиотерапевтических препаратов, таких как доксорубин [183, 184], таксол [185], цисплатин [186], воспалительные цитокины, различные токсины.

Для поддержания концентрации АФК в норме в клетках присутствует ряд защитных систем. Ключевыми ферментами являются супероксиддисмутаза (SOD), каталаза, глутатион-пероксидаза, глутатион-редуктаза. Неферментативную защиту от АФК обеспечивают глутатион, белки тиоредоксины, витамины А, С, Е и другие молекулы. Суммарное действие всех указанных систем поддерживает окислительно-восстановительный баланс клеток. Если все системы функционируют правильно, в клетках происходит нормальный метаболизм и рост. При недостаточном количестве АФК затруднено деление клеток и ослаблена защита от инфекций. Повышенное содержание АФК приводит как к случайному окислительному повреждению различных клеточных

молекул и структур, так и к регуляции метаболизма через специфические сигнальные пути. Возможными последствиями этих процессов являются старение, различные заболевания и смерть клеток.

2.4.1.3 Биохимические системы нейтрализации АФК

Рассмотрим подробнее действие систем нейтрализации АФК. Одним из ключевых элементов защиты является фермент SOD, конвертирующий супероксидный анион-радикал в менее активный пероксид водорода (Рис. 16). SOD существует в нескольких формах в зависимости от переходного металла-кофактора активного центра фермента. Наиболее важные из них содержат ионы меди и цинка (Cu/ZnSOD) или ионы марганца (MnSOD). Cu/ZnSOD функционирует в цитозоле, а MnSOD — в митохондриях. Действием SOD и сравнительно высокой стабильностью пероксида водорода объясняется то, что содержание H_2O_2 является важнейшим параметром живой клетки.

Другим важнейшим ферментом является каталаза (Рис. 16), разлагающая H_2O_2 на воду и молекулярный кислород, а также окисляющая в присутствии пероксида водорода низкомолекулярные спирты и нитриты. Каталаза является тетрамером, каждая субъединица которого содержит в качестве простетической группы окисленный гем, т.е. в сумме — 4 гема на одну молекулу белка. Каталаза обычно локализуется в цитозоле и в отдельных органеллах — пероксисомах, однако H_2O_2 , будучи незаряженной молекулой при физиологических условиях, сравнительно легко диффундирует через мембраны и дезактивируется каталазой [176].

Следует отметить, что некоторые клеточные мембраны обладают относительно низкой проницаемостью для H_2O_2 . Усилению трансмембранного транспорта пероксида водорода способствует соответствующее изменение состава мембраны, а также наличие белковых каналов — аквапоринов [176, 187].

Пероксиредоксины (тиоредоксин-пероксидазы) — распространённое семейство антиоксидантных ферментов, восстанавливающих пероксид водорода, органические гидропероксиды и пероксинитритный анион. Связанная система нейтрализации АФК состоит из тиоредоксина и тиоредоксин-редуктазы. В активном центре тиоредоксина содержится два сближенных цистеина, которые могут окисляться с образованием дисульфидной связи и возвращаться в активную (восстановленную) форму под действием тиоредоксин-редуктазы, использующей NADPH в качестве донора электронов.

Тиоредоксин поддерживает тиольные группы других белков в восстановленной форме (Рис. 16).

Среди молекул антиоксидантов ключевую роль играет глутатион, трипептид глутамата, цистеина и глицина, в котором первая пептидная связь образована γ -карбоксильной группой глутамата (Рис. 16). В клетках животных он содержится в концентрации около 5 мМ. Глутатион участвует в тиол-дисульфидном обмене, восстанавливая дисульфидные связи и одновременно окисляясь до дисульфида глутатиона. Восстановленная форма образуется за счёт действия фермента глутатионредуктазы, который использует NADPH как донор электронов. Соотношение между окисленной и восстановленной формами глутатиона часто используют как меру окислительно-восстановительного баланса клетки. Глутатионпероксидаза катализирует разложение пероксида водорода и органических гидропероксидов. Глутатион-S-трансферазы — группа ферментов, участвующих в дезактивации токсичных соединений за счёт катализа реакции глутатиона с эндо- и экзогенными электрофильными соединениями [176].

2.4.1.4 Роль АФК в клеточном метаболизме

Источники АФК тесно связаны с теми биохимическими функциями, которые эти АФК выполняют.

Пероксисомы являются другим важнейшим источником АФК. В этих респираторных органеллах супероксидный анион-радикал и пероксид водорода образуются в процессе окисления жирных кислот и D-аминокислот результате действия ацетил-кофермент А оксидазы, уратоксидазы, ксантинооксидазы и ряда других ферментов в матриксе и мембранах пероксисом [176], [188]. Скорость образования пероксида водорода в нейтрофилах достигает $1.5 \text{ нмоль}/10^4 \text{ клеток/ч}$ [189].

Роль АФК, в первую очередь пероксида водорода, связана с действием иммунной системы против инфекций. Функционирование нейтрофилов при воспалительном процессе включает в себя активную выработку H_2O_2 (концентрация достигает миллимолей в литре). Это происходит за счёт активности NADPH-оксидазного комплекса (Nox) в отдельных органеллах — фагосомах [187].

АФК в субмикромольных концентрациях ведут себя как сигнальные молекулы для внутриклеточного и межклеточного обмена химической информацией. В нефагоцитарных клетках существуют гомологи белков нейтрофилов, которые являются

источником пероксида водорода. Генерирование H_2O_2 происходит при стимулировании клеток различными факторами роста и цитокинами, включая фактор роста тромбоцитов PDGF, эпидермальный фактор роста EGF, инсулин, фактор некроза опухолей TNF α , интерлейкин IL-1 [179]. Однако механизм активации Nox при взаимодействии этих молекул с рецепторами остаётся неясным. H_2O_2 является ключевым участником системы окислительно-восстановительной системы передачи сигнала. Роль пероксида водорода заключается в регуляции активности сигнальных белков. К биологическим редокс-реакциям с участием H_2O_2 относится окисление цистеиновых остатков, которые связаны с активностью этих ферментов. Например, фосфорилирование остатков тирозина в белках определяется активностями противоположно действующих протеинтирозинфосфатаз и протеинтирозинкиназ. Семейство протеинтирозинфосфатаз в активном центре содержит последовательность аминокислот Cys-X-X-X-X-Arg. Из-за действия аргинина тиольная группа цистеина имеет пониженное значение рКа и существует в анионной форме, которая чрезвычайно подвержена окислению пероксидом водорода. Окисление цистеина приводит к дезактивации протеинтирозинфосфатазы и может быть обращено клеточными тиолами, что было показано на клетках, стимулированных PDGF, EGF, инсулином, лигандом В-клеточного рецептора и другими молекулами. Доказано, что окислительная дезактивация этих фосфатаз и повышенный уровень фосфорилирования тирозина в ключевых белках зависят от интенсивности образования H_2O_2 . Также пероксид водорода способствует фосфорилированию тирозина, активируя протеинтирозинкиназы. Например, при присоединении клеток к внеклеточному матриксу и происходящему вследствие этого образованию H_2O_2 тирозинкиназа Src окисляется по двум остаткам цистеина и таким образом активируется. Более того, обработка клеток, экспрессирующих онкогенную форму Src (v-Src) или его мутантную форму по остатку цистеина активного центра, уменьшает способность v-Src вызывать опухолевую трансформацию клеток. Редокс-зависимая активация Src происходит одновременно с дефосфорилированием С-концевого тирозина — модификацией, необходимой для активации Src [176, 187].

Электронное строение, в первую очередь наличие неспаренных электронов, обуславливает высокую активность АФК в реакциях окисления. Следствием этого является способность многих активных форм кислорода вступать в хемилюминесцентные реакции, наиболее важные из которых рассмотрены в главе 2.5.

2.4.2 Окислительный стресс в раковых клетках

Окислительным стрессом называют состояние клеток, сопровождающееся повышенной стационарной концентрацией АФК по сравнению с нормальными тканями вследствие нарушения баланса между процессами образования и нейтрализации АФК. Причины окислительного стресса могут быть как внешними, например, ионизирующее излучение или токсическое действие химических соединений, так и внутренними, когда происходит нарушение метаболических процессов при различных заболеваниях.

Рак принадлежит к числу многочисленных заболеваний, для которых характерно состояние окислительного стресса. Если раньше различные изменения в ДНК считали безоговорочным источником возникновения рака, то современная концепция канцерогенеза наравне с этим фактором рассматривает и другой — изменения в метаболизме кислорода, причём оба фактора взаимно усиливают друг друга (Рис. 17). Раковые клетки поддерживают иной окислительно-восстановительный баланс, активно продуцируя не только АФК, но и антиоксидантные белки для нейтрализации АФК.

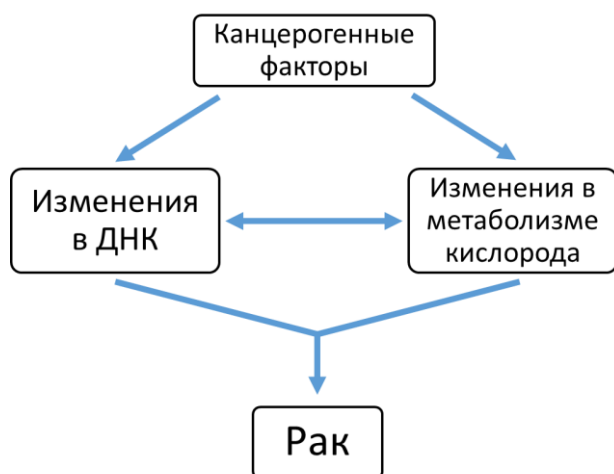


Рис. 17. Современная концепция канцерогенеза [192].

Скорость образования пероксида водорода в нормальных и опухолевых клетках различных типов сильно отличаются. Так, в нейтрофилах, обработанных стимулятором воспаления (форбол-миристат-ацетат), эта скорость достигает величины около $1.5 \text{ нмоль}/10^4 \text{ клеток/ч}$ [189] (Таблица 6). По данным другой работы в отсутствие воспаления нейтрофилы продуцируют пероксид водорода в небольших количествах (4 нмоль пероксида за час в расчете на 10 мкг ДНК), но после обработки

протеогликаном зимозаном или форболовым эфиром продуцируют соответственно 35 и 80 нмоль пероксида за час в расчете на 10 мкг ДНК. Во многих раковых опухолях наблюдается сравнимая с ней скорость накопления пероксида [179]. В то же время в большинстве нормальных тканей скорость образования пероксида намного меньше (Таблица 6).

Таблица 6. Содержание пероксида водорода в различных клеточных культурах и тканях.

Клеточная линия	Содержание/скорость образования пероксида водорода	Метод определения
Полиморфно-ядерные нейтрофилы, стимулированные форболовым эфиром	1.5±0.4 нмоль/10 ⁴ клеток/ч	Флуоресценция скополетина в присутствии азиды натрия [189].
Меланома человека SK-Mel 28	0.5±0.2 нмоль/10 ⁴ клеток/ч	Флуоресценция скополетина в присутствии азиды натрия [189].
Человеческая нейробластома Lan-1	0.3±0.14 нмоль/10 ⁴ клеток/ч	Флуоресценция скополетина в присутствии азиды натрия [189].
Карцинома поджелудочной железы человека ASPC 1	0.35±0.15 нмоль/10 ⁴ клеток/ч	Флуоресценция скополетина в присутствии азиды натрия [189].
Карцинома прямой кишки человека HT 29	0.05±0.01 нмоль/10 ⁴ клеток/ч	Флуоресценция скополетина в присутствии азиды натрия [189].
Карцинома прямой кишки человека HCT 15	0.2±0.05 нмоль/10 ⁴ клеток/ч	Флуоресценция скополетина в присутствии азиды натрия [189].
Карцинома поджелудочной железы человека САМА-I	0.1±0.01 нмоль/10 ⁴ клеток/ч	Флуоресценция скополетина в присутствии азиды натрия [189].
Карцинома яичников человека SK-Ov-3	0.4±0.03 нмоль/10 ⁴ клеток/ч	Флуоресценция скополетина в присутствии азиды натрия [189].
Аденокарцинома легких	0.235±0.131 μM/1.25 мг ткани	Окисление гомованилиновой кислоты [190]
Мелкоклеточный рак легких	0.233±0.108 μM/1.25 мг ткани	Окисление гомованилиновой кислоты [190]
Немелкоклеточный рак легкого	0.11±0.06 μM/1.25 мг ткани	Окисление гомованилиновой кислоты [190]
Плоскоклеточный рак легкого	0.193±0.167 μM/1.25 мг ткани	Окисление гомованилиновой кислоты [190]
Легочная паренхима (норма)	0.04±0.02 μM/1.25 мг ткани	Окисление гомованилиновой кислоты [190]
Мышинные макрофаги из костного мозга в суспензии	0.045±0.03 нмоль/10 мкг ДНК/час	Окисление гомованилиновой кислоты [191]
Мышинные макрофаги из костного мозга в суспензии, обработанные зимозаном	1.12±0.41 нмоль/10 мкг ДНК/час	Окисление гомованилиновой кислоты [191]
Нормальные мышинные макрофаги из костного	<0.1 нмоль/10 мкг ДНК/час	Окисление гомованилиновой кислоты [191]

мозга прикрепленные к субстрату		
Перитонеальные мышечные макрофаги, прикрепленные к субстрату и обработанные зимозаном	3.57 ± 0.95 нмоль/10 мкг ДНК/час	Окисление гомованилиновой кислоты [191]
Перитонеальные мышечные макрофаги, прикрепленные к субстрату и обработанные форболовым эфиром	0.93 ± 0.43 нмоль/10 мкг ДНК/час	Окисление гомованилиновой кислоты [191]
Человеческие нейтрофилы	4.08 ± 4.2 нмоль/10 мкг ДНК/час	Окисление гомованилиновой кислоты [191]
Человеческие нейтрофилы, обработанные зимозаном	35 ± 12 нмоль/10 мкг ДНК/час	Окисление гомованилиновой кислоты [191]
Человеческие нейтрофилы, обработанные форболовым эфиром	80.2 ± 22 нмоль/10 мкг ДНК/час	Окисление гомованилиновой кислоты [191]

Повышенная стационарная концентрация АФК, по всей видимости, является необходимой для функционирования раковых клеток [192, 193]. Скорость образования пероксида водорода в раковых клетках, например, в случае меланомы или рака яичника достигает 0.5 нмоль/ 10^4 клеток/ч, чуть меньше для клеток нейробластомы и рака кишечника. Эти значения примерно в 3 раза меньше, чем при окислительном всплеске у нейтрофилов, но тем не менее они весьма высоки [189].

Метаболизм раковых клеток значительно изменён: для него характерно повышение интенсивности гликолиза и пентозофосфатного цикла при одновременном частичном подавлении клеточного дыхания. Такой сдвиг в метаболизме позволяет использовать продукты интенсивно протекающих процессов для синтеза жиров, холестерина, стероидных гормонов и др., что является необходимым условием при высокой скорости деления клеток [194, 195].

Гликолиз не может быть продуктивен при высоком содержании кислорода в клетках из-за эффекта Варбурга, согласно которому, кислород является ингибитором гликолиза [196]. Ингибирование гликолиза осуществляется не напрямую, а опосредовано: кислород обеспечивает окислительное фосфорилирование с образованием АТФ, восстанавливаясь до молекул воды, при этом АТФ является аллостерическим ингибитором фосфофруктокиназы, ключевого фермента в регуляции гликолиза. Таким образом, раковые клетки вынуждены препятствовать протеканию окислительного фосфорилирования, что происходит за счет преобразования молекулярного кислорода в

супероксид-радикал и пероксид водорода [192]. Образование повышенного количества АФК в клетках приводит к активации цитохрома P450, который в свою очередь активирует гены, приводящие к опухолевой трансформации. Кроме того, H_2O_2 напрямую вызывает изменения в ДНК, а также активирует фактор HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor-1), играющий ключевую роль в канцерогенезе. HIF-1 подавляет окислительное фосфорилирование и активирует гликолиз [197].

Помимо увеличенной интенсивности метаболизма, источниками АФК в раковых клетках являются разнообразные дефекты митохондрий и электрон-транспортной цепи, активность пероксисом, повышенная интенсивность передачи химических сигналов, увеличенная активность оксидаз, циклооксигеназ, липооксигеназ и тимидинфосфорилазы [176, 195].

Раковые клетки самого разного происхождения содержат изменённые хромосомы. Изменения в онкогенах усиливают синтез белков, стимулирующих пролиферацию клеток, мутации в генах белков-супрессоров опухолевого роста приводят к утрате белков, ограничивающих клеточное деление и индуцирующих апоптоз. Молекулярный анализ опухолей за последние несколько десятков лет обнаружил, что генетические изменения в раковых клетках гораздо более многочисленны, чем полагали ранее. Высокая генетическая изменчивость опухолей является серьёзным препятствием для реализации генной терапии. Персональная медицина остаётся очень дорогостоящей и трудоёмкой. Однако помимо генетических изменений, которые индивидуальны для каждой опухоли, всем опухолям необходим измененный метаболизм кислорода, приводящий к окислительному стрессу. Это особенность является универсальной для опухолей различного происхождения, поэтому она может стать мишенью для противораковых препаратов нового поколения [192]. Одним из возможных подходов, использующих повышенную концентрацию пероксида водорода в раковых клетках, может быть прооксидантная терапия. Несмотря на высокое содержание АФК, раковые клетки максимально используют системы их нейтрализации, что приводит к сенсibilизации опухолей к дополнительному увеличению концентрации АФК [193, 195]. Более того, этот механизм является одной из составляющих действия некоторых противоопухолевых препаратов, например, паклитаксель и доксорубин.

2.4.3 Определение активных форм кислорода в биологических системах

Особенности метаболизма кислорода в аэробных организмах приводят к появлению активных форм кислорода – супероксид анион-радикала, гидроксил-радикала, пероксида водорода и др. Преобладающей АФК является пероксид водорода, содержание которого в большинстве нормальных тканей составляет около 10^{-7} М [173]. Опухолевые клетки как в культуре, так и *in vivo*, содержат повышенные концентрации пероксида водорода (Таблица 6). При этом продукция H_2O_2 раковыми клетками лишь в несколько раз уступает скорости его синтеза нормальными нейтрофилами в состоянии острого воспаления. Данный признак может быть использован как для диагностики, так и для терапии опухолевых заболеваний различной природы. Измерение концентраций АФК в биологических системах является сложной задачей из-за малого времени жизни этих частиц в присутствии самых различных субстратов, прежде всего антиоксидантов [152], а также из-за сложности биологических систем, поэтому прямое определение АФК не находит применения, и измерение содержания АФК сводится к определению продуктов их реакций, как правило, с вводимыми в клетку ловушками. Многообразие методов определения АФК схематично представлено на Рис. 18.

Наиболее широко для определения АФК в биологических объектах применяются различные молекулярные зонды, прежде всего, флуоресцентные, флуорогенные и хемилюминесцентные (Таблица 7), которые реагируют с различной селективностью с АФК. В разделе 2.3.5 были рассмотрены зонды, которые могут быть использованы для определения синглетного кислорода (Таблица 4). В данной главе сделан акцент на тех зондах, с помощью которых можно оценить степень окислительного стресса в клетках. Такая оценка осложняется разнообразием АФК. Применение селективных ловушек АФК и таких ферментов как супероксид-дисмутаза (SOD) и каталаза, проявляющих специфичность в отношении определённых АФК, позволяют соотнести оптический ответ зондов с конкретными молекулами. Количественный анализ может также осложняться следующими факторами: 1) высокой внутриклеточной концентрацией глутатиона, который при взаимодействии с АФК способен как образовывать новые различные радикалы, так и дезактивировать АФК [198]; 2) варьирующей концентрацией металлов, которые могут как катализировать, так и ингибировать реакции с участием радикалов; 3) присутствием прочих молекул, например, спермина, способных дезактивировать свободные радикалы [199].

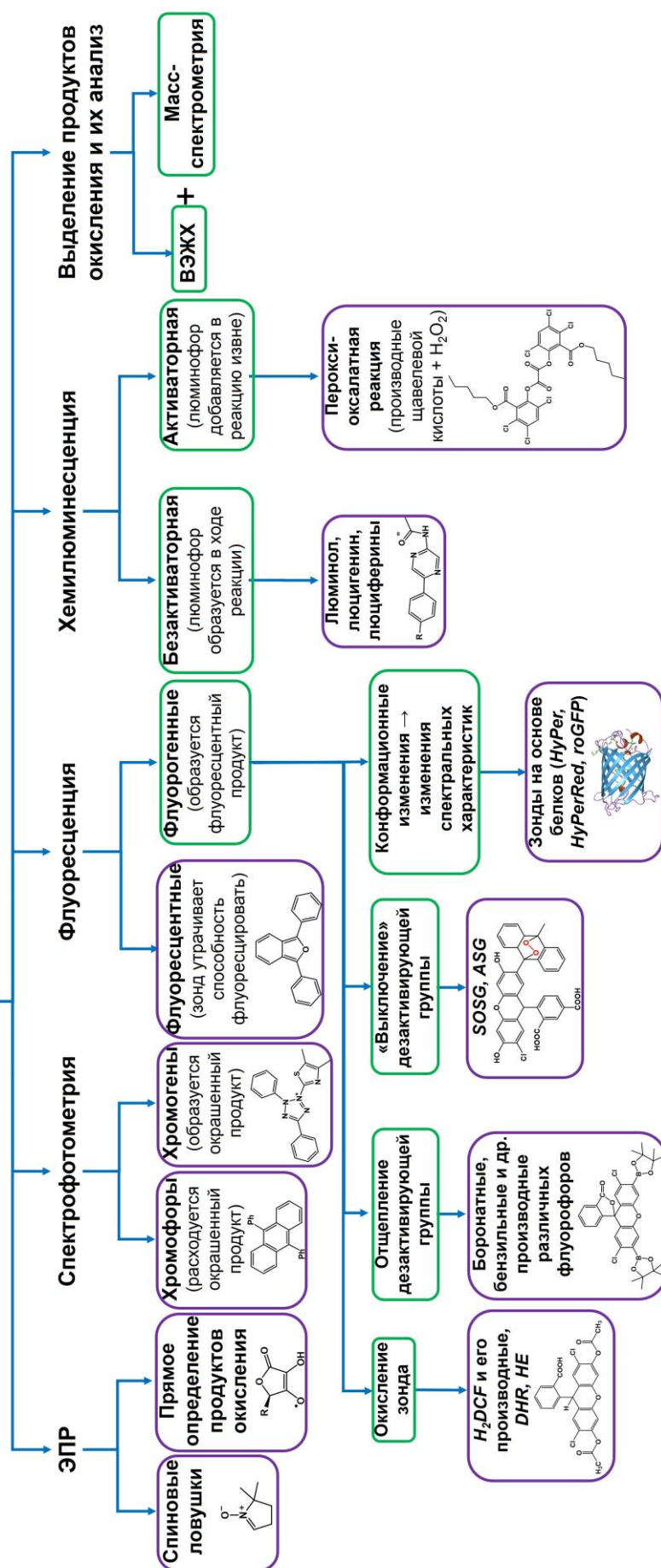
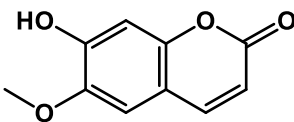
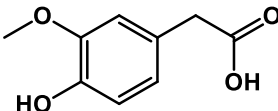
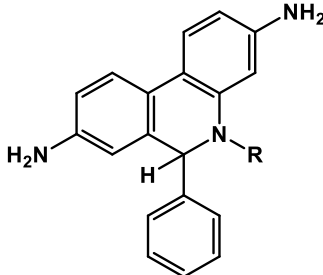
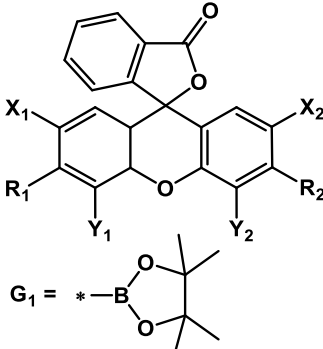
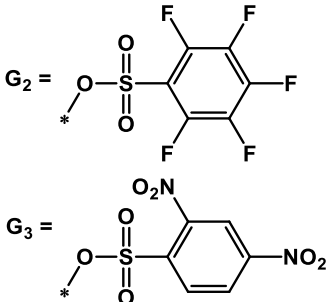


Рис. 18. Классификация методов определения активных форм кислорода.

Таблица 7. Молекулярные зонды для определения АФК в биологических системах.

№	Название зонда	Химическая структура зонда	Особенности ловушки
Спиновые ловушки для ЭПР			
1	5,5-диметил-1-пирролин-1-оксида (DMPO)		Нет селективности, реагируют с HO•, HO2•, CH3• и др. радикалами [200–203]
2	фенил N-трет-бутилнитрона (PBN)		
Хромогенные индикаторы			
Тетразолиевые красители			
3	Нитро тетразолиевый голубой (R1=G; R2=OMe; R3=H; R4=NO2; R5=R6=R7=R8=H)		Образует нерастворимый в воде формазан, восстанавливается супероксидом [204]
4	WST-1 (R1=I; R2=R3=H; R4=NO2; R5=R6=H; R7=R8=SO3Na)		Образует водорастворимый формазан, восстанавливается супероксидом [204, 205]
5	XTT (R1=R4=NO2, R2=R5=OMe, R3=R6=SO3Na, X=-NH-C(O)-; R7=R8=H)		
Порфириновые комплексы металлов			
6	Гем цитохрома с		Продукт восстановления супероксидом имеет очень узкую полосу поглощения, добавления каталазы необходимо, чтобы избежать обратного окисления [205], [206], [207]
Флуорогенные зонды			
Производные 2,7-дихлорофлуоресцеина (DCF)			
7	H2DCF (R1=H; R2=H; R3=COOH)		Окисляется радикалами, в т.ч. HO•, ROO•, CO3•-, NO2•. Реакции с АФК только после отщепления (в т.ч. ферментативного) групп R1 и гидролиза R2 и R3. Реакция с H2O2 требует катализатора, генерирующего HO•. DCF является фотосенсибилизатором. Большое число побочных процессов. Ацилированные
8	H2DCF-DA (R1=Ac; R2=H; R3=COOH)		
9	карбокси-H2DCF-DA (R1=Ac; R2=R3=COOH)		
10	H2DCF-DA AM (R1=Ac; R2=R3=C(O)OC(O)CH3)		

11	CM H ₂ DCF-DA (R ₁ =Ac; R ₂ =CH ₂ Cl; R ₃ =C(O)OC(O)CH ₃)		производные лучше проникают в клетки [152], [177]
Производные флуоресцеина			
12	3'-(п-аминофенил) флуоресцеин (APF): X = N		APF реагирует с HO•, ClO ⁻ , а HPF — только с HO•. Комбинация двух зондов позволяет определить ClO ⁻ в клетках и бесклеточных системах [152, 177, 208, 209]
13	3'-(п-гидроксифенил) флуоресцеин (HPF): X = O		
Производные родаминов			
14	Дигидрородамин 123 (R ₁ =H; R ₂ =H; R ₃ =Me)		Молекулы приобретают положительный заряд при окислении, после чего накапливаются в митохондриях, поэтому нельзя точно сказать, где произошло окисление [152], [210]
15	Дигидрородамин 6G (R ₁ =R ₃ =Et; R ₂ =Me)		
Производные розаминов			
16	MitoTracker Orange (R ₁ =Me; R ₂ =H)		Молекулы приобретают положительный заряд при окислении, после чего накапливаются в митохондриях, поэтому нельзя точно сказать, где произошло окисление [211]
17	MitoTracker Red (R ₁ =CH ₂ CH ₂ CH ₂ -R ₂ ; R ₁ '=CH ₂ CH ₂ CH ₂ -R ₂ ')		
Производные резорубина			
18	Amplex Red (N-ацетил-3,7- дигидроксифеноксазин)		Реагирует с H ₂ O ₂ только в присутствии пероксидаз и других катализаторов, способных превращать H ₂ O ₂ в HO•, не проникает в клетки, восстанавливается на свету, продукт окисления деградирует, низкая стабильность [152, 207, 212– 214]

Прочие ловушки			
19	Скополетин		Реагируют с H ₂ O ₂ только в присутствии пероксидаз и других катализаторов, способных превращать H ₂ O ₂ в HO•. Низкая стабильность в биологическом окружении, низкий коэф. экстинкции, полосы поглощения и флуоресценции в коротковолновой области [152, 215, 216]
20	Гомованилиновая кислота		
21	Гидроэтидин (HE) (восстановленная форма этидия) (R=Et)		
22	MitoSOX (R=(CH ₂) ₆ -P ⁺ Ph ₃)		
Флуорогенные трифенилметановые зонды, чувствительные к АФК-нуклеофилам			
23	R ₁ =R ₂ =G ₁ , X _n =Y _n =H		Боронатная группа селективно отщепляется H ₂ O ₂ , молекулы с одной группой значительно быстрее реагируют, чем те, у которых таких групп несколько
24	R ₁ =OMe, R ₂ =G ₁ , X _n =Y _n =H		
	R ₁ =OH, R ₂ =G ₁ , X _n =Y _n =H		
	R ₁ =NH ₂ , R ₂ =G ₁ , X _n =Y _n =H		
	R ₁ =NEt ₂ , R ₂ =G ₁ , X _n =Y _n =H		
	R ₁ =N-, R ₂ =G ₁ , X ₁ =(CH ₂) ₃ -R ₁ , Y ₁ =(CH ₂) ₃ -R ₁ , X ₂ =Y ₂ =H		
25	R ₁ =OH, R ₂ =G ₂ , X=Y=H		Ловушка высокоселективна к H ₂ O ₂ [220]
26	R ₁ =OH, R ₂ =G ₃ , X=Y=F		Ловушка высокоселективна к O ₂ ^{•-} [220]

Ниже мы кратко остановимся на свойствах различных типов молекулярных зондов, позволяющих обнаружить синглетный кислород в клетках.

2.4.3.1 Электронный парамагнитный резонанс

Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) по указанным выше причинам не используется для прямого определения АФК в биологических системах, вместо этого применяется метод спиновых ловушек. Так, супероксидный анион-радикал и алкильный радикал при окислении липидов в клеточных культурах удалось детектировать с использованием 5,5-диметил-1-пирролин-1-оксида (1) и фенол N-трет-бутилнитрона (2)

(Таблица 7, спиновые ловушки для ЭПР). Спиновые ловушки не проявляют заметной селективности в отношении различных АФК, поэтому для установления того, какие АФК образуются в системе, используют два взаимодополняющих подхода: 1) соотнесение сигналов в спектре с табличными значениями для известных аддуктов, 2) последовательное проведение эксперимента при ингибировании процессов, приводящих к генерированию отдельных типов АФК, чтобы уменьшить число различных радикалов в системе [200–203].

Метод ЭПР позволяет напрямую детектировать радикалы, образующиеся при реакции АФК с различными биологическими молекулами, например, определение аскорбатного и токофероксильного радикалов, образующихся при окислении антиоксидантов аскорбиновой кислоты (витамин С) и токоферола (витамина Е), соответственно, позволили установить принцип действия антиоксидантов в плазме крови, подверженной окислительному стрессу [221].

2.4.3.2 Спектрофотометрия

Спектрофотометрическое определение АФК связано с добавлением к клеткам хромогенов — соединений, который в результате реакций с АФК приобретают сильное поглощение света в какой-либо области спектра.

Основной группой хромогенов, которые всё ещё находят применение в анализе АФК, являются *тетразолиевые красители* (Таблица 7, хромогенные индикаторы). Чувствительность к редокс-потенциалу клеток обуславливает широкое применение этих красителей для оценки жизнеспособности клеток в культуре. При восстановлении супероксидом эти бесцветные соединения образуют ярко окрашенные формазаны. Водонерастворимые производные (3) выпадают в осадок, что можно использовать для оценки локализации восстановления, а после растворения в органическом растворителе — для количественного спектрофотометрического измерения. Водорастворимые формазаны (4-5) могут быть определены напрямую в водной среде. Для определения супероксида во внешней клеточной среде активированных нейтрофилов использовали гидрофильный тетразолий WST-1 (4). При его добавлении к активированным нейтрофилам происходило быстрое развитие окраски за счет восстановления тетразолия супероксидом, приводящего к образованию сильно окрашенного формазана [205]. Этот подход оказался в 2 раза более чувствительным, чем спектрофотометрическое определение продукта восстановления *цитохрома с* (6) супероксидом при

стимулировании нейтрофилов или моноцитов [205], [206]. Продукт восстановления имеет очень узкую полосу поглощения, и для точного измерения требует добавления каталазы, чтобы избежать обратного окисления [207]. Использование хромогенных красителей ограничено клетками, образующими высокие концентрации АФК, прежде всего фагоцитами. Для прочих типов клеток нужны более специфические и чувствительные методы, например, на основе флуоресцентных и хемилюминесцентных зондов [207].

2.4.3.3 Флуориметрия

Все зонды, определение которых основано на измерении интенсивности или спектров флуоресценции, можно разделить на две категории: флуоресцентные и флуорогенные. Флуоресцентные зонды изначально обладают свойством флуоресценции, однако утрачивают его при окислении под действием АФК. Флуорогенные зонды имеют обратное свойство: исходная молекула не является флуорофором в принципе или его флуоресценция почти полностью затухает ковалентно связанной группой. В настоящее время на дизайн и синтез флуорогенных зондов с лучшими характеристиками направлены большие усилия, т.к. такие молекулы дают огромные возможности для исследования очень сложных биологических процессов, включающих АФК, в том числе *in vivo*. Большое число широко используемых флуорогенных зондов не проявляет высокой селективности в отношении определенного вида АФК и может окисляться в результате различных процессов.

Флуоресцеин, родамин и другие красители могут быть химически восстановлены до соответствующих бесцветных нефлуоресцирующих лейко-форм. Эти восстановленные «дигидро»-производные легко окисляются обратно под действием АФК и, таким образом, могут выполнять роль флуорогенных зондов для измерения окислительной активности в клетках и тканях [222–224]. Окисление протекает и спонтанно на воздухе и в результате фотосенсибилизации, которая протекает под действием света, в том числе в ходе измерения при облучении зонда для наблюдения за его флуоресценцией [225], [226]. Для таких зондов рекомендуется строго соблюдать правила хранения и использования, в том числе следует свести к минимуму продолжительность и интенсивность облучения. В целом дигидрофлуоресцеин и дигидрородамин не проявляют селективности к каким-то АФК. 2',7'-Дихлордигидрофлуоресцеин (H_2DCF , 7) и дигидрородамин 123 реагируют с

внутриклеточным пероксидом водорода, этот процесс катализируется пероксидазой, цитохромом с или ионами двухвалентного железа [177].

Диацетат дихлордигидрофлуоресцеина ($H_2DCF-DA$) (8) — наиболее распространенный и изученный зонд, способный проникать внутрь клеток. Он широко используется, чтобы детектировать образование АФК и их производных в нейтрофилах и макрофагах [227, 228]. Для превращения нефлуоресцентного $H_2DCF-DA$ во флуоресцентную форму необходимо гидролизовать сложноэфирные связи. Это происходит в том числе под действием внутриклеточных эстераз. Образовавшийся H_2DCF окисляется в присутствии различных АФК, прежде всего свободных радикалов, включая пероксидный радикал ($ROO^\bullet$) и гидроксильный радикал ($HO^\bullet$), превращаясь в ярко флуоресцирующий 2',7'-дихлорофлуоресцеин (DCF). Пероксинитритный анион ($ONOO^-$) приводит к окислению $H_2DCF-DA$, но не непосредственно, а за счёт образования радикалов диоксида азота и карбоната [229]. Напрямую $H_2DCF-DA$ не окисляется синглетным кислородом, однако зонд может окисляться опосредованно через реакцию с пероксидными продуктами взаимодействия синглетного кислорода с клеточными субстратами [226]. $H_2DCF-DA$ почти не чувствителен и к супероксиду [177, 230].

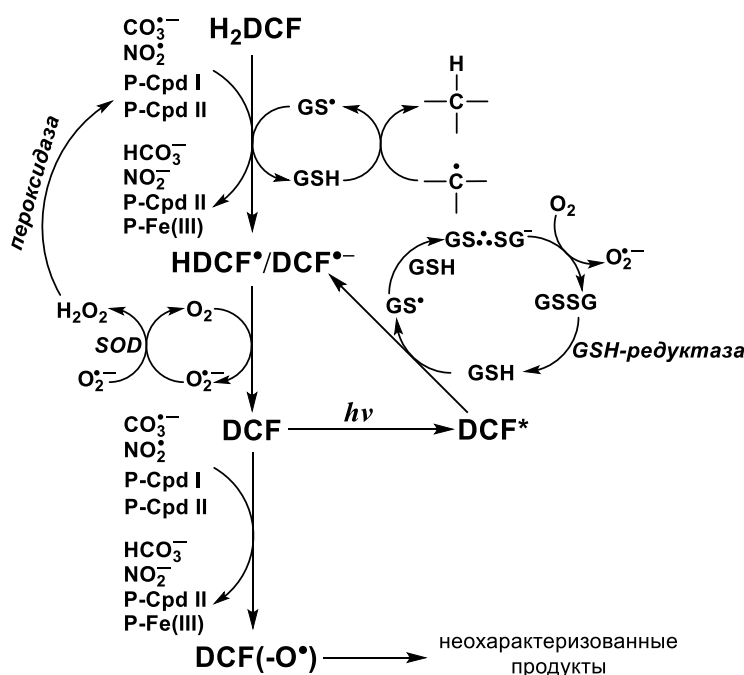


Рис. 19. Внутриклеточные реакции, протекающие с участием флуорогенного индикатора H_2DCF [177]. P-Cpd I и P-Cpd II — участники пероксидазного цикла, окисленные промежуточные формы пероксидазы, способные окислять субстрат фермента.

Несмотря на кажущуюся простоту, результаты экспериментов с H_2DCF и его производными могут искажаться из-за протекания большого числа процессов с участием

зонда, которые действуют в различных направлениях, как в сторону образования DCF, так и в сторону его обратимого и необратимого превращения в другие продукты (Рис. 19) [177, 207].

Определение АФК с помощью H_2DCF имеет следующие ограничения.

1) Пероксид водорода и супероксид не взаимодействуют с этим зондом в отсутствие катализатора [222]. Для протекания реакции с пероксидом необходимо присутствие пероксидазы или другого катализатора на основе переходных металлов, которые приводят к образованию гидроксильного радикала. Таким образом, слабый сигнал или его отсутствие могут быть ошибочно интерпретированы, если в системе не происходит катализ. Аналогично этому увеличение сигнала может свидетельствовать об увеличении доступности переходных металлов, например, при высвобождении цитохрома c при апоптозе [230] или лизосомального железа [231].

2) Многие свободные радикалы, включая те, которые образуются из пероксинитрита, тирозина, тиолов способны окислять зонд. Эти процессы могут быть не связаны с содержанием пероксида водорода [177, 207].

3) Свободный радикал зонда может активно реагировать с антиоксидантами. Так, N-ацетилцистеин или аскорбат, которые часто добавляются в клеточные системы, подавляют флуоресценцию. Наиболее вероятно, что это происходит именно из-за взаимодействия антиоксидантов с радикалом зонда, а не с пероксидом водорода. Второй процесс является значительно более медленным.

4) Зонд сам способен генерировать пероксид водорода при переходе из H_2DCF в DCF, т.к. этот процесс протекает через реакцию радикала DCF и кислорода [232], которая приводит к образованию супероксида, а значит, и пероксида водорода, что дополнительно ускоряет накопление продукта.

5) Антиоксидантные ферменты, нейтрализующие пероксид водорода или супероксид, конкурируют с зондом за АФК, поэтому изменения сигнала могут свидетельствовать об изменении ферментативной активности антиоксидантных ферментов, а не самих АФК [177].

6) DCF сам по себе является фотосенсибилизатором, стимулируя и ускоряя окисление H_2DCF -DA и накопление DCF при облучении внешним светом [226].

В бесклеточной системе H_2DCF окисляется пероксинитритом, пероксидазой хрена (в отсутствие пероксида водорода) и катионами двухвалентного железа (в

отсутствие пероксида водорода). Окисление H_2DCF двухвалентным железом в присутствии пероксида водорода уменьшалось под действием ловушки гидроксильного радикала и хелатирующего лиганда деферроксамина [233].

В обзоре [234] суммированы методы визуализации образования АФК в животных. В частности, авторы предлагают использовать иодид пропидия одновременно с H_2DCF -DA, тем самым параллельно определяя и АФК, и повреждения плазматической мембраны клеток. H_2DCF -DA использовали для визуализации окислительных процессов в печени крысы, перфузированной тетрахлоридом углерода [235], и веноулярном эндотелии при активации нейтрофилов [236]. DCF может претерпевать дальнейшее окисление в реакции, катализируемой пероксидазой хрена, и эта реакция может осложнять интерпретацию результатов, полученных с использованием данного зонда, в клетках, подверженных окислительному стрессу [237]. Хотя существуют другие и продолжают разрабатываться новые зонды, лишённые многих недостатков H_2DCF -DA, этот зонд остается наиболее универсальным индикатором окислительного стресса.

Другие производные H_2DCF

Значительную часть современных флуорогенных зондов для детектирования окислительного стресса в клетках представляют улучшенные производные H_2DCF , обладающие рядом преимуществ.

Внутриклеточное окисление H_2DCF сопровождается вытеканием продукта окисления, DCF, из клеток, что может значительно осложнить количественный анализ и измерение медленных окислительных процессов [238]. Для улучшения удержания флуоресцентного продукта был разработан карбоксилированный аналог H_2DCF -DA, 6-карбокси-2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин (**9**), который имеет два отрицательных заряда при физиологическом значении pH [239], а также его аналог, содержащий две ацетоксиметильные сложноэфирные группы (**10**) (Таблица 7) [240]. Расщепление сложноэфирных связей под действием внутриклеточных эстераз и последующее окисление обоих производных H_2DCF -DA дают 6-карбокси-2',7'-дихлорофлуоресцеин с дополнительным отрицательным зарядом, препятствующим вытеканию зонда из клеток. Хлорометильное производное (**11**) хорошо удерживается в клетках благодаря взаимодействию с внутриклеточными тиолами, например, глутатионом [241].

Производные флуоресцеина 3'-(п-аминофенил)флуоресцеин (APF, **12**) и 3'-(п-гидроксифенил)флуоресцеин (HPF, **13**) проявляют более высокую селективность и

стабильность, чем $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ [208]. Оба этих зонда менее активны и обладают большей устойчивостью к окислению под действием света, а также окисляются гидроксильным радикалом и пероксинитритом [209]. APF в отличие от HPF также реагирует с гипохлоритом, что даёт возможность определять его содержание при совместном использовании APF и HPF [208].

Производные родаминов и розаминов. Дигидрородамин 123 (**14**) является незаряженным и нефлуоресцентным продуктом восстановления родамина 123, красителя, который селективно накапливается в митохондриях. Лейко-форма пассивно диффундирует через большинство клеточных мембран, где в последствии окисляется до катионного родамина 123, который локализуется в митохондриях. Как и H_2DCF , дигидрородамин 123 напрямую не взаимодействует с супероксидным анион-радикалом, однако реагирует с пероксидом водорода в присутствии пероксидаз, цитохрома с или двухвалентного железа [177], а также с пероксинитритом за счёт образования диоксида азота и карбонатного радикала [229]. По реакционной способности восстановленные родамины очень сходны с H_2DCF и окисляются свободными радикалами [207].

Дигидрородамин 6G (**15**) имеет преимущество по сравнению с дигидрородамином 123 в том, что поглощает в более длинноволновой области, что выгодно при одновременном детектировании различных красителей, а также при анализе автофлуоресцирующих клеток и тканей [210].

Другим важным коммерческим семейством флуорогенных зондов является **MitoTracker**, некоторые представители которого (**16-17**) представляют собой восстановленные производные розаминов (лейко-формы) и имеют различные спектральные характеристики в зависимости от заместителей. Восстановленные формы не флуоресцируют, пока не попадут внутрь клеток, в которых происходят процессы клеточного дыхания. Важно отметить, что накопление зондов на основе родаминов и розаминов в митохондриях происходит вследствие наличия положительного заряда, который приобретает только при окислении. Это означает, что их окисление может протекать как в митохондриях, так и в других клеточных компартментах, и только потом эти красители постепенно перераспределяются в митохондрии [211].

Amplex Red (18) очень широко используется для определения пероксида водорода во внешней клеточной среде, т.к. зонд не проникает через клеточные мембраны [207]. При ферментативном окислении зонда пероксидазами образуется резорурфин — яркий

флуорофор. Amplex Red проявляет высокую чувствительность в отношении пероксида, значительно (5-20 раз) превосходя скополетин в аналогичных условиях [152, 212], позволяя определять субмикромольные концентрации. Из побочных реакций следует отметить восстановление резоруфина на свету как в присутствии восстановителей, например, NADPH и глутатиона, так и в их отсутствие, а также его дальнейшее окисление до резазурина пероксидазами [212, 213]. Зонд не реагирует с супероксидом, однако свободный радикал зонда, который является промежуточным продуктом его окисления, быстро взаимодействует с супероксидом. Amplex Red не отличается высокой стабильностью как в нейтральной (pH 6.2-7.7), так и в щелочной среде (pH > 8.3) [213]. Зонд использовали для детектирования АФК при изучении сигнальной роли пероксида водорода на выделенных митохондриях [214], а также при окислительном взрыве эозинофилов и нейтрофилов [212].

В настоящее время на второй план уходят скополетин и гомованилиновая кислота. **Скополетин (19)** является флуорофором, который окисляется в присутствии пероксида водорода с помощью пероксидазы или каталазы, давая нефлуоресцентный продукт. К числу его недостатков относится низкая стабильность в биологическом окружении, низкий коэффициент экстинкции, полосы поглощения и флуоресценции в коротковолновой области, что обуславливает одновременное возбуждение вместе с клеточными флавинами и возникновение интенсивной аутофлуоресценции клеток [152, 216]. Нефлуоресцентная **гомованилиновая кислота (20)** даёт флуоресцентный димер в реакции с пероксидом водорода в присутствии пероксидазы, а также цитохрома с, липооксигеназы и переходных металлов, что может исказить результаты. Продукт окисления имеет ещё более коротковолновые полосы поглощения и испускания, чем скополетин, поэтому использование обоих зондов предпочтительно для супернатантов после отделения клеток или изолированных митохондрий [152, 216].

Восстановленная форма бромистого этидия, **гидроэтидин (21)**, окисляется неселективно по механизму, характерному для H_2DCF . Исключением является реакция с супероксидом, приводящая к образованию свободного радикала гидроэтидина, который быстро присоединяет супероксид, давая 2-гидроксиэтидий [177]. Этот продукт образуется только при реакции с супероксидом, тогда как в реакциях с другими АФК — этидий. Спектры флуоресценции обоих продуктов близки, что не позволяет проанализировать образование супероксида с помощью флуориметрии [217]. Для этого

необходимо выделять продукты окисления гидроэтидина и характеризовать их с помощью ВЭЖХ и масс-спектрометрии. Такой подход является одним из лучших способов определения супероксида [217, 218]. Для изучения редокс-процессов в митохондриях было разработано коммерческое производное **MitoSOX** (22), содержащее трифенилфосфониевый вектор [219].

Генетически кодируемые зонды на основе белков. Этот класс редокс-чувствительных зондов принципиально отличается от всех вышеупомянутых типов тем, что представлен не синтетическими молекулами органических красителей или ловушек радикалов, а белковыми молекулами. Для внедрения белковых сенсоров в клетки сначала осуществляют трансфекцию клеток плазмидами, кодирующими необходимые белковые сенсоры, которые далее синтезируются клеткой самостоятельно. Огромным преимуществом этих зондов является их контролируемая на стадии сборки плазмиды локализация, а также возможность реализации подхода в различных типах клеток и организмов. Наличие вектора на молекуле редокс-белка в виде ковалентно связанного белка трансформированной клетки обуславливает его локализацию в тех клеточных компартментах, которые характерны для данного белкового вектора. Так, успешно получены и использованы белковые сенсоры roGFP1, roGFP2 и др. на основе зеленого флуоресцентного белка GFP, локализованные в цитозоле, митохондриях, на внешней поверхности мембраны, в эндоплазматическом ретикулуме клеток носового эпителия [239], а также многих других типов клеток [242]. Белки roGFP1 и roGFP2 не взаимодействуют с АФК напрямую. Принцип их действия основан на тиол-дисульфидном обмене двух остатков цистеина в разных доменах белкового сенсора, которые находятся в равновесии с клеточным глутатионом и, таким образом, связаны с окислительно-восстановительным балансом клетки [243]. На основе GFP и пероксидазы был создан белок, проявляющий отклик непосредственно на пероксид водорода. Флуоресцентный домен фактически является субстратом пероксидазного домена [244].

Другим важным семейством белковых сенсоров являются желтые флуоресцирующие белки (YFP), на основе которых был создан белковый сенсор Нурег, чувствительный к пероксиду водорода. Его действие основано на окислении пероксидом водорода двух остатков цистеина в редокс-чувствительных доменах с образованием дисульфидной связи. Это приводит к конформационным изменениям в этих доменах, которые в свою очередь индуцируют изменения конформации домена YFP и спектра

возбуждения флуоресценции: наблюдается уменьшение полосы поглощения с максимумом 420 нм и увеличение полосы 500 нм при постоянной длине волны испускания — 516 нм. Определение пероксида водорода основано на измерении соотношения интенсивностей флуоресценции при возбуждении светом с длинами волн, соответствующими первому и второму максимумам спектра возбуждения. Такой метод носит название ратиометрического (ratiometric) [243, 245]. Развитием этого сенсора стал белок HyPerRed на основе красного флуоресцирующего белка cpmApple. Для полученного зонда характерен предел обнаружения пероксида водорода 20 нМ и сдвиг спектров поглощения и флуоресценции в красную [246].

Новое поколение флуорогенных зондов. Окислительно-восстановительная природа реакций между лейко-формами флуорофоров и АФК сопряжена с многочисленными побочными реакциями как самого зонда, так и его промежуточных и конечных продуктов. Это простимулировало разработку зондов, действие которых не включает редокс-реакции. Основные усилия исследователей направлены на получение флуорофоров, содержащих заместители, которые подавляют способность флуоресцировать, но отщепляются под действием АФК, приводя к образованию молекулы исходного флуорофора. При таком подходе задействуются нуклеофильные свойства АФК. В рамках этой стратегии теоретически можно синтезировать производные почти любого флуорофора. Явным преимуществом подход является отсутствие необходимости в катализе реакции АФК с зондом. Наиболее широко для реализации этой идеи используются боронатные, бензилсульфонильные и бензильные производные, чувствительные к пероксиду водорода, супероксиду и пероксинитрилу [207].

Боронатные производные были получены для различных флуорофоров, в том числе трифенилметановых (флуоресцеина, родамина и других) (23-25), резорубина и др [177, 207, 247]. Их действие основано на способности фенилборонатов превращаться в фенол под действием пероксида водорода, однако другие АФК также способны приводить к отщеплению группы «выключателя». Надо отметить, что чувствительность боронатных зондов ограничивается тем, что реакция с пероксидом протекает в отсутствие катализатора, тогда как реакции пероксида с биологическими антиоксидантами (например, глутатионом), которых в клетках на несколько порядков больше, чем зонда, происходят ферментативно. Таким образом, результаты анализа сильно зависят от ферментативной активности [207]. Для бензилсульфонильных и бензильных

производных характерны те же ограничения, что и для боронатных [177, 207]. Динитробензилсуфонатная уходящая группа позволила создать индикатор (26) почти на два порядка более чувствительный к супероксиду, чем пероксиду водорода [220].

2.4.3.4 Выделение продуктов окисления и их анализ

Другие методы определения АФК являются менее распространёнными прежде всего из-за большей трудоёмкости анализа. Эти методы заключаются в определении продуктов реакций АФК с различными биологическими молекулами, однако требуют предварительного выделения этих продуктов. Последующий анализ осуществляется с помощью ВЭЖХ, газовой хроматографии, и масс-спектрометрии. Так, например, молекулы нуклеиновых кислот подвержены действию АФК. Реакции гидроксильного радикала приводят к образованию продуктов распада азотистых оснований и сахаров (2-дезоксирибозы и рибозы), которые могут быть выделены и определены [248].

Гуанин из всех азотистых оснований наиболее подвержен окислению. Его результатом является 8-гидрокси-2'-дезоксигуанозина (8ОНГ) в составе нуклеиновых кислот. Его определение возможно после выделения фракции ДНК и РНК из клеточного лизата и ВЭЖХ с электрохимической детекцией. Преимущество этого метода определения АФК заключается в высокой чувствительности ВЭЖХ. Метод не является селективным, $^1\text{O}_2$, $\text{HO}^\bullet$, $\text{CO}_3^{\bullet-}$, $\text{RO}_2^\bullet$ приводят к образованию указанного продукта, однако помимо него образуется большое число других молекул. Абсолютные измерения нецелесообразны, т.к. определение 8ОНГ зависит от окислительно-восстановительного состояния клеток и внутриклеточной концентрации ионов металлов.

Атака 2-дезоксирибозы гидроксил-радикалом приводит к образованию набора продуктов, часть которых при нагревании при низком рН дают малоновый диальдегид. При взаимодействии с тиобарбитуровой кислотой он формирует окрашенное соединение состава 1:2. Этот метод не является селективным, т.к. другие АФК могут приводить к разрушению 2-дезоксирибозы, однако свидетельствует об окислительном стрессе [248].

2.4.4 Заключение главы 2.4

Из анализа литературы очевидно, что активные формы кислорода играют важнейшую роль в метаболизме. При этом содержание повышается в результате различных воздействий. Повышенное содержание АФК характерно для раковых клетках, что, по всей видимости, связано с нарушением метаболизма кислорода в результате

опухолевой трансформации. Данный признак может быть использован для обнаружения и избирательного уничтожения раковых клеток.

Анализ способов обнаружения АФК показывает, что существует целый ряд подходов к определению общего количества АФК. Наибольшее распространение получили флуорогенные подходы, основанные на использовании производных 2,7-дихлор-дигидрофлуоресцеина. Одно из этих производных ($H_2DCF-DA$) было использовано в настоящей работе.

В то же время анализ селективности используемых подходов показал, что существует несколько методов селективного обнаружения супероксид-анион-радикала и гидроксил-радикала. Однако перекись водорода во внутренней среде клетки обнаружить значительно труднее. Это связано с тем, что наиболее распространенные подходы требуют, помимо окисляемого флуорогенного или флуоресцентного зонда, присутствия пероксидаз, активность которых в клетке может варьировать, что отражается на получаемых результатах. В этой связи пероксиоксалатная хемилюминесцентная реакция, использованная в настоящей работе для определения внутриклеточной концентрации пероксида водорода, представляет большой интерес, поскольку не требует введения в клетку каких-либо ферментов. Хемилюминесцентные методы определения АФК будут рассмотрены в разделе 2.5.2.

2.5 ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИЯ И ЕЁ ПРИМЕНЕНИЕ В ФАРМАКОЛОГИИ, МЕДИЦИНЕ И БИОЛОГИИ

2.5.1 Явление хемилюминесценции

Хемилюминесценция — это явление излучения света в результате химической реакции. Частным случаем хемилюминесценции является биолуминесценция — испускание света в живых организмах при протекании биохимических процессов, катализируемых ферментами. Любой хемилюминесцентный процесс включает в себя образование электронно-возбуждённых состояний в результате протекания экзотермического процесса. Это может происходить как в одну стадию, так и поэтапно. Не каждая экзотермическая реакция может приводить к возбуждению молекул. Как правило, энергия химической реакции используется для разрыва или образования связей. В таком случае энергия расходуется на формирование промежуточного состояния реагента, которое далее образует продукт реакции в колебательно-возбуждённом

состоянии, релаксирующем до основного колебательного уровня с испусканием тепла (Рис. 20). Для возникновения хемилюминесценции необходимо выполнение нескольких требований: 1) реакция обязательно должна характеризоваться высоким экзотермическим эффектом; 2) переходное состояние обязано обладать достаточной энергией, чтобы образовать один из продуктов реакции в электронно-возбуждённом состоянии [249], [101].

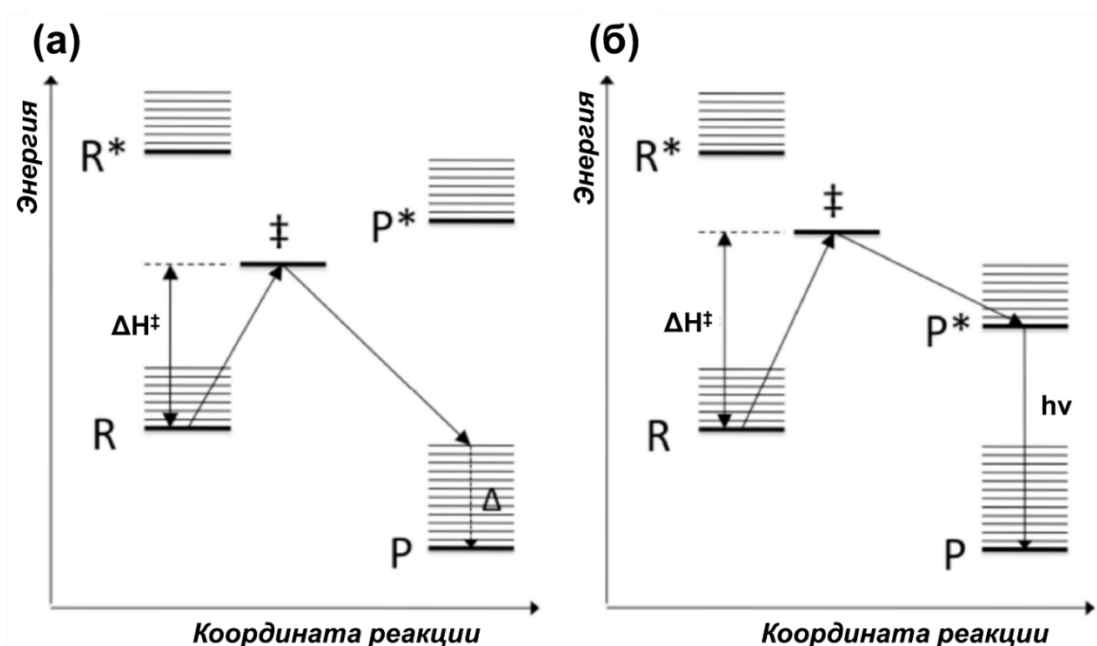


Рис. 20. Диаграммы потенциальной энергии для (а) экзотермической реакции $R \rightarrow P$ и (б) хемилюминесцентной реакции $R \rightarrow P^*$.

Т.к. энергия, выделившаяся на стадии хемовозбуждения (химического возбуждения), должна быть достаточно высокой для образования электронно-возбуждённых состояний, тепловой эффект реакции должен составлять от 50 до 100 ккал·моль⁻¹, что соответствует энергии возбуждения большинства органических хромофоров. Экзотермические акты со столь большой энергией наблюдаются главным образом в радикальных, цепных, а также в окислительно-восстановительных реакциях, протекающих по свободно-радикальному механизму. Также важным аспектом является возможность существования соответствующих возбуждённых состояний излучающей молекулы. Некоторые карбонильные и ароматические соединения отвечают этому требованию, т.е. сложная система сопряжения в молекуле и наличие поляризованных связей способствует превращению химической энергии в энергию возбуждения электронов. Однако, даже в том случае, когда энергия достаточна для хемовозбуждения, важно учитывать геометрические факторы, которые обычно связаны с принципом

Франка-Кондона. Данный принцип утверждает, что временной интервал электронных переходов (10^{-16} – 10^{-14} с) меньше, чем время перемещения ядер (10^{-13} – 10^{-12} с), и, таким образом, электронные переходы происходят значительно быстрее, чем перестановка атомов в структуре молекулы. Химическая реакция, в которой структура переходного состояния подобна структуре возбуждённого состояния продукта реакции и отличается от структуры основного состояния продукта, имеет большую вероятность генерирования возбуждённого состояния.

Эффективность хемилюминесцентного процесса определяется величиной квантового выхода хемилюминесценции (Φ_{CL}), который представляет собой соотношение между числом испущенных фотонов и количеством субстрата реакции, находящегося в недостатке. Квантовый выход хемилюминесценции включает в себя квантовый выход генерации возбуждённого состояния (хемовозбуждения) (Φ_{Ex}) и квантовый выход испускания света возбуждёнными частицами, т.е. квантовый выход флуоресценции (Φ_{Fl}):

$$\Phi_{CL} = \Phi_{Ex} \times \Phi_{Fl} \quad (8)$$

Интенсивность хемилюминесценции связана с квантовым выходом следующим образом: $I_{CL} = \Phi_{CL} \times r$, (9)

где r — скорость реакции [250].

Процесс образования возбуждённого состояния может быть описан с позиций теории переноса электрона Маркуса, где энергетические и геометрические критерии оцениваются с позиций диаграмм потенциальной энергии в зависимости от координаты реакции (Рис. 21). В нехемилюминесцентных экзотермических реакциях энергия активации ($\Delta H^\ddagger$) образования продукта Р в основном электронном состоянии ниже, чем энергия активации ($\Delta H^{*\ddagger}$) генерации электронно-возбуждённого состояния продукта (P^*). Таким образом, образование невозбуждённого продукта Р кинетически предпочтительнее. Это проявляется в ситуации, когда геометрия (координата реакции) реагентов и основного состояния продуктов схожи. В том случае, если геометрия возбуждённого состояния продуктов реакции подобна геометрии реагентов, может происходить хемилюминесцентная реакция, в которой $\Delta H^{*\ddagger}$ меньше, чем $\Delta H^\ddagger$, что делает кинетически более предпочтительным образование возбуждённого состояния продукта, и, следовательно, такой путь может оказаться эффективным.

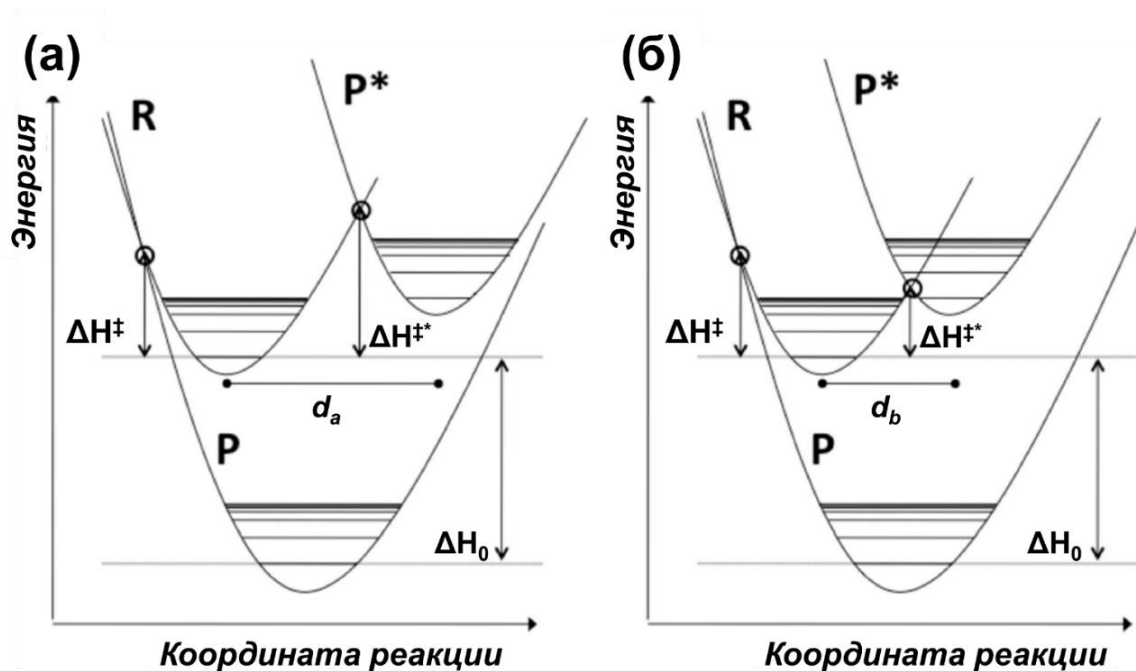


Рис. 21. Диаграмма координат реакции для (а) нехемилуминесцентных экзотермических реакций и (б) хемилуминесцентных экзотермических реакций в соответствии с теорией Маркуса. Расстояния между равновесной геометрией реагентов R и продуктов реакции P* на панелях (а) и (б) обозначены соответственно, как d_a и d_b .

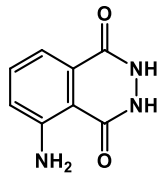
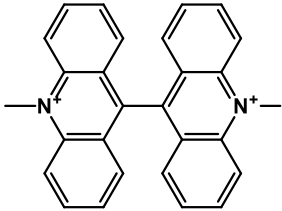
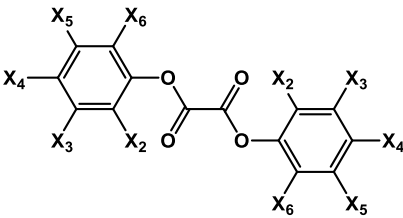
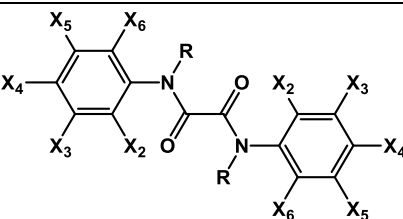
Хемилуминесцентные реакции протекают в три основных этапа: 1) образование высокоэнергетического интермедиата (ВЭИ) через одну или несколько реакций молекул в основном состоянии, 2) мономолекулярное разложение ВЭИ или его взаимодействие с другими реагентами, приводящее к образованию молекулы в электронно-возбуждённом состоянии (стадия химического возбуждения); 3) релаксация возбуждённого состояния до основного, сопровождающаяся флуоресценцией или фосфоресценцией в зависимости от мультиплетности возбуждённого состояния [249].

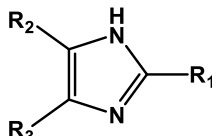
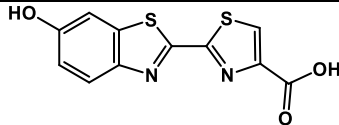
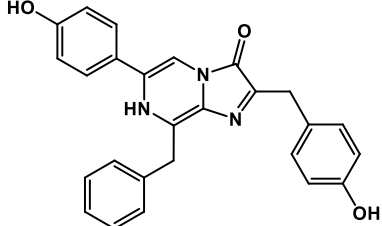
2.5.2 Хемилуминесцентные реакции, используемые в биологических системах

Биологические объекты содержат значительное количество соединений, которые могут быть детектированы при помощи хемилуминесцентных реакций, т.е. могут использоваться для визуализации и диагностики [82, 83, 251–253], а также могут быть основой для терапии [254]. Как было показано в разделе 2.4.1, АФК являются важнейшими участниками клеточного метаболизма. Их высокая реакционная способность обуславливает то, что многие АФК являются субстратами хемилуминесцентных реакций, поэтому одной из ключевых областей применения хемилуминесценции является определение АФК.

Преимуществом хемилюминесцентного подхода для определения АФК является возможность пространственно-временного изучения образования АФК, т.к. испускание света наблюдается только в тот момент, когда происходит реакция АФК с хемилюминесцентным субстратом и только в том месте, где локализуются участники реакции [82, 83, 251]. Другое важное преимущество хемилюминесцентного метода заключается в отсутствии фонового сигнала. Дело в том, что во время измерения интенсивности хемилюминесценции не требуется воздействия внешнего источника освещения, а следовательно, природные флуорофоры не оказывают влияния на фоновый сигнал (аутофлуоресценция) [151]. Здесь (Таблица 8) представлены основные хемилюминесцентные реакции, которые находят применение в данной области. Хемилюминесцентные реакции для определения синглетного кислорода рассмотрены отдельно в разделе 2.5.4. Ниже мы остановимся на некоторых особенностях применения наиболее важных типов хемилюминесцентных реакций для определения АФК.

Таблица 8. Основные хемилюминесцентные реакции, используемые для определения АФК (без учета синглетного кислорода).

№	Экзогенный субстрат	Структурная формула экзогенного субстрата	Особенности
1	Люминол (3-аминофталгидразид)		Необходимы щелочные условия и/или окислители, нет селективности (реагируют $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , O_2 , $ONOO^-$), окисление может быть не связано с АФК
2	Люцигенин		Сенсор на супероксид, но промежуточный продукт реакции — источник супероксида
3	Пероксиоксалатная реакция (ПО-реакция)		
3.1	Оксалаты		Очень высокая селективность к H_2O_2 , необходимость катализа определяется реакционной способностью оксалата/оксамида; нуклеофильный, и общесосновный катализ (имидазол, салицилат натрия)
3.2	Оксамида		

4	Лофин и его аналоги		
4.1	Лофин ($R_1=R_2=R_3=Ph$)		Реагирует с H_2O_2 в щелочной среде в присутствии ионов переходных металлов, например, Cu^{2+} , с триплетным кислородом в щелочных условиях и синглетным кислородом
	PDFI ($R_1 = 2$ -фурил, $R_2=R_3=Ph$)		
	TFI ($R_1=R_2=R_3=2$ -фурил)		
5	Биолюминесцентные реакции люциферинов		
5.1	Люциферин светлячка		Реакции с триплетным кислородом протекают только в присутствии соответствующих люцифераз
5.2	Коэлентеразин		

2.5.2.1 Хемилюминесценция реакция люминола

Люминол (о-аминофталоил гидразид) — вероятно, наиболее известный субстрат хемилюминесцентных реакций (Таблица 8). Хемилюминесцентные свойства люминола проявляются в присутствии окислителей и оснований. В присутствии сильных оснований на первой стадии происходит депротонирование гидразидных атомов азота с образованием дианиона (Рис. 22) [255, 256]. Образовавшаяся структура существует в равновесии с таутомерной формой, которая, вступая с триплетным (невозбужденным) кислородом в реакцию 1,4-циклоприсоединения, отщепляет молекулу азота. В результате образуется возбужденная частица — 3-аминофталат в триплетном состоянии. После интеркомбинационной конверсии образуется 3-аминофталат в возбужденном синглетном состоянии, который претерпевает излучательную дезактивацию.

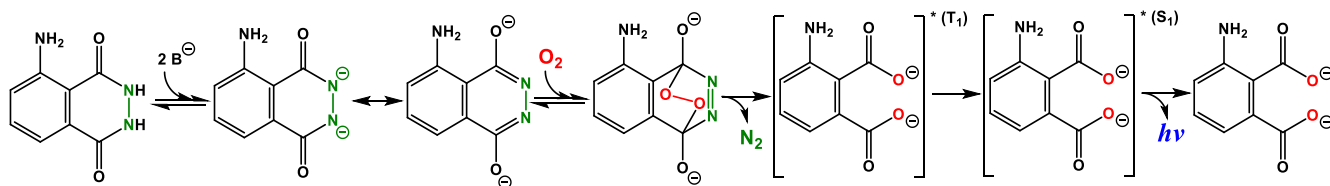


Рис. 22. Механизм хемилюминесцентной реакции окисления люминола [256].

Таким образом, окисление люминола относят к прямой (или безактиваторной) хемилюминесценции, т.к. продукт в возбужденном состоянии способен претерпевать излучательную дезактивацию. Спектр хемилюминесценции в реакции люминола в водной среде и в ДМСО с большой точностью соответствует спектру флуоресценции 3-аминофталата, однако довольно сильно зависит от растворителя, испуская свет с длиной волны 495 нм в ДМСО и 430 нм в воде [257].

Для эффективного протекания этой реакции необходимы щелочные условия: pH 11.6 в воде (соответствует pK_{a1} H_2O_2) или добавление трет-бутилата калия в органических растворителях (ДМСО, ДМФА, пропиленгликоль, ТГФ). Проведение реакции в воде, как правило, требует дополнительно добавления окислителей, например, гемина (белка, содержащего железо в комплексе с порфирином) с пероксидом водорода. В таких условиях квантовый выход хемилюминесценции не зависит от концентрации люминола, окислителей и температуры, хотя кинетика испускания света может отличаться очень сильно. Проведение реакции в оптимальных условиях даёт максимальный квантовый выход для этой реакции (0.0124), который не зависит от среды и может быть достигнут в воде, пропиленгликоле или ДМСО. Столь высокая воспроизводимость реакции сделала её востребованной в качестве стандарта при калибровке ФЭУ или для определения абсолютной спектральной чувствительности [258]. Значительное отклонение условий реакции от оптимальных, например, нейтральная среда, приводит к существенному понижению квантового выхода хемилюминесценции [257].

Роль окислителей в реакции люминола объясняется другим механизмом реакции (Рис. 23) [259]. В результате одноэлектронного окисления люминола образуется радикал, способный легко генерировать супероксид, который в свою очередь даёт эндпероксид, распадающийся аналогично тому, как это было описано на предыдущей схеме (Рис. 22). По существу, оба механизма описывают окисление люминола молекулярным кислородом.

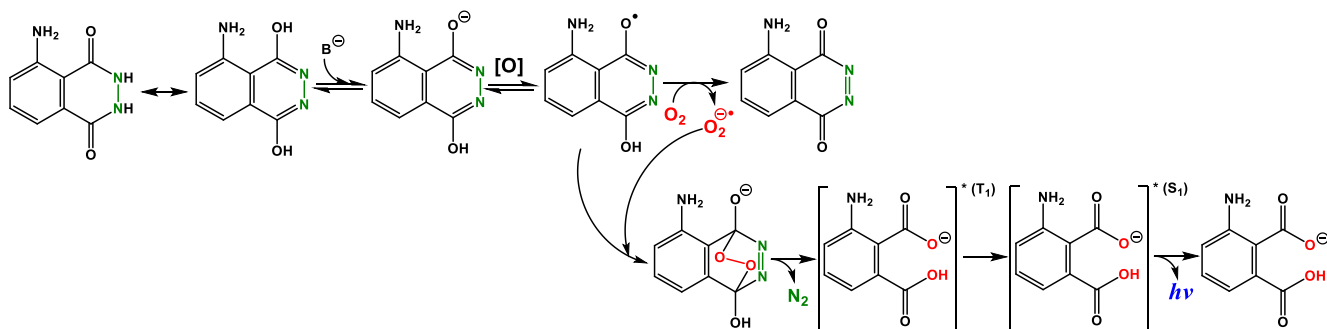


Рис. 23. Механизм хемилюминесцентной реакции люминола в присутствии окислителей.

Было обнаружено, что SOD подавляет хемилюминесценцию люминола в присутствии ксантиноксидазы и ксантина, гексацианоферрата (III) калия, персульфата, гипохлорита и др., указывая на то, что в хемилюминесцентной реакции люминола сначала образуется, а потом расходуется супероксид, как это показано на Рис. 23 [259]. Другие

АФК (H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$, ONOO^-) также могут реагировать с радикалом люминола, что делает эту реакцию неселективной [97].

Таким образом, хемилюминесценция люминола коррелирует с концентрацией радикала люминола, которая определяется эффективностью одноэлектронного окисления и может быть совершенно не связана с концентрацией АФК в системе. К числу известных катализаторов хемилюминесцентной реакции люминола относятся системы на основе пероксида водорода и переходных металлов, в том числе ферментативные системы, содержащие HRP, гемин, миоглобин, цитохром с и др. [257], [259]. Т.к. люминол проявляет низкую чувствительность к пероксиду водорода, по всей видимости, в этих системах хемилюминесценция возникает в результате образования гидроксильного радикала, который выступает в роли одноэлектронного окислителя люминола.

Указанные факты значительно осложняют определение АФК в биологических системах. Особенно следует выделить следующие недостатки хемилюминесцентной реакции люминола:

- 1) люминол не реагирует напрямую с супероксидом, однако является его источником, что может исказить результат анализа [259];
- 2) низкая эффективность хемилюминесцентной реакции при нейтральных значениях pH [257, 259];
- 3) необходимость использования катализатора и обеспечения его локализации вблизи люминола. Ранее для этой цели предлагали использовать конъюгаты с белком трансферрином, ответственным за перенос железа в плазме крови [254];
- 4) невысокая растворимость люминола при нейтральных значениях pH в совокупности с высокой полярностью молекулы требуют для увеличения эффективности его использования иммобилизовать люминол в нанореакторе;
- 5) сложность химической модификации люминола для его ковалентного связывания при создании конструкций. Производные люминола довольно дорогостоящие. Кроме того, модификация молекулы люминола часто приводит к понижению активности в хемилюминесцентной реакции [260, 261].

Основным преимуществом люминола является его достаточно высокая стабильность в растворе.

2.5.2.2 Хемилюминесцентная реакция люцигенина

Люцигенин (Таблица 8, 2) используется как сенсор на супероксидный анион-радикал [262, 263], однако он обладает недостатком люминола и H_2DCF : реакция люцигенина протекает через стадию одноэлектронного восстановления, в результате которой образуется радикал люцигенина — источник супероксида (Рис. 24) [177]. Присоединение супероксида к радикалу люцигенина приводит к образованию диоксетана, который самопроизвольно распадается на две возбуждённые молекулы N-метилакридона, испускающие свет [259].

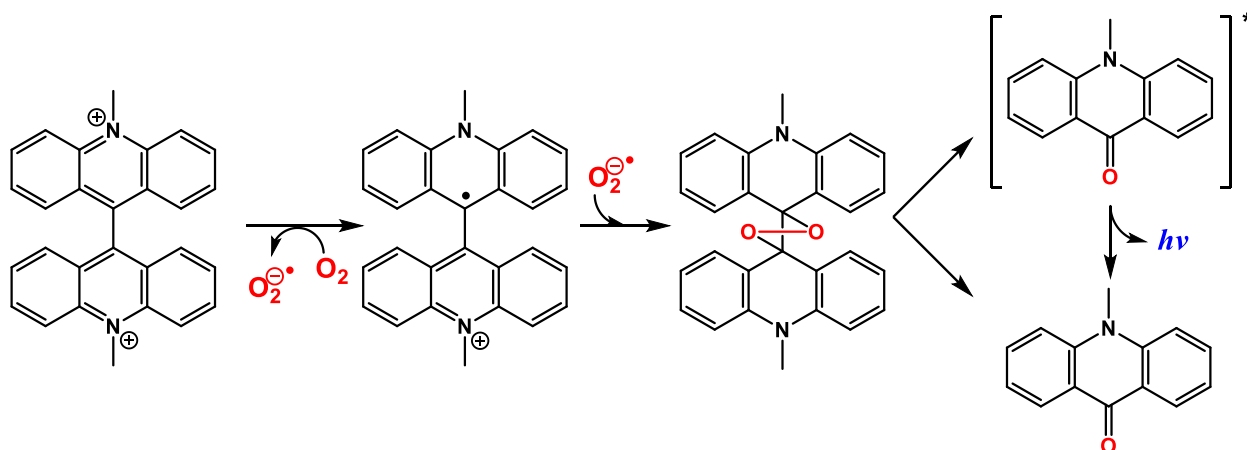


Рис. 24. Механизм хемилюминесцентной реакции люцигенина [177, 259].

В биологических условиях существует очень много источников восстановления люцигенина: NO-синтаза, NADPH-редуктазы, цитохром P450 и др. [177]. Люцигенин значительно усиливает содержание супероксида в лизатах эндотелиальных клеток в присутствии NADH [264]. Поскольку образование супероксида является неотъемлемым побочным процессом генерирования радикала люцигенина, его использование в качестве сенсора на супероксид возможно только в условиях, когда хемилюминесцентного индикатора добавляется очень мало и производимый им супероксид не вносит существенный вклад в общее содержание супероксида в системе. Подбор таких условий является индивидуальным для каждой анализируемой биологической системы [177].

2.5.2.3 Пероксиоксалатная хемилюминесцентная реакция (ПО-реакция)

В последние годы большое внимание привлечено к пероксиоксалатной реакции (ПО-реакция) (Таблица 8, 3) между активными производными щавелевой кислоты (наиболее часто — ароматическими) и перекисью водорода. ПО-реакция протекает через два последовательных акта нуклеофильного замещения, когда происходит атака

неподелённой пары атома кислорода H_2O_2 на карбонильный атом углерода сложноэфирной ($\text{X}=\text{O}$) или амидной связи ($\text{X}=\text{NR}$, где R — заместитель) (Рис. 25) [265].

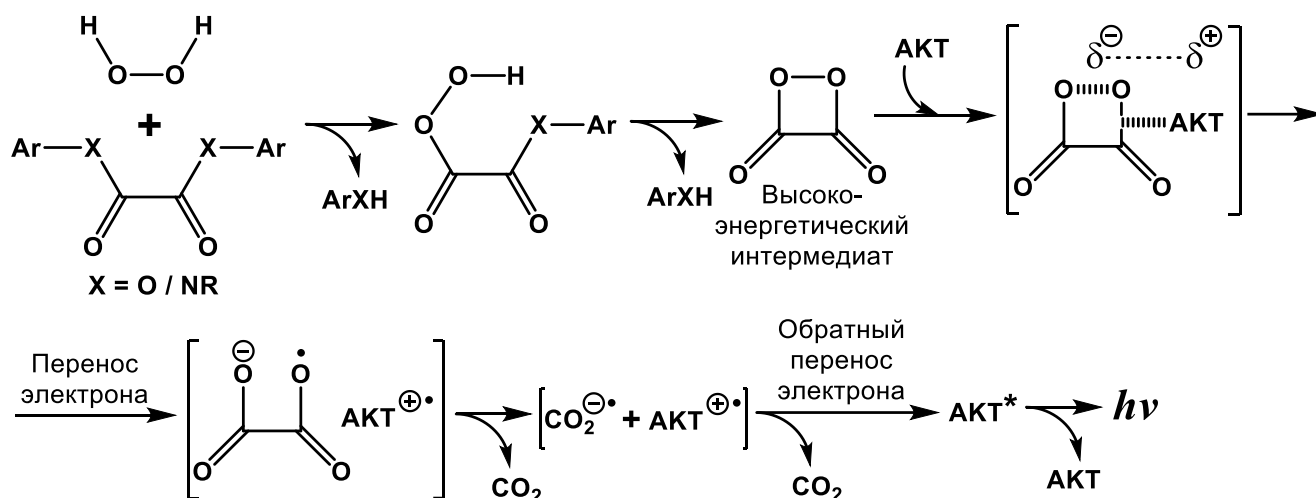


Рис. 25. Механизм пероксиоксалатной хемилюминесцентной реакции.

В результате образуется четырёхчленный циклический высокоэнергетический интермедиат 1,2-диоксетандион, который не способен самостоятельно испускать квант света, однако в присутствии молекул активаторов, роль которых чаще всего выполняют полиароматические флуоресцентные соединения, происходит перенос энергии на активатор. Это приводит к возбуждению активатора и последующему излучению света. ПО-реакция принадлежит к числу активаторных хемилюминесцентных реакций, т.к. для испускания света необходимо присутствие дополнительного участника реакции — эмиттера фотонов. Возбуждение активатора происходит по ступенчатому механизму с химически инициированным электронным обменом [262, 266–268]: сначала происходит образование комплекса 1,2-диоксетандиона с молекулой активатора и разделение зарядов, при этом активатор окисляется. Обратный перенос электрона после высвобождения молекулы CO_2 приводит к генерации возбужденного состояния активатора. Как видно из представленного механизма, эффективность переноса энергии и возбуждения активатора определяется его способностью окисляться и коррелирует с потенциалом окисления (Рис. 26) [267].

Убедительное экспериментальное доказательство образования 1,2-диоксетандиона было получено Ciscato с коллегами [269], которые наблюдали накопление ВЭИ, если активатор вводится в систему с некоторой задержкой по отношению к началу хемилюминесцентной реакции. При этом свет излучался в виде очень узкого и интенсивного пика, причем его интеграл практически совпадал с интегральной

интенсивностью, полученной при одновременном смешении всех реагентов. Этот результат означает, что именно реакция активатора с 1,2-диоксетандионом приводит к генерации света. Существование 1,2-диоксетандиона было также непосредственно подтверждено методом ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, а оксалатного бирадикального интермедиата — с помощью ЭПР-спектроскопии [269, 270].

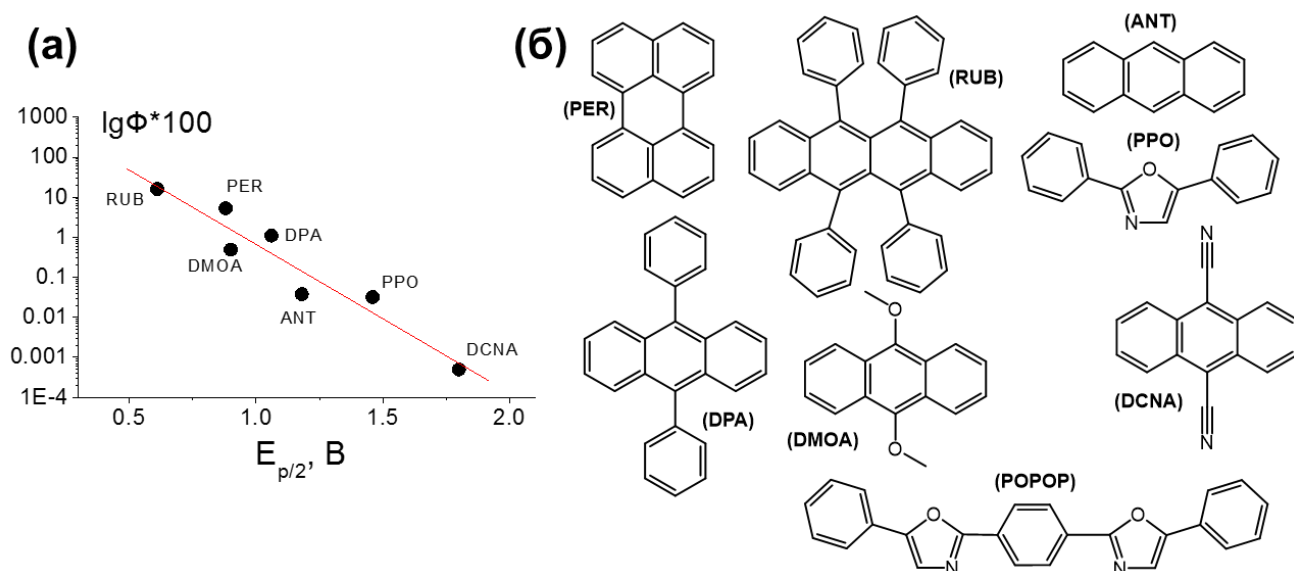


Рис. 26 (а) Корреляция между квантовым выходом пероксиоксалатной реакции и потенциалом окисления активатора. (б) Структуры молекул флуорофоров, наиболее часто используемых в хемилюминесцентных системах.

Нуклеофильная природа первого этапа ПО-реакции обуславливает увеличение константы скорости реакции с ростом электроноакцепторной способности заместителей в уходящей группе Ar-X . Впервые хемилюминесцентная реакция производных щавелевой кислоты с перекисью была осуществлена с использованием оксалилхлорида [271, 272]. Сейчас наиболее часто в качестве хемилюминесцентных производных щавелевой кислоты выступают диарилловые эфиры, содержащие сильные электроноакцепторные заместители: бис-(2,4,6-трихлорфенил)оксалат, бис-(пентахлорфенил)оксалат, бис-(2,4-динитрофенил)оксалат [273]. Их достаточно легко синтезировать, они дают высокий квантовый выход хемилюминесценции, однако очень нестабильны. Среди прочих производных следует выделить диариламины, модифицированные сильными электроноакцепторными группами по амидным атомам азота, у которых заместитель R представлен остатком трифторметансульфоната (трифлатом) [274, 275]. Например, бис(N -трифторметилсульфонил)оксамид, для которого квантовый выход хемилюминесценции составляет 0.34, является самым эффективным синтетическим хемилюминесцентным соединением. Высокой

эффективностью обладает также циклический *N,N*-бис-тозил-1*H*,4*H*-хиноксалин-2,3-дион [276]. Однако с ростом реакционной способности по отношению к пероксиду водорода одновременно возрастает активность и в реакциях с другими нуклеофилами, например, с водой. Таким образом, это ограничивает использование ПО-реакции с участием активных оксалатов и оксамидов в водных средах по причине гидролиза.

Особенностью гидролиза оксалатов и оксамидов является значительное уменьшение (около 3 порядков) констант гидролиза при переходе от первой к второй уходящей группе [277]. Это объясняется тем, что щавелевая кислота достаточно сильная ($pK_{a1}=4.28$, $pK_{a2} = 1.27$ [278]) и при гидролизе одной сложноэфирной/амидной связи образовавшийся карбоксил существует в анионной форме. Сложноэфирная и амидная группы являются сильными акцепторами электронов по отношению к соседней карбоксильной группе щавелевой кислоты, тогда как карбоксилат таким свойством уже не обладает, поэтому гидролиз по второй ступени происходит значительно медленнее. Соотношение между константами скоростей гидролиза по двум ступеням хорошо соответствует различиям почти на 3 порядка между двумя pK_a щавелевой кислоты [278].

Продуктами гидролиза являются соответствующие фенолы или анилины для ароматических уходящих групп. В литературе описано большое число хемилюминесцентных оксалатов и оксамидов с заместителями, увеличивающими их растворимость за счет, например, введения диссоциирующих групп или олигомерных фрагментов полиэтиленгликоля [279–281]. Помимо низкомолекулярных оксалатов, в литературе сообщается о синтезе нескольких полимеров, содержащих оксалатные фрагменты. Подробнее полимерные оксалаты рассмотрены в главе 2.5.7.

Одним из ключевых преимуществ ПО-реакции является почти полная селективность субстратов реакции к пероксиду водорода. Константа скорости реакции с пероксидом превосходит константу реакции с органическими пероксидами на 3 и более порядков [273]. Интенсивность хемилюминесценции более чем на порядок выше для пероксида водорода, чем для супероксида, тогда как для остальных АФК детектируемый сигнал пренебрежимо мал [251], [83].

Кинетика ПО-реакции

Кинетическая кривая испускания света в ходе ПО-реакции в отсутствие побочных процессов описывается следующим уравнением:

$$I_t = \frac{d(h\nu)}{dt} = \frac{M \times k_1}{k_1 - k_2} (e^{-k_2 t} - e^{-k_1 t}), \quad (10)$$

где константы k_1 и k_2 описывают, соответственно, участки подъёма и спада на кинетической кривой, M — максимальная концентрация высокоэнергетического интермедиата [282, 283]. Константа k_1 описывает скорость переноса энергии с интермедиата на молекулу активатора, а k_2 соответствует константе скорости расходования оксалата. В том случае, когда, помимо ПО-реакции, оксалат расходуется в процессе гидролиза, эта константа включает в себя оба процесса.

Пероксиоксалатные хемилюминесцентные реакции катализируются по механизмам общего основного и нуклеофильного катализа. При использовании сильных нуклеофилов, таких как имидазол, оба механизма реализуются одновременно, т.к. выступающие в роли катализаторов соединения обладают, как правило, как основными, так и нуклеофильными свойствами [284].

Согласно первому механизму, катализатор выполняет роль основания, превращая перекись водорода в перекисный анион, который является более сильным нуклеофилом. Скорость его взаимодействия с производным щавелевой кислоты выше, чем скорость реакции перекиси. Также стадия циклизации с образованием 1,2-диоксетандиона ускоряется акцепторами протонов, роль которых выполняют основные катализаторы.

На первой стадии механизма нуклеофильного катализа происходит нуклеофильное замещение с образованием производного щавелевой кислоты, заместители в котором представлены остатками катализатора. Такое производное обладает большей реакционной способностью по отношению к перекиси, поэтому ускоряется образование 1,2-диоксетандиона.

Таким образом, эффективность катализатора определяется его основностью, нуклеофильностью и способностью выступать в качестве уходящей группы. Часто роль катализатора выполняет триэтиламин, соли фталевой и салициловой кислот, пиридин, пирозин, трис-(гидроксиметил)аминометан (TRIS), однако наибольшую эффективность проявляет имидазол. Катализ пероксиоксалатных хемилюминесцентных реакций имидазолом хорошо изучен [265, 283, 285–287]. Для действия имидазола предложена расширенная кинетическая схема [283], согласно которой на первой стадии образуется оксалил-N,N'-диимидазол быстро образующий при реакции с перекисью водорода 1,2-диоксетандион (Рис. 27) [265], [283]. Структуры переходных состояний для стадий II и III

представлены ниже. Таким образом, имидазол проявляет себя и как нуклеофильный, и как общий основной катализатор.

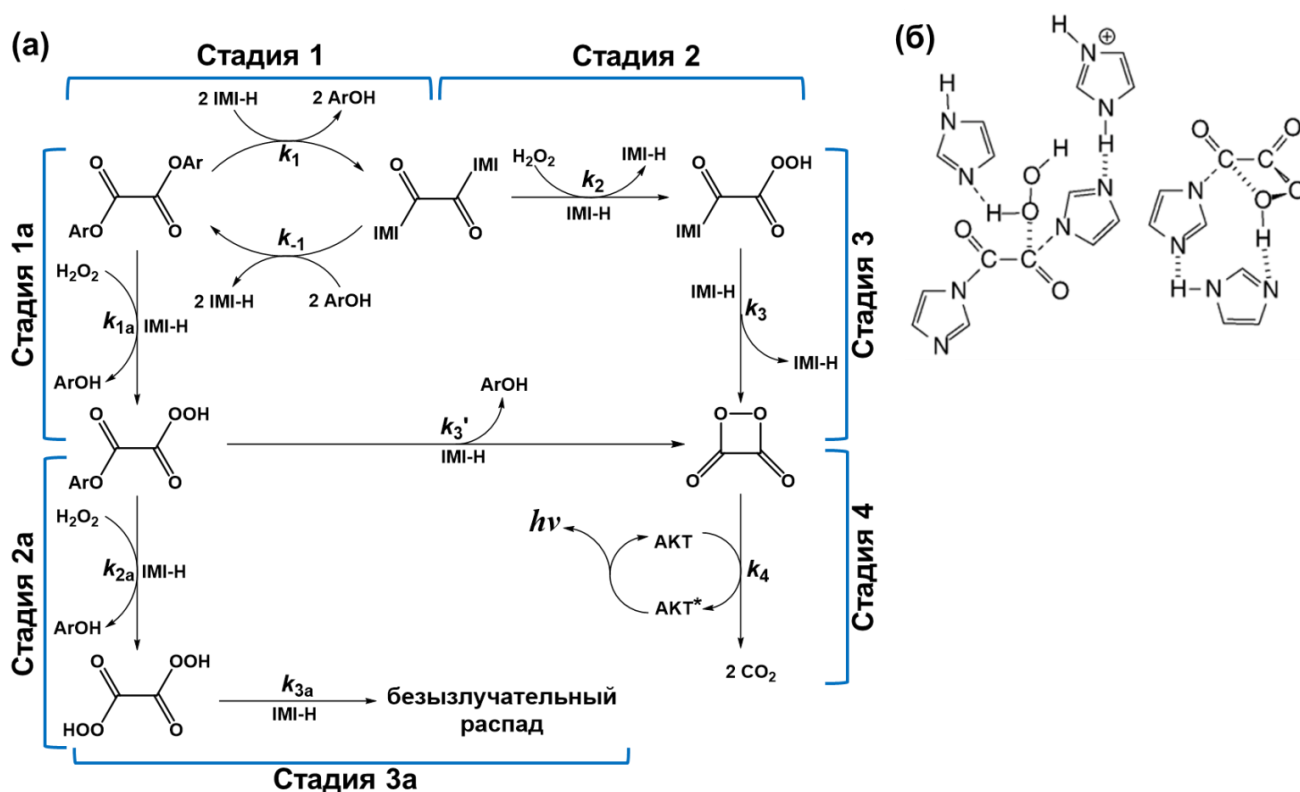


Рис. 27. Имидазол как катализатор ПО-реакции [265]. (а) Кинетическая схема ПО-реакции при катализе имидазолом. (б) Структуры переходных состояний для стадий II и III.

2.5.2.4 Хемилюминесцентная реакция лофина

Лофин (2,4,5-трифенил-1H-имидазол) и его аналоги (Таблица 8, 4) вступают в хемилюминесцентную реакцию с перекисью водорода в щелочной среде в присутствии катионов металлов (например, Cu²⁺ [288]). Он известен как первое синтетическое хемилюминесцентное органическое соединение [289]. В щелочной среде лофин также реагирует с молекулярным кислородом, а также с синглетным кислородом в результате активации фотосенсибилизатора метиленового голубого [290]. Как известно, в присутствии ионов переходных металлов пероксид водорода образует супероксид и гидроксил-радикал, поэтому наиболее вероятно, что реакция протекает именно с этими частицами, прежде всего с супероксидом, т.к. он способен образовать диоксетан [288].

Условия реакции, несовместимые с внутриклеточными измерениями, ограничивают сферу использования хемилюминесцентной реакции лофина биологическими жидкостями, клеточными лизатами и др. Эту реакцию можно использовать для определения катионов меди [288], кобальта [291] и некоторых других переходных

металлов, т.к. в их отсутствие реакция протекает чрезвычайно медленно. Среди аналогов наиболее распространены имидазолы с 2-фурильными, 2-пиридильными и различными замещёнными фенильными заместителями [288], [290], [291] (Таблица 8).

2.5.2.5 Билюминесцентные реакции люциферинов

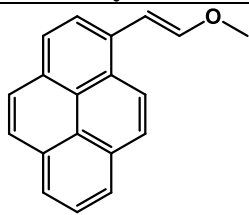
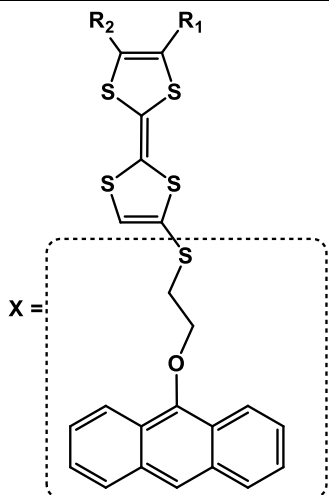
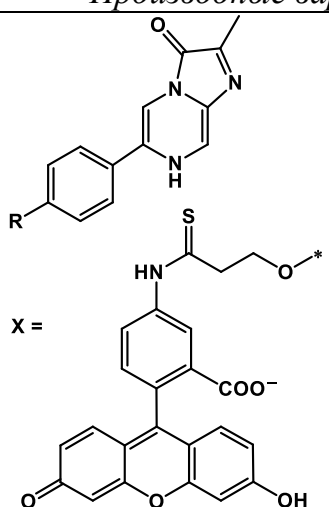
Из всех хемилюминесцентных реакций следует выделить в отдельную группу билюминесцентные реакции. В отличие от остальных реакций, биогенным субстратом которых являются, как правило, АФК, билюминесцентные реакции протекают ферментативно. В соответствующих организмах люциферины окисляются кислородом под действием специальных ферментов — люцифераз. Иногда оксилюциферин выступает в роли донора энергии по механизму FRET для флуоресцентных белков, например, GFP [292].

Одной из наиболее известных билюминесцентных систем является окисление люциферина (Таблица 8, 5) в присутствии фермента люциферазы, которое обуславливает билюминесценцию некоторых организмов, например, светлячков, жуков-щелкунов, кишечнорастворимых *Renilla*, некоторых бактерий и морских существ. Люциферины это класс веществ, которые сильно различаются по структуре в зависимости от организма, в котором они синтезируются, однако для всех люциферинов характерно образование промежуточного возбуждённого продукта, оксилюциферина, в результате ферментативного окисления триплетным кислородом. Одними из наиболее хорошо изученных билюминесцентных реакций являются реакции окисления люциферина светлячка (5.1) и коэлектратора (5.2) [293].

2.5.3 Хемилюминесцентные индикаторы для определения синглетного кислорода

Частным случаем АФК является синглетный кислород, который также можно детектировать с помощью хемилюминесцентных подходов. Для решения этой задачи используют другие хемилюминесцентные реакции по сравнению с теми, которые были рассмотрены выше. Это обусловлено тем, что для синглетного кислорода характерна крайне высокая реакционная способность, а также иная химия, обусловленная наличием как неподеленной электронной пары, так и вакантной орбитали. Ниже показаны основные хемилюминесцентные ловушки синглетного кислорода (Таблица 9).

Таблица 9. Хемилюминесцентные индикаторы для определения синглетного кислорода

№	Название ловушки	Структурная формула ловушки	Побочные реакции	
1	MVP (транс-1-(2'-метоксивинил) пирен)		Специфичен к ¹ O ₂ , можно определять концентрации синглетного кислорода порядка μM [172, 294]	
2	Производные тетратиафульвалена			
2.1	4,4'(5')-бис[2-(9-антрилокси) этилтио] тетратиафульвален (R ₁ /R ₂ =X, H; R ₂ /R ₁ =H)		Высокая селективность к синглетному кислороду, предел обнаружения порядка 1 мкМ в полярных средах, на 1-2 порядка ниже в неполярных средах [295–297]	
2.2	4,5-диметилтио-4'-[2-(9-антрилокси) этилокси] тетратиафульвален (R ₁ =R ₂ =SMe)			
3	Производные варгулина			
3.1	CLA (R=H)		Также реагируют с супероксидом [151, 297]	
3.2	MCLA (R=OMe)			
3.3	FCLA (R=X)			
4	Стабильные диоксетаны			
	PG=TBS=SiMe ₂ ^t Bu		Предел обнаружения достигает 5×10 ⁻¹³ М, определение синглетного кислорода в два этапа: 1)	PG отщепляется фторид-анионом [298]
	PG=Ac			PG отщепляется в результате гидролиза под действием эстераз [299]

PG=OPO ₃ H ⁻		образование стабильного диоксетана, 2) запуск хемилюм. реакции снятием группы PG.	PG отщепляется щелочной фосфатазой [300]
PG=Gal (остаток галактозы)			PG отщепляется β-галактозидазой [253]
PG = *—B—O—C(CH ₃) ₂ —O—C(CH ₃) ₂ —O—			PG отщепляется пероксидом водорода [253]
PG=G ₁			PG отщепляется глутатионом [253]

Транс-1-(2'-метоксивинил)пирен (MVP) (Таблица 9, **1**) может использоваться для определения пикомолей синглетного кислорода в химических и биологических системах, что делает его одним из наиболее чувствительных зондов среди известных. Этот высокоселективный хемилюминесцентный зонд не взаимодействует с другими АФК, такими как гидроксильный радикал, супероксидный анион-радикал и перекись водорода [172, 294]. Окисление зонда синглетным кислородом приводит к образованию высокоэнергетического интермедиата, при распаде которого наблюдается хемилюминесценция с максимумом полосы испускания 465 нм (Рис. 28).

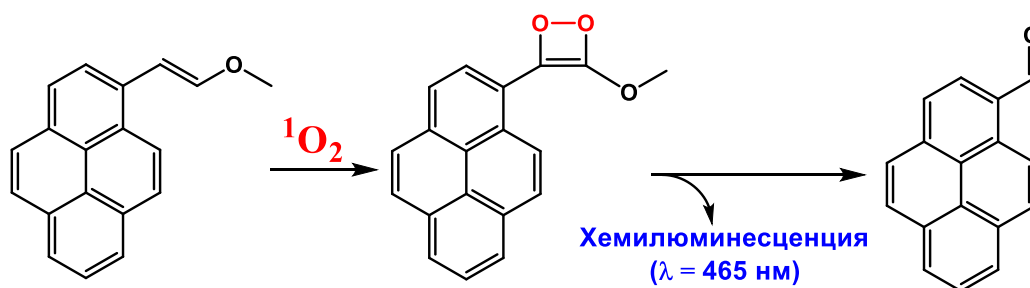


Рис. 28. Схема хемилюминесцентной реакции транс-1-(2'-метоксивинил)пирена с синглетным кислородом.

Замещенные тетрагидрофураны устроены таким образом, что фрагмент тетрагидрофурана выступает в роли сильного донора электронов, тогда как антраценовый флуорофор проявляет отличную селективность и высокую чувствительность по отношению к синглетному кислороду. Превосходные

характеристики этих зондов обусловлены специфичностью антрацена к синглетному кислороду, в результате этой реакции образуется эндопероксид. Донорные свойства тетратиафульвалена усиливают взаимодействие антрацена с $^1\text{O}_2$. Использование этих зондов ограничено их гидрофобностью, поэтому были получены производные, содержащие звенья ПЭГа [301]. Сигнал от реакции с синглетным кислородом как минимум на два порядка выше, чем в случае супероксида, пероксида водорода и гидроксильного радикала. Предел обнаружения этих ловушек понижается при переходе от неполярных сред (50% ТГФ/ H_2O) к полярным (20% $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$), изменяясь от 76 нМ до 1 мкМ синглетного кислорода, соответственно [296, 301]. В данных работах не продемонстрировано использование таких соединений для определения синглетного кислорода в живых клетках, однако нет сомнения, что характеристики этих зондов позволят их использовать *in vitro* и *in vivo*.

Другое важное семейство хемилюминесцентных индикаторов синглетного кислорода состоит из варгулина — люциферина ракообразных *Vargula hilgendorffii* и его производных. Эти вещества реагируют с синглетным кислородом, образуя диоксетан, который распадается с образованием возбужденного карбонильного соединения. Однако в аналогичную реакцию вступает и супероксид, поэтому недостаточная селективность представляет собой главный недостаток этих систем [151].

Принципиально иным подходом к хемилюминесцентному детектированию синглетного кислорода является использование ловушек, образующих с ним стабильные диоксетаны, хемилюминесценцию которых затем можно активировать отщеплением защитной группы (Рис. 29) [151].

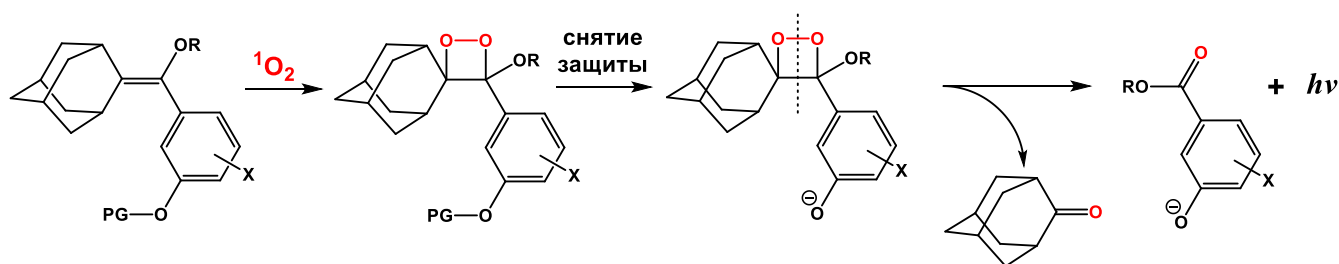


Рис. 29. Хемилюминесцентный способ определения синглетного кислорода на основе стабильных диоксетанов. PG — защитная группа.

Основным примером таких систем являются производные спироадамантил-замещенных виниловых эфиров, содержащих, к примеру, диметил-трет-бутилсилильную защиту, легко удаляемую фторид-ионами [298], ацетильную защиту, отщепляемую эстеразами [299], или фосфатную защиту, являющуюся субстратом щелочной фосфатазы

[300]. Такие ловушки позволяют определять концентрации синглетного кислорода ниже 1 пМ [151]. Сначала в образце аккумулируется стабильный 1,2-диоксетан, концентрацию которого затем можно рассчитать, запустив хемилюминесцентную реакцию добавлением реагента, снимающего защитную группу, и измерив количество выделившегося света.

Этот подход оказался достаточно гибким, позволив расширить возможности системы несколькими способами. Во-первых, были получены производные, содержащие молекулы широко используемых флуорофоров (флуоресцеина и хинон-цианина), ковалентно связанных с бензольным кольцом (Рис. 29, X = флуорофор) [252]. Перенос энергии с возбужденного продукта реакции на флуорофор приводит к его возбуждению, т.е. спектр испускания можно контролировать выбором флуорофора. Во-вторых, было предложено использовать в качестве заместителя X (Рис. 29) сильные акцепторы электронов, что позволило сдвинуть в красную область спектра максимум испускания, на несколько порядков увеличить квантовый выход флуоресценции и более чем на 3 порядка увеличить эффективность хемилюминесценции [253, 302]. В-третьих, использование различных защитных групп позволило применить эти системы для анализа биологических объектов. Галактозная защитная группа обеспечила чувствительность зондов к β -галактозидазе как *in vitro*, так и *in vivo* на мышах. Также были созданы системы, чувствительные к пероксиду водорода (боронатная защитная группа) , щелочной фосфатазе (фосфатная защитная группа) и глутатиону [252], [253].

2.5.4 Хемилюминесцентные системы как источник возбуждения фотосенсибилизаторов для ФДТ

Впервые такой подход был опробован в 80-х годах для подавления опухолей аденокарциномы молочной железы у мышей [303, 304]. Авторы этих работ применили пероксиоксалатную хемилюминесцентную реакцию активного N,N'-дитрифлил оксамида, содержащего положительный заряд в заместителе, для возбуждения Фотофрина II, коммерческого фотосенсибилизатора, широко используемого в фотодинамической терапии, представляющего собой олигомеры гематопорфирина. Сначала мышам вводили Фотофрин II, а через сутки — систему, состоящую из дисульфированного производного рубрена и оксамида, солюбилизированных в мицеллах поверхностно-активного вещества Deceresol N1. Роль активатора ПО-реакции выполняло производное рубрена, тогда как Фотофрин II возбуждался в результате переноса энергии. Организация компонентов в системе не была изучена. Для генерирования света систему

предварительно активировали добавлением перекиси. Использование данной хемилюминесцентной системы оказалось более эффективным, чем возбуждение Фотофрина II лазером в аналогичных условиях.

Хемилюминесцентную активацию фотосенсибилизатора гиперидина использовали для борьбы с лошадиным вирусом инфекционной анемии, имеющим много сходств с вирусом иммунодефицита человека [305]. Для этого использовали хемилюминесцентную реакцию ферментативного окисления люциферина люциферазой. Оксильюциферин-гиперидин является эффективной парой донора и акцептора при переносе энергии по механизму FRET. Добавление компонентов хемилюминесцентной системы в водный раствор, содержащий вирус, приводило к уменьшению инфицирующей способности на порядок.

Люциферин-люциферазную реакцию также использовали для подавления клеток NIH 3T3, трансфицированных геном люциферазы [306]. Фотосенсибилизатор Бенгальский розовый эффективно возбуждался оксильюциферин-ом в результате переноса энергии по механизму FRET. В оптимальных условиях удавалось добиться гибели 90% клеток. Эффективность реакции сильно зависела от внутриклеточной концентрации АТФ.

Конъюгаты люциферазы и квантовых точек использовали для возбуждения фотосенсибилизатора хлорина е6 против клеток рака кишечника, меланомы и рака легких в культуре [307]. Роль субстрата реакции выполнял особый вид люциферина — коэлютеразин. Добавление его к раствору конъюгата приводило к красному свечению, соответствующему испусканию квантовых точек. В опытах *in vitro* клетки сначала обрабатывали хлорином е6, а затем к ним добавляли конъюгаты и коэлютеразин. В условиях кратковременной инкубации конъюгатов с клетками частицы преимущественно находились вблизи клеточной поверхности, но не проникали в цитозоль, но вызывали гибель клеток, пропорциональную концентрации добавленных частиц. В работе приводятся подробные расчеты интенсивности облучения и количества фотонов при использовании лазера и хемилюминесцентной реакции. С использованием флуорогенных зондов H₂DCF-DA и SOSG было показано, что хемилюминесцентное возбуждение хлорина е6 сопровождалось образованием АФК, в том числе синглетного кислорода. Использование данных конструкций *in vivo* позволило замедлить рост опухолей у мышей, разрушить лимфатическую структуру лимфоузлов и метастазирующие в них клетки,

уменьшить число клеток меланомы. Использование квантовых точек является серьёзным недостатком данной системы из-за невозможности их деградации и вызываемой токсичности [308].

Laptev с соавторами предложили хемилюминесцентную систему на основе люминола, проявляющую выраженный фототоксический эффект в культурах клеток мышинной гибридомы и лейкемии [254]. Конъюгат фотосенсибилизатора — гематопорфирина — с трансферрином, направленный на повышение селективности к опухолевым клеткам, содержащим повышенное количество рецепторов на данный белок, обеспечил семикратное увеличение эффективности по сравнению со свободным порфирином. Кроме того, трансферрин является переносчиком ионов железа, необходимых для катализа окисления люминола. Высокая селективность локализации фотосенсибилизатора необходима для преодоления одного из наиболее значительных побочных эффектов ФДТ — повышенной фоточувствительности. Эта работа впервые продемонстрировала возможность провести внутриклеточную хемилюминесцентную реакцию с эндогенными АФК.

Целью одной из работ являлось сравнение эффективности хемилюминесцентного возбуждения различных фотосенсибилизаторов (флуоресцеина, эозина, метиленового голубого, гиперицина и фталоцианина) с помощью реакции окисления люминола или фталгидразида по способности подавлять рост различных штаммов бактерий и нескольких линий животных клеток [309]. Для активации хемилюминесценции пероксид водорода и сульфат меди в качестве катализатора добавляли прямо в суспензию бактерий или клеток. Актуальность данной работы вызывает большие вопросы, учитывая, что все компоненты системы добавляли к клеткам, а также то, что экспериментальные точки для фталгидразида и люминола оказались очень близки.

Обработка клеток рака кишечника в культуре 5-аминолевулиновой кислотой, являющейся предшественником в синтезе биогенного протопорфирина IX, а затем люминолом и сульфатом железа (II) приводило к повышенной цитотоксичности, однако не позволяло полностью подавить рост клеток [310].

Итак, анализ литературы показывает, что хемилюминесцентные реакции могут использоваться для подавления опухолей как *in vitro*, так и *in vivo*. Однако при этом эффективность описанных систем невелика. Можно предположить, что потенциал данных систем используется далеко не в полной мере, т.к. наиболее привлекательная

особенность хемилюминесцентных систем, заключающаяся в возможности избирательного воздействия на клетки с повышенной продукцией АФК, используется лишь в одной из цитируемых работ [254]. В настоящей диссертации была предпринята попытка заполнить этот пробел.

2.5.5 Полимерные нанореакторы для использования хемилюминесцентных реакций в биологических системах

Рассмотрение различных хемилюминесцентных реакций позволяет сделать вывод о том, что ПО-реакция является наиболее гибкой при создании наноразмерных хемилюминесцентных частиц благодаря нескольким факторам. Во-первых, легко варьируемая на стадии синтеза природа используемых субстратов даёт возможность включать оксалаты/оксамиды в нанореакторы как за счёт солюбилизации гидрофобных соединений в нанореакторах, содержащих гидрофобную микрофазу, так и за счёт ковалентного связывания оксалатных/оксамидных фрагментов с полимерным носителем. Во-вторых, оксалатные/оксамидные звенья могут быть объединены в полимерной цепочке. Более того, совместная локализация компонентов ПО-реакции является первостепенным требованием для достижения высокой эффективности реакции, что делает необходимым использование нанореакторов.

В литературе представлены 3 основные типа полимерных нанореакторов типа «ядро-оболочка», содержащие гидрофобную микрофазу для включения в её состав гидрофобных компонентов ПО-реакции.

Первой группой являются твёрдые полимерные частицы, полученные методом упаривания неполярного растворителя эмульсии. Таким способом из эмульсии дихлорметан/вода, гомогенизированной ультразвуком, были получены совместные частицы полиоксалата на основе 4-гидроксibenзилового спирта и 1,8-октандиола и флуорофора пентацена, стабилизированные поливиниловым спиртом [251].

Наночастицы могут быть получены диспергированием плёнки, сформированной при упаривании раствора всех компонентов нанореактора. Таким способом получали частицы гидрофобных низкомолекулярных веществ – оксалата бис(2-карбопентилокси-3,5,6-трихлорфенил)оксалата (CPPO) и активатора Cu^{2+} . Частицы были покрыты биodeградируемым сополимером лактида и гликолида и стабилизированы плуроником F127 [311].

Развитием этого метода являются твёрдые частицы на основе очень гидрофобных низкомолекулярных оксалатов и флуорофоров, покрытые амфифильным полимером. Этот тип нанореакторов следует отличать от мицелл, т.к. основу ядра мицелл составляют гидрофобные звенья амфифильных сополимеров. В данном же случае низкомолекулярные соединения, составляющие ядро, обеспечивают очень плотную упаковку, формируя нанокристаллы, на поверхности которых адсорбируется амфифильный полимер. Этот подход был использован для создания твердых наночастиц (около 15-25 нм) на основе флуорофоров, люминесценция которых возрастает при агрегации [81], а также флуорофоров, проявляющих свойство твердофазной флуоресценции без типичного самотушения при агрегировании [82]. В обоих случаях оксалат и флуорофор, по всей видимости, были выбраны таким образом, чтобы их молекулы могли плотно упорядоченно упаковываться и образовывали совместные нанокристаллы. Флуорофоры на основе 9,10-дистирилантрацена, содержащие очень жесткие объёмные заместители имеют определенное структурное сходство с оксалатом CPPO.

Другим способом получения твёрдых полимерных наночастиц является метод наноосаждения. Так, чрезвычайно гидрофобные полупроводниковые полимеры-активаторы осаждали из совместного раствора с бис(2,4,6-трихлорфенилоксалатом) (ТСРО) и плуроником F127 в ТГФ быстрым впрыском в воду. Наночастицы (10-25 нм) сохраняли размер в водном растворе в течение как минимум 60 дней [83]. Спектры поглощения и флуоресценции для такой системы оказывались неизменными по меньшей мере в течение суток.

Уже упомянутые мицеллярные нанореакторы представляют собой второй тип нанореакторов. Steijger с сотрудниками исследовал хемилюминесцентную реакцию бис(трихлорфенил с пероксидом водорода в мицеллах различных ПАВ, в качестве которых использовали Тритон X-100, додецилсульфат натрия, Genapol C-100 (кокосовое масло, конденсированное с полиоксиэтиленом со средней степенью полимеризации 10), Arkopal N-90, N-130, N-150 и N-300 (продукты конденсации полиоксиэтилена со средним числом звеньев, равным, 9, 13, 15 и 30, соответственно, и нонилфенолом) и цетилтриметиламмонийбромид (СТАВ). В работе показано, что интегральная интенсивность хемилюминесценции в мицеллах Arkopal N-300, проявившего наибольшую эффективность, сопоставима с интенсивностью в смеси фосфатный буфер-

ацетонитрил (80:20). Таким образом, нерастворимость оксалата в воде может быть преодолена за счет его солюбилизации в мицеллах ПАВ, при этом, согласно результатам, полученным авторами работы, стабильность оксалата по отношению к гидролизу в мицеллярной системе не увеличилась [312]. Также в качестве мицеллообразующего полимера для создания хемилюминесцентных нанореакторов для ПО-реакции использовали биodeградируемый блок-сополимер ПЭГ-поли(ε-капролактон) [43]. Амфифильный гребнеобразный сополимер может содержать оксалатные фрагменты в боковой цепи, выступая одновременно и в качестве мицеллообразующего полимера, и в роли субстрата ПО-реакции [313].

Третьим типом нанореакторов являются микроэмульсии. Нанокapли соевого масла (50-60 нм), содержащие CPPO и производное BODIPY в качестве флуорофора-активатора, стабилизировали плюроником F127 [31]. Для получения таких частиц раствор всех компонентов системы в дихлорметане диспергировали в воде и упаривали органический растворитель.

Несмотря на выдающиеся результаты по чувствительности к пероксиду водорода и визуализации очагов воспаления *in vivo*, с позиции биомедицинского применения твёрдые наночастицы на основе агрегирующих полимароматических соединений [81], [82], [311], [83] вызывают большие сомнения в пригодности для использования в качестве инструмента для диагностики из-за сложности распада наночастиц, невозможности деградации составляющих их веществ в организме и вероятных тяжелых токсических эффектов при ферментативном окислении этих соединений.

Наиболее многообещающими выглядят нанореакторы на основе природных, биodeградируемых и биосовместимых компонентов, не имеющих долгосрочных побочных эффектов, в частности полимерные частицы полиоксалата, стабилизированные ПВС [251]. Все компоненты этой системы, кроме активатора, разрешены к применению для создания лекарственных форм, согласно нормативам агентства по надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA). Перспективны эмульсионные конструкции на основе природных масел и маслоподобных веществ [31], а также наночастицы, на основе биodeградируемых полимеров лактида и гликолида [311] и мицеллы биodeградируемых блок-сополимеров [43]. Использование плюроников, прежде всего гидрофильных (например, F127, F68, L64), также допустимо.

2.5.6 Полимерные оксалаты

Ранее описанные оксалаты полимерного строения выполняют две очень разные роли. Некоторые полиоксалаты способны выступать в роли субстрата ПО-реакции, реагируя с пероксидом водорода. В литературе описано всего несколько таких примеров. Прежде всего, это полиоксалат на основе 4-гидроксibenзилового спирта и 1,8-октандиола, полученный поликонденсацией указанных диолов с оксалилхлоридом [251]. Молекулярная масса полиоксалата составила 8900, $M_w/M_n=2.6$. Несмотря на кажущуюся сравнительно низкую реакционную способность по отношению к пероксиду водорода, этот полиоксалат позволил достичь предела обнаружения около 250 нМ в водном растворе и визуализировать очаги воспаления, индуцированного липополисахаридом, *in vivo* на мышах. Период полупревращения ПО-реакции с 10 мкМ пероксида водорода составил около 25 минут, реакция не требовала добавления катализаторов. Авторам работы не удалось аналогичным образом получить полиоксалат на основе гидрохинона, полиоксалаты на основе 3-(4-гидроксифенил)-1-пропанола обладали низкой стабильностью в водной среде, а полиоксалат, полученный из 1,4-циклогександиметанола, проявлял низкую активность в отношении пероксида водорода.

Другой полиоксалат той же группы авторов был успешно применён для определения пероксида водорода в водном растворе. Он представляет собой гребнеобразный амфифильный сополимер, полученный методом метатезисной полимеризации норборненовых мономеров с раскрытием цикла на катализаторе Граббса. Один тип звеньев содержал в качестве боковой цепи короткие цепочки ПЭГа, а другой — несимметричный оксалатный фрагмент, образующий сложные связи с 5-норборнен-2-метанолом и фенолом [313]. Полученный полимер имел молекулярную массу 35000 (M_w/M_n 1.5), в водном растворе формировал мицеллы размером около 30 нм и обеспечил предел обнаружения пероксида водорода 50 нМ. По квантовому выходу ПО-реакции несимметричное оксалатное звено этого полимера лишь незначительно уступало бисфенилоксалату.

Несмотря на то, что авторам работ [251, 313] удалось добиться высокой чувствительности определения перекиси водорода, в данных работах не исследовалось влияние полимерной природы оксалатов и их молекулярной массы на их способность реагировать с перекисью водорода. В данных работах также не исследовалось влияние

степени полимеризации полиоксалатов на их стабильность по отношению к гидролизу в водной среде.

Другая группа полиоксалатов представляет собой очень перспективные биodeградируемые полимеры для различных биомедицинских применений от имплантов до средств доставки лекарств. В качестве бифункциональных мономеров для поликонденсации с оксалилхлоридом часто используется 1,4-циклогександиметанол и 4-гидроксibenзиловый спирт. Типичная молекулярная масса такого полиоксалата составляет 25000 (M_w/M_n 1.8) [314]. При включении его в состав частиц (диаметр около 500 нм), полученных упариванием органического растворителя из эмульсии дихлорметан/вода, он проявляет антиоксидантные свойства, снижая уровень окислительного стресса в макрофагах, стимулированных липополисахаридом, а также подавляя воспаление благодаря биологически активному действию 4-гидроксibenзилового спирта [314]. Также полимер подавлял воспаление легких у мышей [315]. Полимер в результате гидролиза полностью расщепляется до щавелевой кислоты и исходных мономеров, которые не проявляют токсичности. Полиоксалат на основе 1,4-циклогександиметанола (масса 11000, M_w/M_n 1.8) в составе частиц, стабилизированных ПВС и полученных аналогичным образом, оказался значительно менее токсичен по отношению к клеткам макрофагов и почек в культуре, чем сополимер лактида и гликолида [316]. Аналогичный полиоксалат ($M_w=15000-23000$) использовали для инкапсулирования бычьего сывороточного альбумина методом двойной эмульсии, что позволило достичь 80%-ной эффективности загрузки белка, однако скорость вытекания белка из таких частиц в разы выше, чем в случае поли(ϵ -капролактона) и сополимера лактида и гликолида из-за меньшей стабильности полиоксалата к гидролизу. Период полураспада полимера в результате гидролиза при pH 7.4 составил 6.5 суток [317].

Таким образом, полиоксалаты, описанные в литературе, проявляют антиоксидантные свойства, поэтому не могут быть использованы для создания системы для химического возбуждения фотосенсибилизаторов и генерирования синглетного кислорода, т.к. этот подход призван оказывать прооксидантное воздействие.

Решением этой проблемы может стать использование в качестве мономера для полиоксалата диола, проявляющего прооксидантные свойства. К числу таких соединений относится бисфенол А, который способствует росту содержания внутриклеточного

пероксида водорода и митохондриального супероксида. за счёт образования активных феноксильных радикалов при окислении [318].

2.5.7 Заключение главы 2.5

Сопоставление преимуществ и недостатков хемилюминесцентных реакций, рассмотренных выше, позволяют заключить, что ПО-реакция по ряду причин является более предпочтительной для решения различных биомедицинских задач, в том числе задачи настоящей работы — возбуждения фотосенсибилизатора для ФДТ за счёт реакции субстрата с эндогенными АФК. Прежде всего, ПО-реакция проявляет чрезвычайно высокую селективность в отношении пероксида водорода по сравнению с другими АФК. Содержание пероксида водорода в клетках является наибольшим среди всех АФК. Кроме того, природа ПО-реакции позволяет использовать самые разные активаторы хемилюминесценции с различными спектральными характеристиками, в т.ч. фотосенсибилизаторы. Однако, при реализации данного подхода необходимо учесть несколько особенностей ПО-реакции: 1) уязвимость оксалатов и оксамидов к гидролизу; 2) необходимость совместной локализации производного щавелевой кислоты и фотосенсибилизатора в едином нанореакторе; 3) упаковка оксалата/оксамида, по всей видимости, играет ключевую роль в достижении высокой эффективности ПО-реакции.

Возбуждение фотосенсибилизаторов с помощью энергии химических реакций с биогенными АФК как маркерами раковых опухолей является крайне актуальной задачей, т.к. может позволить преодолеть ограничения ФДТ. На данный момент этот подход не был реализован с использованием ПО-реакции, однако имеет большой потенциал из-за ряда уже упомянутых преимуществ этой системы. Примеры реализации данного подхода, описанные в литературе подчёркивают его уникальные возможности и широкие перспективы использования, однако всё же далеки до решения поставленной задачи и требуют проведения дополнительных исследований в данной области. В имеющихся на настоящий момент работах, посвященных полиоксалатам, не исследовалось влияние полимерной природы субстрата ПО-реакции на ее эффективность. Не исследованной осталась и зависимость стабильности полиоксалатов по отношению к гидролизу в водной среде от их молекулярной массы.

3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 МАТЕРИАЛЫ И ОЧИСТКА РЕАКТИВОВ

В работе были использованы следующие коммерческие препараты амфифильных полимеров: триблок-сополимеры этиленоксида (ЭО) и пропиленоксида (ПО) Плюроники L61 ($\text{EO}_2\text{PO}_{30}\text{EO}_2$) «BASF» (США) **(1)**, L64 ($\text{EO}_{13}\text{PO}_{30}\text{EO}_{13}$) «Sigma» (США) **(2)**, F68 ($\text{EO}_{76}\text{PO}_{30}\text{EO}_{76}$) «Serva» (Германия) **(3)**, а также чередующийся сополимер диметилсилоксана (ДМС) и этиленоксида ($(\text{ДМС-ЭО})_7$), 700 («Polysciences», США) **(4)**.

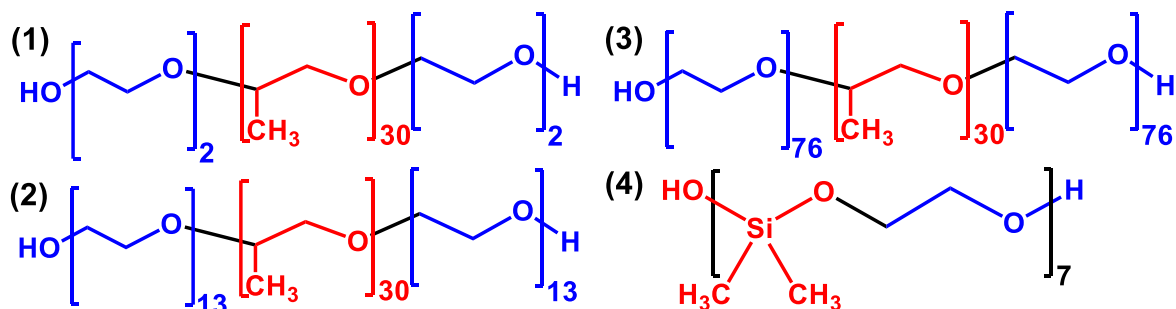


Рис. 30. Химические формулы полимеров: (1) плюроник L61, (2) плюроник L64, (3) плюроник F68, (4) чередующийся сополимер диметилсилоксана и этиленгликоля (ДМС-ЭО)₇.

Указанные амфифильные сополимеры, фенолы для получения низкомолекулярных оксалатов (фенол, пентахлорфенол, 4-нитрофенол) а также мономеры для синтеза полиоксалата, олигопропиленоксид ППО425 ($M=425$), олигопропиленоксид ППО400 ($M=400$) и бисфенол А перед использованием сушили от воды, подвергая трём циклам азеотропной отгонки бензола из их растворов (примерно 3×20 мл бензола на 1 г вещества) на роторном испарителе.

Поли-N,N-диметиламиноэтилметакрилат ($M_n = 17500$ г/моль, $M_w = 34200$ г/моль, $M_w/M_n=1.9$) был синтезирован ранее в нашей лаборатории путем полимеризации в толуоле с использованием ДАК в качестве инициатора и использовался без дополнительной очистки.

Фенол («Реахим», Россия) перегоняли в вакууме водоструйного насоса и хранили в темноте в присутствии осушителя.

Пентахлорфенол («Sigma-Aldrich», США) использовали без дополнительной очистки.

4-нитрофенол («Реахим», Россия) перекристаллизовывали из бензола. 4 г 4-нитрофенола растворяли в 30 мл бензола при нагревании почти до 80°C , после чего раствор охлаждали. Выпавшие почти белые (бледно желтые) кристаллы собирали

фильтрованием под вакуумом. Далее кристаллы высушивали в вакуумном сушильном шкафу при комнатной температуре. 4-нитрофенол хранили в темноте без доступа влаги. На свету 4-нитрофенол быстро (в течение нескольких часов) приобретает ярко желтый цвет.

2,2-Дифенилолпропан (бисфенол А, БФА, «Реахим», Россия и «Sigma-Aldrich», США) перекристаллизовывали из хлорбензола. 6 г БФА растворяли в 60 мл моноклорбензола при нагревании и интенсивном перемешивании. Вблизи точки кипения весь бисфенол растворялся без остатка. Раствор упаривали до 50 мл и охлаждали до комнатной температуры. БФА выпадает крупными игольчатыми кристаллами. Хранить БФА надо в темноте без доступа влаги. Отсутствие примеси фенола в очищенном препарате БФА было подтверждено методом ^{13}C -ЯМР. Очистка препарата производства «Sigma-Aldrich» не влияла на результат поликонденсации, поэтому при повторных синтезах она не производилась.

Тетраметилгематопорфирин IX (ТМГП) [диметиловый эфир 8,13-бис(1-метоксиэтил)-3,7,12,17-тетраметил-21Н,23Н-порфин-2,18-дипропионовой кислоты] был любезно предоставлен проф. А.Б. Соловьевой из института Химической физики имени Н.Н. Семенова Российской Академии Наук. Чистота и строение ТМГП были подтверждены при помощи ^{13}C -ЯМР (Рис. 31).

Водные растворы перекиси водорода («Реахим», Россия) стандартизовали иодометрическим титрованием. Люминол, рубрен, менадион (в форме бисульфита натрия), паракват (в форме гидрата гидрохлорида) («Sigma-Aldrich», США), 1,6-дифенилгексатриен (ДФГТ) («Reanal», Венгрия), трет-бутанол (аналитический стандарт для ГЖХ, «Реахим», Россия), реактив Фишера (СП «Титратор», Россия), доксорубицин (в форме гидрохлорида) («Верафарм», Россия), фосфатный буфер (modified Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, PBS), трис(гидроксиметил)аминометан (TRIS) и компоненты буферных растворов («Sigma-Aldrich», США) использовали без дополнительной очистки. Растворы имидазола (pH 7.4) готовили нейтрализацией раствора гидрохлорида имидазола («Sigma-Aldrich», США) добавлением щелочи.

При работе с культурами клеток использовалась культуральная среда **DMEM** (Dulbecco's Modified Eagle Medium), эмбриональная сыворотка быка (**ФБС**, «Invitrogen», США), 0.56 мМ раствор ЭДТА в растворе Хэнкса для ведения клеточных культур, 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолийбромид (**МТТ**) («ПанЭко», Россия) для

спектрофотометрического определения числа выживших клеток, диацетат 2',7'-дихлор-дигидрофлуоресцеина (**H₂DCF-DA**) и пероксидаза хрена («Sigma-Aldrich», США) для определения уровня окислительного стресса в клетках и концентрации перекиси в культуральной среде, Singlet Oxygen Sensor Green (**SOSG**) для определения синглетного кислорода и диgidрохлорид 4',6-диамидино-2-фенилиндола (**DAPI**) для проверки чистоты клеточных культур («Invitrogen», США).

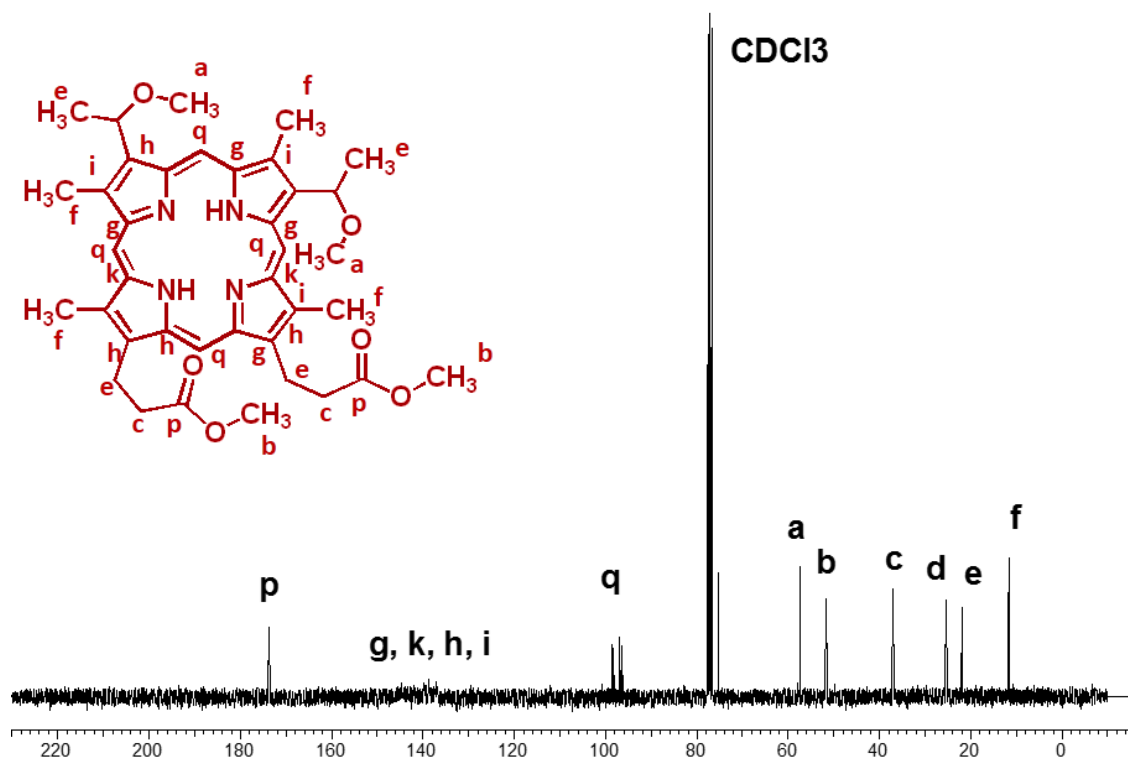


Рис. 31. Формула тетраметилгематопорфирина IX и его ¹³C-ЯМР-спектр в дейтерохлороформе.

Ацетонитрил производства «Sigma-Aldrich» (США) марки «для ВЭЖХ» содержит примесь воды в количестве около 60 мкг/мл растворителя (3.3 мМ). Поскольку это содержание воды сопоставимо с концентрацией оксалатов в запасных растворах, мы обезвоживали этот растворитель по следующей методике. На первом этапе ацетонитрил выдерживали над гидридом кальция без нагревания на мешалке в течение 2 часов, после чего гидрид отделяли фильтрованием на стеклянном пористом фильтре. В том случае, если содержание воды на этой стадии превышало 10 мкг/мл растворителя, к отфильтрованному ацетонитрилу добавляли свежую порцию гидрида кальция и кипятили 3-4 часа с обратным холодильником. В таком препарате в результате гидролиза образуется аммиак, который качественно определяли в растворе с помощью реактива Несслера. Для определения примеси аммиака в ацетонитриле с помощью реактива Несслера к 200 мкл ацетонитрила добавляли 200 мкл дистиллированной воды и 200 мкл

реактива Несслера («Sigma-Aldrich», США). В пробах с содержанием аммиака более 2 мкМ наблюдается желтое окрашивание, которое развивается в течение 2-10 мин, после чего формируется светло-коричневый осадок. В исходном ацетонитриле аммиак практически не определяется, однако после его перегонки над щелочью или гидридом кальция в ацетонитриле появляется большое количество аммиака. После перегонки над пентаоксидом фосфора ацетонитрил не давал реакции с реактивом Несслера. Для удаления следов аммиака и воды в ацетонитрил добавляли небольшое количество (1-2 г на 150 мл) оксида фосфора (V) и перегоняли. Аппарат для перегонки предварительно продували в течение 15 минут сухим аргоном при выключенном потоке воды в холодильнике. Далее в холодильник подавали воду, начиная нагрев системы плиткой и продолжая продувать аппарат еще 15 минут. Осушка аргона производилась пропусканием газа последовательно через две промывалки с концентрированной серной кислотой, трубку с измельченным гидроксидом калия и трубку с ватой для удерживания твердых частиц щелочи. Предгон отбрасывали (около 10 мл). В осушенном ацетонитриле контролировали содержание воды электрометрическим титрованием по Фишеру. В хорошо осушенном ацетонитриле при чувствительности используемой установки для титрования вода не определялась, т.е. после добавления 5 мл растворителя стрелка амперметра не отклонялась. При необходимости повторяли перегонку ацетонитрила над оксидом фосфора (V) еще 1-2 раза

В работе [319] сообщается, что при перегонке над пентаоксидом фосфора ацетонитрил может быть загрязнен следами фосфорной кислоты, поэтому его рекомендуется после пентаоксида фосфора перегонять над тщательно высушенным карбонатом калия. Однако оказалось, что после перегонки над карбонатом калия, высушенным в пламени горелки, а затем в вакууме при 180°C, содержание воды в ацетонитриле увеличивалось от 1.5 мМ до 3.8 мМ. Для того, чтобы оценить содержание фосфорной кислоты в ацетонитриле, перегнанном над пентаоксидом фосфора, мы использовали рН-индикатор нейтральный красный, pK_a феназиновой группы которого составляет около 7. При изменении рН раствора от 6.5 до 7.5 соотношение коэффициентов экстинкции индикатора на длинах волн 450 нм и 530 нм в водном растворе менялось от 0.5 до 3, а в 30% ацетонитриле «Sigma-Aldrich» марки «для ВЭЖХ» — менялось от 0.6 до 1.5. При этом спектральное соотношение индикатора в 30% ацетонитриле, перегнанном над P_2O_5 , составило 1.1, что соответствует концентрации

кислоты 0.1 мкМ. Поскольку это содержание намного меньше концентрации оксалатов в запасных растворах, а реакция оксалатов с перекисью водорода проводится, как правило, в присутствии буфера, отделение следов пентаоксида фосфора путем перегонки над карбонатом калия для решения поставленных задач было признано нецелесообразным.

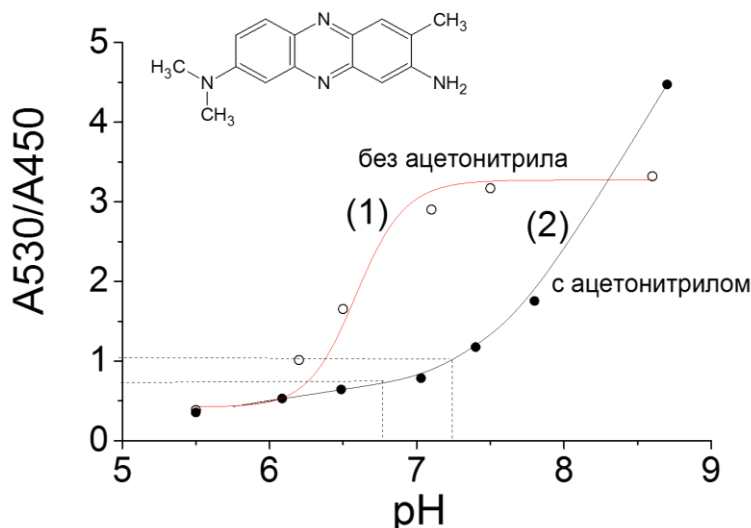


Рис. 32. (а) Зависимость соотношения коэффициентов экстинкции нейтрального красного на длинах волн 530 и 450 нм от pH в воде (1) и в 30% растворе ацетонитрила (2). Пунктиром показано спектральное соотношение индикатора в ацетонитриле, неперегнанном (а) и перегнанном над пентаоксидом фосфора (б) после трехкратного разбавления водой.

Ацетонитрил, в котором вода не определялась, хранили в запаянных ампулах. Использовался метод непродолжительного хранения ацетонитрила в сцинтилляционных флаконах с уплотняющими прокладками на крышке. Резьбу флаконов уплотняли с помощью тефлоновой ленты. Перед использованием эти флаконы тщательно прокаливали в пламени горелки в Бунзена и охлаждали в токе сухого аргона. Такие флаконы помещали в герметичные банки с твердой щелочью и оксидом фосфора (V), наполненные сухим аргоном. Пентаоксид фосфора необходимо менять в банках не реже 1 раза в 3-4 дня.

Диметилфталат («Scharlab SL», Испания) содержал 573 мкг воды на 1 мл растворителя. Для очистки его перегоняли под вакуумом. Аппарат для перегонки предварительно прогревали пламенем горелки, продувая сухим аргоном до полного охлаждения. Содержание воды в исходном диметилфталате и фракциях, полученных в результате перегонки, определяли методом электрометрического титрования по К. Фишеру. В предгоне (около 30%, т. кип. $\sim 100^{\circ}\text{C}$) содержание воды составляло 2140 мкг/мл. Вторая фракция (50-60%, т. кип. $100-160^{\circ}\text{C}$) содержала около 380 мкг/мл воды, а третья (20-30%, т. кип. 170°C) — 170 мкг/мл. Повторная перегонка полученной третьей

фракции не позволила полностью убрать воду из диметилфталата, содержание воды в третьей фракции после повторной перегонки составило около 150 мкг/мл, что указывает на то, что остаточная вода, по всей видимости, образует прочные связи с диметилфталатом, и ее следы не могут быть полностью удалены из растворителя. Можно надеяться, что такая прочно связанная вода с трудом принимает участие в нуклеофильных реакциях, о чем говорит воспроизводимость результатов хемилюминесценции при хранении растворов, приготовленных на основе такого диметилфталата. Хранили в герметичных баночках, которые помещали в герметичные сосуды над щелочью. Для продолжительного хранения запаивали ДМФ в ампулы, которые затем хранили в морозильнике при -80°C .

Тетрагидрофуран (ТГФ) («Реахим», Россия) очищали в два этапа. Вначале его перемешивали над щелочью в течение суток, а затем перегоняли, после чего кипятили над металлическим калием. Спустя несколько часов в растворитель добавляли несколько крупинок бензофенона. Когда раствор приобретал синий цвет, кипячение заканчивали и растворитель перегоняли. Аппарат для перегонки предварительно тщательно продували аргоном и только после заполнения и вытеснения влажного воздуха включали охлаждение в холодильнике, после чего начинали перегонку. Т. кип. 56°C . ТГФ для ГПХ готовили следующим образом. ТГФ перемешивали с щелочью в течение ночи (около 12 часов), а затем либо перегоняли в аппарате для перегонки и далее фильтровали через 0.2 мкм фильтры и дегазировали при активном перемешивании в вакууме водоструйного насоса, либо перегоняли при небольшом вакууме на водоструйном насосе.

Диоксан («Реахим», Россия) очищали также как тетрагидрофуран. Т. кип. $101-102^{\circ}\text{C}$. ТГФ и диоксан непродолжительно хранили в ампулах при -80°C , чтобы избежать накопления органических перекисей.

Диэтиловый эфир (ДЭЭ) («Реахим», Россия) осушали по той же методике, что и ТГФ.

Для синтеза и выделения оксалатов использовали только свежеприготовленные безводные ТГФ, диоксан и ДЭЭ, либо растворители, которые хранились в запаянных ампулах при -80°C не более недели.

Бензол («Реахим», Россия) осушали кипячением с обратным холодильником над металлическим натрием с последующей перегонкой. Бензол для азеотропной осушки веществ хранили в колбе, которую помещали в эксикатор со щелочью.

Оксалилхлорид («Sigma-Aldrich», США) перегоняли при атмосферном давлении непосредственно перед использованием. Аппарат для перегонки предварительно прогревали в пламени горелки и охлаждали в токе сухого аргона. Предгон отбрасывали. Перегнанный оксалилхлорид можно хранить в запаянных ампулах.

Триэтиламин («Sigma-Aldrich», США) кипятили над гидридом кальция в течение 4-6 часов, после чего перегоняли. Для каждого синтеза ТЭА готовили заново.

Определение воды электрометрическим титрованием воды по Карлу Фишеру [320]. Метод определения воды по Карлу Фишеру основан на химических процессах, показанных на Рис. 33. В присутствии воды протекает окислительно-восстановительная реакция между диоксидом серы и иодом, в результате которой диоксид серы окисляется до триоксида серы, а иод восстанавливается до иодида. Триоксид серы образует комплекс с пиридином и другими аминами, который сульфировал метанол с образованием метилсульфата существующего в виде ионной пары. Иодоводород в присутствии основания также дает пару ионов. Ионы, являющиеся результатом реакции воды с реактивом Фишера, обуславливают проводимость раствора и силу тока, регистрируемую микроамперметром.

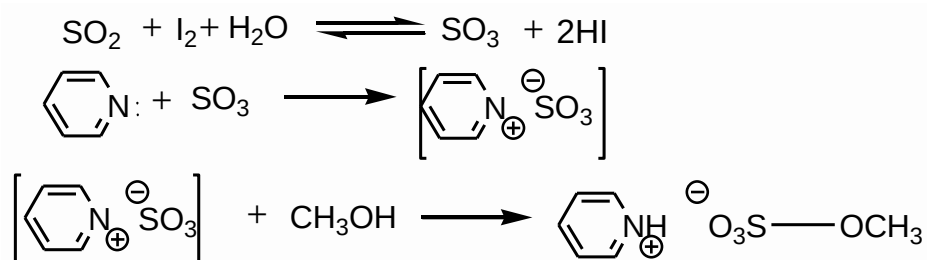


Рис. 33. Схема реакций, на которых основано определение воды по методу К. Фишера.

Схема установки, которая использовалась для электрометрического титрования по Фишеру, приведена на Рис. 34. Бюретку заполняли раствором реактива Фишера и изолировали от влаги воздуха хлоркальциевой трубкой. На конец бюретки через силиконовый шланг присоединяли толстую металлическую иглу, которую через резиновую пробку герметично присоединяли к конической колбе. Колба для титрования имеет дополнительный отвод для добавления пробы, который закрывается хлоркальциевой трубкой, а также два впаянных платиновых электрода. Электроды имеют клеммы снаружи колбы, к которым присоединяются провода электрической цепи. Цепь состоит из источника тока, представляющего собой две батарейки типа ААА,

сопротивления 30 кОм и микроамперметра типа М-24 на 250 мкА. Содержимое колбы во время титрования постоянно перемешивалось при помощи магнитной мешалки.

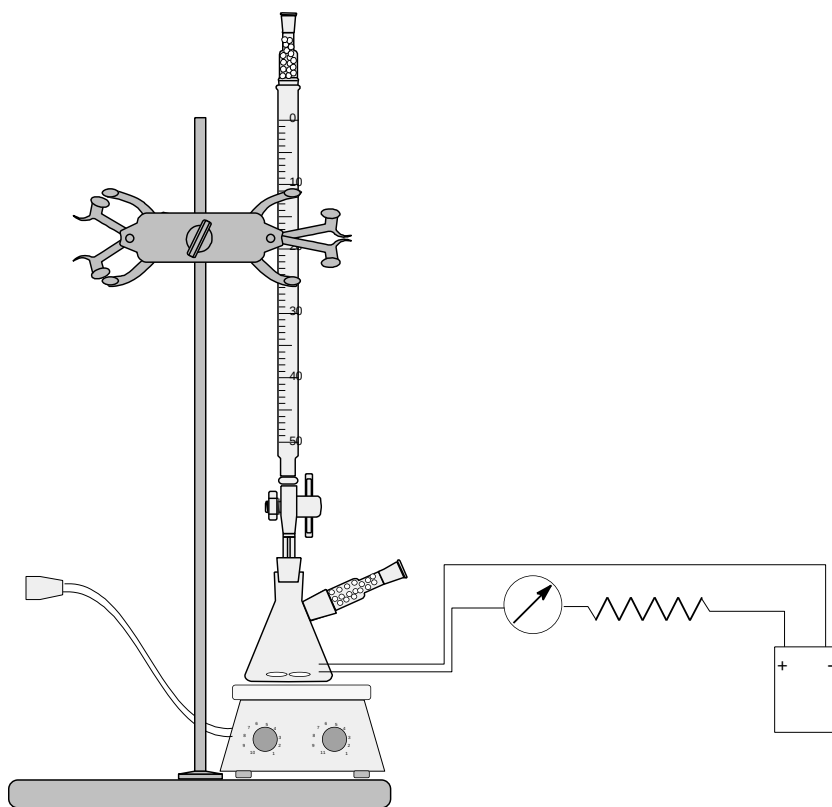


Рис. 34. Схема установки для определения воды по Карлу Фишеру.

Реактив Фишера готовился смешением 1 объема раствора А (диоксид серы в моноэтаноламине) и 2 объемов раствора Б (иод в метаноле). Раствор выдерживали в темноте без доступа влаги, по крайней мере, сутки до использования.

Титрование проводили следующим образом. Сначала в колбу добавляли 5 мл метанола, при этом амперметр показывал слабый ток 10-30 мкА. При добавлении нескольких капель реактива Фишера раствор приобретал желтый цвет и ток возрастал примерно до 80 мкА. Дальнейшее добавление титранта не приводило к существенным изменениям тока вплоть до достижения точки эквивалентности, в которой ток скачкообразно повышается до значения 100 мкА. При этом раствор приобретал чайный (темно-коричневый) цвет. При приближении к точке эквивалентности добавление титранта вели со скоростью 1 капля в 2-3 с.

В оттитрованный метанол добавляли либо известное количество воды для определения титра реактива Фишера, либо аликвоту раствора или растворителя, в которой необходимо определить содержание воды.

Также использовался вариант реализации титрования, когда раствор 1 помещается в колбу с образцом, а раствор 2 — в бюретку. При таком исполнении не требуется дополнительного времени на приготовление реактива Фишера, однако нужно учесть, что раствор 1 добавляется в избытке по сравнению с водой, содержащейся в образце.

Газы. В работе использовали аргон нескольких марок: 1) высокой или особой чистоты, использовали без дополнительной очистки; 2) технический, пропускали через последовательно соединённые промывалки с твёрдой щелочью (KOH), концентрированной серной кислотой и предохранительную пустую промывалку. Углекислый газ (ОСЧ), используемый для культивирования клеток, применяли без дополнительной очистки.

3.2 СИНТЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Синтез бис-(4-нитрофенил)оксалата (БНФО). Реакционную колбу на 50 мл прогревали в пламени горелки и охлаждали в токе сухого аргона. 4-нитрофенол непосредственно перед взвешиванием трижды осушали азеотропной отгонкой бензола. Затем в нее помещали мешалку и 0.95 г (6.8 ммоль) 4-нитрофенола и, продолжая продувать колбу аргоном, погружали колбу в ледяную баню. По окончании охлаждения прекращали подачу аргона и добавляли 20 мл эфира и 0.69 г (0.95 мл, 6.8 ммоль) триэтиламина. Далее при постоянном интенсивном перемешивании к раствору при помощи капельной воронки, закрытой хлоркальциевой трубкой, добавляли 0.29 мл (0.43 г, 3.4 ммоль) оксалилхлорида, разбавленного 10 мл безводного эфира. Прибавление продолжали в течение 20-30 мин, после чего реакционную смесь осторожно нагревали до комнатной температуры и продолжали перемешивание в течение еще 3 часов при комнатной температуре. Затем хлоргидрат триэтиламина отфильтровали на стеклянном пористом фильтре, продукт тщательно экстрагировали избытком эфира (5×40 мл). Объединенный экстракт упарили на роторном испарителе, продукт перекристаллизовали из горячего ацетонитрила. Т. пл. 260-265°C [273].

Синтез бис-(пентахлорфенил)оксалата (БПХФО). Реакционную колбу на 50 мл прогревали в пламени горелки и охлаждали в токе сухого аргона. Затем в нее помещали мешалку и 0.50 г (1.88 ммоль) пентахлорфенола и, продолжая продувать колбу аргоном, погружали колбу в ледяную баню. По окончании охлаждения прекращали подачу аргона и добавляли 20 мл эфира и 0.19 г (0.26 мл, 1.88 ммоль) триэтиламина. Далее

при постоянном интенсивном перемешивании к раствору при помощи капельной воронки, закрытой хлоркальцевой трубкой, добавляли 0.08 мл (0.12 г, 0.94 ммоль) оксалилхлорида, разбавленного 10 мл безводного эфира. Прибавление продолжали в течение 20-30 мин, после чего реакционную смесь осторожно нагревали до комнатной температуры и продолжали перемешивание в течение еще 3 часов при комнатной температуре. Затем выпавший продукт и хлоргидрат триэтиламина отфильтровали на стеклянном пористом фильтре. Осадок очень быстро последовательно промыли 3 мл холодной дистиллированной воды, 3 мл диоксана и 3 мл бензола. Далее осадок диспергировали в бензоле и осушили азеотропной отгонкой бензола 5 раз. От бензола продукт высушивали в течение суток в вакуумном шкафу при комнатной температуре.

Синтез бисфенилоксалата (БФО). В приёмнике взвешивали фенол (1.0 г, 10.6 ммоль), а затем удаляли из него воду трёхкратной азеотропной перегонкой с абсолютным бензолом. Далее в приёмник помещали мешалку, 1.53 мл (1.11 г, 11 ммоль) ТЭА, 5 мл абсолютного ДЭЭ. Колбу, закрытую резиновой пробкой, продували аргоном в течение 5 минут и погружали в ледяную баню. По окончании охлаждения прекращали подачу аргона.

Далее при постоянном интенсивном перемешивании к раствору при помощи капельной воронки, закрытой хлоркальцевой трубкой, добавляли 0.457 мл (0.68 г, 5.3 ммоль) оксалилхлорида, разбавленного 10 мл безводного эфира. Прибавление продолжали в течение 20-30 мин, спустя ещё 1 час реакционную колбу извлекли из ледяной бани и продолжали перемешивание в течение еще 2 часов при комнатной температуре. Затем осадок отфильтровали на стеклянном пористом фильтре, промывая большим избытком абсолютного эфира. Фильтрат желтого цвета (200 мл) концентрировали приблизительно до 5 мл на роторном испарителе, после чего из него выпали белые блестящие игольчатые кристаллы, которые отфильтровали на пористом стеклянном фильтре. Выход составил 0.592 г (46%).

Синтез полиоксалата. Реакционный сосуд прокалили в пламени горелки и охладили в токе сухого аргона до комнатной температуры. Чтобы соблюсти эквивалентность между числом гидроксильных и хлорангидридных групп, 2.38 ммоль (0.302 г, 0.204 мл) легколетучего оксалилхлорида взвешивали в реакционной колбе и добавляли к нему 2 мл свежеприготовленного ТГФ. Колбу незамедлительно герметично закрывали и погружали в ледяную баню на 10 минут. Затем смесь 2.13 ммоль (0.487 г)

бисфенола А, 0.25 ммоль (0.098 г) олигопропиленоксида и 4.76 ммоль триэтиламина (0.662 мл) в 3 мл ТГФ добавляли по каплям в реакционную колбу. Дополнительно 2×1 мл ТГФ использовали для количественного перенесения всех компонентов в реакционную колбу. После завершения добавления колбу инкубировали в ледяной бане в течение получаса и затем реакцию проводили в течение 7 дней при комнатной температуре в темноте.

Использовалось два способа выделения полиоксалата. Первый способ заключается в отделении осадка гидрохлорида триэтиламина фильтрованием реакционной смеси на стеклянном пористом фильтре ПОР16 и последующем тщательным промыванием осадка безводным ТГФ. Фильтрат сушили на роторном испарителе, продукт диспергировали на свежеприготовленном безводном диоксане. Полученную суспензию центрифугировали (12000 об/мин, 15 мин), супернатант собирали, а осадок 2-3 раза тщательно промывали свежими порциями диоксана, растирая вещество при помощи стеклянной палочки. Диоксановые вытяжки собирали и растворитель тщательно упаривали. Для этого использовали роторный испаритель и лиофильную сушку. Наилучший результат был получен с использованием сушки на роторном испарителе при нагревании, т.к. вещество, полученное таким образом, дольше сохранялось при хранении, тогда как лиофильно высушенный образец довольно быстро (в течение месяца) в значительной степени гидролизировался. Выход продукта в различных экспериментах варьировал от 50 до 62%. Для синтеза полиоксалата использовали несколько образцов бисфенола А, однако характеристики полученного продукта хорошо воспроизводились, независимо от того, подвергали бисфенол А очистке или нет.

Второй способ выделения оксалата адаптирован для извлечения всего полимера без фракционирования по растворимости в диоксане. Реакционную смесь центрифугировали 4 раза, каждый раз декантируя раствор и затем тщательно диспергируя осадок (около 2 мл) в 5-6 мл сухого ТГФ. Все супернатанты, содержащие полиоксалат, объединяли и концентрировали на роторном испарителе примерно до 10 мл. Такой раствор далее разбавляли и анализировали методом аналитической ГПХ. Неразбавленный раствор использовали для препаративного разделения полиоксалата на фракции (загрузка колонки составляла около 30 мг в 0.1 мл ТГФ). Для выделения нефракционированного полиоксалата и его фракций, растворы упаривали досуха на роторном испарителе.

ИК: 1750 cm^{-1} (C=O), 1176 cm^{-1} (C-O-C, простой и сложный эфиры).

^1H ЯМР: 1.67 ppm (m, 6H, $\text{C}(\text{CH}_3)_2$); 7.2 и 6.7 ppm (m, 8H, Ar); 1.14, 1.32 ppm (m, 3H, -O-CH₂-CH(CH₃)-O-), 3.63 ppm (m, 3H, -O-CH₂-CH(CH₃)-O-). БФА/ППО = 85/15 (мол.).

3.3 ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Приготовление эмульсий ДМФ/Л64/Н₂О. Плурионик Л64 (количество дозировали на весах), раствор полиоксалата или БФО в безводном ДМФ (от 5 до 30% по массе) и раствор ТМГП в безводном ацетонитриле (0.5 или 5.0 мг/мл) тщательно смешивали в необходимом соотношении (оптимизированный состав Л64/ДМФ/ПОКС/ТМГП 1.0:2.7:0.3:0.013 по массе). Затем к этим смесям быстро добавляли соответствующее количество буферного раствора или культуральной среды, предварительно термостатированных при 37°C, и получали дисперсии путём интенсивного перемешивания с использованием встряхивателя для пробирок VibroFix VF-1 («ИКА», Германия). Концентрация дисперсий в данном пункте и далее приведена в виде концентраций плурионика Л64 при указанных массовых соотношениях компонентов.

Хемилюминесцентные реакции бис-(4-нитрофенил)оксалата и бис-(пентахлорфенил)оксалата с пероксидом водорода в мицеллах полимеров.

Хемилюминесцентная реакция бис-(4-нитрофенил)оксалата и бис-(пентахлорфенил)оксалата с перекисью водорода в мицеллах полимеров проводили следующим образом. В кварцевой кювете или кювете из оптического стекла смешивались растворы в ацетонитриле: раствор 0.5 мг/мл бис-(4-нитрофенил)оксалата, раствор 0.3 мг/мл бис-(пентахлорфенил)оксалата, раствор порфирина (ТМГП) 0.5 или 5.0 мг/мл и раствор полимера 500 мг/мл. В большинстве экспериментов суммарный объем ацетонитрила составлял 160 мкл. Если после смешения всех реагентов, объем ацетонитрильного раствора оказывался меньше, то его доводили до 160 мкл добавлением сухого ацетонитрила.

Отдельно готовили смесь 1820 мкл буферного раствора с требуемым pH и раствора перекиси водорода заданной концентрации. Кювету с раствором реагентов в ацетонитриле помещали в кюветное отделение флуориметра Hitachi 650-10S («Hitachi», Япония), оборудованного ФЭУ R928 («Hamamatsu Photonics», Япония) при выключенной лампе возбуждения. При закрытой крышке кюветного отделения через тefлоновый или полипропиленовый капилляр с помощью полипропиленового шприца впрыскивали

раствор пероксида водорода в буфере, тем самым запуская реакцию. Общий объем реакционной смеси составлял 2.0 мл. Раствор буфера, а также держатель кюветы флуориметра в ходе эксперимента постоянно термостатировали при 37°C. Использовались следующие настройки чувствительности ФЭУ флуориметра: range = 0.1, fine = 7, PM Gain = Norm, PM Response = Norm.

Хемилюминесцентные реакции бисфенилоксалата и полиоксалата с пероксидом водорода в эмульсии ДМФ/L64/H₂O.

Эмульсию готовили в 1.5 мл термостатированного буфера, инкубировали в термостате в течение необходимого времени и перед началом реакции переносили в кварцевую кювету или кювету из оптического стекла, предварительно термостатированную в держателе ячейки флуориметра. Отдельно готовили 500 мкл раствора, содержащего имидазол и пероксид водорода требуемой концентрации. Общий объем реакционной смеси составлял 2.0 мл.

При закрытой крышке кюветного отделения через тефлоновый или полипропиленовый капилляр с помощью полипропиленового шприца впрыскивали раствор пероксида водорода и имидазола в буфере, тем самым запуская реакцию. Раствор буфера, а также держатель кюветы флуориметра в ходе эксперимента постоянно термостатировали при 37°C. Кинетику испускания света измеряли как описано выше, используя следующие настройки чувствительности ФЭУ флуориметра: range = 30, fine = 7, PM Gain = High, PM Response = Norm.

Из-за относительно медленной кинетики даже в присутствии имидазола в качестве катализатора реакцию останавливали в момент 10-кратного уменьшения интенсивности по отношению к максимальной в образце. При очень низкой скорости реакции иногда реакцию заканчивали при достижении интенсивности хемилюминесценции, составляющей 30% от максимума. Для каждой экспериментальной кривой рассчитывали интегральную интенсивность по следующей методике: 1) вследствие шумов прибора из-за низкой интенсивности сигнала и настроек чувствительности усредняли начальный участок кривой (10-20 секунд до добавления образца) и после окончания реакции (10-20 секунд), тем самым получая две точки базовой линии в начальный и конечный момент реакции; 2) вычитали линейную базовую линию, проведенную по двум точкам, предполагая линейную зависимость фона от времени, и тем самым переносили первую точку экспериментальной кривой испускания света в начало

координат; 3) рассчитывали интегральную интенсивность, т.е. площадь под кривой (уравнение 11); 4) производили сглаживание методом скользящей медианы или, используя фильтр Савицкого-Голая, позволяющих получить нешумную кривую, но хорошо описывающих максимум на кривой; 5) определяли значение интенсивности в максимуме, из него рассчитывали сигнал, соответствующий необходимой доли от максимума (обычно 10%), и по сглаженной кривой определяли момент времени, при котором достигалось это значение интенсивности; 6) на зависимости интеграла интенсивности хемилюминесценции от времени, полученной на шаге 3, находили интегральную интенсивность, соответствующую окончанию реакции.

Уравнение для расчёта интегральной интенсивности хемилюминесценции:

$$Q = \int_0^{\tau} I dt, \quad (11)$$

где τ — время достижения необходимой конверсии в ходе реакции.

Такая процедура необходима по нескольким причинам: 1) чтобы учесть изменение приборного фона сигнала во времени; 2) адекватное сравнение различных образцов требует одинаковой конверсии в каждом из них, что обеспечивается одинаковым соотношением сигнала в конечной точке реакции и в максимуме; 3) интегрирование сглаженной и несглаженной кривых приводит к идентичному результату, т.е. шумы не влияют на значение интеграла под кривой, что полностью соответствует литературным данным [321].

Большинство точек на графиках получены усреднением результата обработки трёх экспериментальных кривых.

Солюбилизация ДФГТ. Свежеприготовленный раствор ДФГТ в ацетоне в концентрации 10 мМ разбавляли в 1000 раз фосфатным буфером и интенсивно перемешивали в течение 1-2 часов при комнатной температуре для полного упаривания ацетона. Растворы плуроника L64 и ДМФ, дисперсии L64/ДМФ (1:3 по массе), L64/10% раствор полиоксалата в ДМФ (1:3 по массе), L64/5% раствор полиоксалата в ТГФ (1:4 по массе). Растворы полиоксалата в ДМФ и ТГФ без плуроника смешивали с буфером и последовательно разбавляли непосредственно перед использованием. 0.7 мл каждого образца смешивали с 0.3 мл 10 мкМ раствора ДФГТ и инкубировали в течение 30 минут при 37°C. Интенсивность флуоресценции ($\lambda_{\text{ex}}=366$ нм, $\lambda_{\text{em}}=433$ нм) измеряли на флуориметре при 37°C.

Динамическое светорассеяние (ДСР). Образцы для анализа методом светорассеяния готовили непосредственно перед измерением путём интенсивного взбалтывания смесей L64/ДМФ (1:3), L64/10% раствор полиоксалата в ДМФ (1:3) или L64/5% раствор полиоксалата в ТГФ (1:4.23) после добавления буфера, отфильтрованного от пыли через фильтры из ацетата целлюлозы со средним размером пор 0.2 мкм. Все указанные соотношения являются массовыми.

Автокорреляционные функции и средние интенсивности рассеянного света были получены с использованием гониометра рассеянного лазерного света PhotoCor («PhotoCor Corp.», США). В качестве источника света использовали He-Ne лазер ($\lambda = 633$ нм, 15 мВт). Автокорреляционные функции флуктуации интенсивности рассеянного света (АКФ) измеряли с помощью 288-канального коррелятора FotoCor-SP с логарифмической временной шкалой от 2.5×10^{-8} до 6800 с. Сбор данных для получения АКФ проводили в течение 5-20 минут в зависимости от интенсивности рассеянного света. Анализ АКФ проводили методом регуляризации с использованием программы DynaLS («PhotoCor Corp.», США) для получения распределений рассеивающих частиц по коэффициентам диффузии. Величины гидродинамических радиусов рассчитывали с использованием уравнения Стокса в приближении сферических частиц:

$$D_0 = \frac{kT}{6\pi\eta R_h}. \quad (12)$$

Все измерения проводили при постоянной температуре 37°C.

Электрокинетический потенциал нанореакторов измеряли методом динамического светорассеяния, используя прибор Zetasizer NanoZS («Malvern», Southborough, MA). Метод основан на том, что в режиме измерения скорости в спектре колебаний рассеянного света появляется компонента, смещенная относительно несущей частоты колебаний на величину доплеровской частоты. Эта величина пропорциональна скорости движущихся частиц. Скорость движения частиц, рассчитанная по фазовой функции, позволяет определить электрофоретическую подвижность частиц

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{2\varepsilon\zeta}{3\eta}, \quad (13)$$

где μ — электрофоретическая подвижность, v — скорость движения частиц в электрическом поле с напряженностью E , ε — диэлектрическая проницаемость, ζ — электрокинетический потенциал частиц, η — вязкость растворителя.

Прибор оснащен He-Ne лазером с длиной волны 633 нм и мощностью 4 мВт. Измерения интенсивности рассеянного света проводились под углом 173° при 37°C . В кювету помещали эмульсионную систему в конечной концентрации, соответствующей концентрации плуроника L64 1.0 мг/мл и измеряли значение электрофоретической подвижности частиц и ζ -потенциала. Для того, чтобы исследовать изменения электрофоретической подвижности частиц во времени измерения продолжали в течение 1-2 часов. Образцы комплексов эмульсий с поликатионом измеряли аналогичным образом. Эксперименты проводили в 5 мМ буфере TRIS/ацетат pH 7.4, растворы ПДМАЭМА доводили до pH 7.4 добавлением TRIS.

Гель-проникающая хроматография. Молекулярно-массовое распределение полиоксалата анализировали с помощью ГПХ в ТГФ при комнатной температуре без термостатирования при скорости потока 0.5 мл/мин. Для анализа использовали хроматограф, оборудованный колонкой Styragel HR3 (5 мкм, 7.8 мм $\times$ 300 мм, «Waters», США), насосом Altex 114М (США), детектором оптической плотности с варьируемой длиной волны Waters 484 (США) и дифференциальным детектором показателя преломления Smartline 2300 («Knauer», Германия). Оптическую плотность измеряли при длине волны 254 нм.

Препаративное разделение проводили в ТГФ при комнатной температуре без термостатирования при скорости потока 5.0 мл/мин на хроматографе, оборудованном полупрепаративной колонкой Phenogel 10u («Phenomenex», США), наполненных ультрастирогелем с размером пор 1000 Å, насосом «Аквилон» (насос для ВЭЖХ серии I) (Россия), детектором оптической плотности с варьируемой длиной волны «Knauer» (Германия).

Для калибровки обеих хроматографических систем использовали набор узкораспределённых стандартов полистирола («Sigma-Aldrich», США).

ЯМР-спектроскопия. ^1H ЯМР спектры регистрировали на ЯМР-спектрометре Bruker DRX500 (США) с рабочей частотой 500 МГц. Частоты химических сдвигов калибровали, используя тетраметилсилан (TMS) в качестве стандарта, а также сигналы остаточных протонов растворителей. Растворы полиоксалата в CDCl_3 («Deutero GmbH», Германия) для анализа помещали в стандартные ампулы. Спектры регистрировали при комнатной температуре.

ИК-спектроскопия. ИК-спектры полиоксалата регистрировали в пленке, которую получали выпариванием 50% раствора полиоксалата в ТГФ на оптическом кристалле KRS-5 (42% TlBr, 58% TlI). Для регистрации спектров использовали спектрометр Specord M-80 («Carl Zeiss Jena», Германия).

Расчёт гидрофобности. Расчет величины гидрофобности по Ганшу ($\lg P$) для оксалатов осуществляли с помощью программы «ACDLabs LogP 6.0» («ACDLabs», Канада).

Коэффициент распределения оксалатов между водой и мицеллами амфифильных полимеров оценивали следующим образом. Сначала рассчитывали коэффициент распределения оксалатов между водой и мицеллами плуроника P85 ($\lg P_{P85/\text{вода}}$) на основании корреляционного уравнения, предложенного в работе [322]:

$$\lg P_{P85/\text{вода}} = 0.15 + 0.38 \times A - 1.24 \times B + 0.82 \times S_{\text{гфб}}, \quad (14)$$

где параметры A (Н-кислотность) и B (Н-основность) характеризуют способность соединения отдавать и принимать протоны при образовании водородных связей, а $S_{\text{гфб}}$ — это площадь гидрофобной поверхности солюбилизуемого вещества.

Далее рассчитывали коэффициенты распределения оксалатов между водой и мицеллами плуроников, для чего использовали корреляцию между ККМ плуроников различного состава и коэффициентами распределения пирена между водой и мицеллами блок-сополимеров [323]:

$$\lg P_{\text{пирен}} = 0.26 - 0.67 \times \lg \text{ККМ} \quad (15)$$

Полагая, что наклон зависимости коэффициента распределения от ККМ сополимеров слабо зависит от природы солюбилизуемого соединения и в основном определяется природой плуроников, вводили поправку в свободный член корреляционного уравнения, равную разности логарифмов коэффициентов распределения пирена и соответствующего оксалата между водой и мицеллами плуроника P85.

Н-кислотность A и Н-основность B веществ рассчитывали, используя демонстрационную версию программы ADME Boxes, версия 2.0 («Sirius Analytical Instruments»), алгоритм которой основан на суммировании вкладов отдельных функциональных групп, входящих в молекулу [324].

Площадь гидрофобной поверхности молекул оценивали с использованием программы «HyperChem 7.0» («Hypercube, Inc.»): проводили поиск наиболее

энергетически выгодных конформаций молекулы в вакууме с помощью встроенного программного модуля «Conformational search», применяя алгоритмы молекулярной механики. При этом разрешалось вращение вокруг всех одинарных связей. Удаление из структуры полярных гетероатомов позволяло рассчитать площадь гидрофобной поверхности с помощью модуля «QSAR properties».

Степень солюбилизации БНФО между водой и мицеллами плуроника α определяли по уравнению

$$\alpha = \frac{\bar{v}_0 P(c - \text{ККМ})}{100 + \bar{v}_0 (P - 1)(c - \text{ККМ})}, \quad (16)$$

в котором P — коэффициент распределения вещества между водой и мицеллами, $\bar{v}_0$ — удельный парциальный объем сополимера, c — концентрация сополимера, выраженная в массовых процентах, а ККМ — критическая концентрация мицеллообразования, также выраженная в массовых процентах [323].

3.4 МЕТОДЫ РАБОТЫ С КЛЕТКАМИ В КУЛЬТУРЕ

Размораживание клеток. Эпителиальные клетки аденокарциномы молочной железы человека, проявляющие множественную лекарственную устойчивость, MCF-7/ADR, были любезно предоставлены проф. А.А.Штилем из НИИ канцерогенеза (ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина»). Клетки хранили в ампулах со средой, содержащей эмбриональную сыворотку крупного рогатого скота и 10% диметилсульфоксида (ДМСО), в сосудах Дьюара с жидким азотом. Для размораживания клеток нагревали 5-7 мл 70% этанола до 37°C и помещали в него ампулу с клетками. Как только среда в ампуле начинала таять, содержимое ампулы переносили во флакон культивирования Nunc с площадью рабочей поверхности 25 см² («Nuncлон», Дания) с 5-7 мл культуральной среды DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, 4 мМ глутамина, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (далее — полная культуральная среда). Флакон с клетками помещали в CO₂-инкубатор «NAPCO» (США), где инкубировали 3-4 часа при 37°C в атмосфере 5% CO₂ и влажности 95% (стандартные условия). После адгезии основной массы клеток на стенке лежащего флакона, в нем заменяли среду на свежую, чтобы удалить ДМСО, и продолжали инкубацию в стандартных условиях.

Культивирование клеток. Клетки MCF-7/ADR культивировали в полной культуральной среде DMEM в стандартных условиях, пересевая их 2-3 раза в неделю в

зависимости от плотности посева: при посеве 3×10^5 клеток на флакон клетки пересеивали 2 раза в неделю, а при посеве $4.0-4.5 \times 10^5$ клеток на флакон — 3 раза в неделю. Для пересева клетки смывали со стенки флакона 1 мл версена (0.02% ЭДТА), который хелатирует ионы кальция, необходимые для адгезии клеток, в результате чего происходит открепление клеток от подложки. Хелатные свойства ЭДТА нейтрализовали добавлением 2 мл полной культуральной среды и осаждали клетки центрифугированием (5 мин, 100 g, центрифуга Sigma σ -15, «Sigma Laborzentrifugen», Германия). Осадок клеток суспендировали в 3-4 мл среды и считали количество клеток в камере Горяева, используя микроскоп Axiovert 25 («Zeiss», Германия). В культуральный флакон вносили 3-4 мл среды и суспензию клеток до получения их плотности 1.2×10^4 клеток/см² (3×10^5 клеток на флакон с площадью рабочей поверхности 25 см²).

Проверка чистоты клеточной культуры. Чистоту культуры клеток контролировали с помощью флуоресцентного красителя DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол). Метод основан на возрастании флуоресценции этого красителя при связывании с ДНК, причем не только клеток, но и микоплазмы, бактерий и других ДНК-содержащих организмов. DAPI проходит сквозь клеточные мембраны и встраивается в кластеры ДНК, обогащенные парами аденин-тимин, на любой стадии клеточного цикла. При встраивании эмиссия флуоресценции DAPI возрастает в 20 раз и можно наблюдать голубое свечение при длине волны $\lambda_{em} = 460$ нм. DAPI может присоединяться и к РНК, однако при этом интенсивность флуоресценции красителя в 5 раз слабее, чем при образовании комплекса с ДНК, и регистрируется при другой длине волны $\lambda_{em} = 500$ нм, т.е. не перекрывается с λ_{em} комплекса DAPI и ДНК.

Для анализа на покровное стекло, лежащее в чашке Петри диаметром 3 см, высевали около 10^5 клеток, вносили 3-4 мл среды и инкубировали клетки в стандартных условиях в течение 2 суток. Затем среду культивирования удаляли, клетки промывали 2 раза 3 мл раствора PBS и фиксировали в 2 мл холодного метанола в течение 10-15 минут при -20°C. После фиксации метанол удаляли и промывали клетки 2 раза 3 мл раствора PBS. Для окрашивания ДНК в каждую чашку Петри вносили по 2 мл 0.3 мкМ раствора DAPI в PBS и инкубировали в течение 5-10 мин. Непрореагировавший краситель удаляли раствором PBS (промывка 3 раза по 3 мл). На предметное стекло наносили по 10-15 мкл смеси PBS и глицерина (1:1) и на нее помещали образцы на покровных стеклах клетками вниз. Покровные стекла закрепляли по краям с помощью лака и после его высыхания

наносили нефлуоресцирующее иммерсионное масло 518С. Образцы анализировали на флуоресцентном микроскопе («OPTON», Германия) при облучении светом в диапазоне 390-420 нм и увеличении $\times 630$. Если заражения нет, то синее свечение наблюдается только в ядрах клеток. При заражении культуры микоплазмой синяя флуоресценция DAPI наблюдается также на наружной клеточной мембране и вне клеток. В этом случае к клеткам в культуральную среду добавляли 5 мкг/мл препарата, убивающего микоплазму (Micoplasma Removing Agent, «ICN Biochemicals»), и культивировали их в присутствии этого препарата в течение 7-10 суток. Данный препарат относится к антибиотикам трифторметилхинолонового ряда и избирательно ингибирует гиразу микоплазмы. Очищенную таким образом культуру клеток использовали для экспериментов только после 2-3 стандартных пересевов.

Замораживание клеток для хранения. Клетки собирали со стенки культурального флакона, как при пересеве, и суспендировали в 1-2 мл эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота, содержащей 10% ДМСО в качестве криопротектора. После подсчета плотности клеток их переносили в ампулы для замораживания по 1.5-3.0 млн клеток на ампулу. Ампулы помещали в толстостенные штативы из пенопласта и выдерживали сутки при температуре -40°C , после чего переносили в сосуд Дьюара с жидким азотом.

Определение цитотоксичности. Цитотоксичность полимеров и других соединений оценивали по доли клеток, выживших после инкубации с этими соединениями. Для исследования токсичности соединений готовили их раствор в среде DMEM без сыворотки, и непосредственно перед экспериментом готовили серию его разведений в 1.5-2.0 раза в среде DMEM без сыворотки. Эмульсии ДМФ, стабилизированные плуроником L64, получали добавлением среды без сыворотки к безводной смеси, содержащей взвешенную порцию L64 и раствора полиоксалата в ДМФ, а также точный объем раствора ТМГП в ацетонитриле, и тщательно диспергировали с помощью шейкера Vibrofix. Приготовленные таким образом эмульсии последовательно разбавляли средой без сыворотки и 100 мкл каждого раствора добавляли к клеткам.

Клетки MCF-7/ADR засевали в лунки 96-луночного планшета (3500-4000 клеток на лунку, около 9000 клеток/см²) за сутки до эксперимента и культивировали в стандартных условиях в среде DMEM, содержащей сыворотку. В день опыта среду культивирования удаляли, в каждую лунку вносили 100 мкл исследуемого соединения и инкубировали в

течение 1 ч в CO₂-инкубаторе при 37°C. Контрольные лунки содержали только 100 мкл среды DMEM без сыворотки. Каждый образец анализировали в трех параллелях. По окончании инкубации клеточную среду заменяли на DMEM с сывороткой и культивировали клетки в течение трех суток в стандартных условиях.

После этого определяли количество клеток в лунках планшета с помощью МТТ-теста, который основан на способности сукцинатдегидрогеназы живых клеток восстанавливать неокрашенный субстрат 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ) в фиолетовый кристаллический формазан, растворимый в ДМСО. Интенсивность окраски полученных растворов пропорциональна концентрации живых клеток [325].

Раствор МТТ, 5 мг/мл в воде, хранили при 4°C. Перед анализом его разводили в 5 раз средой DMEM без сыворотки. Для определения количества живых клеток во все лунки вносили по 50 мкл раствора МТТ в среде (конечная концентрация МТТ в лунке — 0.2 мкг/мл). Через 3-4 ч инкубации в стандартных условиях среду удаляли, вносили во все лунки по 100 мкл ДМСО, перемешивали в течение 10-15 минут и измеряли оптическую плотность раствора в лунках при 550 нм (D550) на фотометре Multiscan («Titertek», США). Разброс значений D550 в параллельных лунках, рассчитанный как среднее квадратичное отклонение относительно среднего значения (sd/mean, %), составлял 5-7%. Подбирали такую плотность посева клеток, чтобы D550 в контроле было около 1. Долю выживших клеток рассчитывали как отношение D550 в лунке, содержащей исследуемый образец, к среднему значению D550 в контрольных лунках. Цитотоксичность DOX и полимеров оценивали по двум параметрам: 1) максимальной концентрации соответствующего соединения, выше которой количество выживших клеток начинает снижаться (наибольшая нетоксичная концентрация, ННК) и 2) концентрацию соединения, при которой гибло 50% клеток — IC_{50} . IC_{50} определяли, используя нелинейную аппроксимацию экспериментальных данных логистической функцией:

$$\text{Выживаемость, \%} = \frac{100\%}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{C} \right)^p}, \quad (17)$$

где C — концентрация в образце, p — параметр, определяющий крутизну наклона кривой.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения OriginPro 9 («Microcal Corp.», США).

Стимуляция окислительного стресса и определение содержания АФК в клетках. Клетки высаживали в 24-луночные планшеты (плотность 9000 клеток/см²) за сутки до эксперимента в среде для культивирования. Индукторы окислительного стресса добавляли к клеткам в концентрации близкой к их ННК: С(H₂O₂) = 180 мкМ, С(доксорубин)=6 мкМ, С(менадион)=20 мкМ, С(параquat) = 200 мкМ). Клетки инкубировали с индукторами окислительного стресса (H₂O₂, доксорубин, менадион или параquat) в среде без сыворотки в течение 1 часа при 37°C, а затем заменяли растворы индукторов на полную среду. Дальнейшая работа с клетками проводилась спустя 1 час инкубирования, чтобы перекись водорода, содержащаяся во внешней среде полностью разложилась под действием каталазы сыворотки [326].

Для оценки уровня окислительного стресса к клеткам добавляли 20 мкМ раствор H₂DCF-DA в сбалансированном солевом растворе Хэнкса, не содержащем индикатор, в течение 30 мин. Раствор H₂DCF-DA получали разбавлением свежеприготовленного 1.5 мМ раствора в безводном ДМФА. Монослой клеток промывали PBS, соскабливали клетки в 50 мкл PBS, переносили суспензию в лунки чёрного непрозрачного 96-луночного планшета и измеряли флуоресценцию с помощью планшетного флуориметра Victor X5 2030 Multilabel Reader («Perkin Elmer», США) при $\lambda_{ex} = 490$ нм, $\lambda_{em} = 535$ нм и времени накопления сигнала 1.0 с/лунка. Полученные значения нормировали на количество белка, которое измеряли методом Лоури после разбавления суспензии клеток добавлением 0.1 мл 1 М NaOH [327].

Определение пероксида водорода во внешней клеточной среде с помощью 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеина (H₂DCF) и пероксидазы хрена. Определение основано на образовании 2',7'-дихлорофлуоресцеина (DCF), проявляющего сильную флуоресценцию, из нефлуоресцирующего (H₂DCF) (Таблица 7) в результате окисления гидроксильными радикалами, которые образуются пероксидазой хрена из перекиси водорода [328, 329]. Для получения деацетилированной формы H₂DCF-DA 0.25 мл 1 мМ раствора зонда в метаноле смешивали с 2 мл 0.01 М NaOH и инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем раствор разбавляли 10 мл 25 мМ фосфатного буфера с pH 7.4 и получали бесцветный раствор H₂DCF в концентрации 50 мкМ. При последующем хранении на открытом воздухе в течение 10-12 час раствор становился ярко-жёлтым,

поэтому раствор использовали непосредственно после приготовления. 50 мкл свежеприготовленного раствора добавляли в лунки 96-луночного чёрного планшета, содержащие 100 мкл раствора H_2O_2 в среде DMEM с 10% сыворотки и 10 mM раствором HEPES, и не содержащей индикатор феноловый красный и бикарбонат натрия. В эти лунки добавляли 50 мкл 1 мкМ раствора пероксидазы хрена и образцы инкубировали в течение 15 мин, а затем измеряли флуоресценцию DCF на плащечном флуориметре Victor X5 2030 Multilabel Reader.

Измерения хемилюминесценции в клеточном монослое. 150-400 тысяч высаживали в 12-луночный планшет за день до эксперимента. Клетки обрабатывали пероксидом водорода как описано выше и инкубировали в полной среде в течение 1.5 часов, чтобы добиться полного разложения пероксида водорода во внешней среде. 0.2 мл эмульсий, содержащих полиоксалат, перилен и бензимидазол (L64/ПОКС/ДМФ/PER/BIm = 1.0:2.7:0.3:0.06:0.12 масс.) при концентрации L64 2.0 мг/мл, готовили в бессывороточной среде DMEM, не содержащей феноловый красный и бикарбонат натрия, но содержащей 10 mM HEPES, и добавляли к клеткам в равном объёме среды, планшет незамедлительно помещали в держатель планшетного флуориметра Victor X5 2030 Multilabel Reader, предварительно термостатированного до 37°C, и измеряли хемилюминесценцию при времени сбора данных равном 10 с. Апертура ФЭУ была максимально открыта. Измерение интенсивности хемилюминесценции света в каждой лунке повторяли каждые 5 мин в течение 1 часа, чтобы получить кинетику испускания света. Интегральную интенсивность хемилюминесценции рассчитывали как площадь под кинетической кривой. Фактическое количество клеток в образцах рассчитывали из количества белка, которое определяли в лунках после окончания эксперимента.

Калибровочные кривые для оценки количества пероксида водорода получали в тех же условиях. С этой целью в 2 раза более концентрированные дисперсии готовили в DMEM и смешивали с равным объёмом калибровочных растворов H_2O_2 , также приготовленных в DMEM. Измерение хемилюминесценции проводили при настройках прибора, указанных выше.

Флуоресцентная конфокальная сканирующая микроскопия. Конфокальную микроскопию проводили на микроскопе FluoView FV1000 («Olympus Corp.», Япония), оборудованном специальной версией сканирующего модуля и детектором проходящего света. Для наблюдения за флуоресценцией ТМГП в клетках использовали диодный лазер

с длиной волны излучения 405 нм и измеряли интенсивность флуоресценции DAPI в диапазоне 425-475 нм и флуоресценцию ТМГП в диапазоне 570-670 нм. Одновременно получали изображения методом дифференциального интерференционного контраста, в котором разность фаз света, проходящего через рассеивающий объект (клетку) и среду достигается за счет использования неподвижной призмы Номарского. Микрофотографии получали с помощью программного обеспечения FV10 ASW 1.7 («Olympus Corp.», Япония).

Для детектирования внутриклеточной флуоресценции окисленной формы зонда SOSG-EP клетки засеивали в чашки Петри со стеклянным дном за сутки до эксперимента (плотность посева около 100000 клеток на чашку). Один образец оставляли необработанным в качестве контроля, а остальные образцы обрабатывали пероксидом водорода, как описано выше. Спустя 1 час инкубации клеток в присутствии полной культуральной среды к клеткам добавляли эмульсию с ТМГП (опыт) или без ТМГП (контроль), содержащую 10 мМ SOSG, и инкубировали в течение 1 часа. Контрольные образцы, к которым не добавляли эмульсии, обрабатывали 10 мМ раствором SOSG в среде DMEM без сыворотки. Все образцы готовили в среде DMEM, не содержащей индикатора фенолового красного, бикарбоната натрия и сыворотки, но содержащей 10 мМ HEPES. Микрофотографии этих образцов получали при скорости сканирования 20 мкс/пиксель. Во избежание самопроизвольного фотоокисления SOSG каждое поле сканировали однократно при длине волны возбуждения 488 нм (многоволновый аргонный лазер, диапазон регистрации флуоресценции 500–600 нм). Чувствительность детекции и интенсивность возбуждающего пучка регулировали таким образом, чтобы сигналы попадали в диапазон линейности детекторов. Микрофотографии обрабатывали с помощью программного обеспечения ImageJ 1.50i («Wayne Rasband», National Institute of Health, США) следующим образом. Для измерения средней интенсивности пикселя, клетки помечали на изображениях фазового контраста, и измеряли интенсивность этого же пикселя на флуоресцентных изображениях. Таким образом определяли значения интенсивности примерно для 300 клеток (около 10 микрофотографий) и их усредняли. Для получения средней интенсивности фона определяли фон в 10 независимых измерениях, результаты которых усредняли, а затем среднее значение фона вычитали из среднего значения клеточной флуоресценции в условных единицах флуоресценции.

4 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В основе полимерных хемилюминесцентных конструкций, описанных в настоящей работе, лежит ПО-реакция между H_2O_2 и производными щавелевой кислоты (раздел 2.5.2.3). Первая стадия данной реакции (Рис. 1, стадия I) проходит по двухступенчатому $\text{S}_{\text{N}}2$ -механизму. На второй стадии происходит перенос энергии от молекулы 1,2-диоксетандиона (Рис. 1, ВЭИ) на молекулу АКТ по окислительно-восстановительному механизму с распадом ВЭИ на 2 молекулы CO_2 и образованием возбужденного состояния АКТ (Рис. 1, путь 1, стадия II). В основе настоящей работы лежит предположение, что порфириновый фотосенсибилизатор может участвовать в ПО-реакции в качестве АКТ, т.е. способен переходить в возбужденное состояние в ходе ПО-реакции, а затем релаксировать, не только испуская свет, но и генерируя синглетный кислород (Рис. 1, путь 2). Поскольку механизм ПО-реакции включает, по крайней мере, две бимолекулярные стадии, совместная локализация всех компонентов необходима для её эффективного протекания.

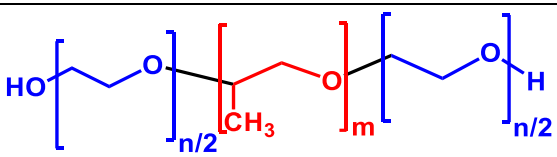
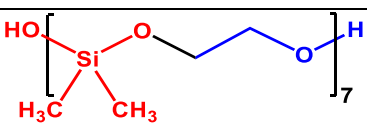
Нуклеофильная атака пероксидом водорода эффективна лишь в случае производных щавелевой кислоты, содержащих электроноакцепторные заместители, в первую очередь, ароматические. Такие эфиры очень быстро гидролизуются, причем реакционная способность оксалата по отношению к воде и H_2O_2 в водном растворе возрастает симбатно. Поэтому защита оксалатов от гидролиза является важнейшим условием получения синглетного кислорода и/или испускания света при проведении ПО-реакции в водной среде. Кроме того, наиболее эффективные оксалаты гидрофобны и не растворяются в воде.

Для решения этой проблемы в работе представлен ряд подходов. Во-первых, предлагается создать нанореакторы, имеющие гидрофобное ядро, в которое поместить оксалат и порфирин, чтобы, с одной стороны, повысить их локальную концентрацию во время реакции, а с другой стороны — изолировать от воды. Во-вторых, предлагается синтезировать полимерный оксалат, гидролиз которого мог бы быть затруднен вследствие коллапса полимерной цепи в полярном микроокружении.

4.1 МИЦЕЛЛЫ АМФИФИЛЬНЫХ СОПОЛИМЕРОВ КАК НАНОРЕАКТОРЫ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПЕРОКСИОКСАЛАТНОЙ РЕАКЦИИ

Известно, что гидрофобное ядро мицелл амфифильных полимеров слабо гидратировано, поэтому можно было ожидать, что солюбилизация в мицеллах гидрофобных оксалатов и активатора приведет к увеличению эффективности ПО-реакции. В качестве мицеллообразующих полимеров была выбрана серия плуроников, содержащих 30 звеньев пропиленоксида в гидрофобном блоке и разное число звеньев этиленоксида в гидрофильных блоках (Рис. 30, Таблица 10). Выбор этих полимеров был обусловлен тем, что плуроники хорошо себя зарекомендовали в качестве биосовместимых полимеров, находят широкое применение для доставки лекарств. Коммерческая доступность большого набора сополимеров этиленоксида и пропиленоксида, различающихся по структуре и степени полимеризации, позволяет строить зависимости их свойств от состава в широком диапазоне молекулярных масс гидрофобного и гидрофильного блоков.

Таблица 10. Состав, структура и молекулярная масса исследованных амфифильных полимеров

Полимер	n	m	$M \times 10^{-3}$	Общая формула
L61	4	30	2.1	
L64	26	30	2.9	
F68	152	30	8.4	
(ДМС-ЭО) ₇	7	7	0.7	

4.1.1 Бис-(пентахлорфенил)оксалат в ассоциатах плуроника L61

Бис-(пентахлорфенил)оксалат (БПХФО, Рис. 35a) обладает высокой реакционной способностью по отношению к пероксиду водорода (pK_a пентахлорфенола 4.74 [330]). Поскольку конечной целью настоящей работы являлось получение систем, способных продуцировать синглетный кислород, в качестве активатора был использован тетраметиловый эфир гематопорфирина IX (ТМГП, Рис. 31), являющийся эффективным фотосенсибилизатором. Добавление концентрированного раствора БПХФО и ТМГП в ацетонитриле к большому объему раствора пероксида водорода в ацетонитриле запускало

хемилюминесцентную реакцию и сопровождалось интенсивным излучением света (Рис. 35б). При этом даже через 7 мин после начала реакции система продолжала излучать свет. Излучение света в ходе реакции говорит о том, что ТМГП действительно может быть активатором ПО-реакции и в результате реакции переходит в возбужденное состояние. Эффективность ПО-реакции оценивали по интегральной интенсивности, соответствующей площади под кривой испускания света (уравнение 11).

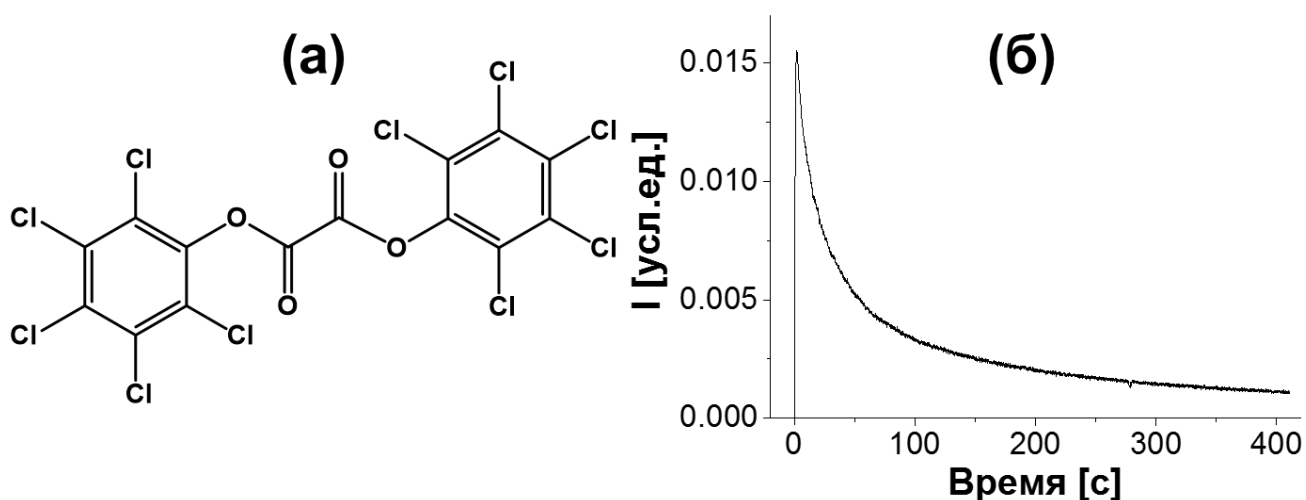


Рис. 35. (а) Химическая структура молекулы бис-(пентахлорфенил)оксалата (БПХФО). (б) Кинетика выделения света при реакции 26 мкМ БПХФО со 160 мМ пероксида водорода в присутствии 76 мкМ ТМГП в ацетонитриле при 37°C.

Аналогичная реакция протекает и в водной среде, однако ее эффективность очень низка, причем излучение света заканчивается через 2.5 с (Рис. 36, кривая 1). Солюбилизация БПХФО в ассоциатах плуроника L61 приводит к значительному увеличению интенсивности хемилюминесценции (Рис. 36, кривая 2). При этом подъем интенсивности, соответствующий стадии возбуждения флуорофора и его излучательной дезактивации (Рис. 1, реакция (II)), происходит со скоростью, аналогичной скорости этой стадии в водном растворе, однако ниспадающая часть кривой, соответствующая стадии циклизации и образования ВЭИ (Рис. 1, реакция (I)), протекает значительно медленнее, и излучение полностью заканчивается через 20 с. Это указывает на то, что при проведении реакции в полимерных ассоциатах заметную роль может играть скорость проникновения H_2O_2 внутрь ассоциатов.

Из Рис. 36 следует, что проведение реакции в ассоциатах плуроника значительно увеличивает интегральную интенсивность хемилюминесценции.

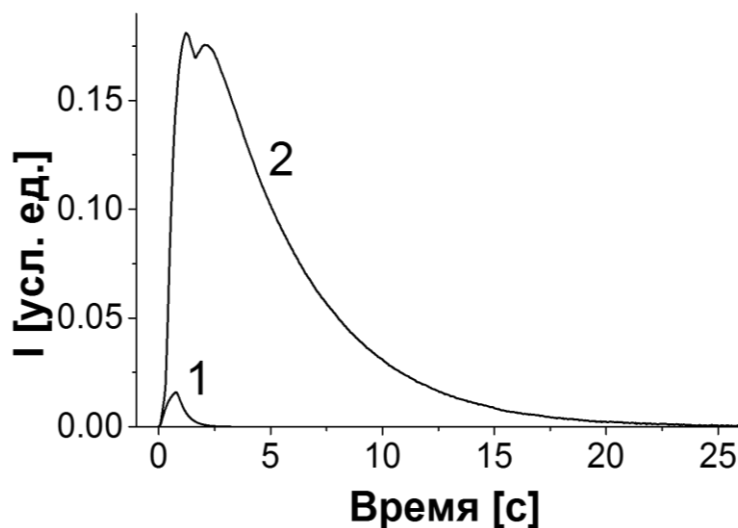


Рис. 36. Кинетика выделения света при реакции 26 мкМ БПХФО со 160 мМ пероксида водорода в присутствии 76 мкМ ТМГП в PBS в отсутствие полимера (1) и в ассоциатах 10 мг/мл плюроника L61 (2) при 37°C.

Поскольку и скорость пероксиоксаладной реакции, и скорость гидролиза оксалата сильно зависят от pH, можно полагать, что и влияние плюроника на эффективность реакции также может быть pH-зависимым. Оказалось, что интегральная интенсивность при проведении ПО-реакции в водном растворе в отсутствие плюроника плавно увеличивается с ростом pH (Рис. 37, закрашенные столбцы).

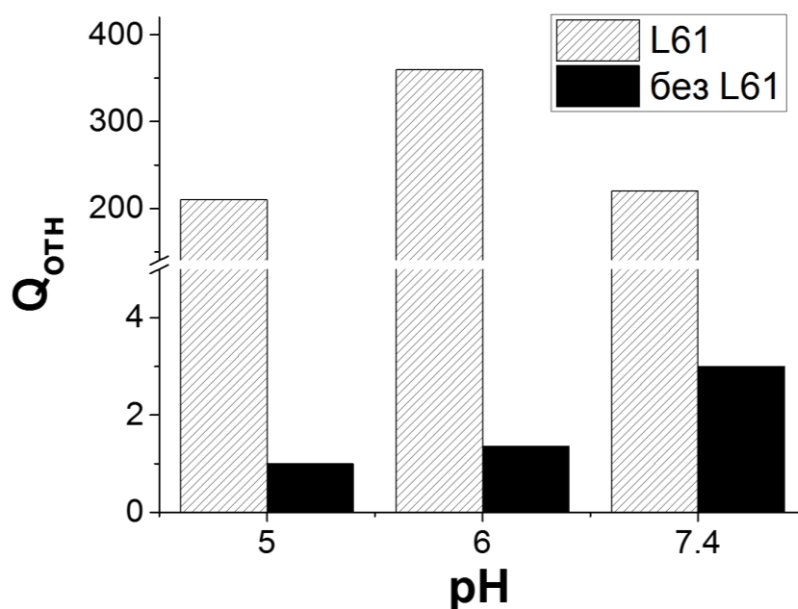


Рис. 37. Зависимость относительной интегральной интенсивности хемилюминесценции (нормированной на минимальную интенсивность на графике, т.е. при pH 5 в отсутствие L61) при реакции БПХФО с H_2O_2 от pH водного буфера в ассоциатах плюроника L61 (1) и в отсутствие полимера (2). $C(\text{БПХФО})=26$ мкМ, $C(\text{ТМГП})=76$ мкМ, $C(H_2O_2)=160$ мМ, $C(\text{L61})=10$ мг/мл, 37°C.

Это объясняется увеличением степени диссоциации пероксида водорода, поскольку пероксид-анион проявляет более высокую реакционную способность в ПО-реакции, что согласуется с ранее опубликованными данными [276]. Однако в присутствии ассоциатов плуроника характер рН зависимости меняется: наибольшая эффективность реакции наблюдается при рН 6, причем интегральная интенсивность увеличивается почти в 300 раз (Рис. 37, заштрихованные столбцы). При увеличении рН до 7 интегральная интенсивность заметно снижается. Можно предположить, что в этих условиях ассоциаты уже насыщены пероксид-анионом и более высокая концентрация этих частиц в ассоциатах уже не может быть достигнута. Между тем, повышение концентрации гидроксил-анионов способствует их проникновению в ассоциаты, вследствие чего ускоряется гидролиз оксалата.

БПХФО очень быстро гидролизуется даже в ацетонитриле в присутствии следовых количеств воды. Это объясняется наличием электроноакцепторных групп, придающих оксалату высокую реакционную способность не только по отношению к H_2O_2 , но и к воде. Кроме того, растворимость БПХФО в ацетонитриле очень низка. Несмотря на то, что высокая степень осушки ацетонитрила может быть достигнута, хранение его и растворов оксалата представляет собой чрезвычайно сложную задачу. Вследствие низкой растворимости БПХФО в ацетонитриле даже следовые количества воды, попадающие в раствор из воздуха в процессе эксперимента, гидролизуют оксалат, что приводит к невоспроизводимости результатов. Эти особенности создают большие проблемы при проведении экспериментов с БПХФО в отсутствие возможности измерять хемилюминесценцию в инертной атмосфере. Поэтому мы были вынуждены отказаться от экспериментов с БПХФО, несмотря на его высокую активность в отношении H_2O_2 , и в дальнейшем в качестве высокоактивного оксалата мы использовали бис-(4-нитрофенил)оксалат (БНФО).

4.1.2 Бис-(4-нитрофенил)оксалат в мицеллах амфифильных полимеров

Хемилюминесцентная реакция с участием бис-(4-нитрофенил)оксалата (БНФО) протекает аналогичным образом: в водном растворе она заканчивается за 2 с (Рис. 38, кривая 1). Однако максимальная интенсивность хемилюминесценции в данном случае оказывается почти в 50 раз больше, чем при реакции с БПХФО. В растворе ассоциатов плуроника L61 максимальная интенсивность хемилюминесценции в ПО-реакции с БНФО увеличивается (Рис. 38, кривая 2), но в меньшей степени, чем

наблюдалось в реакции с БПХФО (Рис. 36). Сокращается также и продолжительность излучения по сравнению с БПХФО, она составляет лишь 7–8 с.

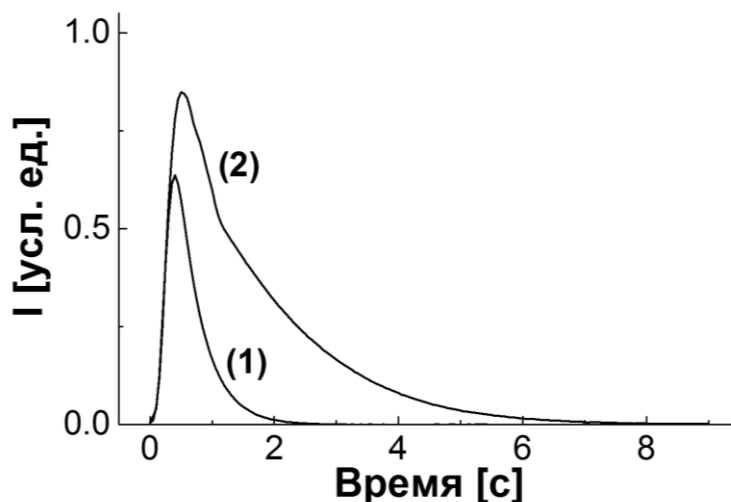


Рис. 38. Кинетика выделения света при реакции 75 мкМ БНФО с 16 мМ H_2O_2 в присутствии 7.6 мкМ ТМГП в буферном растворе (1) и в растворе ассоциатов плуроника L61, 10 мг/мл (2).

Интегральная интенсивность хемилюминесценции при солюбилизации БНФО в ассоциатах $Q_{\text{миц}}$ увеличился в ~ 4.5 раза по сравнению с системой без полимера, $Q_{\text{вод}}$, что значительно меньше, чем для БПХФО. Это может быть связано с большей гидрофобностью БПХФО: расчет указанной величины по Ганшу дает значение $\lg P_{\text{октанол/вода}} = 9.1 \pm 0.6$ для БПХФО и 3.8 ± 0.6 для БНФО. В результате при введении в водную фазу БПХФО мгновенно выпадает в виде мельчайших агрегатов, которые стабилизируются плуроником. Такие агрегаты оказываются более устойчивыми к гидролизу, но оксалат вступает в реакцию с H_2O_2 значительно медленнее, чем если бы он находился в растворенном состоянии. Тем же фактором объясняется и большая продолжительность излучения света в реакции с участием БПХФО по сравнению с БНФО. Напротив, менее гидрофобный БНФО частично растворяется в воде в процессе формирования ассоциатов, и переходит в полимерные ассоциаты уже из водной фазы. Следовательно, с одной стороны, он более подвержен гидролизу, чем БПХФО, а с другой — это обеспечивает более высокую интенсивность хемилюминесценции в присутствии плуроника и меньшую продолжительность испускаемого света, чем в реакции с БПХФО.

Варьирование концентрации плуроника L61 при постоянных концентрациях БНФО, ТМГП и пероксида водорода сопровождается изменением интегральной интенсивности хемилюминесценции (Рис. 39): вначале при концентрации порфирина

7.6 мкМ он возрастает до максимального значения при концентрации плуроника 5 мг/мл, а затем резко уменьшается (Рис. 39, кривая 1).

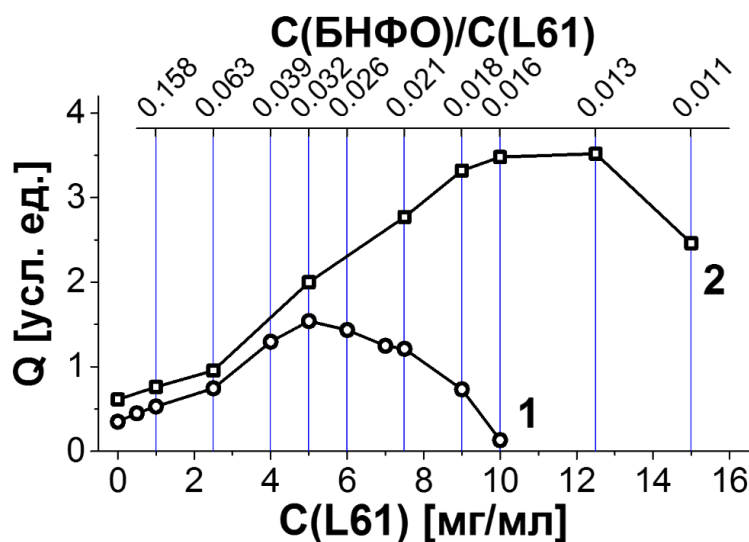


Рис. 39. Зависимость интегральной интенсивности хемилюминесценции, излучаемой в ходе ПО-реакции от концентрации плуроника L61 и мольного отношения БНФО в ассоциатах к плурониду в присутствии 7.6 (1) и 76 мкМ (2) ТМГП. $C(\text{БНФО}) = 75 \text{ мкМ}$, $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 16 \text{ мМ}$.

Аналогичная зависимость, полученная при концентрации порфирина 76 мкМ, имеет сходный вид, однако максимальная интегральная интенсивность хемилюминесценции увеличивается вдвое и достигается при более высокой концентрации плуроника (10 мг/мл) (Рис. 39, кривая 2). Это может быть связано с увеличением доли БНФО, солюбилизованного в ассоциатах, и локальным концентрированием в них оксалата и порфирина. После достижения максимума наблюдается спад интенсивности, связанный, по-видимому, с ростом числа ассоциатов в системе, и как следствие, с уменьшением локальной концентрации порфирина, что приводит к понижению как эффективности стадии возбуждения ПО-реакции, так и ее интегральной интенсивности хемилюминесценции. Напротив, при увеличении концентрации порфирина в системе концентрация плуроника, соответствующая максимальной интегральной интенсивности хемилюминесценции, возрастает.

Следует отметить, что при высоких концентрациях плуроника L61 повышается мутность системы, что вносит некоторый вклад в наблюдаемую интенсивность хемилюминесценции, хотя он и не имеет решающего значения.

Интегральная интенсивность света, излучаемого в ходе ПО-реакции в ассоциатах плуроника L61, увеличивается пропорционально концентрации БНФО вплоть до концентрации около 75 мкМ (Рис. 40).

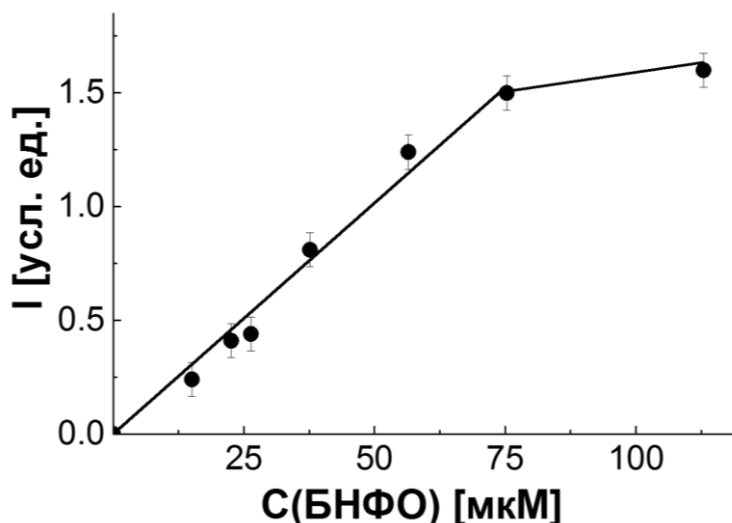


Рис. 40. Зависимость интегральной интенсивности света, испускаемого в ходе ПО-реакции в ассоциатах плюроника L61 от концентрации БНФО. $C(\text{ТМГП}) = 7.6 \text{ мкМ}$, $C(\text{L61}) = 5 \text{ мг/мл}$, $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 16 \text{ мМ}$.

При более высокой концентрации оксалата наблюдается отклонение от линейной зависимости, т.е. в таких условиях избыточное количество оксалата не встраивается в полимерные ассоциаты. БНФО, не поместившийся в ассоциаты, способен вступать в хемилюминесцентную реакцию. В водном растворе она менее эффективна, чем в ассоциатах, поэтому ее вклад в интегральную интенсивность невелик, что вызывает падение интегральной интенсивности хемилюминесценции. Данное наблюдение полностью согласуется с результатами, представленными на Рис. 38.

Очевидно, что описанная хемилюминесцентная система может быть использована для регистрации концентрации пероксида водорода. Действительно, изменение концентрации H_2O_2 сильно влияет на количество света, испускаемого в ходе хемилюминесцентной реакции (Рис. 41). В области концентраций H_2O_2 от 10^{-5} до 10^{-4} М интегральная интенсивность увеличивается пропорционально концентрации пероксида. При дальнейшем повышении ее концентрации до 6 мМ также наблюдается существенный рост интенсивности. Можно предполагать, что значительный вклад в это увеличение интенсивности испускаемого света вплоть до 6 мМ H_2O_2 вносит сдвиг баланса между реакцией гидролиза оксалата и стадией циклизации ПО-реакции в сторону последней. Изменение концентрации H_2O_2 в интервале $(6\text{--}16) \text{ мМ}$ уже слабо влияет на количество испускаемого света; следовательно, эффективность ПО-реакции уже в основном определяется стадией возбуждения, а не циклизации.

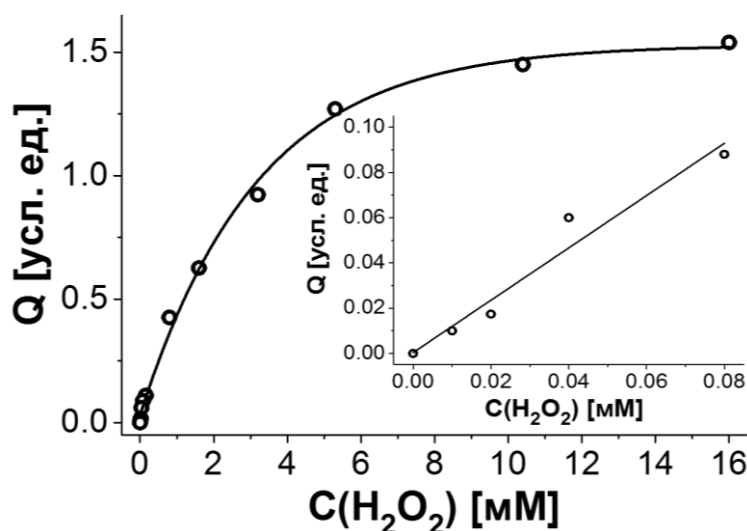


Рис. 41. Зависимость интегральной интенсивности света, испускаемого в ходе ПО-реакции 75 мкМ БНФО в присутствии ассоциатов плуроника L61 (5 мг/мл) от концентрации H_2O_2 . На вставке показана область низких концентраций H_2O_2 .

4.1.3 Связь структуры амфифильных полимеров и эффективности пероксиоксалатной реакции

В последующих экспериментах были использованы два плуроника, L64 и F68, отличающиеся от L61 длиной гидрофильных блоков (Таблица 10) при неизменной длине гидрофобного блока. Оказалось, что вплоть до концентрации 10-20 мг/мл они практически не влияют на эффективность ПО-реакции с участием БНФО (Рис. 42а, кривые 1 и 2).

С чем же связано принципиальное отличие плуроников F68 и L64 от L61? Существенным фактором в данном случае является степень солюбилизации оксалата. Напрямую измерить эту величину невозможно ввиду быстрого гидролиза оксалата в водных растворах. Однако ее можно рассчитать, используя корреляционные подходы, предложенные в наших предыдущих работах [322, 323].

Для оценки коэффициентов распределения БНФО и БПХФО между водой и ассоциатами плуроников L61, L64 и F68 мы воспользовались корреляционным уравнением (15), связывающим коэффициент распределения мицеллы/вода и ККМ полимера, которое было предложено ранее на основании анализа взаимодействия 24 различных плуроников с пиреном [323].

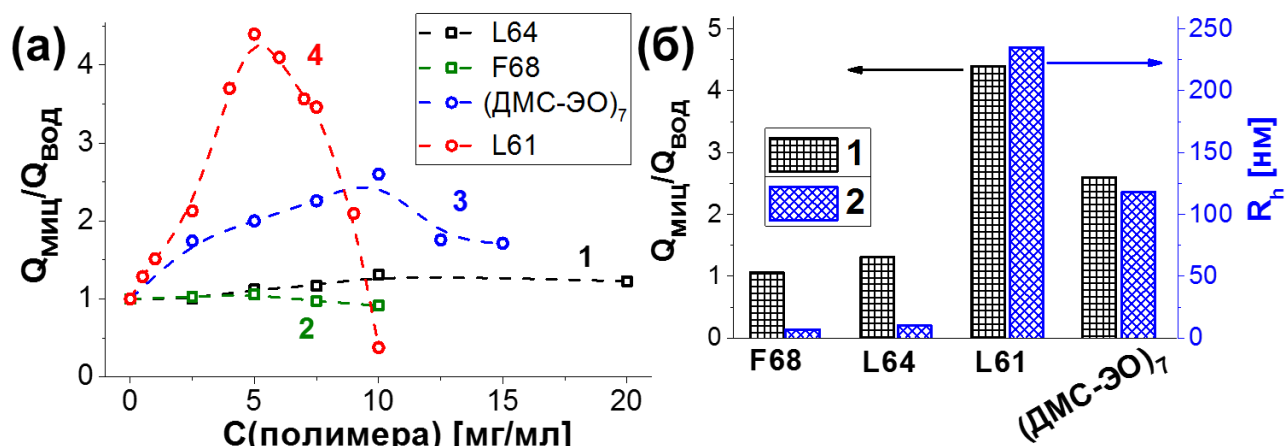


Рис. 42. (а) Зависимость интегральной интенсивности хемилюминесценции от концентрации плуроников L64 (1), F68 (2), (ДМС-ЭО)₇ (3) и плуроника L61 (4). (б) Интегральная интенсивность хемилюминесценции в полимерных мицеллах, нормированная к интенсивности в отсутствие полимеров (1), и гидродинамический радиус полимерных ассоциатов (2) для различных полимеров. $C(\text{ТМГП}) = 7.6$ мкМ, $C(\text{БНФО}) = 75$ мкМ, $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 16$ мМ.

Можно предположить, что наклон данной зависимости в основном определяется природой плуроников и слабо зависит от природы солюбилизируемого вещества. Тогда, сравнивая коэффициенты распределения пирена ($\lg P_{\text{P85/вода}} = 3.4$ [323]) и БНФО ($\lg P_{\text{P85/вода}} = 2.7 \pm 0.5$, рассчитанное значение) между водой и мицеллами плуроника P85, можно получить, что для БНФО уравнение (15) должно сдвинуться в сторону меньших значений $\lg P$ на 0.7, т.е. оно будет иметь следующий вид:

$$\lg P_{\text{пирен}} = -0.43 - 0.67 \times \lg KKM \quad (18)$$

Отсюда следует, что коэффициенты распределения убывают в ряду L61–L64–F68 (Таблица 11). При этом для плуроника L61 логарифмы коэффициентов распределения БНФО и БПХФО составляют 2.9 ± 0.5 и 4.1 ± 0.5 , что отчасти объясняет более выраженное влияние плуроника на хемилюминесцентную реакцию с участием БПХФО по сравнению с БНФО.

Сопоставление величин степени солюбилизации, рассчитанной по уравнению (16), показывает, что при переходе от плуроника L61 к L64 и далее — к F68 степень солюбилизации понижается от 0.88 до 0.63 и 0.12 соответственно. Таким образом, степень солюбилизации оксалатов вносит существенный вклад в наблюдаемую зависимость эффективности хемилюминесценции от природы плуроников.

Однако приведенные расчеты не могут в полной мере объяснить различия в эффективности хемилюминесценции между плурониками L61 и L64. Можно

предположить, что размер полимерных ассоциатов также способен влиять на выход хемилюминесцентной реакции.

Таблица 11. Характеристики исследованных мицеллярных хемилюминесцентных систем.

Полимер	ККМ, мг/мл	$\frac{Q_{миц}}{Q_{вод}}$	$lgP_{БНФО}$	Степень солюбилиза- ции БНФО, α	Радиус, нм	Радиус, нм (данные литературы)
L61	0.025 [65]	4.5±0.5	2.9±0.5	0.88	235 ± 64	135±30 [331]
L64	0.29 [65]	1.0±0.1	2.3±0.5	0.63	-	7.2 [59] 5.1 [332] 10.2 [333]
F68	6.72 [65]	1.0±0.1	1.7±0.5	0.12	-	7.1 [59] 2.3 (30°) 7.8 (54.2°C) [62]
(ДМС-ЭО)₇	0.02 [334]	2.0±0.2	-	-	118 ± 26	-

Известно, что плуроники L64 и F68 образуют мицеллы с гидродинамическим радиусом до 10 нм при концентрации в растворе выше 0.29 мг/мл (0.1 мМ) и 6.72 мг/мл (0.8 мМ), соответственно (Таблица 11). При этом НКТР 1%-ного раствора плуроника L64 составляет 58°C, а для F68 — выше 100°C [335], следовательно, в условиях экспериментов ($T = 37^\circ\text{C}$) можно пренебречь агрегацией мицелл. Таким образом, почти во всем изученном диапазоне (за исключением наиболее высоких концентраций) плуроник F68 находится в виде единичных молекул (юнимеров), в то время как L64 при всех рассмотренных концентрациях находится в виде мицелл.

В диапазоне концентраций плуроника L61, соответствующем максимальной интегральной интенсивности хемилюминесценции, система находится не только выше ККМ (0.025 мг/мл или 12 мкМ), но и в области точки помутнения или даже выше нее. Прямых литературных данных об НКТР плуроника L61 нет, однако известно, что плуроник L62 в концентрации 1% имеет точку помутнения при 32 °C [335], а НКТР полипропиленоксида с молекулярной массой 2000 в концентрации 2.5 мМ (5 мг/мл) составляет 28-29°C [336]. Предположение о том, что система L61-вода находится в области НКТР, подтверждается данными, полученными методом динамического светорассеяния (Рис. 43). Размеры его ассоциатов не должны превышать 10 нм, однако

измеренный гидродинамический радиус ассоциатов L61 значительно больше (Рис. 43а) и увеличивается с концентрацией полимера от 130 нм при концентрации 0.1 мг/мл, что хорошо согласуется с опубликованными ранее результатами [337], до 670 нм при концентрации 1.0 мг/мл (Рис. 43б). Определение гидродинамического радиуса ассоциатов при более высоких концентрациях оказалось невозможным ввиду высокой интенсивности рассеянного света.

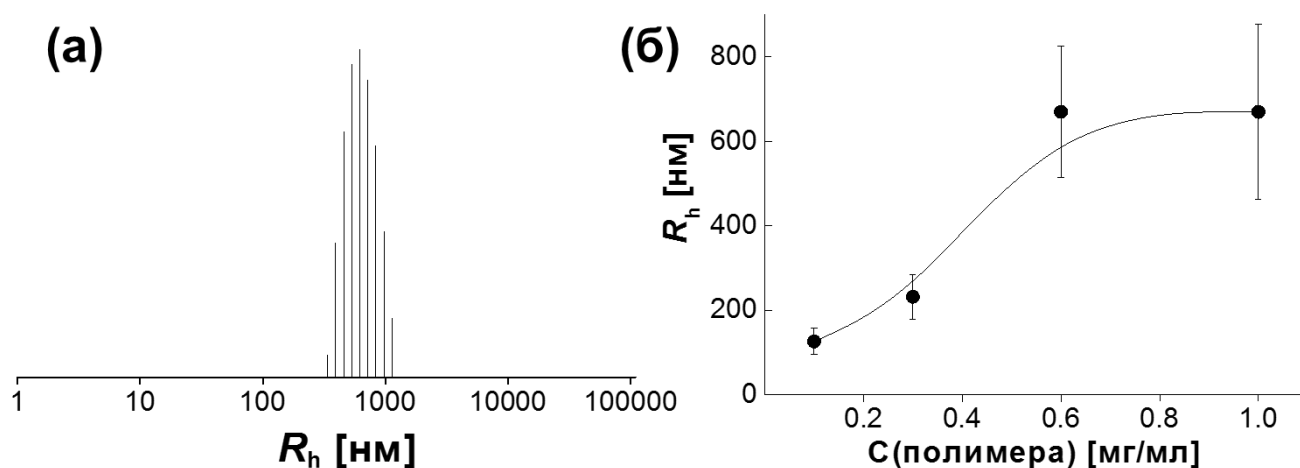


Рис. 43. (а) Распределение ассоциатов, образуемых плуроником L61 в водном растворе, по гидродинамическому радиусу, (б) концентрационная зависимость гидродинамического радиуса.

Таким образом, можно предположить, что в частицах небольшого размера (мицеллах), в которых отношение площади к объему велико, повышена вероятность столкновения БНФО с границей гидрофобного ядра. Известно, что в мицеллах плуроников граница между гидрофобным ядром и полярной опушкой размыта и сильно гидратирована [64, 70, 71]. На этой границе может происходить гидролиз БНФО, что должно приводить к уменьшению интегральной интенсивности хемилюминесценции. Следовательно, при солубилизации в более крупных частицах БНФО оказывается более стабилен. Чтобы проверить приведенные соображения, мы исследовали полимер иного класса — чередующийся сополимер этиленоксида и диметилсилоксана (ДМС-ЭО)₇. Известно, что такие сополимеры склонны к образованию крупных частиц в водных растворах [92–94], причем внутреннее ядро ассоциатов должно быть менее гидратировано вследствие значительно более высокой гидрофобности ДМС.

Мы обнаружили, что в водном растворе (ДМС-ЭО)₇ формируется три типа ассоциатов со средним гидродинамическим радиусом около 8, 40 и 1000 нм (Рис. 44а). С увеличением концентрации сополимера радиус наиболее крупных частиц уменьшается до 300–400 нм, а размеры остальных ассоциатов не изменяются (Рис. 44б).

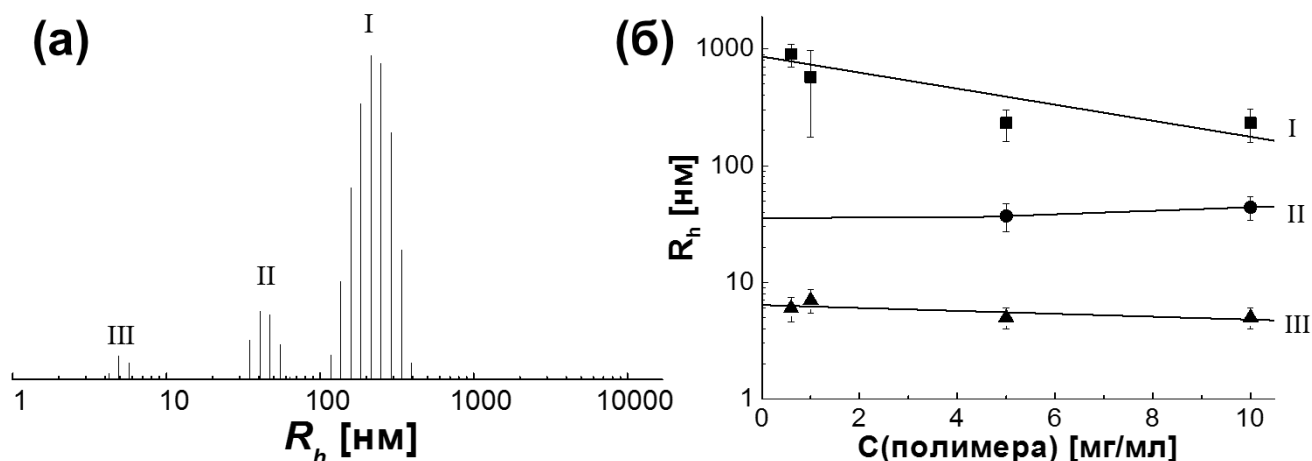


Рис. 44. (а) Распределение ассоциатов, образуемых сополимером (ДМС-ЭО)₇ в водном растворе, по гидродинамическому радиусу, (б) концентрационная зависимость размера ассоциатов I, II и III.

При использовании (ДМС-ЭО)₇ в ПО-реакции БНФО в водном растворе было установлено, что, как и в случае плуроника L61, при повышении его концентрации наблюдается увеличение интегральной интенсивности хемилюминесценции, причем максимальное значение достигается при содержании (ДМС-ЭО)₇ 10 мг/мл (Рис. 42а, кривая 3). Эффективность хемилюминесценции при реакции БНФО в ассоциатах, образуемых (ДМС-ЭО)₇, несколько меньше, чем в ассоциатах плуроника L61 (Рис. 42а, кривая 4). Это могло быть вызвано присутствием в растворах (ДМС-ЭО)₇ мелких ассоциатов, которые не влияют на интегральную интенсивность хемилюминесценции, но связывают компоненты пероксиоксалатной системы.

Еще один фактор, способствующий повышению эффективности хемилюминесценции, обусловлен совместной локализацией порфирина и оксалата в пределах одной частицы. Чем меньше размер частиц, тем с большей вероятностью в системе могут присутствовать частицы, содержащие только один из компонентов вместо двух. Естественно ожидать, что при постоянной концентрации полимера в системах с крупными ассоциатами количество таких частиц меньше, а значит, вероятность появления мицелл, содержащих оксалат, но не содержащих порфирина, уменьшается. Таким образом, эффект «мицеллярного концентрирования» в большей степени должен проявляться в системах с крупными ассоциатами полимеров, что и наблюдается в эксперименте.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что введение активных низкомолекулярных оксалатов в гидрофобную среду способствует увеличению эффективности ПО-реакции. Однако в мицеллярных нанореакторах испускание света

наблюдалось только в течение нескольких десятков секунд, что, по-видимому, связано с тем, что полимерные ассоциаты, исследованные в настоящей работе, не обеспечивали стабильности оксалатов, достаточной для проведения биологических экспериментов. Этот результат показал, что наличие только гидрофобного окружения недостаточно для повышения стабильности оксалатов.

4.2 ПОЛИОКСАЛАТ

Мы предположили, что скорость гидролиза оксалата может быть снижена в полимере, содержащем оксалатные группы в основной цепи, т.к. описанные в литературе полиоксалаты проявляли высокую стабильность в отношении гидролиза [251, 313], хотя их сравнение с аналогичными низкомолекулярными оксалатами никогда не проводилось и роль полимерной природы в данном случае остаётся неясна.

4.2.1 Синтез полиоксалата

Для проверки вышеуказанного предположения была проведена поликонденсация оксалилхлорида, бисфенола А и гептапропиленоксида (Рис. 45).



Рис. 45. Схема синтеза полиоксалата.

Выбор бисфенола А (**БФА**) в качестве мономера для сополиконденсации был обусловлен необходимостью использовать бифункциональный фенол с относительно низкой кислотностью (высокими значениями pK_a), т.к. оксалаты на основе фенолов, содержащих сильные электроноакцепторные группы, весьма подвержены гидролизу [277]. Попытка синтезировать полиоксалат на основе 4,4'-дигидроксифенила привела к образованию полимера, практически нерастворимого в распространенных органических растворителях, указывая на важность гибкости бисфенольного фрагмента. Наличие алифатической развязки между ароматическими кольцами БФА придаёт полимеру на его основе дополнительную гибкость и растворимость. Кроме того, бисфенол А проявляет прооксидантную активность и тем самым способствует накоплению АФК, в частности H_2O_2 , в клетке за счёт образования активных феноксильных радикалов при окислении [318], что благоприятствует решению поставленной в работе цели. В этом отношении бисфенол А имеет преимущество перед 4-гидроксифенильным спиртом, проявляющим антиоксидантные свойства [251, 315] и,

таким образом, защищающим клетки от разрушающего действия синглетного кислорода. Короткоцепочечный олигопропиленоксид с массой 425 (ППО425) или 400 (ППО400) (20% от массы БФА и около 17% от массы всех гидроксил-содержащих мономеров, т.е. 10 мол. %) использовали в качестве сомономера для придания дополнительной растворимости полиоксалату в органических растворителях. Полимер, приготовленный таким образом, имел хорошую растворимость в о-диметилфталате (ДМФ) и ТГФ.

Полученный полиоксалат выделяли двумя способами, которые приводили к получению продуктов с различными молекулярно-массовыми характеристиками. Первый способ заключался в диспергировании продукта поликонденсации БФА, ППО425 и оксалилхлорида в безводном диоксане и выделении диоксан-растворимой фракции, которая составляла большую часть продукта (выход 80%). Молекулярно-массовое распределение такого полиоксалата (ПОКС-1), определенное методом аналитической ГПХ в ТГФ с использованием полистирольных стандартов, показано на Рис. 46, а молекулярно-массовые характеристики приведены в Таблица 12.

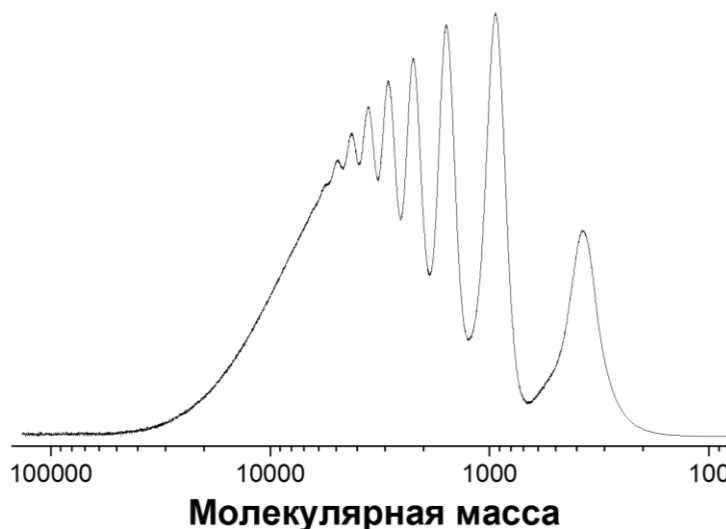


Рис. 46. Молекулярно-массовое распределение полиоксалата ПОКС-1, полученное методом аналитической ГПХ в ТГФ. Молекулярная масса рассчитана по полистирольным стандартам.

Средний состав полученного сополимера, определенный по ^1H ЯМР (оксалилхлорид/БФА/ППО = 1.00:0.85:0.15) практически совпал с соотношением сомономеров в исходной смеси (1.0:0.9:0.1). Т.к. хроматограмма, полученная методом ГПХ, не выявила наличие остаточного мономера в системе, небольшое отклонение в определении состава продукта методом ЯМР, вероятно, объясняется погрешностью интегрирования и возможным частичным перекрыванием пика протонов БФА в ароматической области и пика протонов хлороформа (Рис. 47).

Таблица 12. Молекулярно-массовые характеристики полиоксалатов, полученные методом препаративной ГПХ. Для ПОКС-1 данные получены при помощи колонки Styragel HR3, для остальных полиоксалатов — Phenogel 10μ.

Образец	Время выхода, мин	P _n	M _w	M _n	M _w /M _n
ПОКС-1	10-21	6	4400	1700	2.6
ПОКС-2	7-15	12	7500	3600	2.1
Фракция 1	9-10	38	14900	11400	1.30
Фракция 2	11-12	14	5300	4200	1.26
Фракция 3	13-14	4	1500	1100	1.36

Поэтому для расчёта средней массы звена для определения степени полимеризации из среднечисловой молекулярной массы брали значение, рассчитанное из соотношения мономеров в реакционной смеси:

$$\begin{aligned}
 \bar{M}_{\text{звена}} &= M(\text{звено БФА}) \times n(\text{звено БФА}) + M(\text{звено ППО}) \times n(\text{звено ППО}) = \\
 &= (M(\text{БФА}) + M(\text{оксалилхлорид}) - 2 \times M(\text{HCl})) \times n(\text{БФА}) + \\
 &+ (M(\text{ППО}) + M(\text{оксалилхлорид}) - 2 \times M(\text{HCl})) \times n(\text{ППО}) = \\
 &= 282.3 \times 0.897 + 478.7 \times 0.103 = 300 \text{ г/моль}
 \end{aligned}$$

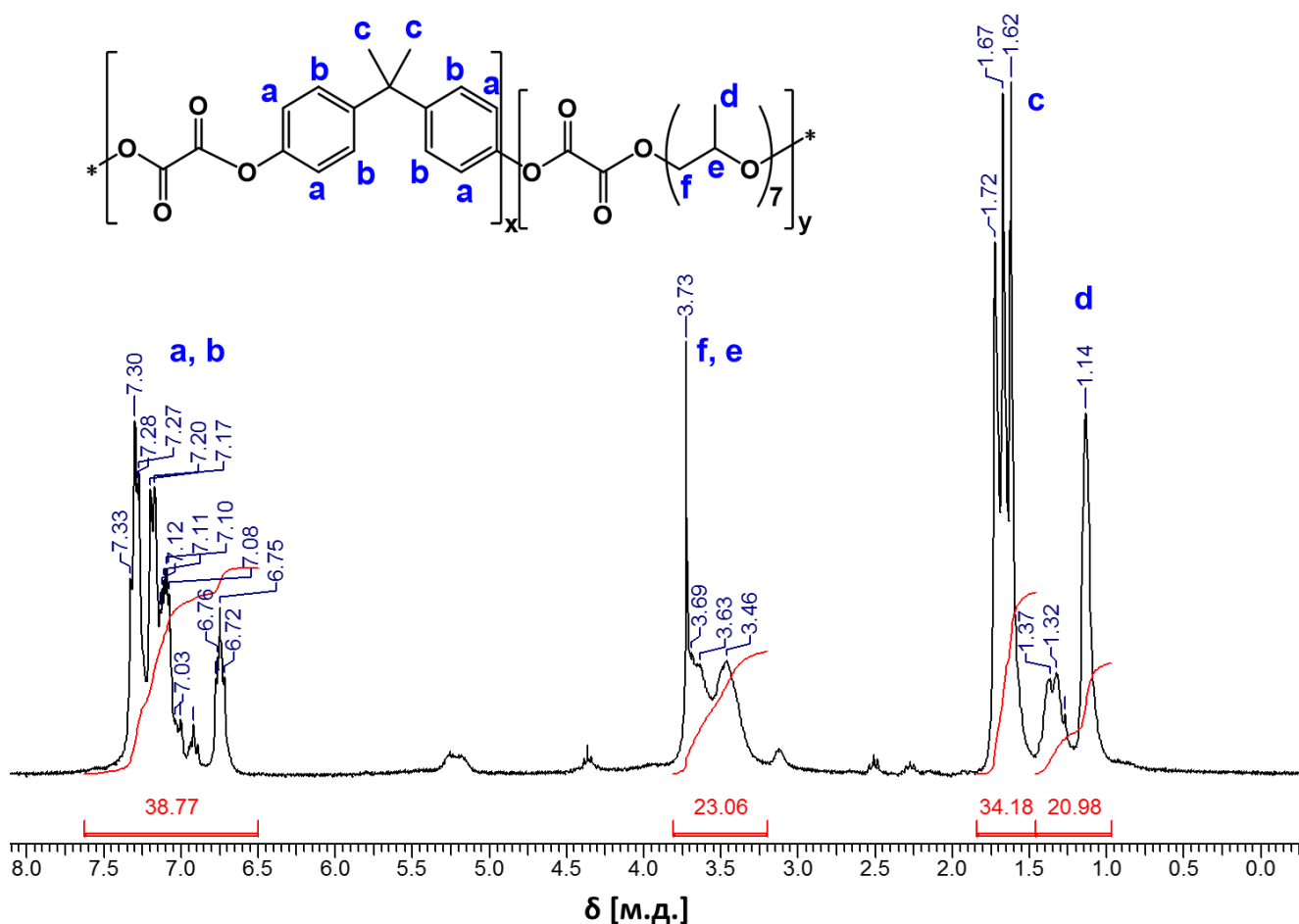


Рис. 47. Спектр ¹H ЯМР полиоксалата ПОКС-1 в CDCl₃.

Аналогичный расчёт для экспериментально определённого состава полиоксалата даёт среднюю массу звена 312 г/моль, т.е. столь небольшая разница не может привести к значительной ошибке в расчёте.

Для расчета конверсии (p) из экспериментально определенной среднечисловой степени полимеризации (M_n) мы воспользовались известным уравнение Карозерса (19)

$$M_n = \frac{1}{1-p} \quad (19)$$

Величина p , определенная по этому уравнению на основании экспериментально определенной степени полимеризации составила 83%.

Второй способ получения полиоксалата был призван избежать любого фракционирования, возможного в первом случае, поэтому продукт поликонденсации БФА, ППО400 и оксалилхлорида отделяли только от ТЭА и его соли. Для работы с нефракционированным полиоксалатом его раствор в ТГФ упаривали досуха, получая тем самым образец ПОКС-2 (Рис. 48а). Для изучения влияния молекулярной массы на стабильность полиоксалата по отношению к гидролизу и его способность вступать в ПО-реакцию с H_2O_2 , реакционную смесь сначала концентрировали на роторном испарителе, а затем наносили на полупрепаративную колонку ГПХ и таким образом получали относительно узкие фракции ПОКС-2 (Рис. 48б). Молекулярно-массовые характеристики нефракционированного полиоксалата и трёх выделенных фракций, использованных в последующих экспериментах, приведены в Таблица 12.

Конверсия, рассчитанная на основании экспериментально определенной среднечисловой степени полимеризации по уравнению (19), составила 91%.

Как и в первом случае, на хроматограмме не проявляются мономеры, поэтому, учитывая указанные выше сложности при определении состава продукта методом ЯМР, состав ПОКС-2 полагали равным составу мономерной смеси, который был одинаков для ПОКС-1 и ПОКС-2, т.е. средняя молекулярная масса звена оказалась одинаковой для всех полученных полиоксалатов.

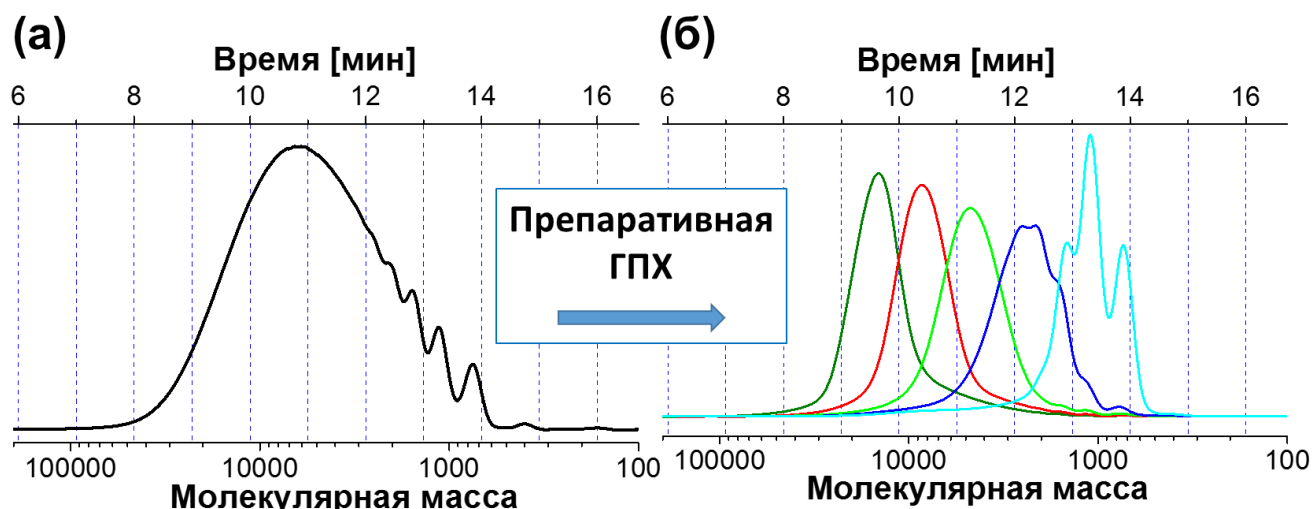


Рис. 48. (а) Молекулярно-массовое распределение полиоксалата ПОКС-2, полученное методом аналитической ГПХ и (б) результат его фракционирования методом препаративной ГПХ.

Молекулярные массы рассчитаны по полистирольным стандартам.

Анализ узко распределенных фракций полиоксалата с помощью УФ-спектроскопии показал, что содержание бисфенола А в них практически не отличалось, указывая на композиционную однородность сополимера.

4.2.2 Эмульсионные нанореакторы. Получение и коллоидные свойства

Для проведения ПО-реакции с участием полиоксалата в водной среде необходимо поместить его в микрогетерогенную систему, в которой полиоксалат был бы экранирован от деструктирующего действия воды, т.е. в нанореактор. Как было показано в главе 4.1 на мицеллах полимеров, большой гидродинамический радиус полимерного нанореактора (более 100 нм) способствует повышению эффективности ПО-реакции (Рис. 42). Известно, что частицы эмульсий имеют, как правило, большой гидродинамический радиус [84]. Преимуществом эмульсионных нанореакторов является также тот факт, что включение легко гидролизуемого полиоксалата в таких частицах может быть достигнуто за счет эмульгирования раствора в органическом масле, причем оксалат на стадии получения эмульсии напрямую не оказывается в водном микроокружении.

Органический растворитель для получения эмульсионных нанореакторов должен (1) хорошо растворять полиоксалат, (2) не должен существенно растворяться в воде и (3) не должен обладать существенной токсичностью. Всем этим требованиям отвечает одиметилфталат (ДМФ, Рис. 49). По нашим данным, растворимость полиоксалата в ДМФ составляет около 300 мг/мл, растворимость воды в ДМФ составляет около 0.1 мг/мл, а

ДМФ в воде — около 2.5 мг/мл. При этом известно, что ДМФ проявляет достаточно низкую токсичность [338].

Для стабилизации эмульсий ДМФ в воде мы использовали ранее описанные в предыдущем разделе плуроники (Таблица 10), являющиеся биосовместимыми полимерами [339]. Оказалось, что в этом ряду наилучшими эмульгирующими свойствами обладает плуроник L64. Среди семейства полимерных ПАВ плуроник L64 проявляет относительно низкую цитотоксичность [65]. Ранее он эффективно использовался для стабилизации эмульсий ароматических растворителей [84], в том числе ксилола [89] и сложных эфиров, например, трибутилфосфата [90].

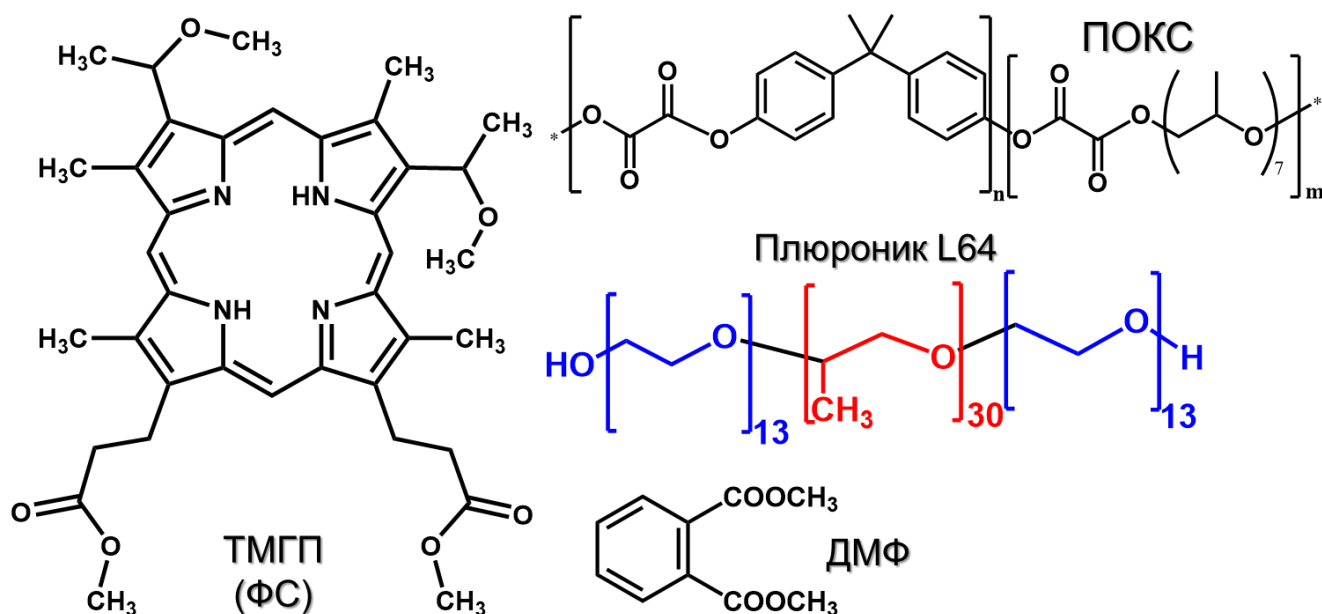


Рис. 49. Компоненты хемилюминесцентных эмульсий: полиоксалат (ПОКС), фотосенсибилизатор — ТМГП, органическая фаза эмульсии — ДМФ, амфифильный полимер — плуроник L64.

Для получения эмульсии полиоксалат ПОКС-1 (Таблица 12) растворяли в безводном ДМФ, смешивали его с безводным плуроником L64, тем самым образуя смешанный раствор L64 и полиоксалата в ДМФ, после чего быстро смешивали с водным буфером при интенсивном перемешивании в течение 60 с. Как будет показано далее, вероятно, такой способ получения водных дисперсий полиоксалата минимизирует его контакт с водой в процессе диспергирования. Оказалось, что полученные таким образом эмульсионные нанореакторы с ПОКС-1 содержали частицы, имеющие бимодальное распределение по размеру. Гидродинамический радиус, определённый методом динамического светорассеяния, составил 105 ± 25 нм и 400 ± 100 нм, соответственно (Рис. 50а). Обе фракции стабильны во времени как минимум в течение 3 часов (Рис. 50б).

Для выявления роли ДМФ в получении дисперсий полиоксалата, обеспечивающих защиту полиоксалата от гидролиза и проявляющих высокую эффективность в ПО-реакции, эмульсии на основе раствора полиоксалата в ДМФ сравнивали с дисперсиями, приготовленными полностью аналогичным образом, но из раствора в ТГФ. ДМФ и ТГФ являются хорошими растворителями для ароматических оксалатов, и активно использовались для проведения ПО-реакции [276, 340]. Оба растворителя могут быть использованы для приготовления довольно концентрированных растворов полиоксалата (до 30-50% масс.) и проявляют незначительную цитотоксичность вплоть до концентрации 0.4%. Концентрация эмульсий (дисперсий, содержащих ДМФ) и мицелл (дисперсий, полученных из раствора в ТГФ) выражена через концентрацию плуроника L64 в мг/мл при указанном массовом соотношении между остальными компонентами.

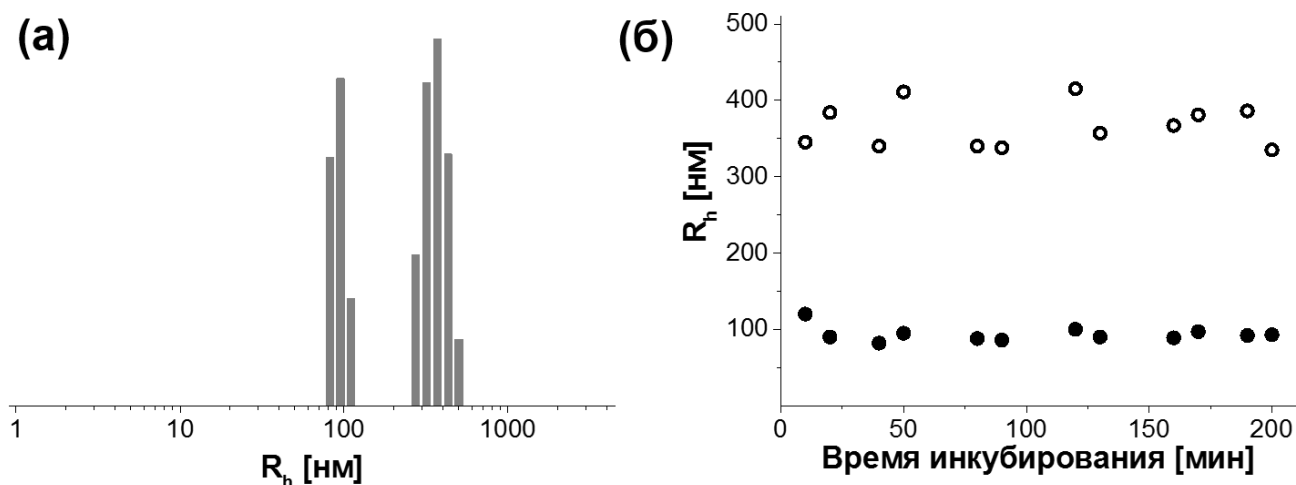


Рис. 50. (а) Распределение по размеру эмульсий, полученных из раствора ПОКС-1 и плуроника L64 в ДМФ. (б) Стабильность во времени гидродинамического радиуса обеих фракций эмульсий. L64/ДМФ/ПОКС-1 = 1.0:2.7:0.3 масс., $C(L64) = 0.25$ мг/мл, PBS, 37°C.

При использовании ТГФ вместо ДМФ полученные частицы имели также бимодальное распределение, но характеризовались значительно меньшим размером, гидродинамический радиус для них составил 23 ± 9 и 100 ± 30 нм, соответственно.

Разбавление обеих типов дисперсий на основе полиоксалата в диапазоне концентраций от 0.03 до 0.25 мг/мл плуроника L64 при фиксированном массовом соотношении L64/ДМФ/ПОКС-1 (1.0/2.7/0.3) приводило к уменьшению интенсивности рассеянного света (Рис. 51, кривая 1). Это означает, что частицы присутствовали в растворе даже при 10-кратном разбавлении эмульсий. Аналогичный результат был

получен для мицелл, содержащих полиоксалат (Рис. 51, кривая 2). В этом случае интенсивность рассеяния была значительно ниже из-за меньшего размера частиц.

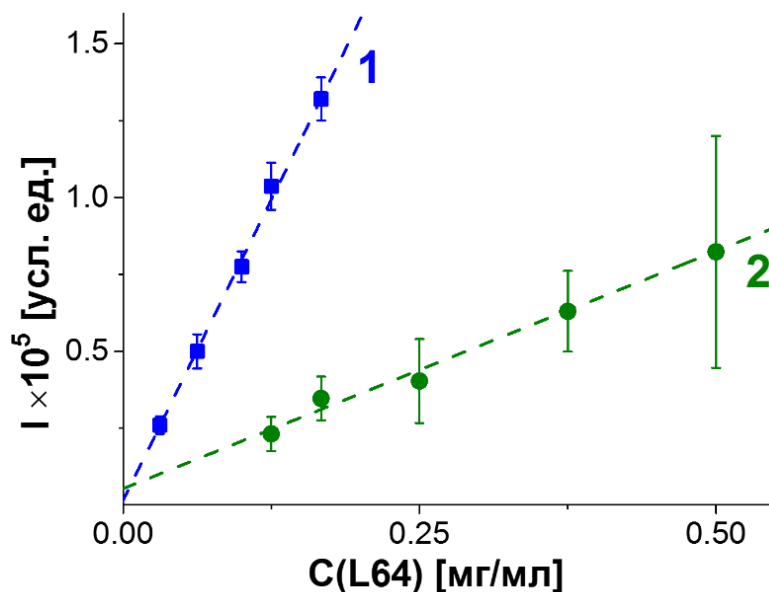


Рис. 51. Концентрационная зависимость средней интенсивности рассеянного света при угле рассеяния 90° для (1) эмульсий L64/ДМФ/ПОКС-1 (1.0:2.7:0.3 по массе) и (2) мицелл L64/ТГФ/ПОКС-1 (1.0:2.7:0.3 по массе) в PBS, 37°C . Интенсивность рассеянного света измерена в трёх повторях как минимум в двух независимых экспериментах.

Принципиальная разница между эмульсиями, содержащими ДМФ в гидрофобном ядре, и мицелл, приготовленных из раствора полиоксалата в ТГФ, была также подтверждена солубилизацией гидрофобного зонда ДФГТ. Этот подход основан на увеличении интенсивности флуоресценции ДФГТ при его распределении в гидрофобной микрофазе частиц [341]. Высокая чувствительность этого метода позволяет определять критическую концентрацию образования дисперсий различного состава, которая соответствует зарождению гидрофобной микрофазы (Рис. 52а).

Образование мицелл в растворах плуроника L64 наблюдалось при концентрации выше 0.35 мг/мл в полном соответствии с ранее опубликованными данными [65]. Для эмульсий L64/ДМФ и L64/ДМФ/ПОКС-1 образование гидрофобной микрофазы наблюдалось при более низких концентрациях, в 1.5 и 10 раз, соответственно (Рис. 52б). Это свидетельствует о том, что солубилизация ДМФ и в большей степени полиоксалата и ДМФ в мицеллах плуроника стабилизировали частицы при их разбавлении. В последнем случае критическая концентрация составила 0.03 мг/мл в полном соответствии с данными по светорассеянию. В противоположность этому раствор полиоксалата в ТГФ

лишь незначительно влиял на критическую концентрацию образования дисперсий. Ни ДМФ, ни полиоксалат не образовывали гидрофобную фазу в отсутствие плуроника L64.

Эти результаты показывают, что ТГФ, использованный как растворитель для полиоксалата, вероятно, перераспределяется в дисперсионную среду (водную фазу), что приводит к образованию дисперсий, состоящих только из плуроника и полиоксалата, т.е. мицелл, в гидрофобном ядре которых солюбилизирован полиоксалат. Однако, если дисперсии готовили из раствора полиоксалата в ДМФ, гидрофобное ядро частиц содержало не только плуроник и полиоксалат, но и ДМФ, т.е. такие дисперсии представляли собой эмульсию.

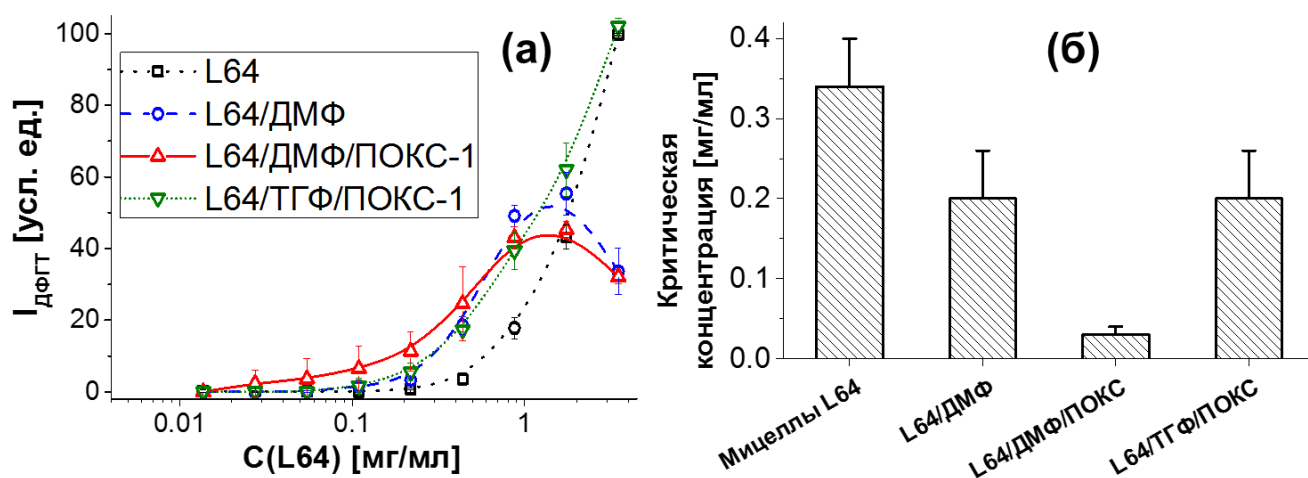


Рис. 52. Характеристика дисперсий, содержащих полиоксалат. (а) Зависимость интенсивности флуоресценции ДФГТ от концентрации дисперсий: (1) мицелл L64, (2) эмульсий L64/ДМФ (1:3 масс.), (3) эмульсий L64/ДМФ/ПОКС-1 (1.0:2.7:0.3 масс.) и (4) L64/ТГФ/ПОКС-1 (1.00:4.23:0.23 масс) в PBS, 37°C. Концентрация дисперсий выражена в эквивалентной концентрации плуроника L64.

Еще одно доказательство формирования эмульсионных нанореакторов, включающих все компоненты, показанные на Рис. 49, было получено методом центрифугирования. Для этого были приготовлены растворы, содержащие все упомянутые компоненты во всех возможных сочетаниях. В полученных образцах были измерены спектры поглощения в интервале от 200 до 400 нм, после чего образцы были подвергнуты центрифугированию при $6000 \times g$ в течение 20 минут, и опять были измерены УФ-спектры супернатантов. Оказалось, что в присутствии плуроника L64, ПОКС-1 или ТМГП более 95% ДМФ седиментирует вместе с частицами (Рис. 53).

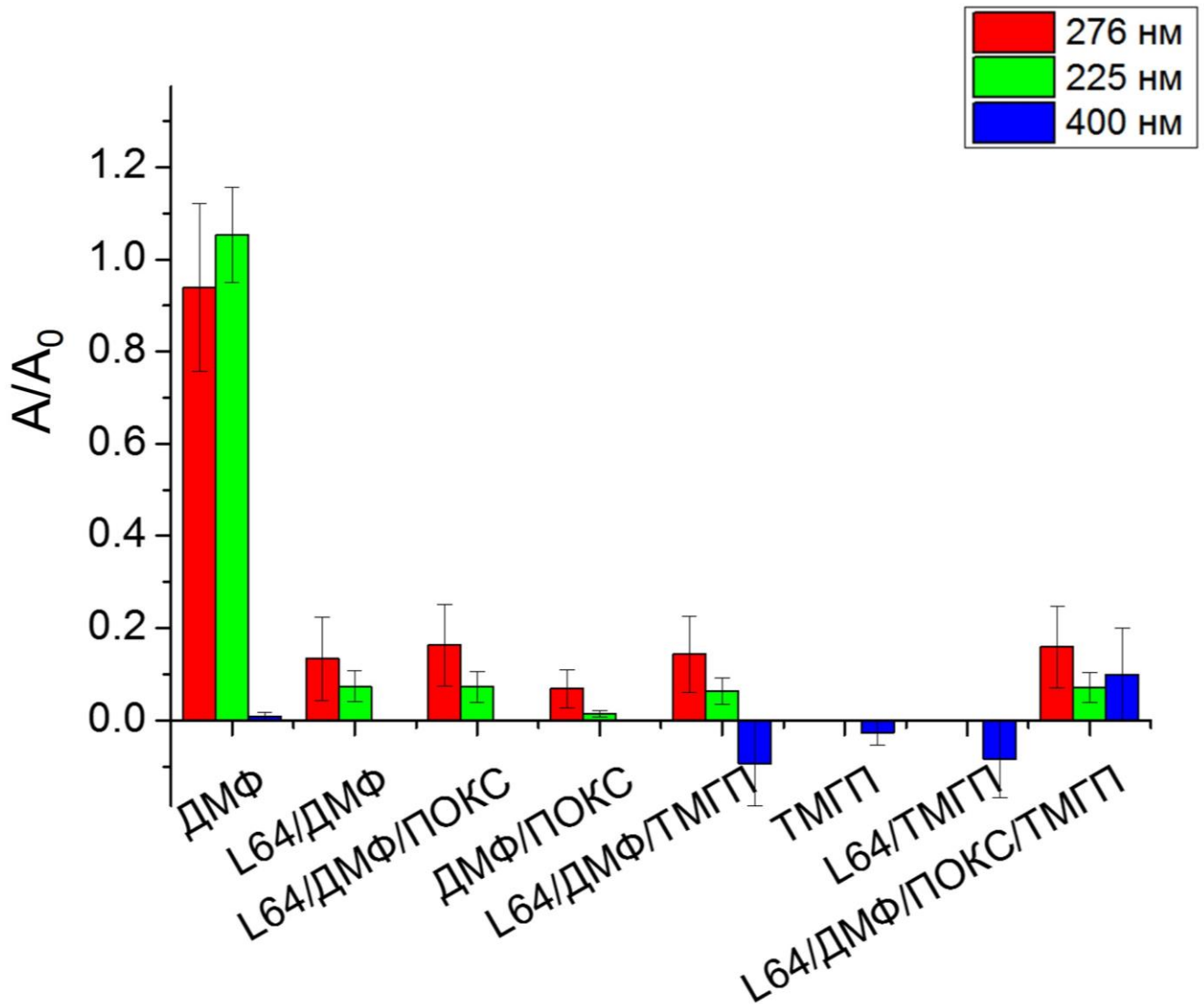


Рис. 53. Доля оптической плотности при длинах волн 276, 225 и 400 нм, оставшейся в супернатантах систем, показанных на оси абсцисс, после центрифугирования при $6000 \times g$ в течение 20 мин. $C(\text{ДМФ}) = 2.7 \text{ мг/мл}$, $C(\text{L64}) = 1.0 \text{ мг/мл}$, $C(\text{ПОКС-1/ДМФ}) = 10\% (\text{масс.})$, $C(\text{ТМГП}) = 0.05 \text{ мг/мл}$, $C(\text{ПОКС-1}) = 0.3 \text{ мг/мл}$.

Это означает, что в растворе, содержащем плуроник L64, ДМФ, ПОКС-1 и ТМГП, формируются частицы, поверхность которых покрыта плуроником L64, а гидрофобное ядро этих частиц содержит ДМФ, ПОКС-1 и ТМГП (Рис. 54). Разбавление системы, содержащей все 4 компонента, даже в 20 раз не приводит к исчезновению гидрофобной фазы, о чем свидетельствуют данные по солюбилизации ДФГТ (Рис. 52а).

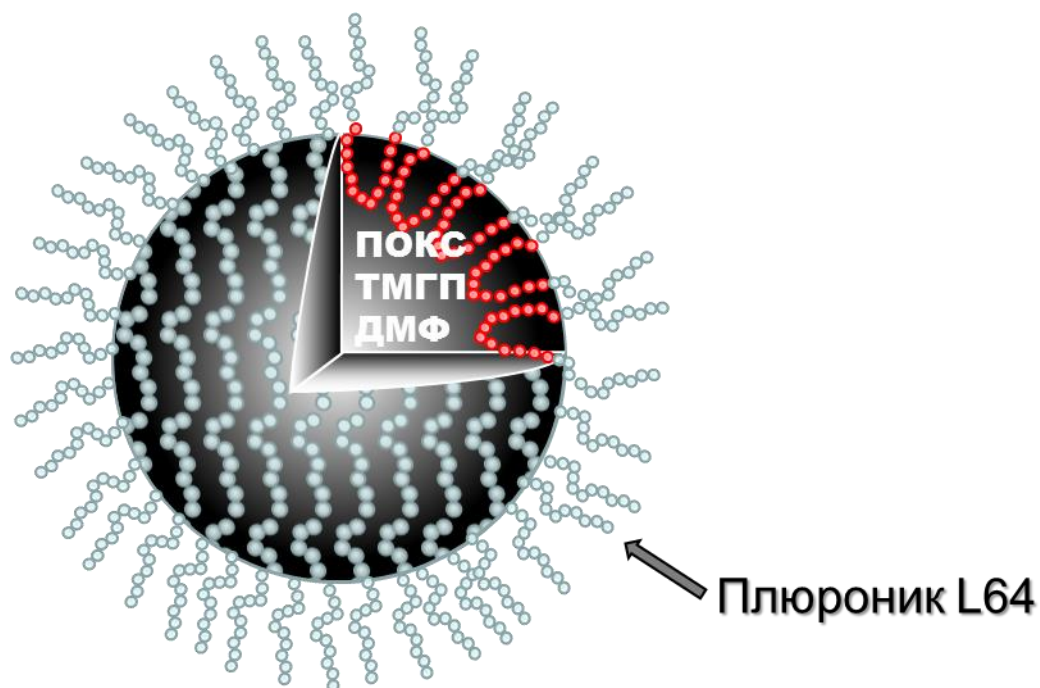


Рис. 54. Схематическое изображение эмульсионных нанореакторов, состоящих из плюроника L64, ДМФ, ПОКС и ТМГП.

4.2.3 Пероксиоксالاتная реакция и образование синглетного кислорода в эмульсионных нанореакторах

ПО-реакцию между оксалатом, включенным в частицы эмульсии, и H_2O_2 проводили в присутствии ТМГП, который также включали в состав частиц. Полиоксалат на основе бисфенола А гораздо менее активен, чем низкомолекулярный БНФО, использованный в первой части работы, поэтому скорость ПО-реакции была очень медленной, а сигнал очень слабым (Рис. 55а, кривая 1), что делало невозможной адекватную оценку интегральной интенсивности хемилюминесценции. Чтобы решить эту проблему, в систему добавляли имидазол, проявляющий свойства катализатора ПО-реакции [342]. Имидазол выполняет роль и нуклеофильного, и общесосновного катализатора [раздел 2.5.2.3] [282, 286, 343, 344], катализируя скорость-лимитирующую стадию ПО-реакции — расщепление сложноэфирной связи пероксидом водорода с образованием ВЭИ (Рис. 1, стадия I). Добавление имидазола привело к более быстрому затуханию хемилюминесценции (Рис. 55а, кривая 2) и тем самым позволило сократить время измерения до более приемлемых временных интервалов (обычно — около получаса).

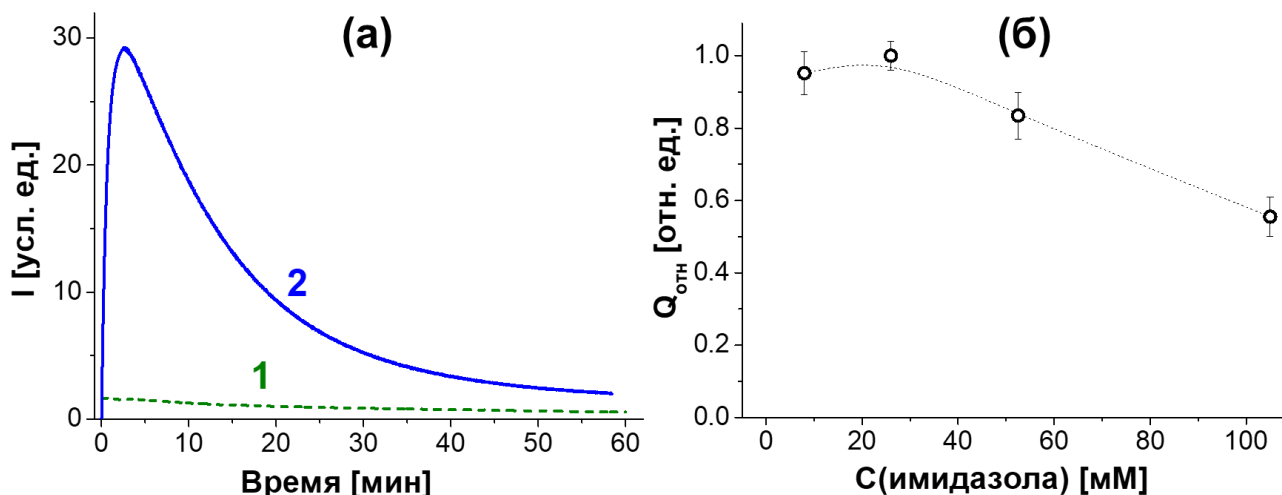


Рис. 55. Влияние имидазола на кинетику ПО-реакции. (а) Кинетика выделения света в ходе ПО-реакции ПОКС-1 в эмульсиях (1) в отсутствие имидазола и (2) в присутствии 26 мМ имидазола. (б) Зависимость относительной интегральной интенсивности хемилюминесценции эмульсий от концентрации добавленного имидазола. $C(L64) = 1.0$ мг/мл, $C(ДМФ) = 2.66$ мг/мл, $C(ПОКС-1) = 0.30$ мг/мл, $C(ТМГП) = 7.6$ мкМ, $C(H_2O_2) = 15.0$ мМ. Интегральные интенсивности нормированы на значение интенсивности, полученной при 26 мМ имидазола ($Q_{отн} = Q/Q_{макс}$).

Концентрации имидазола ниже 30 мкМ не влияли на интегральную интенсивность света, испущенного в ходе протекания ПО-реакции, тогда как дальнейшее увеличение концентрации катализатора приводило к небольшому уменьшению эффективности хемилюминесценции (Рис. 55б) в полном соответствии в ранее опубликованными данными [342, 345]. Таким образом, все дальнейшие эксперименты проводились при концентрации имидазола 26 мМ.

В предыдущем разделе мы продемонстрировали значительные отличия коллоидных свойств дисперсий полиоксалата, приготовленных с использованием ДМФ от аналогичных дисперсий, полученных с использованием ТГФ. Интегральная интенсивность света, испускаемого эмульсией ДМФ, содержащей полиоксалат, оказалась на два порядка выше, чем для аналогичных дисперсий, полученных из раствора полиоксалата в ТГФ. Этот указывает на существенные различия в упаковке компонентов в системах L64/ДМФ/ПОКС и L64/ТГФ/ПОКС. Можно предположить, что в системе на основе ТГФ смешивающийся с водой ТГФ перераспределяется в воду, тогда как полиоксалат, остающийся в мицеллах, подвергается гидролизу, что делает такую систему чрезвычайно малоэффективной в экспериментах по измерению хемилюминесцентной активности. Это означает, что природа растворителя влияет не только на коллоидные свойства получаемых нанореакторов, но и определяет способность полиоксалата вступать в ПО-реакцию.

Таким образом, добавление H_2O_2 к эмульсии, содержащей полиоксалат и ТМГП, приводило к испусканию света. Это говорит о том, что ПО-реакция в этих условиях протекает, и при этом ТМГП переходит в возбужденное состояние. По данным литературы [346], при возбуждении внешним источником света он способен генерировать синглетный кислород. Поскольку ТМГП возбуждается и в ПО-реакции, то можно было предположить, что и в нашей системе он тоже генерирует синглетный кислород.

Для проверки этого предположения был использован коммерчески доступный флуоресцентный зонд Singlet Oxygen Sensor Green (**SOSG**, Рис. 56а), проявляющий высокую селективность в отношении синглетного кислорода. Его молекула состоит из фрагментов 2'-хлорфлуоресцеина и 10-метилантрацена. Флуоресценция 2'-хлорфлуоресцеинового фрагмента в данной молекуле значительно снижена вследствие внутримолекулярного переноса электрона с антраценового фрагмента на флуоресцеиновый. При реакции зонда с синглетным кислородом образуется продукт окисления антрацена, эндопероксид SOSG-EP, сопряжение нарушается, и флуоресценция 2'-хлорфлуоресцеинового фрагмента сильно возрастает.

Производитель SOSG заявляет о чрезвычайно высокой чувствительности зонда по отношению к синглетному кислороду [157], однако очень неожиданным результатом оказалось быстрое окисление зонда в присутствии 20 мМ пероксида водорода в отсутствие фотосенсибилизатора (Рис. 56б, кривая 1). Реакция протекает до полного исчерпания SOSG. Однако скорость окисления падала по мере уменьшения концентрации пероксида водорода (Рис. 56б, кривая 2) и становилась пренебрежимо малой при 100 мкМ и 30 мкМ пероксида водорода (Рис. 56б, кривые 3 и 4, соответственно). Этот результат однозначно продемонстрировал возможность использования SOSG для детектирования образования синглетного кислорода при протекании ПО-реакции в присутствии низких концентраций пероксида водорода.

Оказалось, что протекание ПО-реакции в эмульсионных нанореакторах сопровождается значительным увеличением флуоресценции по сравнению с образцом, не содержащим ТМГП (Рис. 56в). Кинетика окисления SOSG в результате ПО-реакции в присутствии 30 мкМ пероксида водорода подчиняется моноэкспоненциальному закону с характеристическим временем около 20 минут (Рис. 56в, кривая 1), что соответствует кинетике ПО-реакции. Дальнейшее инкубирование реакционной смеси после окончания

ПО-реакции не приводило к дополнительному окислению SOSG. Это означает, что окисление зонда в данном эксперименте происходило за счёт реакции с синглетным кислородом, генерируемым порфириновым фотосенсибилизатором при протекании ПО-реакции, а не за счёт прямого окисления пероксидом водорода или молекулярным (атмосферным) кислородом. Этот результат доказывает образование синглетного кислорода в эмульсионных нанореакторах, содержащих ТМГП и полиоксалат. Следует особо подчеркнуть, что отсутствие в системе либо полиоксалата, либо ТМГП полностью предотвращало окисление SOSG при низких концентрациях пероксида водорода (Рис. 56в, кривые 2 и 3).

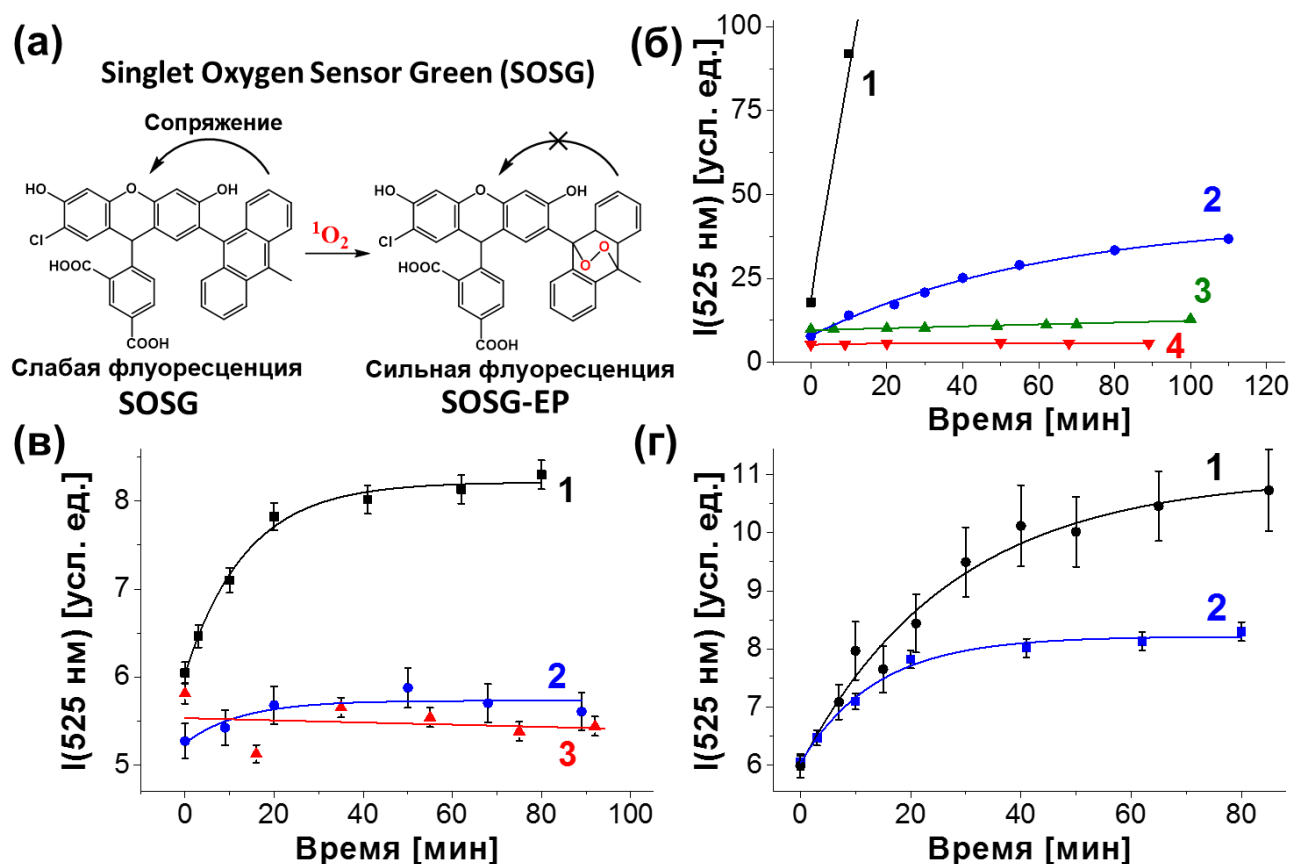


Рис. 56. (а) Структура молекулы флуоресцентного зонда SOSG и схема реакции его окисления синглетным кислородом. (б) Кинетика окисления флуоресцентного зонда SOSG в присутствии 20 мМ (1), 1 мМ (2), 100 мкМ (3) и 30 мкМ (4) пероксида водорода. (в) Временная зависимость интенсивности флуоресценции SOSG-EP в присутствии 30 мкМ H_2O_2 и полной эмульсии (1), эмульсии без ТМГП (2) и эмульсии без полиоксалата (3). Состав эмульсий L64/ДМФ/ПОКС-1/ТМГП = 1.0:2.85:0.15:0.05 масс. (г) Влияние дейтерированного растворителя на кинетику образования SOSG-EP в результате протекания ПО-реакции между полной эмульсией и 30 мкМ H_2O_2 в PBS, приготовленном в D_2O (1) и H_2O (2).

Известно, что время жизни триплетного возбужденного состояния порфиринов значительно возрастает в дейтерированных растворителях [347]. Оказалось, что замена

H_2O на D_2O привела к двукратному увеличению количества продукта окисления зонда, образовавшегося в ходе ПО-реакции в присутствии полной эмульсии (Рис. 56г). Этот результат является дополнительным доказательством образования синглетного кислорода при протекании ПО-реакции в бесклеточной системе.

4.2.4 Оптимизация состава эмульсионных нанореакторов для повышения эффективности пероксиоксалазной реакции

Так как эмульсионная хемилюминесцентная система L64/ДМФ/ПОКС/ТМГП содержит большое количество компонентов, содержание каждого из которых способно оказывать влияние на количество испускаемого света, состав эмульсии был оптимизирован для достижения максимальной эффективности ПО-реакции, доступной для этих конструкций.

Для эмульсионных систем важнейшим параметром, определяющим их стабильность, является соотношение между ПАВ и дисперсной фазой, т.е. в данном случае — между плуроником L64 и гидрофобной микрофазой, состоящей преимущественно из ДМФ и полиоксалата. Увеличение концентрации плуроника при постоянной концентрации гидрофобных компонентов (2.7 мг/мл ДМФ и 0.3 мг/мл полиоксалата) приводило к резкому возрастанию интегральной интенсивности хемилюминесценции, которая достигала плавного максимума при массовой доли плуроника, равной 0.34 (Рис. 57а). В соответствии с классической концепцией стабильности эмульсий [84], такое содержание плуроника соответствует его минимальному количеству, достаточному для того, чтобы покрыть поверхность всех частиц, т.е. всю поверхность границы раздела фаз. Дальнейшее повышение концентрации плуроника приводило к медленному снижению эффективности хемилюминесценции.

Интенсивность хемилюминесценции линейно возрастает с концентрацией активатора вплоть до 20 мкМ ТМГП (Рис. 57б) в полном соответствии с механизмом ПО-реакции (Рис. 1), который также подразумевает линейную зависимость от концентрации активатора. С позиции кинетики, скорость образования возбуждённого состояния активатора в результате его реакции с ВЭИ, а также скорость его излучательной релаксации зависит от концентрации активатора в первой степени. В том случае, если ВЭИ не успевает передать энергию на активатор, он претерпевает распад либо самопроизвольно, либо под действием многочисленных нуклеофилов, присутствующих

в системе. Однако выше 20 мкМ ТМГП наблюдается плато, вероятно, вследствие самотушения хемилюминесценции порфирина.

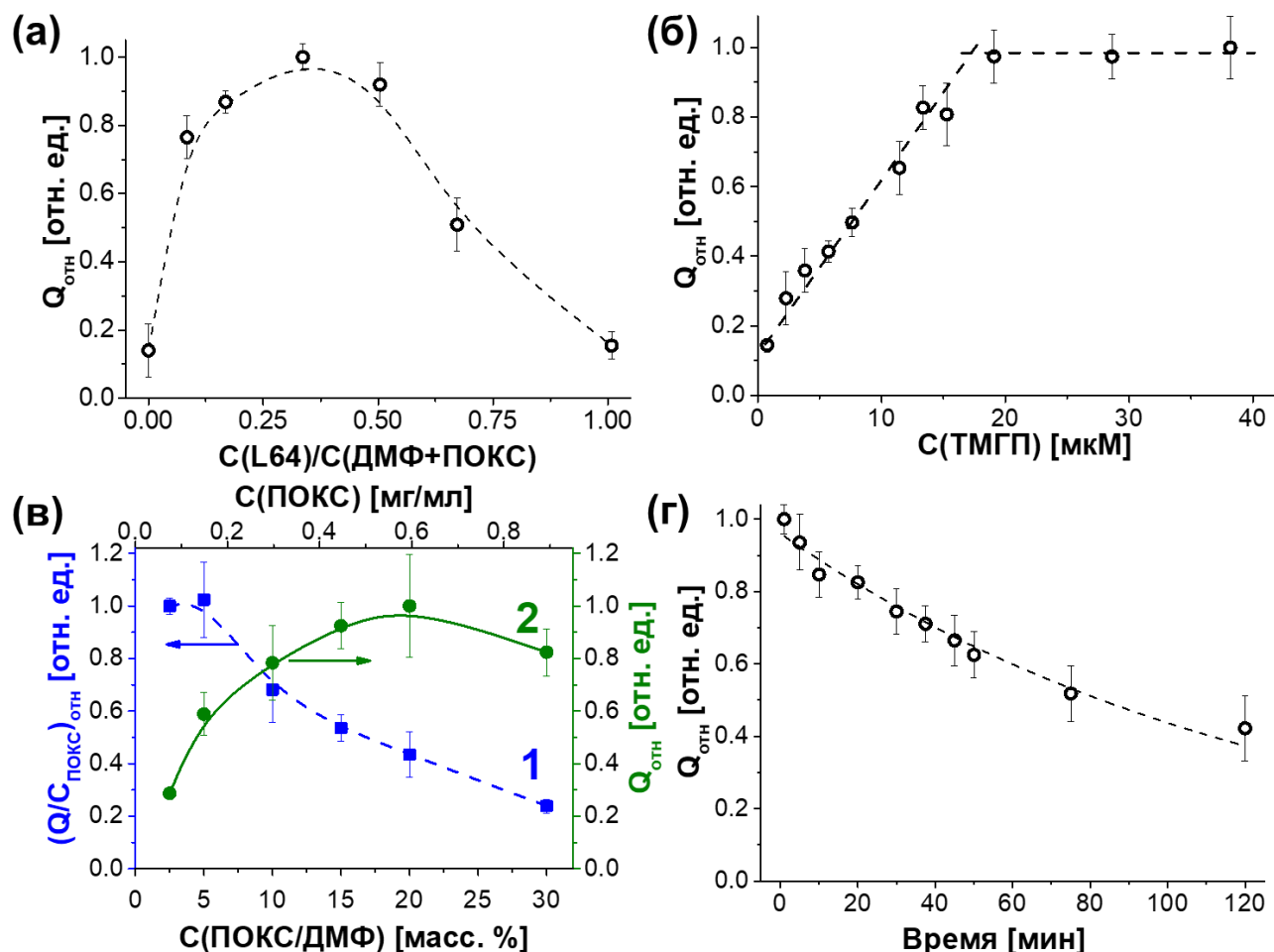


Рис. 57. Зависимость относительной интегральной интенсивности ПО-реакции ($Q_{\text{отн}} = Q/Q_{\text{макс}}$) от состава эмульсионной хемилюминесцентной системы. (а) Варьирование содержания плуроника L64, которое выражено в виде массовой доли по отношению к органической фазе (ДМФ+ПОКС-1). $C(\text{ДМФ}) = 2.7$ мг/мл, $C(\text{ПОКС-1}) = 0.3$ мг/мл, $C(\text{ТМГП}) = 7.6$ мкМ (0.005 мг/мл); (б) Варьирование концентрации ТМГП. $C(\text{L64}) = 1.0$ мг/мл, $C(\text{ДМФ}) = 2.7$ мг/мл, $C(\text{ПОКС-1}) = 0.3$ мг/мл. (в) Варьирование содержания полиоксалата: (1) зависимость интегральной интенсивности хемилюминесценции, нормированной на количество полиоксалата в системе (левая ось, $(Q/C(\text{ПОКС}))_{\text{отн}} = (Q/C(\text{ПОКС})) / (Q/C(\text{ПОКС}))_{\text{макс}}$) и (2) относительной интегральной интенсивности (правая ось) от концентрации полиоксалата в расчёте на всю систему (верхняя ось) и в расчёте на раствор в ДМФ (нижняя ось). $C(\text{L64}) = 1.0$ мг/мл, $C(\text{ДМФ}+\text{ПОКС-1}) = 3.0$ мг/мл, $C(\text{ТМГП}) = 7.6$ мкМ; (г) Кинетика гидролиза полиоксалата в эмульсии L64/ДМФ/ПОКС-1 (1.0:2.7:0.3 по массе).

Во всех экспериментах $C(\text{имидазола}) = 26$ мМ, $C(\text{H}_2\text{O}_2) = 15.0$ мМ.

Варьирование концентрации ПОКС-1 в ДМФ в растворе, используемом для приготовления эмульсии, при фиксированной концентрации ТМГП оказывает сильное влияние на эффективность ПО-реакции. Интегральная интенсивность, нормированная на количество полиоксалата, пропорциональна квантовому выходу хемилюминесценции,

т.е. является величиной, характеризующей количество света, генерируемого 1 диэфирным фрагментом (только диэфир щавелевой кислоты активен в реакции с пероксидом водорода). Эта величина уменьшалась с ростом содержания полиоксалата в ДМФ (Рис. 57в, кривая 1, левая ось). При низких концентрациях полиоксалата (2.5 и 5.0% по массе в ДМФ) наблюдается плато, характеризующееся максимальной эффективностью хемилюминесценции. Однако в этих двух точках абсолютная интенсивность хемилюминесценции относительно низка (Рис. 57в, кривая 2, правая ось). В то же время эмульсии, приготовленные из 10 и 30% растворов полиоксалата в ДМФ продуцировали почти одинаковое количество света (Рис. 57в, кривая 2). Поэтому в дальнейшем мы работали с 10% (масс.) раствором полиоксалата в ДМФ, т.к. она обеспечивает как высокую интегральную интенсивность (Q , правая ось), так и приемлемую эффективность хемилюминесценции (Q/C_{POX}).

На основании полученных результатов был определён оптимальный состав эмульсий: L64/ДМФ/ПОКС-1/ТМГП 1.0:2.7:0.3:0.013.

Для эмульсий, полученных из 10%-го раствора полиоксалата в ДМФ, определили стабильность ПОКС-1, содержащегося в частицах. Для этого формировали эмульсию в концентрации, соответствующей 1.0 мг/мл плуроника L64, а затем её инкубировали при 37°C в течение определённого промежутка времени и запускали ПО-реакцию добавлением смешанного раствора пероксида водорода и имидазола. Интегральная интенсивность хемилюминесценции уменьшалась с ростом времени инкубирования эмульсии, предположительно, вследствие гидролиза полиоксалата (Рис. 57г). Изменениями системы на коллоидном уровне можно пренебречь, т.к. эмульсия продемонстрировала стабильность в экспериментах по светорассеянию в пределах всего изучаемого временного интервала (Рис. 50б). Период полураспада полиоксалата в результате гидролиза составил около 1.5 часов (Рис. 57г). Этот результат является приемлемым, т.к. позволяет тестировать полученные хемилюминесцентные эмульсии на клеточных культурах.

4.2.5 Зависимость скорости пероксиоксалатной реакции и стабильности полиоксалата в эмульсионных нанореакторах от его молекулярной массы

Для того чтобы выявить роль полимерной природы оксалата и определить влияние его молекулярной массы на эффективность ПО-реакции, были получены кривые испускания света для узко распределенных фракций полиоксалата (Таблица 12). В качестве объекта сравнения был использован синтезированный нами низкомолекулярный аналог полиоксалата — бисфенилоксалат (БФО), степень полимеризации которого принимали равной 1. БФО должен проявлять такую же реакционную способность по отношению к пероксиду водорода и воде, как и полиоксалат на основе бисфенола А, т.к. с позиции электронных эффектов соответствующие сложноэфирные фрагменты чрезвычайно близки. Следует отметить, что в данном эксперименте степень полимеризации рассчитывалась по числу диэфирных оксалатных фрагментов (фрагментов щавелевой кислоты, где обе карбоксильные группы образуют сложные эфиры), т.к. именно такой фрагмент является минимальной единицей, активной в реакции с пероксидом водорода (Рис. 58). В то же время моноэфир щавелевой кислоты, содержащий свободную карбоксильную группу не способен взаимодействовать с H_2O_2 .

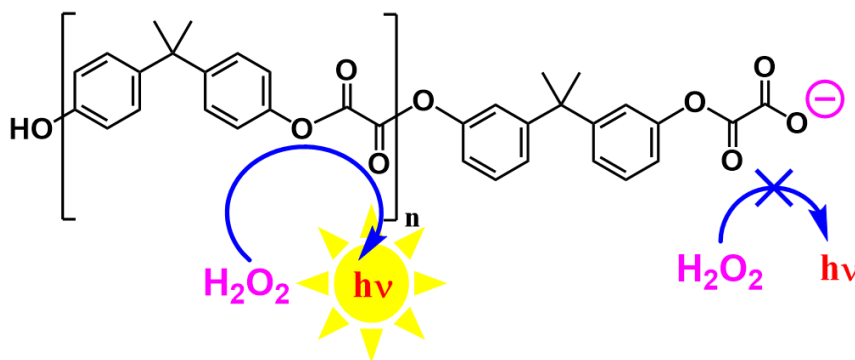


Рис. 58. Схема макромолекулы полиоксалата: фрагмент щавелевой кислоты, где обе карбоксильные группы образуют сложные эфиры — минимальная единица, активная в реакции с пероксидом водорода.

Изучение кинетики хемилюминесценции для этих образцов в эмульсии показало, что с ростом степени полимеризации уменьшается максимальная интенсивность хемилюминесценции, однако сильно возрастает продолжительность испускания света (Рис. 59а), что в итоге приводит к увеличению интегральной интенсивности на порядок (Рис. 59б).

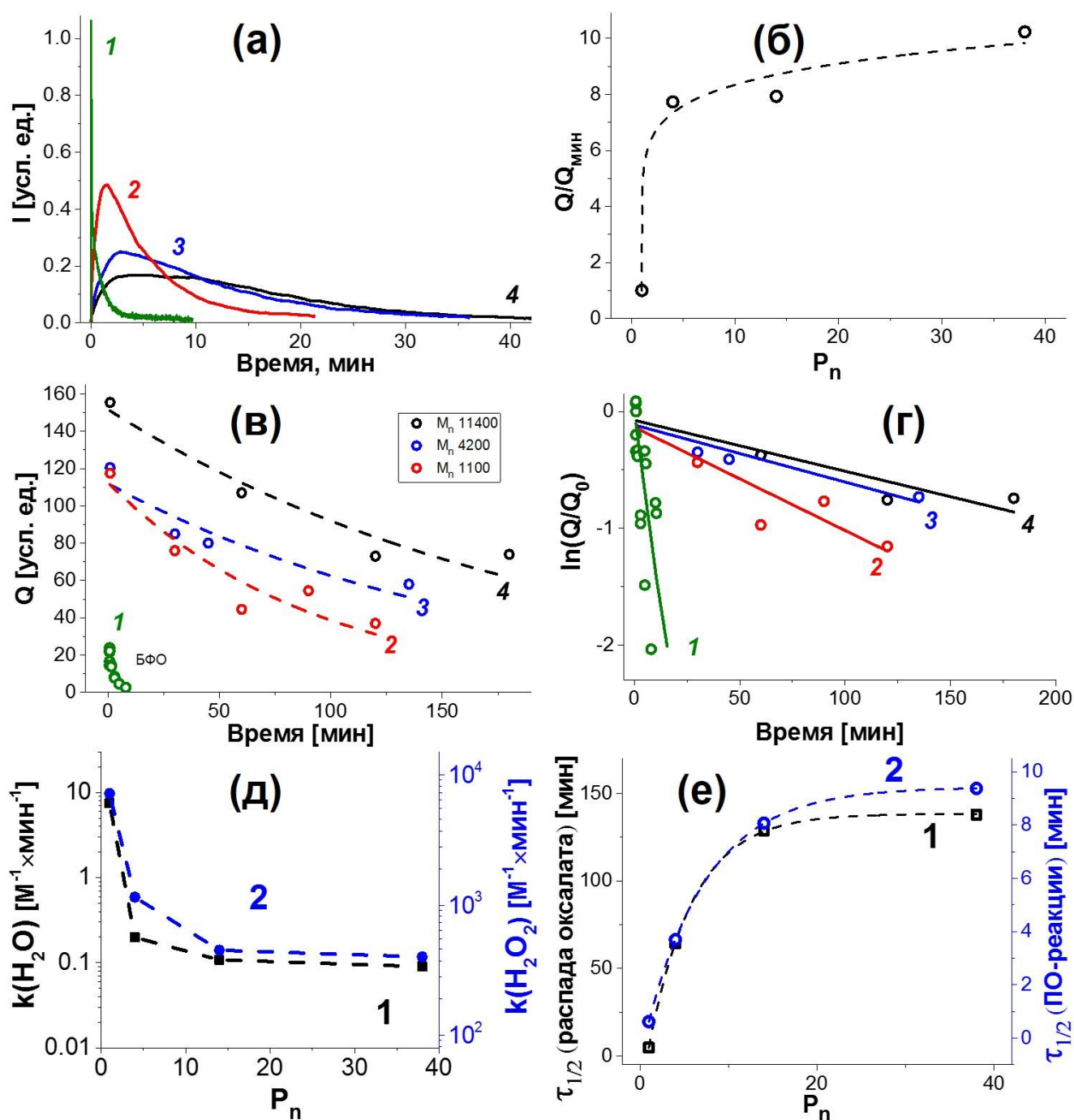


Рис. 59. Влияние молекулярной массы полиоксалата на его реакционную способность в реакциях с водой и пероксидом водорода. (а) Временная зависимость интенсивности хемилюминесценции, излучаемой эмульсиями, содержащими БФО (1) и полиоксалаты с M_n 1100 (2), 4200 (3) и 11400 (4). (б) Зависимость относительной интегральной интенсивности ($Q/Q(P_n=1)$) хемилюминесценции от степени полимеризации полиоксалата. Кинетика гидролиза БФО (1) и полиоксалатов (2-4) в эмульсии в (в) линейных и (г) полулогарифмических координатах. (д) Зависимость константы скорости гидролиза полиоксалата (кривая 1, левая ось ординат) и константы скорости реакции с H_2O_2 (кривая 2, правая ось ординат) от степени полимеризации полиоксалата. (е) Зависимость времени полупревращения БФО и полиоксалата в реакции гидролиза (кривая 1, левая ось ординат) и ПО-реакции (кривая 2, правая ось ординат) от степени полимеризации полиоксалата. Во всех опытах L64/ДМФ/оксалат/ТМГП (1.00:2.85:0.15:0.005 по массе), $C(\text{L64})=1$ мг/мл, $C(\text{имидазола})=26$ мМ, $C(\text{H}_2\text{O}_2)=15.0$ мМ.

Для объяснения наблюдаемого эффекта была изучена зависимость кинетики гидролиза полиоксалата от его молекулярной массы (Рис. 59в). Для этого полностью сформированные эмульсии инкубировали в течение некоторого времени, после чего к ним добавляли H_2O_2 и имидазол и измеряли интегральную интенсивность хемилюминесценции. Оказалось, что кинетика снижения интегральной интенсивности описывается экспоненциальной функцией, указывая на псевдопервый порядок гидролиза (Рис. 59в, г).

При этом, по мере роста молекулярной массы, константа скорости гидролиза полиоксалата в эмульсии, $k(\text{H}_2\text{O})$, уменьшается вначале резко, а затем более полого, как это обычно наблюдается для различных физико-химических параметров полимеров [348, 349] (Рис. 59д, кривая 1, левая ось ординат) (данные по константам скоростей реакций БФО и полиоксалатов с водой и пероксидом водорода, выраженные через времена полупревращения, приведены на Рис. 59е). В результате константа скорости гидролиза полиоксалатов уменьшается на два порядка с ростом их молекулярной массы. Однако одновременно снижается и константа скорости «полезной» реакции с пероксидом водорода $k(\text{H}_2\text{O}_2)$, но только на один порядок (Рис. 59д, кривая 2, правая ось ординат). Эта разница и приводит к увеличению на порядок общего количества генерируемого света с ростом молекулярной массы (Рис. 59б). Данный эффект может быть обусловлен рядом причин.

Во-первых, рост длины цепи может приводить к снижению скоростей ПО-реакции и гидролиза вследствие стерических причин, т.к. нуклеофильная атака как пероксида водорода, так и воды требует их соответствующего расположения относительно плоскости сложноэфирных групп.

Вторым фактором, влияющим на скорость реакции, может быть качество растворителя. Использованный для получения эмульсий ДМФ, по всей видимости, не является хорошим растворителем для полиоксалата. На это указывает несколько фактов: 1) при одинаковой концентрации полиоксалата в ДМФ с ростом молекулярной массы полимера в изученном интервале ухудшается его растворимость, 2) концентрированные растворы полиоксалата при нагревании растворяются, но при охлаждении медленно мутнеют.

Таким образом, ДМФ не является хорошим растворителем для полиоксалата, а следовательно, можно предположить, что цепь полиоксалата частично сколлапсирована

в ДМФ что также ограничивает доступность сложноэфирных связей для пероксида. Более того, при попадании раствора полиоксалат/ДМФ в воду, полиоксалат становится растворённым не в чистом ДМФ, а в ДМФ, насыщенном водой, что также ухудшает качество растворителя.

Наконец, в качестве третьего весьма вероятного фактора, необходимо отметить то, что рост цепи существенно увеличивает гидрофобность полимера и его коэффициент распределения между водой и ДМФ, способствуя его погружению в центр эмульсионной частицы. Коэффициенты распределения пероксида водорода и воды в системе октанол/вода составляют 0.38 и 0.042, соответственно. Таким образом, пероксид водорода имеет большее сродство к гидрофобной микрофазе эмульсий, чем вода, поэтому баланс между гидролизом и реакцией с H_2O_2 смещается в сторону последней.

Полученные результаты однозначно указывают на то, что полимерные оксалаты имеют значительное преимущество по сравнению с низкомолекулярными аналогами в качестве субстратов ПО-реакции.

4.2.6 Взаимодействие эмульсионных нанореакторов с раковыми клетками

4.2.6.1 Цитотоксичность хемилюминесцентных эмульсий

Эмульсии тестировали на клетках аденокарциномы молочной железы человека, проявляющих устойчивость ко многим лекарствам (**MCF-7/ADR**) и трудно поддающихся лечению. Для этой линии клеток характерен измененный метаболизм АФК, связанный с устойчивостью этих клеток к большинству химиотерапевтических лекарств [350]. Прежде всего определяли цитотоксичность всех компонентов эмульсии (Рис. 60а). Цитотоксичность гидрофобных ПОКС-1, ДМФ и ТМГП определяли не отдельно, а в составе дисперсий, стабилизированных плуроником L64, на основе дополнительного вклада в цитотоксичность по сравнению с чистым L64. Диапазон концентраций отдельных компонентов или конструкций на их основе для тестирования на клетках определяли таким образом, чтобы кривая токсичности (зависимость доли выживших клеток от концентрации вещества) имела выраженные плато, соответствующие 100 и 0% выживших клеток. Это необходимо для того, чтобы наиболее точно аппроксимировать экспериментальные точки функцией (уравнение 17 в разделе 3.4) и таким образом точнее рассчитать параметр IC_{50} , который использовали в качестве количественной характеристики цитотоксичности. IC_{50} соответствует концентрации вещества, вызывающей гибель 50% клеток. Также в качестве количественной характеристики

цитотоксичности использовали параметр ННК (наибольшую нетоксичную концентрацию) — максимальную концентрацию соответствующего соединения, выше которой количество выживших клеток начинает снижаться.

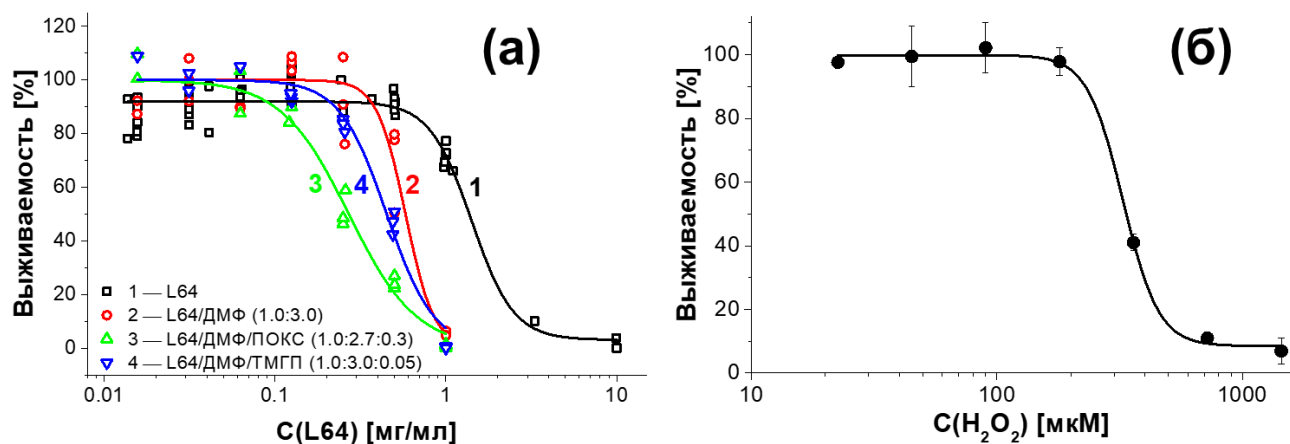


Рис. 60. (а) Цитотоксичность компонентов эмульсии (1 — плуроник L64, 2 — L64/ДМФ 1.0:3.0, 3 — L64/ДМФ/ПОКС-1 1.0:2.7:0.3, 4 — L64/ДМФ/ТМГП 1.0:3.0:0.05) и (б) пероксида водорода.

Для оценки цитотоксичности клетки (3500 на лунку) инкубировали в течение 1 часа с тестируемым веществом в среде DMEM без сыворотки, а затем оставляли в среде с сывороткой на 3 суток. Выживаемость клеток оценивали с помощью МТТ-теста.

Т.к. ПО-реакция протекает только в присутствии всех компонентов, возникновение цитотоксичности, обусловленной ПО-реакцией с внутриклеточным пероксидом водорода, можно ожидать только для нанореакторов, содержащих и полиоксалат, и фотосенсибилизатор. Таким образом, в качестве контрольных образцов во всех экспериментах использовали нанореакторы, аналогичные тестируемым по составу, но не содержащие фотосенсибилизатор ТМГП. Такой выбор был обусловлен тем, что именно с возбуждением ТМГП в результате ПО-реакции должно быть связано образование синглетного кислорода. Контроль с ТМГП, но без полиоксалата, сильнее отличается от тестируемых конструкций, т.к. обладает иным поверхностным зарядом (полиоксалат придаёт отрицательный заряд эмульсиям, см. раздел 4.2.7) и, возможно, прочими характеристиками. Состав эмульсии для тестирования на клетках соответствовал оптимальному составу, определенному в бесклеточных экспериментах.

После инкубации клеток с эмульсией, содержащей ТМГП, разница по сравнению с контролем без фотосенсибилизатора была незначительна (0.21 ± 0.03 и 0.26 ± 0.02 мг/мл) (Рис. 61а). Вероятно, очень малая дополнительная токсичность полной эмульсии обусловлена недостаточной концентрацией эндогенного пероксида водорода, необходимого для протекания ПО-реакции.

Чтобы увеличить содержание эндогенных АФК, клетки подвергались окислительному стрессу, который индуцировали добавлением пероксида водорода [351, 352] в нетоксичной концентрации, равной ННК (около 200 мкМ) (Рис. 60б). Клетки, предварительно обработанные таким образом, инкубировали с эмульсией и обнаружили значительную разницу в значениях IC_{50} для полных нанореакторов (IC_{50}^{XII}) и для контроля (IC_{50}^K) (Рис. 61б). Для количественной оценки вклада ПО-реакции в цитотоксичность хемилюминесцентных конструкций использовали соотношение IC_{50}^K/IC_{50}^{XII} , которые варьировали в диапазоне от 3 до 6 в независимых экспериментах.

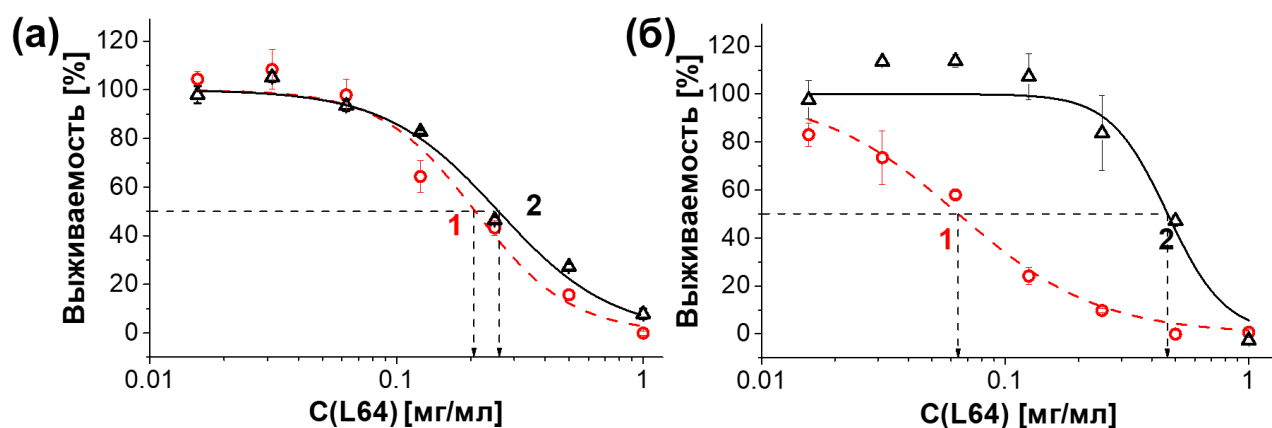


Рис. 61. Зависимости доли выживших клеток MCF-7/ADR от концентрации эмульсии для (а) интактных клеток и (б) клеток в состоянии окислительного стресса, к которым добавляли полную эмульсию (1) или образец сравнения (эмульсию без ТМГП) (2). Концентрация эмульсии выражена через концентрацию L64 при соотношении компонентов L64/ДМФ/ПОКС-1/ТМГП = 1.0:2.7:0.3:0.05 масс.

Увеличение цитотоксичности хемилюминесцентных эмульсий могло быть результатом взаимодействия солюбилизированного полиоксалата как с эндогенным пероксидом водорода, так и со следами пероксида водорода в клеточной среде, использованного для стимуляции окислительного стресса в клетках. Чтобы выяснить причину наблюдаемого эффекта, концентрацию пероксида водорода в клеточной среде определяли напрямую с использованием широко известного подхода, основанного на окислении нефлуоресцирующей молекулы диацетата дигидродихлорофлуоресцеина ($H_2DCF-DA$) внутриклеточными АФК до флуоресцирующего дихлорофлуоресцеина (DCF). Метод основан на том, что $H_2DCF-DA$ сам по себе не может окисляться из-за ацетилированных гидроксильных групп, однако его внутриклеточное деацилирование под действием ферментов делает возможным его окисление гидроксил-радикалами или супероксидными анион-радикалами (Рис. 62а). Эти АФК генерируются из пероксида

водорода пероксидазами. Пероксид водорода во внешней клеточной среде определяли с помощью подхода, изначально предложенного в работе [328] и в дальнейшем использованного в других публикациях [329, 353]. Он заключается в предварительном гидролизе $H_2DCF-DA$ до деацилированной нефлуоресцирующей формы H_2DCF и дальнейшем окислении пероксидом водорода до флуоресцирующего DCF в присутствии пероксидазы хрена. Предел обнаружения этого метода составил около 50 нМ пероксида водорода (Рис. 62б).

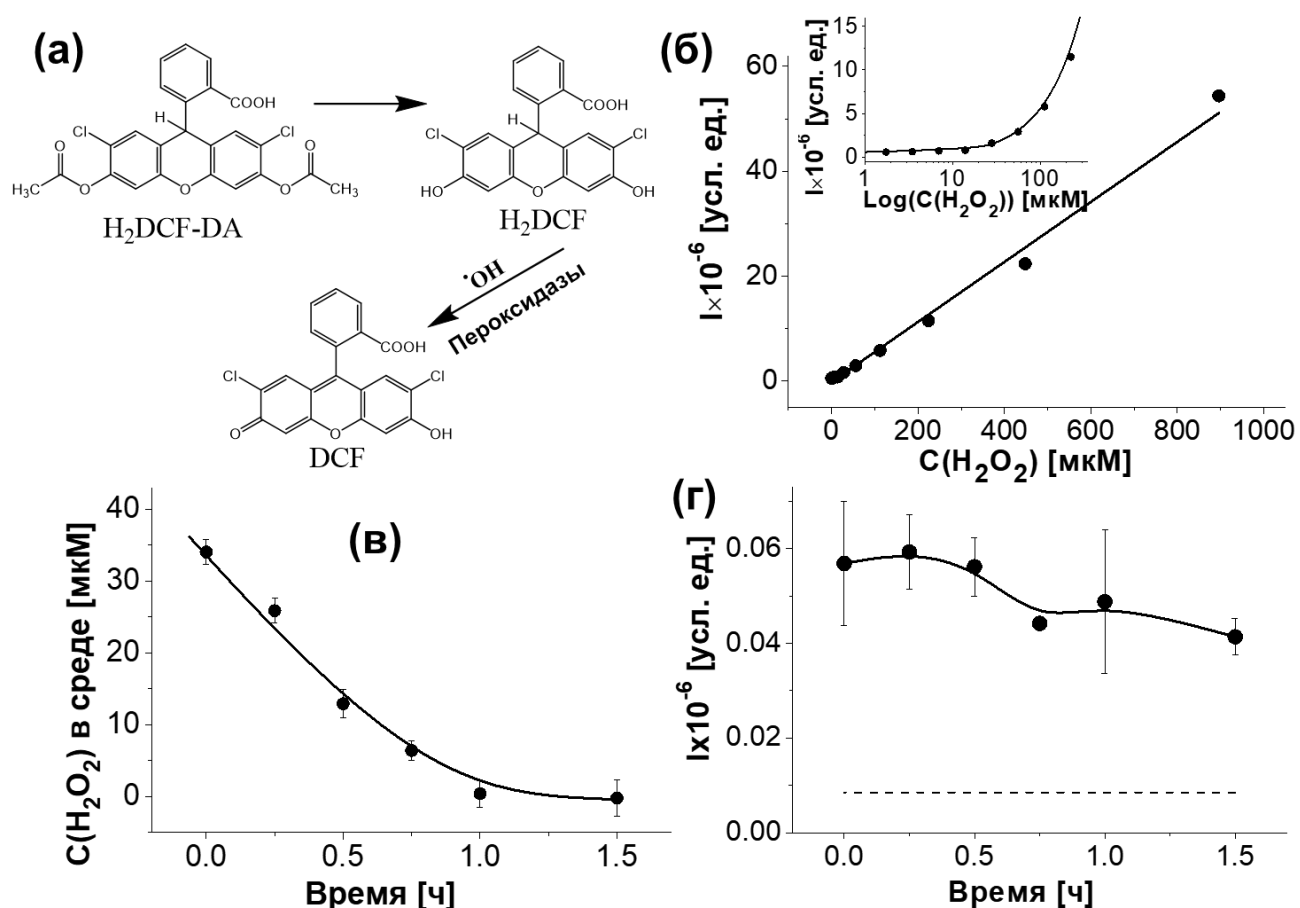


Рис. 62. Разложение H_2O_2 в культуральной среде под действием ФБС. (а) Механизм окисления $H_2DCF-DA$ в клетках в состоянии окислительного стресса [328]. (б) Зависимость интенсивности флуоресценции DCF от концентрации H_2O_2 при окислении $H_2DCF-DA$ в присутствии 0.2 мкМ пероксидазы хрена в среде DMEM без индикатора среды фенолового красного и гидрокарбонатного буфера, с добавлением 10 мМ HEPES и 10% ФБС. На вставке показан предел обнаружения H_2O_2 . (в) Зависимость концентрации H_2O_2 в культуральной среде от времени и (г) зависимость внутриклеточной флуоресценции DCF от времени при обработке клеток, предварительно стимулированных 200 мкМ H_2O_2 , средой, содержащей 10% ФБС. Пунктиром показана флуоресценция DCF в интактных клетках.

С использованием этого подхода было показано, что после обработки клеток пероксидом водорода замена клеточной среды на среду с сывороткой приводит к уменьшению концентрации пероксида водорода почти до нуля из-за присутствия

каталазы сыворотки (Рис. 62в). В то же время уровень внутриклеточной флуоресценции DCF в тех же образцах возрастал после инкубации монослоя клеток с 200 мкМ H_2O_2 в течение 1 часа и оставался постоянным по меньшей мере в течение дополнительных 1.5 часов при культивировании клеток в полной среде (Рис. 62г).

Таким образом, эксперименты показали значительную цитотоксичность, связанную с протеканием ПО-реакции, на клетках в состоянии окислительного стресса. Следует подчеркнуть, что во внутреклеточную ПО-реакцию вступает пероксид водорода, биосинтезированный клетками в ответ на действие экзогенного пероксида водорода.

4.2.6.2 Влияние состава хемилюминесцентных эмульсий на цитотоксичность

Полученные результаты свидетельствуют о том, что эмульсии, состав которых был оптимизирован в опытах по измерению хемилюминесценции в бесклеточных системах, вызывали цитотоксичность (Рис. 63а, кривые 1 и 2), связанную, по-видимому, с протеканием ПО-реакции с внутриклеточным пероксидом водорода, возбуждением фотосенсибилизатора и генерированием высокотоксичного синглетного кислорода. Было проверено, является ли такой состав оптимальным и в клеточных опытах. Для этого в экспериментах на клетках с состоянием окислительного стресса варьировали состав эмульсии (Рис. 63) аналогично тому, как это было реализовано для бесклеточных опытов (Рис. 57).

Во-первых, конструкции, приготовленные из раствора полиоксалата в ТГФ, были совершенно неактивны в клеточных экспериментах (Рис. 63а, кривые 3 и 4), что полностью соответствует опытам по измерению хемилюминесценции, где такие дисперсии продуцировали на несколько порядков меньше света, чем эмульсии содержащие ДМФ. Для эмульсии на основе ДМФ параметр IC_{50}^K/IC_{50}^{XII} зависел от соотношения ПАВ/гидрофобная микрофаза (Рис. 63б), причем оптимум достигался примерно при том же составе, что и в бесклеточных опытах (Рис. 57а). Высокие значения IC_{50}^K/IC_{50}^{XII} наблюдались при соотношениях 0.17 и 0.34, тогда как при 0.68 оно значительно уменьшалось.

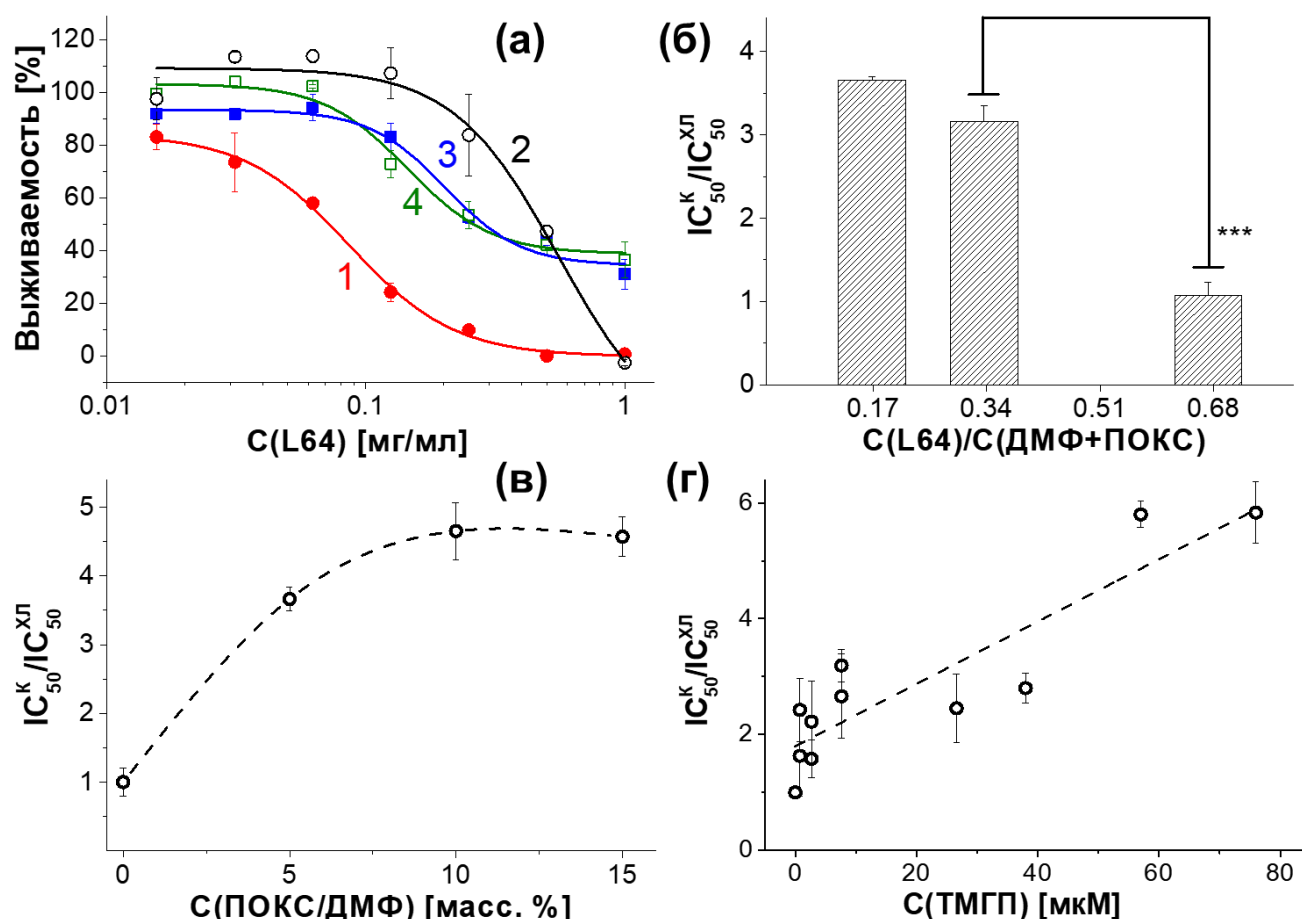


Рис. 63. Зависимость цитотоксичности, обусловленной протеканием ПО-реакции с внутриклеточным пероксидом водорода, от состава хемилюминесцентных нанореакторов. (а) Сравнение нанореакторов, приготовленных на основе растворов полиоксалата в ДМФ (эмульсии, кривые 1 и 2) и в ТГФ (мицелл, кривые 3 и 4). Клетки обрабатывали полными дисперсиями с ТМГП (кривые 1 и 3) и контрольными образцами без ТМГП (кривые 2 и 4). (б) Зависимость параметра IC_{50}^K/IC_{50}^{XL} от соотношения концентраций полимерного ПАВ и гидрофобной микрофазы частиц (L64/(ДМФ+ПОКС-1)) при постоянном содержании (10% по массе) ПОКС-1 в ДМФ. (в) Зависимость параметра IC_{50}^K/IC_{50}^{XL} от содержания ПОКС-1 в ДМФ при постоянном соотношении (1:3) концентраций полимерного ПАВ и гидрофобной микрофазы частиц (L64/(ДМФ+ПОКС-1)). В опытах (а)-(в) использовали 7.6 мкМ ТМГП. (г) Зависимость параметра IC_{50}^K/IC_{50}^{XL} от концентрации ТМГП при постоянном массовом соотношении L64/ДМФ/ПОКС-1 = 1.0:2.7:0.3. Окислительный стресс в клетках MCF-7/ADR стимулировали с помощью 200 мкМ H_2O_2 . Звездочки показывают достоверно различающиеся столбики согласно критерию Стьюдента с вероятностью $p < 0.05$.

Полное соответствие с эффективностью хемилюминесценции наблюдалось и при варьировании содержания полиоксалата в ДМФ. Увеличение концентрации полиоксалата в ДМФ от 5 до 10% приводило к увеличению IC_{50}^K/IC_{50}^{XL} в 1.3 раза (Рис. 63в), что очень близко к полуторакратному увеличению интегральной интенсивности хемилюминесценции, которое наблюдалось в бесклеточной системе (Рис. 57в).

Дальнейшее увеличение содержания полиоксалата не приводило к дополнительному росту и цитотоксичности, и хемилюминесценции.

Наконец, соотношение IC_{50}^K/IC_{50}^{XII} увеличивалось с концентрацией ТМГП, демонстрируя тот факт, что цитотоксичность в основном определяется эффективностью генерирования синглетного кислорода (Рис. 63г). Этот результат также согласуется измерениями хемилюминесценции (Рис. 57б). Это подтверждает, что в сконструированных эмульсиях ТМГП выполняет роль как активатора, так и фотосенсибилизатора.

В целом хорошее соответствие между данными по цитотоксичности и по эффективности хемилюминесценции в бесклеточных опытах является сильным аргументом в пользу того, что в основе обоих процессов лежит один и тот же механизм, а именно — протекание ПО-реакции с биогенным пероксидом водорода. В результате этого происходит возбуждение молекул фотосенсибилизатора и генерирование синглетного кислорода в клетках, который является источником токсичности для полученных эмульсий, содержащих полиоксалат и фотосенсибилизатор.

4.2.6.3 Хемилюминесценция в клетках в состоянии окислительного стресса

Использование эмульсий L64/ДМФ/ПОКС-1/ТМГП не позволило наблюдать внутриклеточную хемилюминесценцию, используя метод сканирующей конфокальной флуоресцентной микроскопии. Вероятно, причиной этого являются особые свойства ТМГП, который изначально выбирался с таким расчётом, чтобы выполнять роль фотосенсибилизатора. ТМГП является эффективным фотосенсибилизатором (квантовый выход генерации синглетного кислорода 0.74 [354]), но довольно малоэффективным флуорофором (квантовый выход флуоресценции в митохондриях 0.11-0.13 [355]). Для увеличения интенсивности хемилюминесценции состав эмульсий был модифицирован: ТМГП заменили на перилен (Рис. 64а), который не проявляет активности фотосенсибилизатора, но обладает очень высоким квантовым выходом флуоресценции (около 0.92 [356]). Перилен испускает синий свет, к которому большинство ФЭУ проявляет высокую чувствительность.

Другим фактором, способным увеличить скорость испускания света в ходе ПО-реакции, является использование нуклеофильного катализатора. Имидазол эффективно работал в бесклеточных системах (Рис. 55). В то же время, поскольку имидазол является гидрофильным соединением ($\lg P_{\text{октанол/вода}} = -0.16$), его проникновение в клетки

представляется сомнительным. Поэтому вместо имидазола использовали бензимидазол (Рис. 64а), который, вследствие на порядок большей гидрофобности ($\lg P_{\text{октано́л/вода}}=1.38$) может распределяться в гидрофобную микрофазу эмульсионных нанореакторов. Учитывая этот факт, бензимидазол был использован в концентрации значительно более низкой, чем имидазол (1 мМ). Таким образом, модифицированная эмульсия содержала 1.0 мг/мл плуроника L64, 2.7 мг/мл ДМФ, 0.3 мг/мл полиоксалата, 0.22 мМ перилена и 1.0 мМ бензимидазола.

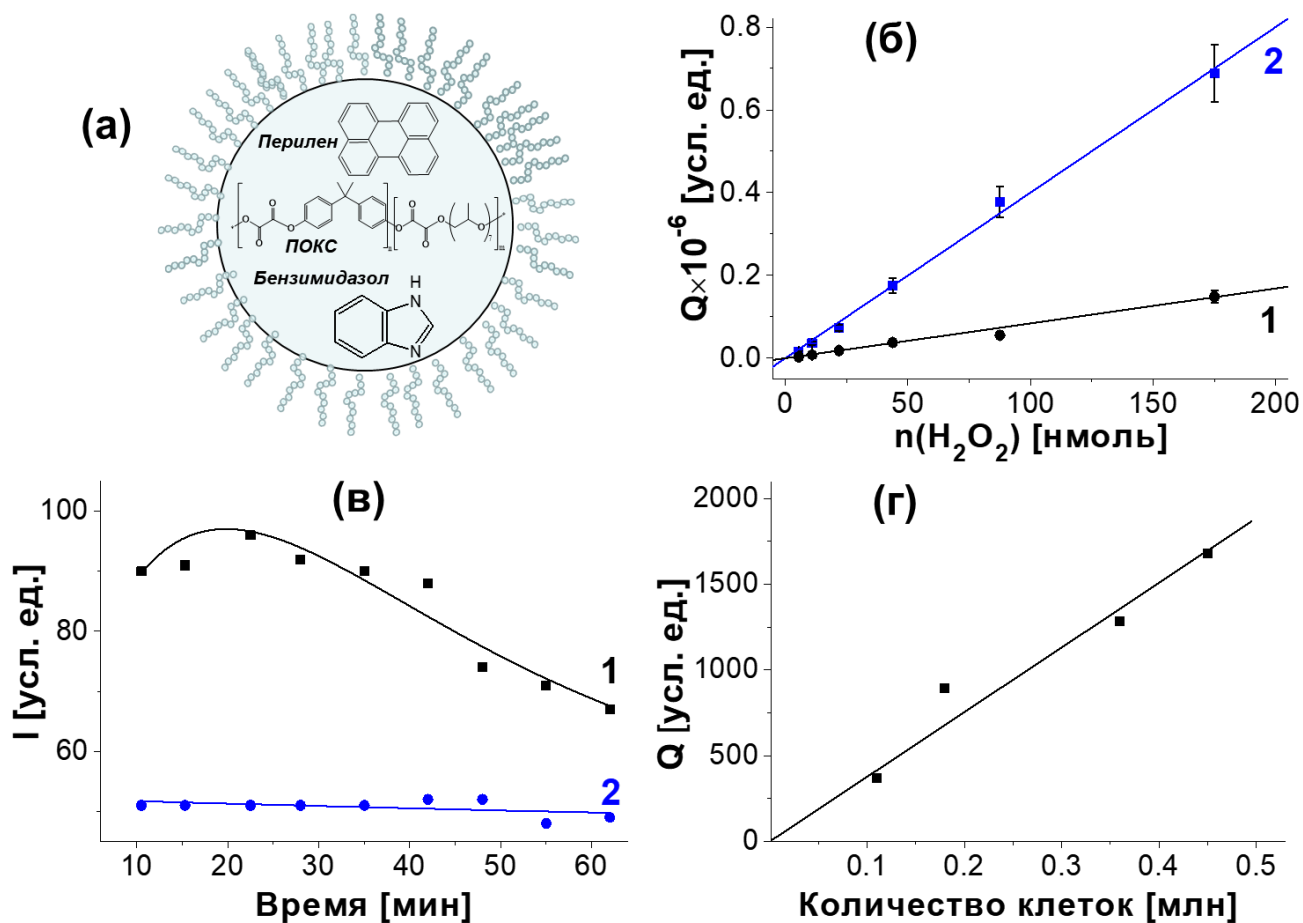


Рис. 64. Хемилюминесценция в ходе протекания ПО-реакции в клетках в состоянии окислительного стресса. (а) Схема эмульсии, модифицированной для увеличения эффективности хемилюминесценции. Конструкции содержат перилен в качестве активатора и бензимидазол в качестве катализатора. (б) Зависимость интегральной интенсивности хемилюминесценции от количества H_2O_2 для эмульсий, содержащих ТМГП (1) и перилена (2). Концентрации активаторов 0.22 мМ в обоих случаях. К конструкциям, содержащим ТМГП, добавляли 26 мМ имидазола для катализа ПО-реакции, эмульсии с периленом содержали 1 мМ бензимидазола. (в) Кинетика внутриклеточной хемилюминесценции, испускаемой 0.45 млн. клеток MCF-7/ADR, которые обработали (1) эмульсией, содержащей 0.3 мг/мл ПОКС-1, 0.22 мМ перилена и 1.0 мМ бензимидазола и (2) контрольным образцом без перилена. (г) Зависимость интегральной интенсивности хемилюминесценции, испускаемой в ходе внутриклеточной ПО-реакции, от числа клеток в образце.

В бесклеточной среде такие эмульсии оказались значительно более чувствительными по отношению к пероксиду водорода, чем эмульсия, содержащая ТМГП в присутствии имидазола (Рис. 64б). Добавление эмульсий с периленом и бензимидазолом к монослою клеток в состоянии окислительного стресса (около 0.45 млн клеток на образец) приводило к испусканию света, интенсивность которого была достаточной, чтобы её можно было измерить (Рис. 64в). Этот результат подтверждает, что ПО-реакция может протекать с участием внутриклеточного пероксида водорода.

Интенсивность испускаемого света зависела от плотности клеточного монослоя. Интегральная интенсивность падала с уменьшением количества клеток (Рис. 64г). Этот факт дает дополнительный аргумент в пользу нашего утверждения, что источником пероксида водорода в системе являются именно клетки, а не следы пероксида водорода, использованного для стимуляции клеток.

Линейный характер зависимости позволил оценить содержание пероксида водорода в клетках MCF-7/ADR в состоянии окислительного стресса. Соотношение наклонов прямых на Рис. 64г и прямой (2) на Рис. 64б составило 0.9 нмоль на 1 млн клеток. Следует подчеркнуть, что такое содержание было определено в клетках, стимулированных добавлением пероксида водорода в концентрации, равной ННК.

4.2.6.4 Накопление хемилюминесцентных эмульсий в клетках и образование синглетного кислорода в результате внутриклеточной пероксиоксидатной реакции

Внутриклеточную локализацию полученных эмульсий изучали методом сканирующей конфокальной флуоресцентной микроскопии. Добавление хемилюминесцентных эмульсий к клеткам приводило к захвату частиц и их распределению преимущественно в цитозоле (Рис. 65, красная флуоресценция соответствует ТМГП). Ядро было селективно помечено интеркалирующим красителем DAPI (синяя флуоресценция), при этом флуоресценция ТМГП в ядре значительно меньше, чем в цитозоле. Этот результат показывает, что частицы эмульсии способны проникать внутрь клеток.

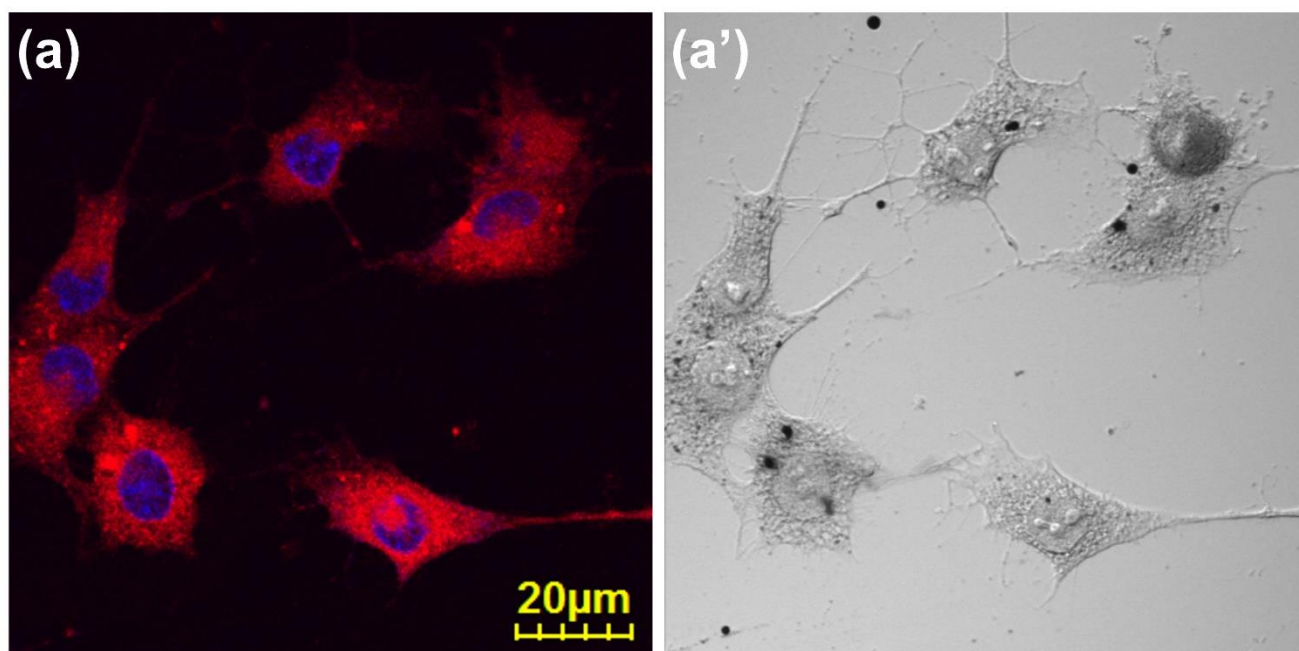


Рис. 65. Конфокальные микрофотографии клеток, инкубированных с полной эмульсией в культуральной среде без сыворотки в течение 1 часа при 37°C и фиксированные 4% раствором формальдегида в PBS. Ядра были селективно помечены синим флуоресцентным красителем DAPI. (a) Флуоресцентные микрофотографии (синий и красный каналы объединены); (a') дифференциальный интерференционный контраст.

Полученные выше результаты лишь косвенно указывают на то, что хемилюминесцентные эмульсии работают согласно теоретически предсказанному механизму. Согласно предположению, которое легло в основу данной работы, результатом протекания ПО-реакции между полиоксалатом, находящимся в частицах, и биогенным внутриклеточным пероксидом водорода является возбуждение фотосенсибилизатора и образование высокотоксичного синглетного кислорода. Однако единственным прямым доказательством того, что данная концепция была реализована можно считать лишь детектирование синглетного кислорода непосредственно внутри клеток. Для решения этой задачи использовали флуоресцентный зонд SOSG, чувствительный к синглетному кислороду (Рис. 56а), который также использовали для доказательства образования синглетного кислорода в бесклеточных системах (раздел 4.2.3).

В описании зонда SOSG, представленном производителем [157], указано, что зонд не проникает в клетки, однако в литературе было показано, что в отсутствие сыворотки он накапливается в клетках [159] и может окисляться синглетным кислородом, продуцированным различными фотосенсибилизаторами [160–163]. Добавление SOSG к интактным клеткам (Рис. 66а) или клеткам, стимулированным пероксидом водорода (Рис.

66б) приводило к чрезвычайно слабому окрашиванию цитозоля, причем ядра абсолютно не содержали окисленного зонда. Однако при добавлении хемилюминесцентных эмульсий и SOSG к стимулированным клеткам наблюдалось яркое окрашивание всех клеточных компартментов, включая ядра (Рис. 66в). Контрольные образцы эмульсий без ТМГП вызывали значительно меньшее окрашивание, чем полная конструкция (Рис. 66г). Однако некоторые клетки в этом образце имели значительно более яркую флуоресценцию, чем необработанные клетки (Рис. 66а и Рис. 66б).

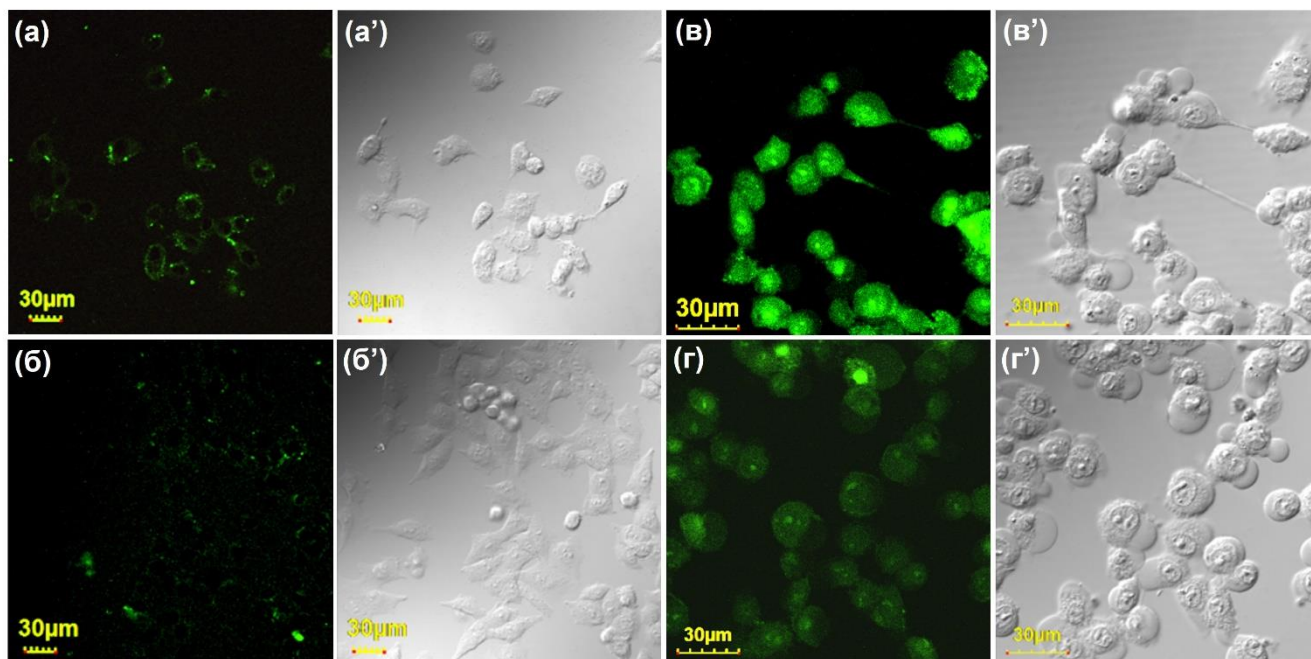


Рис. 66. Внутриклеточная локализация окисленной формы флуоресцентного зонда SOSG при обработке клеток хемилюминесцентными эмульсиями. Конфокальные микрофотографии (а) интактных клеток, (б-г) клеток в состоянии окислительного стресса, (в) клетки обработаны хемилюминесцентными эмульсиями, содержащими ТМГП; (г) клетки обработаны контрольным образцом эмульсий без ТМГП. Все образцы содержат 10 мМ флуоресцентного зонда SOSG.

На основе анализа не менее 10 различных микрофотографий, содержащих в сумме около 300 клеток, строили распределение клеток по интенсивности флуоресценции в образцах (а-г) (Рис. 66). Полученное распределение показывает, что средняя интенсивность флуоресценции клеток, обработанных полной эмульсией, примерно в 2 раза превышает сигнал от клеток, обработанных эмульсией без ТМГП (Рис. 67а). Очень близкий результат был получен при измерении интенсивности флуоресценции SOSG-EP в монослое клеток, обработанном различными образцами эмульсий, с помощью плащечного флуориметра (Рис. 67б).

По всей видимости, значительное количество (около 15%) ярко флуоресцирующих клеток в контрольном образце (Рис. 66г) обусловлено способностью

SOSG выступать не только в качестве фотосенсибилизатора, как это было показано ранее в литературе (раздел 2.3.5.2), но и в качестве активатора ПО-реакции. Это свойство характерно для сопряженных полиароматических соединений, включая антрацен и дифенилантрацен (раздел 2.5.2.3), и, следовательно, способность антраценового фрагмента выступать в роли активатора пероксиоксалатной хемилюминесценции является очень вероятной. В то же время флуоресцеиновый фрагмент является довольно эффективным фотосенсибилизатором (квантовый выход генерации $^1\text{O}_2$ составляет 0.2) [159]. Этот фактор может являться причиной сравнительно высокого уровня SOSG-EP в образцах без ТМГП.

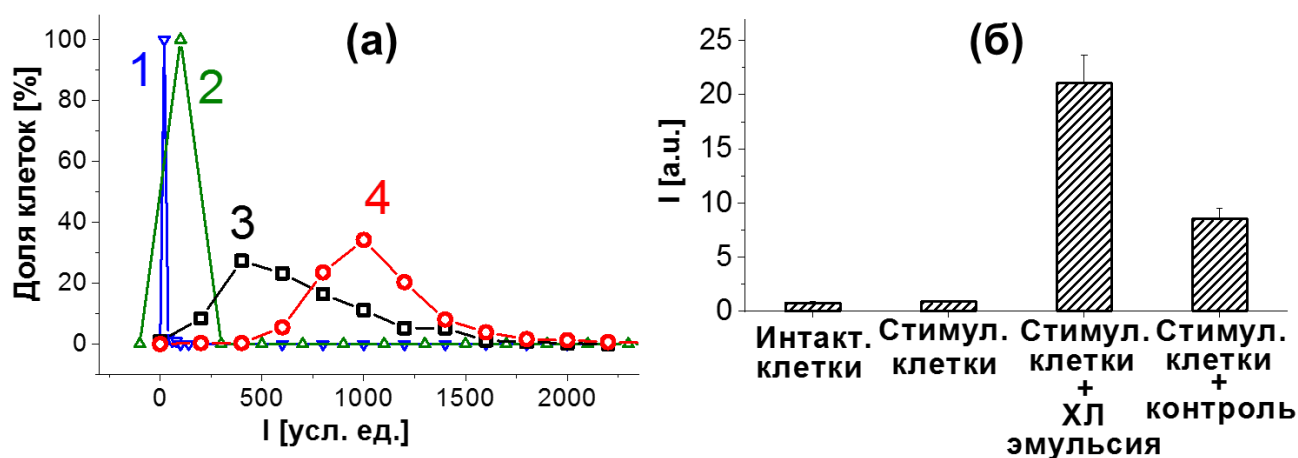


Рис. 67. (а) Распределение клеток по интенсивности их флуоресценции, рассчитанной из анализа не менее 10 различных микрофотографий, содержащих в сумме около 300 клеток. 1 – интактные клетки, 2-4 – клетки в состоянии окислительного стресса, 3 – клетки обработаны хемилюминесцентными эмульсиями, содержащими ТМГП, 4 – клетки обработаны контрольным образцом эмульсий без ТМГП (б) Измерение флуоресценции окисленной формы зонда SOSG-EP в аналогичных образцах с использованием плащечного флуориметра. Каждый образец содержал около 0.2 млн. клеток.

Таким образом, полученные результаты доказывают образование синглетного кислорода внутри клеток в результате протекания ПО-реакции.

4.2.6.5 Зависимость цитотоксичности, обусловленной протеканием пероксиоксалатной реакции, от уровня окислительного стресса

Механизм действия предложенных в работе нанореакторов основан на взаимодействии полиоксалата, попадающего внутрь клеток в составе частиц эмульсии, с биогенным пероксидом водорода. При заданной чувствительности системы к H_2O_2 , которая зависит от химической природы полиоксалата и устройства нанореакторов, эффективность протекания ПО-реакции должна определяться внутриклеточной концентрацией пероксида водорода. То, насколько интенсивно в клетках образуются

различные АФК, в итоге приводящие к образованию пероксида водорода, зависит от метаболизма кислорода, характерного для данного состояния клеток. Окислительным стрессом называют такое состояние клеток, при котором активно продуцируются АФК, оно характерно для раковых клеток. Окислительный стресс играет важную роль в канцерогенезе [195, 357] и пролиферации раковых клеток [179, 195, 358]. López-Lázaro предположил, что это является результатом принципиальных изменений в метаболизме кислорода, которые выражаются в переходе метаболизма от пути, сопровождающегося синтезом АТФ, к синтезу АФК [192]. В целом в раковых клетках содержание АФК значительно больше по сравнению с нормальными клетками [раздел 2.4.2], поэтому можно утверждать, что раковые клетки находятся в состоянии окислительного стресса. Незначительный прирост цитотоксичности для полных эмульсий в нестимулированных раковых клетках (Рис. 61) не означает, что в таких клетках мало H_2O_2 . Данная ситуация говорит о недостаточной чувствительности конкретной пероксиоксалатной конструкции по отношению к H_2O_2 . Однако уровень окислительного стресса может различаться, и выработку биогенных АФК можно стимулировать добавлением различных индукторов [183, 359, 360], причём такая методика является общепринятой при изучении окислительного стресса. В частности, обработка клеток H_2O_2 приводит к стимулированию биогенного синтеза АФК.

Содержание внутриклеточных АФК определяли с помощью флуоресцентного зонда $H_2DCF-DA$ (Рис. 62а). Обработка клеток пероксидом водорода в диапазоне концентраций ниже НК, т.е. до 200 мкМ, приводило к увеличению интенсивности флуоресценции DCF (Рис. 68а, заштрихованные столбцы), что свидетельствует об индуцировании окислительного стресса пероксидом водорода. Соотношение $IC_{50}^K / IC_{50}^{XII}$ при увеличении концентрации H_2O_2 также возрастало (Рис. 68а, закрашенные столбцы). Этот факт доказывает, что внутриклеточное содержание АФК определяет цитотоксичность, вызванную возбуждением фотосенсибилизатора.

Этот вывод также подкрепляется опытами с доксорубицином, менадионом и паракватом, известными индукторами окислительного стресса [183, 359, 360]. Все они способствовали образованию АФК, о чем свидетельствует рост интенсивности флуоресценции DCF (Рис. 68б, заштрихованные столбцы) и одновременное увеличение цитотоксичности, обусловленной возбуждением фотосенсибилизатора (Рис. 68б, закрашенные столбцы). Прямая корреляция между относительным увеличением

генерации АФК и цитотоксичностью, выраженной через соотношение IC_{50}^K/IC_{50}^{XII} , демонстрирует, что протекание ПО-реакции с участием нанореакторов, попавших внутрь клеток, приводит к гибели клеток.

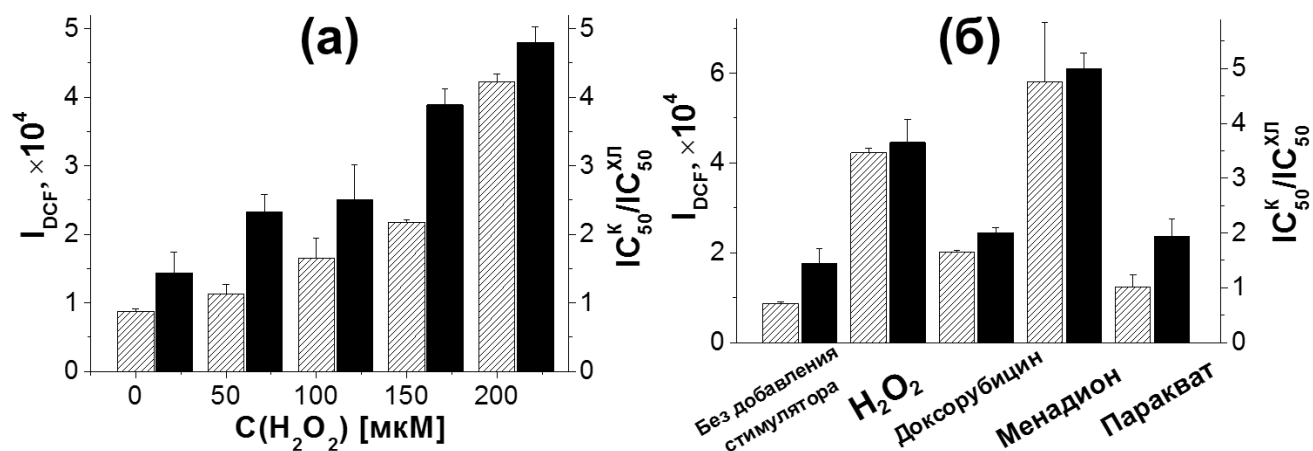


Рис. 68. Связь между цитотоксичностью нанореакторов и внутриклеточным содержанием АФК.

Влияние пероксида водорода (а) и других индукторов окислительного стресса (б) на интенсивность флуоресценции DCF, нормированной на мг клеточного белка (заштрихованные столбики), и на цитотоксичность, обусловленную протеканием ПО-реакции, выраженную как соотношение IC_{50}^K/IC_{50}^{XII} (черные столбики). Состав нанореакторов L64/ДМФ/ПОКС-1/ТМГП = 1.0:2.7:0.3:0.05 (масс.).

Таким образом, в настоящей работе с помощью целого ряда подкрепляющих друг друга результатов была доказана принципиальная состоятельность предложенного подхода, т.е. полученные хемилюминесцентные конструкции, содержащие полиоксалат и фотосенсибилизатор, могут быть применены для подавления клеток, активно продуцирующих АФК. Пероксид водорода является наиболее устойчивой и наименее токсичной молекулой среди АФК [361], поэтому повышение уровня окислительного стресса приводило к росту цитотоксичности. Данный эффект не зависел от способа индуцирования окислительного стресса в клетках (Рис. 68б). Все протестированные индукторы окислительного стресса [179, 180, 358], такие как паракват, классический противоопухолевый препарат доксорубицин и даже пищевая добавка менадион увеличивали эффективность токсичности, вызванную протеканием ПО-реакции. Последний индуктор в этом ряду является провитамином и может считаться безопасным для комплексной (комбинированной) терапии. Комбинация с доксорубицином является особенно важной, т.к. открывает возможность увеличения эффективности химиотерапии на основе широко используемых противораковых препаратов.

Безусловно, представленные конструкции на основе полиоксалата не претендуют на применение в качестве готовых терапевтических препаратов. Однако, есть шанс, что дальнейшее развитие таких систем приведет к появлению новых способов противораковой терапии, способных уничтожать опухоли, на данный момент не поддающиеся лечению.

4.2.7 Полимер-коллоидные комплексы полиоксалата в эмульсии и поликатиона

Известно, что константа скорости гидролиза оксалатов по первой ступени на 2-3 порядка выше, чем по второй [277] (Рис. 69). Сложноэфирная группа является сильным акцептором электронов, что приводит к высокой реакционной способности оксалата при гидролизе по первой ступени. Однако высокая кислотность карбоксильной группы щавелевой кислоты ($pK_a = 1.27$ [278]) приводит к её ионизации, а карбоксилат, заряженный отрицательно, проявляет значительно меньшую электроноакцепторную способность, поэтому гидролиз по второй ступени значительно менее эффективен.

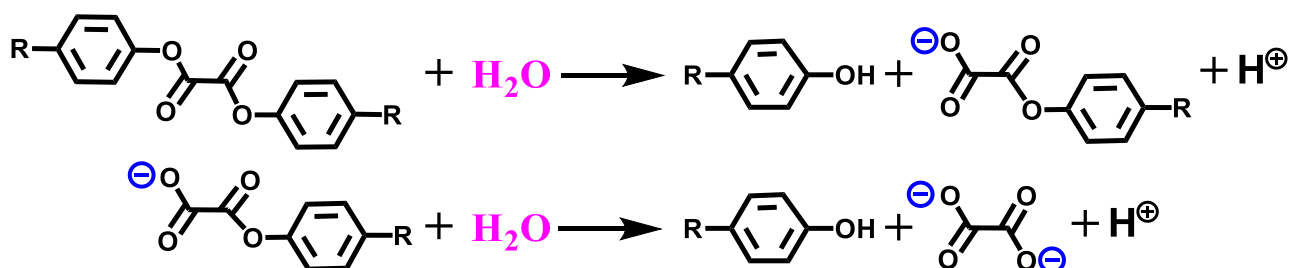


Рис. 69. Схема гидролиза оксалата по первой и второй ступени.

В связи с этим можно ожидать, что на концах макромолекул полиоксалата в водной эмульсии находятся карбоксильные группы моноэфира щавелевой кислоты (Рис. 70а). Вследствие высокой кислотности щавелевой кислоты, концевые карбоксильные группы должны быть полностью ионизованы, и заряд экспонирован на поверхности частиц (Рис. 70б). Это предположение было подтверждено измерением электрокинетического потенциала, которое показало наличие существенного отрицательного заряда, который оставался неизменным на протяжении как минимум трёх часов (Рис. 70в). Контроль, не содержащий полиоксалат, имел заряд, очень близкий к нулю (данные не приведены). Это подтверждает, что отрицательный заряд частиц обусловлен именно полиоксалатом, а не возможным присутствием продуктов гидролиза ДМФ. Во всех экспериментах в данной главе использовался полиоксалат ПОКС-1 (Таблица 12).

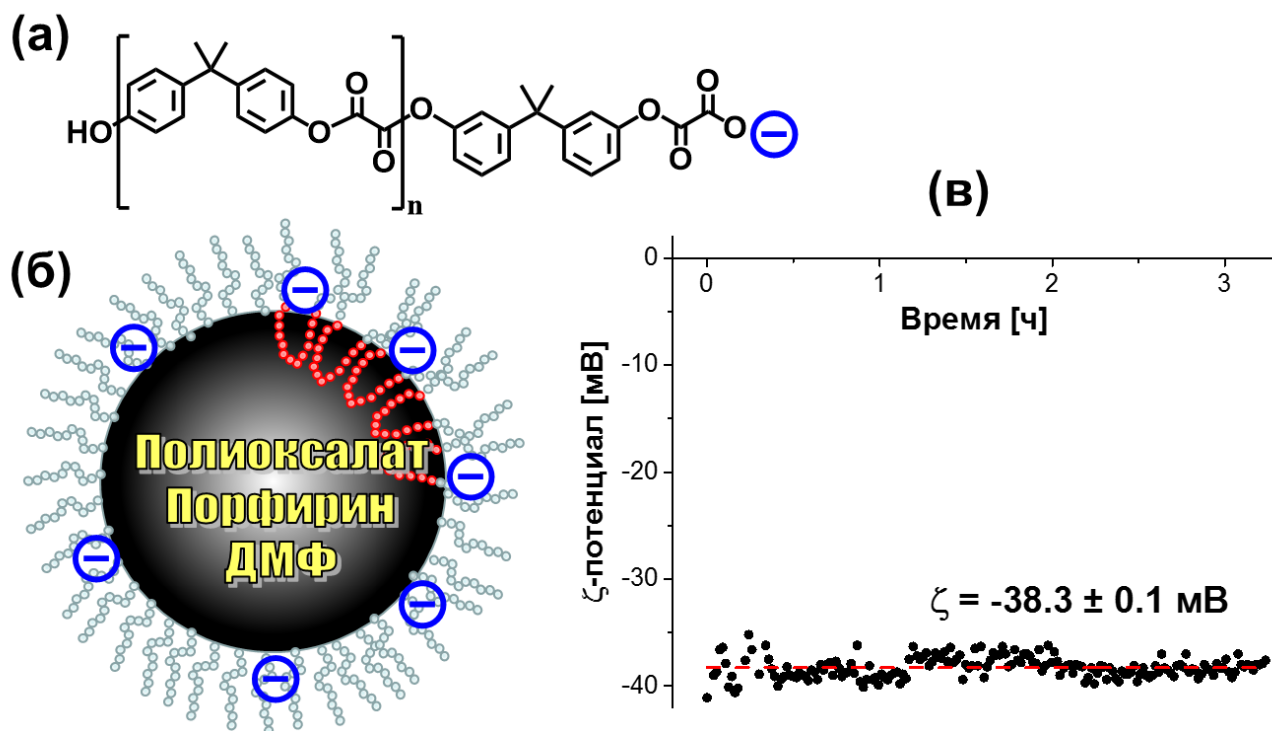


Рис. 70. (а) Структура полиоксалаата; (б) схема, объясняющая появление отрицательного заряда на частицах эмульсии, содержащих полиоксалаат, за счёт диссоциации концевых карбоксильных групп щавелевой кислоты; (в) зависимость электрокинетического потенциала от времени для эмульсий, содержащих полиоксалаат. Состав эмульсий L64/ДМФ/ПОКС-1/ТМГП = 1.0:2.7:0.3:0.005 масс.

Как известно, поверхность клеточной мембраны также несет отрицательный заряд, что могло ограничивать наблюдаемые на клетках биологические эффекты при использовании эмульсионной системы (раздел 4.2.6). Поэтому было принято решение изучить, возможно ли образование электростатических комплексов отрицательно заряженных эмульсий с поликатионом. Получение положительно заряженных комплексов могло бы значительно увеличить эффективность взаимодействия конструкций с клетками. Для проверки этого предположения был выбран поликатион поли(N,N-диметиламиноэтилметакрилат) (ПДМАЭМА, Рис. 71а), по взаимодействию которого с клетками накоплен значительный экспериментальный опыт, в том числе в нашей лаборатории [362]. Добавление ПДМАЭМА к уже сформированным эмульсиям приводило к образованию полимер-коллоидных комплексов, в том числе положительно заряженных (Рис. 71б, кривая 1).

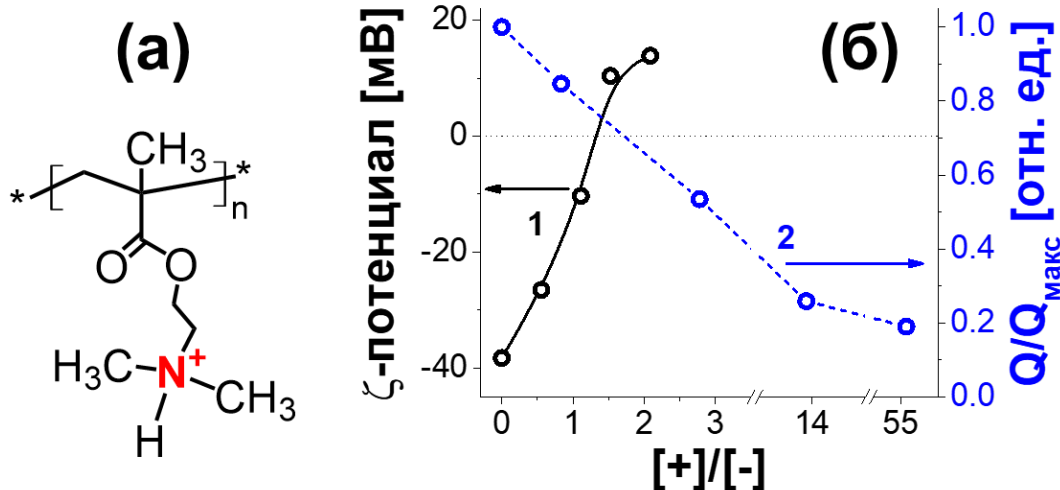


Рис. 71. (а) Формула поликатиона ПДМАЭМА; (б) зависимость электрокинетического потенциала и относительной интегральной интенсивности хемилюминесценции от соотношения зарядов в полимер-коллоидных комплексах. Состав эмульсий L64/ДМФ/ПОКС-1/ТМГП = 1.0:2.7:0.3:0.005 масс.

Следует отметить, что изменение заряда частиц происходило медленно (Рис. 72), что является нетипичным для образования полиэлектролитных комплексов, формирование которых принято считать чрезвычайно быстрым процессом. Возможно, скорость образования электростатических комплексов лимитируется ограниченной диффузией макромолекул полиоксалата, т.к. они должны быть погружены в гидрофобную микрофазу частиц эмульсии. Также можно предположить, что опушка, представленная цепями ПЭГа гидрофильного блока плуроника L64, может препятствовать диффузии заряженных звеньев поликатиона, несмотря на довольно высокие значения электрокинетического потенциала.

Для расчёта соотношения концентраций зарядов $([+]/[-])$ предполагалось, что макромолекулы полиоксалата в среднем несут по одному отрицательному заряду на одном из концов. Это допущение основано на том, что гидролиз полиоксалата должен протекать по закону случая, расщепляя макромолекулы в произвольном месте цепи. При этом образовавшиеся две более короткие макромолекулы также будут содержать в среднем один заряд, т.к. при гидролизе сложноэфирной связи фенольный компонент остаётся на одной макромолекуле, а фрагмент щавелевой кислоты, несущий отрицательный заряд — на другой. Несколько иная ситуация наблюдается для ПО-реакции. С одной стороны, она так же, как и гидролиз, протекает по закону случая. С другой стороны, ПО-реакция приводит к «удалению» фрагмента щавелевой кислоты из цепи полиоксалата, оставляя на образовавшихся концах двух новых макромолекул по

фенольной группе. Молекулярная масса полиоксалата, использованная для расчёта числа макромолекул, была положена равной среднечисловой молекулярной массе полиоксалата ПОКС-1 и составила 1700. Таким образом, при концентрации плуроника L64 1.0 мг/мл и составе эмульсий L64/ДМФ/ПОКС-1/ТМГП = 1.0:2.7:0.3:0.005 масс. концентрация полиоксалата и, соответственно, отрицательных зарядов в системе составляет 0.3 мг/мл, т.е. $0.3/1700 \text{ моль/л} = 0.18 \text{ мМ}$.

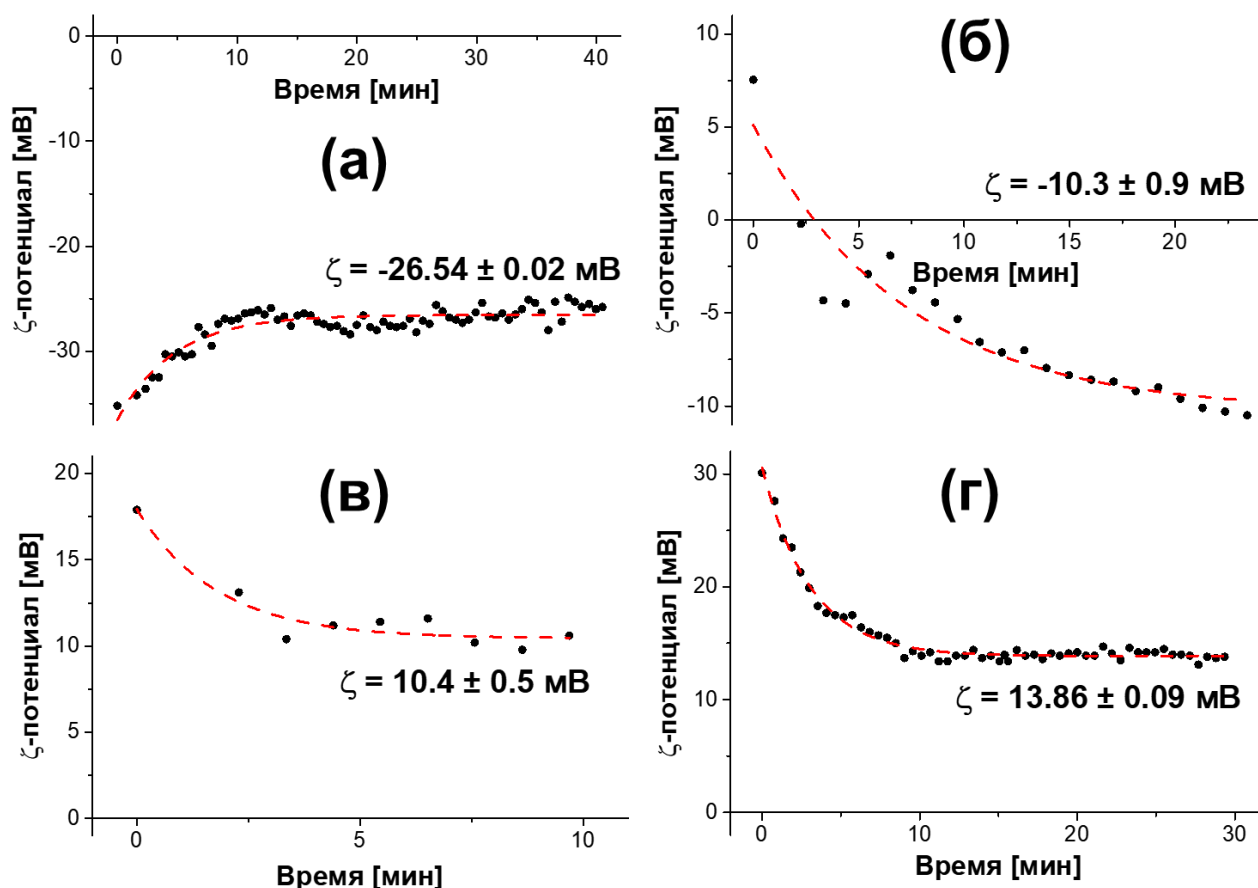


Рис. 72. Зависимость электрокинетического потенциала от времени для полиэлектролитных комплексов поликатиона ПДМАЭМА с эмульсиями, содержащими полиоксалат. Состав эмульсий L64/ДМФ/ПОКС/ТМГП = 1.0:2.7:0.3:0.005 масс. Состав комплексов (соотношение зарядов $[+]/[-]$): (а) 0.6; (б) 1.1; (в) 1.5; (г) 2.1.

Известно, что многие замещённые аммониевые катионы проявляют свойства тушителей флуоресценции [363], что указывает на возможность аналогичного эффекта в присутствии ПДМАЭМА, который при физиологических условиях в значительной степени ионизован [362]. Кроме того, ПДМАЭМА, будучи третичным амином, может проявлять свойства основного катализатора, тем самым оказывая влияние на эффективность хемилюминесценции. По указанным причинам для полученных полимер-коллоидных комплексов также измеряли кривые испускания света в ходе ПО-реакции

(Рис. 71б, правая ось ординат, кривая 2). Было обнаружено, что ПДМАЭМА действительно уменьшает интегральную интенсивность хемилюминесценции, однако получить положительно заряженные комплексы удалось при соотношениях катионных групп ПДМАЭМА и анионных групп полиоксалата ($[+]/[-]=1.5-2.2$), которые приводили лишь к небольшому уменьшению интегральной интенсивности хемилюминесценции.

Способность полимер-коллоидных комплексов разных составов вступать в ПО-реакцию с внутриклеточным пероксидом водорода была протестирована на клетках (Рис. 73). Оказалось, что комплексы состава $[+]/[-]=2.2$ были примерно в 16 раз более токсичны, чем соответствующие комплексы аналогичного состава, но не содержащие ТМГП. Об этом свидетельствует сдвиг кривой цитотоксичности в сторону меньших концентраций эмульсий (Рис. 73а). Это говорит о значительном увеличении вклада ПО-реакции в токсичность полимер-коллоидных комплексов по сравнению с исходными эмульсиями.

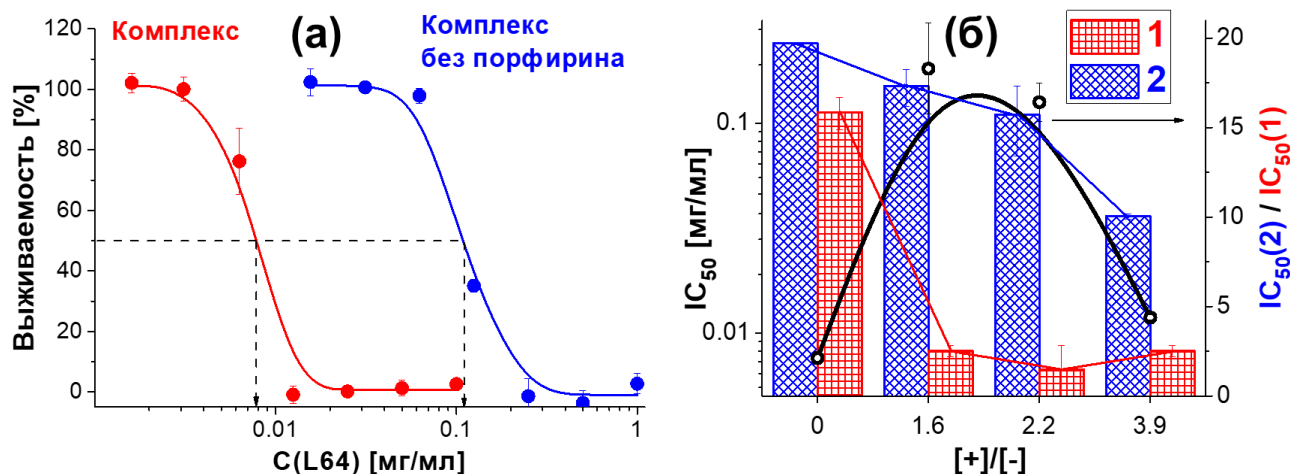


Рис. 73. (а) Зависимости доли выживших клеток MCF-7/ADR от концентрации (а) полных полимер-коллоидных комплексов и комплексов без ТМГП. Концентрация комплексов выражена через концентрацию L64 при соотношении компонентов L64/ДМФ/ПОКС/ПДМАЭМА/ТМГП = 1.0:2.7:0.3:0.06:0.05 масс. и соотношении зарядов ПДМАЭМА и ПОКС $[+]/[-] = 2.2$. (б) Зависимость цитотоксичности (левая ось ординат) полимер-коллоидных комплексов, содержащих (1) и не содержащих (2) ТМГП от состава полимер-коллоидных комплексов, выраженного как соотношение зарядов $[+]/[-]$. Зависимость отношения IC_{50} (правая ось ординат) для комплексов, не содержащих и содержащих ТМГП, от соотношения зарядов $[+]/[-]$.

По всей видимости, данный эффект вызван увеличением захвата эмульсий клетками за счет электростатического связывания с отрицательно заряженной поверхностью клеток. Содержание ПДМАЭМА и связанное с ним соотношение положительных и отрицательных зарядов в полимер-коллоидных комплексах определяет эффективность подавления роста раковых клеток в состоянии окислительного стресса

(Рис. 73б, правая ось ординат, черная кривая). При соотношении зарядов в комплексе равном 1.6 достигается резкое снижение IC_{50} (Рис. 73б, левая ось ординат, 1). При этом цитотоксичность контрольных образцов изменяется незначительно (Рис. 73б, 2). Последующее двукратное увеличение содержания ПДМАЭМА не усиливает эффект.

Таким образом, обнаруженный отрицательный заряд эмульсий, содержащих полиоксалат, позволил сформировать положительно заряженные электростатические комплексы с поликатионом ПДМАЭМА, что в свою очередь увеличило разницу в цитотоксичности, обусловленной протеканием ПО-реакции с внутриклеточным пероксидом водорода, по сравнению с контролем до 16-18 раз, т.е. в 4-5 раз по сравнению с эмульсионной системой.

5 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

5.1 ИТОГИ ВЫПОЛНЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящей работе впервые исследованы полимерные нанореакторы, позволяющие использовать хемилюминесцентную реакцию с участием внутриклеточного пероксида водорода, который содержится в повышенных количествах в раковых клетках, для возбуждения фотосенсибилизатора, генерации синглетного кислорода и последующего уничтожения раковых клеток. Реализовать эту идею удалось благодаря использованию нескольких подходов физикохимии макромолекул (специальность 02.00.06 – высокомолекулярные соединения, химические науки).

Во-первых, было показано, что полимерный оксалат обладает на порядок более высокой стабильностью по отношению к гидролизу, чем его низкомолекулярный аналог. Именно поэтому использование полимерного оксалата вместо низкомолекулярных позволило на порядок увеличить эффективность ПО-реакции.

Во-вторых, использование амфифильного полимера, плуроника L64, позволило создать эмульсионные нанореакторы, ядро которых составлял раствор полимерного оксалата в о-диметилфталате. Такое устройство нанореакторов обеспечило высокую эффективность ПО-реакции и стабильность полиоксалата в водной среде. Сформированная система подавляла раковые клетки в состоянии окислительного стресса за счёт генерации синглетного кислорода.

В-третьих, в работе было обнаружено, что такие нанореакторы в водном растворе несут отрицательный заряд. Этот факт был использован для формирования комплексов нанореакторов с поликатионом, что позволило увеличить эффективность подавления раковых клеток в состоянии окислительного стресса в 3-5 раз.

Наконец, в-четвертых, в работе впервые осуществлено использование биогенного пероксида водорода, образующегося в повышенных количествах в раковых клетках, в качестве мишени, на которую направлено действие разработанных нанореакторов. Данный аспект работы отвечает специальности 03.01.04 – биохимия, химические науки.

Результаты, полученные с использованием предложенной хемилюминесцентной системы на основе полимерного оксалата представляют собой доказательство состоятельности подхода, который лёг в основу работы. Впервые доказано образование синглетного кислорода при протекании хемилюминесцентной реакции с биогенным пероксидом водорода.

5.2 ВЫВОДЫ

1. Разработаны подходы к созданию полимерных нанореакторов для проведения хемилюминесцентной реакции между эфирами щавелевой кислоты и пероксидом водорода в водной среде. Нанореакторы, содержащие полимерный оксалат и тетраметилловый эфир гематопорфирина в диметилфталате, и стабилизированные блок-сополимером плуроником L64, обеспечивали не только испускание света, но и образование синглетного кислорода.

2. Установлено, что мицеллы гидрофобных сополимеров с радиусом более 100 нм, использованные в качестве нанореакторов, в 3-4 раза увеличивают эффективность пероксиоксалатной хемилюминесцентной реакции. Сополимеры, формирующие мицеллы радиусом около 10 нм, неэффективны в данных экспериментах.

3. Показано, что по мере увеличения молекулярной массы полиоксалата на порядок возрастает эффективность пероксиоксалатной хемилюминесцентной реакции и на 2 порядка увеличивается стабильность оксалата к гидролизу при проведении реакции в эмульсионных нанореакторах.

4. Эмульсионные нанореакторы могут проникать в раковые клетки и проявлять цитотоксичность, обусловленную образованием синглетного кислорода в результате протекания пероксиоксалатной реакции между полиоксалатом и внутриклеточной перекисью водорода.

5. Впервые обнаружено, что частицы, содержащие гидрофобный полиоксалат, несут отрицательный заряд. Формирование полимер-коллоидных комплексов этих частиц с поликатионом увеличивает их цитотоксичность, вызванную протеканием пероксиоксалатной реакции.

5.3 РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Развитие данной темы должно идти по нескольким направлениям. В первую очередь необходимо исследовать взаимодействие нанореакторов с сывороточными белками и оптимизировать их структуру для повышения стабильности в кровотоке. Для этого целесообразно получение нанореакторов на основе наногелевых частиц, стабилизированных ковалентными сшивками.

Совершенно необходимо повысить чувствительность нанореакторов к пероксиду водорода. Для этих целей в качестве строительных блоков для получения полиоксалата необходимо использовать фенолы, содержащие электроноакцепторные группы. Не исключено, что добиться существенного увеличения чувствительности возможно, используя в качестве строительных блоков трифторметансульфониламиды биогенных аминов или аминокислот.

Повышение эффективности нанореакторов возможно также за счет увеличения эффективности генерации возбужденного состояния фотосенсибилизатора в ходе пероксиоксалатной реакции. Не исключено, что направленный поиск фотосенсибилизаторов, проявляющих более высокую способность к обратимому окислению в ходе пероксиоксалатной реакции, чем использованный в настоящей работе гематопорфирин, также помогло бы увеличить эффективность разрабатываемой системы.

Наконец, разрабатываемые нанореакторы могли бы быть использованы в медицине только в том случае, если все используемые для их синтеза компоненты не проявляют собственной токсичности. Можно предположить, что использование биогенных фенолов или аминов для конструирования полиоксалатов и нанореакторов на их основе позволит решить эту проблему.

В заключение необходимо отметить, что значение предложенного в настоящей работе подхода заключается в том, что он закладывает основу разработки нового поколения лекарственных средств, позволяющих использовать окислительный стресс, всегда происходящий в раковых клетках, для их выявления и избирательного уничтожения.

6 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Русскоязычные аббревиатуры

АТФ — аденозин трифосфат

АФК — активные формы кислорода

БНФО — бис-(4-нитрофенил)оксалат

БПХФО — бис-(пентахлорфенил)оксалат

БФА — бисфенол А

БФО — бисфенилоксалат

ВЭИ — высокоэнергетический интермедиат (1,2-диоксетандион)

ДМС — диметилсилоксан

(ДМС-ЭО)₇ — чередующийся сополимер ДМС и ЭО

ДМФ — *o*-диметилфталат

ДФГТ — 1,6-дифенилгексатриен

ДЭЭ — диэтиловый эфир

ННК — наибольшая нетоксичная концентрация

ПО-реакция — пероксиоксалатная хемилюминесцентная реакция

ПО — пропиленоксид

ПОКС — полиоксалат

ППО — полипропиленоксид

ПЭО — полиэтиленоксид

СДТ — сонодинамическая терапия

ТМГП — тетраметилловый эфир гематопорфирина

ТЭА — триэтиламин

ФБС — фетальная бычья сыворотка

ФД — фотодинамический

ФДТ — фотодинамическая терапия

ФЭУ — фотоэлектронный умножитель

ЭО — этиленоксид

Англоязычные аббревиатуры

ASG — Aarhus Sensor Green — флуорогенный зонд, позволяющий определять синглетный кислород

DAPI — 4',6-диамидино-2-фенилиндола

DCF — окисленная и гидролизованная форма $H_2DCF-DA$, проявляющая интенсивную флуоресценцию

DMEM — Dulbecco's Modified Eagle Medium — культуральная среда

DOX — доксорубицин

EGF — (Epidermal Growth Factor) — фактор роста эпидермальных клеток

GSH – восстановленная (тиол-содержащая) форма глутатиона

$H_2DCF-DA$ — 2,7-дихлор-дигидрофлуоресцеин диацетат — флуорогенный зонд для определения АФК (в основном, гидроксил-радикала)

HEPES — 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота

HIF-1 – Hypoxia inducible factor 1, белок, появление которого в клетках приводит к подавлению окислительного фосфорилирования и активации гликолиза

IC_{50} — концентрация соединения, при которой погибает 50% клеток

IL-1 — интерлейкин-1 — лимфокин, отвечающий за воспалительную реакцию, стимулируется $TNF\alpha$.

MTT — 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолий бромид

MVP — транс-1-(2'-метоксивинил)пирен

NADPH — никотинаденин динуклеотид

Nox — NADPH-оксидазный белковый комплекс

PDGF — (platelet-derived growth factor) фактор роста тромбоцитов

PBS — фосфатный буфер (modified Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)

Src — тирозинкиназа, участвующая в клеточном развитии и делении. Ген Src обычно относят к онкогенам, т.е. белкам, отвечающим за деление и дифференцировку клеток

SOD – супероксиддисмутаза, фермент, катализирующий превращение супероксид-анионрадикала до пероксида водорода

SOSG — Singet Oxygen Sensor Green — флуорогенный зонд, позволяющий определять синглетный кислород

SOSG-EP — эндопероксид SOSG, образующийся при присоединении синглетного кислорода к антраценовому фрагменту SOSG

$TNF\alpha$ — фактор некроза опухолей α , лимфокин, способствующий развитию острого воспаления

7 БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю благодарность научным руководителям д.х.н., ведущему научному сотруднику Мелик-Нубарову Николаю Сергеевичу и д.б.н., ведущему научному сотруднику Гроздовой Ирине Дмитриевне за постоянную поддержку и обсуждение результатов.

Автор выражает глубокую благодарность к.ф.-м.н., старшему научному сотруднику Физического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова Ежову Александру Анатольевичу за проведение измерений методом конфокальной микроскопии, сотрудникам Химического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова к.х.н, старшему научному сотруднику Будыниной Екатерине Михайловне за спектры ЯМР, к.х.н, старшему научному сотруднику Спиридонову Василию Владимировичу за спектры ИК, д.х.н., в.н.с., профессору Бойко Наталье Ивановне и аспиранту Бугакову Мирону Александровичу за помощь в проведении препаративного разделения полиоксалата методом ГПХ, д.х.н., в.н.с., профессору Изумрудову Владимиру Алексеевичу за помощь в представлении работы, сотруднику Института химической физики имени Н.Н. Семенова РАН, заведующему лабораторией, д.х.н., профессору Соловьевой Анне Борисовне за предоставление тетраметилового эфира гематопорфирина IX, сотруднику НИИ канцерогенеза (ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина»), д.м.н., профессору Штилю Александру Альбертовичу за предоставленную культуру клеток MCF-7/ADR, а также стеклодуву Самарской Надежде Петровне за изготовление колбы для определения следовых количеств воды по Фишеру.

8 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Petrosko S. H., Johnson R., White H., and Mirkin C. A. / Nanoreactors: Small Spaces, Big Implications in Chemistry. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2016. – V. 138. – № 24. – P. 7443–7445.
2. Roy S., Skoff D., Perroni D. V., Mondal J., Yethiraj A., Mahanthappa M. K., Zanni M. T., and Skinner J. L. / Water Dynamics in Gyroid Phases of Self-Assembled Gemini Surfactants. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2016. – V. 138. – № 8. – P. 2472–2475.
3. Williams D. E., Dolgoplova E. A., Pellechia P. J., Palukoshka A., Wilson T. J., Tan R., Maier J. M., Greytak A. B., Smith M. D., Krause J. A., and Shustova N. B. / Mimic of the green fluorescent protein β -barrel: Photophysics and dynamics of confined chromophores defined by a rigid porous scaffold. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2015. – V. 137. – № 6. – P. 2223–2226.
4. Tagliazucchi M. and Szleifer I. / How Does Confinement Change Ligand-Receptor Binding Equilibrium? Protein Binding in Nanopores and Nanochannels. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2015. – V. 137. – № 39. – P. 12539–12551.
5. Okeyoshi K., Suzuki D., and Yoshida R. / Effect of nanointegration on photoinduced hydrogen-generating nanogel systems. // *Langmuir*. – 2012. – V. 28. – № 2. – P. 1539–1544.
6. Saha S. C., Patel D., Rahman S., and Savva M. / Physicochemical Characterization, Solubilization, and Stabilization of 9-Nitrocamptothecin Using Pluronic Block Copolymers. // *J. Pharm. Sci.* – 2013. – V. 102. – № 10. – P. 3653–3665.
7. Deraedt C., Pinaud N., and Astruc D. / Recyclable catalytic dendrimer nanoreactor for part-per-million Cu I catalysis of “click” chemistry in water. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2014. – V. 136. – № 34. – P. 12092–12098.
8. Liu J., Spulber M., Wu D., Talom R. M., Palivan C. G., and Meier W. / Poly(*N* - isopropylacrylamide- *co* -tris-nitrilotriacetic acid acrylamide) for a Combined Study of Molecular Recognition and Spatial Constraints in Protein Binding and Interactions. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2014. – V. 136. – № 36. – P. 12607–12614.
9. Müllner M., Lunkenbein T., Schieder M., Gröschel A. H., Miyajima N., Förtsch M., Breu J., Caruso F., and Müller A. H. E. / Template-directed mild synthesis of anatase hybrid nanotubes within cylindrical core-shell-corona polymer brushes. // *Macromolecules*. – 2012. – V. 45. – № 17. – P. 6981–6988.
10. Kobayashi S. and Miyamura H. / Polymer-incarcerated metal(0) cluster catalysts. // *Chem. Rec.* – 2010. – V. 10. – № 5. – P. 271–290.
11. Qian G., Zhu B., Wang Y., Deng S., and Hu A. / Size-tunable polymeric nanoreactors for one-pot synthesis and encapsulation of quantum dots. // *Macromol. Rapid Commun.* – 2012. – V. 33. – № 16. – P. 1393–1398.
12. Gota C., Okabe K., Funatsu T., Harada Y., and Uchiyama S. / Hydrophilic Fluorescent Nanogel Thermometer for Intracellular Thermometry. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2009. – V. 131. – № 8. – P. 2766–2767.
13. Zhang J., Xu S., and Kumacheva E. / Photogeneration of fluorescent silver nanoclusters in polymer microgels. // *Adv. Mater.* – 2005. – V. 17. – № 19. – P. 2336–2340.
14. Blanco A., López C., Mayoral R., Míguez H., Meseguer F., Mifsud A., and Herrero J. / CdS photoluminescence inhibition by a photonic structure. // *Appl. Phys. Lett.* – 1998. – V. 73. – № 13. – P. 1781–1783.
15. Vlasov Y. A., Luterova K., Pelant I., Hönerlage B., and Astratov V. N. / Enhancement of optical gain of semiconductors embedded in three-dimensional photonic crystals. // *Appl. Phys. Lett.* – 1997. – V. 71. – № 12. – P. 1616.
16. Siddalingappa B., Benson H. A. E., Brown D. H., Batty K. T., and Chen Y. / Stabilization of resveratrol in blood circulation by conjugation to mPEG and mPEG-PLA polymers: Investigation of conjugate linker and polymer composition on stability, metabolism, antioxidant activity and pharmacokinetic profile. // *PLoS One*. – 2015. – V. 10. – № 3. – P. 1–22.
17. Elsabahy M., Perron M.-È., Bertrand N., Yu G., and Leroux J.-C. / Solubilization of Docetaxel in Poly(ethylene oxide)- block -poly(butylene/styrene oxide) Micelles. // *Biomacromolecules*. –

2007. – V. 8. – № 7. – P. 2250–2257.
18. Bakshi M. S. / Colloidal micelles of block copolymers as nanoreactors, templates for gold nanoparticles, and vehicles for biomedical applications. // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2014. – V. 213 – P. 1–20.
 19. Förster S. and Antonietti M. / Amphiphilic Block Copolymers in Structure-Controlled Nanomaterial Hybrids. // *Adv. Mater.* – 1998. – V. 10. – № 3. – P. 195–217.
 20. Roucoux A., Schulz J., and Patin H. / Reduced Transition Metal Colloids: A Novel Family of Reusable Catalysts?. // *Chem. Rev.* – 2002. – V. 102. – № 10. – P. 3757–3778.
 21. Klingelhöfer S., Heitz W., Greiner A., Oestreich S., Förster S., and Antonietti M. / Preparation of Palladium Colloids in Block Copolymer Micelles and Their Use for the Catalysis of the Heck Reaction. // *J. Am. Chem. Soc.* – 1997. – V. 119. – № 42. – P. 10116–10120.
 22. Le Bars J., Specht U., Bradley J. S., and Blackmond D. G. / A Catalytic Probe of the Surface of Colloidal Palladium Particles Using Heck Coupling Reactions. // *Langmuir.* – 1999. – V. 15. – № 22. – P. 7621–7625.
 23. Zhiyentayev T. M., Boltaev U. T., Solov'eva A. B., Aksenova N. A., Glagolev N. N., Chernjak A. V., and Melik-Nubarov N. S. / Complexes of Chlorin e6 with Pluronic and Polyvinylpyrrolidone: Structure and Photodynamic Activity in Cell Culture. // *Photochem. Photobiol.* – 2014. – V. 90. – № 1. – P. 171–182.
 24. Wasylw B., Stone E., and Pucknat J. G. / Low-foaming latexes for use in printing ink formulations. // . 1994.
 25. Chen Y. C., Dimonie V., and El-aasser M. S. / Role of Surfactant in Composite latex Particle Morphology. // *J. Appl. Polym. Sci.* – 1992. – V. 45. – № 3. – P. 487–499.
 26. Gulbekian E. V and Limited V. P. / The Emulsion Polymerization of Vinyl Acetate . Factors Controlling Particle Surface Area and Rate of Polymerization. // 1968. – V. 6 – P. 2265–2280.
 27. Maksimova E. D., Faizuloev E. B., Izumrudov V. a., Litmanovich E. a., and Melik-Nubarov N. S. / Synthesis of poly(N,N-dimethylaminoethyl methacrylate) nanogels in reverse micelles for delivery of plasmid DNA and small interfering RNAs into living cells. // *Polym. Sci. Ser. C.* – 2012. – V. 54. – № 1. – P. 69–79.
 28. Kozlova N. O., Bruskovskaya I. B., Melik-Nubarov N. S., Yaroslavov A. A., and Kabanov V. A. / Catalytic properties and conformation of hydrophobized alpha-chymotrypsin incorporated into a bilayer lipid membrane. // *FEBS Lett.* – 1999. – V. 461. – № 3. – P. 141–144.
 29. Zhang X. Y., Liu D. M., Lv X. H., Sun M., Sun X. L., and Wan W. M. / RAFT-Polymerization-Induced Self-Assembly and Reorganizations: Ultrahigh-Molecular-Weight Polymer and Morphology-Tunable Micro-/Nanoparticles in One Pot. // *Macromol. Rapid Commun.* – 2016. – V. 37. – № 21. – P. 1735–1741.
 30. Popielski T. M., Otsuka I., Halila S., Muniz E. C., Soldi V., and Borsali R. / Preparation of Polymeric Micelles of Poly(Ethylene Oxide-b-Lactic Acid) and their Encapsulation With Lavender Oil. // *Mater. Res.* – 2016. – V. 19. – № 6. – P. 1356–1365.
 31. Singh A., Cho H.-J., Lee S., Koh J., and Kim S. / Natural oil-based chemiluminescent nanodroplets for In vivo imaging of hydrogen peroxide. // *Macromol. Res.* – 2014. – V. 22. – № 10. – P. 1136–1139.
 32. Manziek L., Langenmayr E., Lamola a, Gallagher M., Brese N., and Annan N. / Functionalized emulsion and suspension polymer particles: Nanoreactors for the synthesis of inorganic materials. // *Chem. Mater.* – 1998. – V. 10. – № 10. – P. 3101–3108.
 33. Vriezema D. M., Aragonès M. C., Elemans J. A. A. W., Cornelissen J. J. L. M., Rowan A. E., and Nolte R. J. M. / Self-assembled nanoreactors. // *Chem. Rev.* – 2005. – V. 105. – № 4. – P. 1445–1489.
 34. Spulber M., Baumann P., Liu J., and Palivan C. G. / Ceria loaded nanoreactors: a nontoxic superantioxidant system with high stability and efficacy. // *Nanoscale.* – 2015. – V. 7. – № 4. – P. 1411–1423.
 35. Baumann P., Spulber M., Dinu I. A., and Palivan C. G. / Cellular Trojan horse based polymer nanoreactors with light-sensitive activity. // *J. Phys. Chem. B.* – 2014. – V. 118. – № 31. – P.

- 9361–9370.
36. van Dongen S. F. M., Nallani M., Cornelissen J. J. L. M., Nolte R. J. M., and van Hest J. C. M. / A Three-Enzyme Cascade Reaction through Positional Assembly of Enzymes in a Polymersome Nanoreactor. // *Chem. - A Eur. J.* – 2009. – V. 15. – № 5. – P. 1107–1114.
 37. van Oers M. C. M., Rutjes F. P. J. T., and Van Hest J. C. M. / Cascade reactions in nanoreactors. // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2014. – V. 28 – P. 10–16.
 38. Peters R. J. R. W., Marguet M., Marais S., Fraaije M. W., Van Hest J. C. M., and Lecommandoux S. / Cascade reactions in multicompartimentalized polymersomes. // *Angew. Chemie - Int. Ed.* – 2014. – V. 53. – № 1. – P. 146–150.
 39. Tang H., Sakamura Y., Mori T., Katayama Y., and Kishimura A. / Development of Enzyme Loaded Polyion Complex Vesicle (PICsome): Thermal Stability of Enzyme in PICsome Compartment and Effect of Coencapsulation of Dextran on Enzyme Activity. // *Macromol. Biosci.* – 2017. – V. 17. – № 8. – P. 1600542.
 40. Anraku Y., Kishimura A., Kamiya M., Tanaka S., Nomoto T., Toh K., Matsumoto Y., Fukushima S., Sueyoshi D., Kano M. R., Urano Y., Nishiyama N., and Kataoka K. / Systemically Injectable Enzyme-Loaded Polyion Complex Vesicles as in Vivo Nanoreactors Functioning in Tumors. // *Angew. Chemie - Int. Ed.* – 2016. – V. 55. – № 2. – P. 560–565.
 41. Peyratout C. S., Möhwald H., and Dähne L. / Preparation of Photosensitive Dye Aggregates and Fluorescent Nanocrystals in Microreaction Containers. // *Adv. Mater.* – 2003. – V. 15. – № 20. – P. 1722–1726.
 42. Ghan R., Shutava T., Patel A., John V. T., and Lvov Y. / Enzyme-catalyzed polymerization of phenols within polyelectrolyte microcapsules. // *Macromolecules.* – 2004. – V. 37. – № 12. – P. 4519–4524.
 43. Dasari M., Lee D., Erigala V. R., and Murthy N. / Chemiluminescent PEG-PCL micelles for imaging hydrogen peroxide. // *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* – 2009. – V. 89A. – № 3. – P. 561–566.
 44. Liu L., Li Y., Liu H., and Fang Y. / Synthesis and characterization of chitosan-graft-polycaprolactone copolymers. // *Eur. Polym. J.* – 2004. – V. 40. – № 12. – P. 2739–2744.
 45. Schlapschy M., Binder U., Borger C., Theobald I., Wachinger K., Kisling S., Haller D., and Skerra A. / PASylation: a biological alternative to PEGylation for extending the plasma half-life of pharmaceutically active proteins. // *Protein Eng. Des. Sel.* – 2013. – V. 26. – № 8. – P. 489–501.
 46. Bilalis P., Pitsikalis M., and Hadjichristidis N. / Controlled nitroxide-mediated and reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization of N-vinylpyrrolidone: Synthesis of block copolymers with styrene and 2-vinylpyridine. // *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* – 2006. – V. 44. – № 1. – P. 659–665.
 47. Kostov G., Boschet F., Buller J., Badache L., Brandsadter S., and Ameduri B. / First Amphiphilic Poly(vinylidene fluoride- co -3,3,3-trifluoropropene)- b -oligo(vinyl alcohol) Block Copolymers as Potential Nonpersistent Fluorosurfactants from Radical Polymerization Controlled by Xanthate. // *Macromolecules.* – 2011. – V. 44. – № 7. – P. 1841–1855.
 48. Mokry J., Karbanova J., Lukas J., Paleckova V., and Dvorankova B. / Biocompatibility of HEMA Copolymers Designed for Treatment of CNS Diseases with Polymer-Encapsulated Cells. // *Biotechnol. Prog.* – 2000. – V. 16. – № 5. – P. 897–904.
 49. Park J. H., Ye M., and Park K. / Biodegradable polymers for microencapsulation of drugs. // *Molecules.* – 2005. – V. 10. – № 1. – P. 146–61.
 50. Tian H., Tang Z., Zhuang X., Chen X., and Jing X. / Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application. // *Prog. Polym. Sci.* – 2012. – V. 37. – № 2. – P. 237–280.
 51. Kirkham S., Castelletto V., Hamley I. W., Reza M., Ruokolainen J., Hermida-Merino D., Bilalis P., and Iatrou H. / Self-Assembly of Telechelic Tyrosine End-Capped PEO and Poly(alanine) Polymers in Aqueous Solution. // *Biomacromolecules.* – 2016. – V. 17. – № 3. – P. 1186–1197.
 52. Griffin, William C. and Griffin W. C. / Calculation of HLB Values of Non-Ionic Surfactants. // *J. Soc. Cosmet. Chem.* – 1954. – V. 5. – № 4. – P. 249–56.

53. Davies J. T. / A quantitative kinetic theory of emulsion type. I. Physical chemistry of the emulsifying agent. // *Proc. 2nd Int. Congr. Surf. Act.* – 1957. – V. 1 – P. 426–438.
54. Холмберг К., Йёнссон Б., Кронберг Б., and Линдман Б. / Поверхностно-активные вещества и полимеры в водных растворах. // Москва: Бином. – 2007.
55. Русанов А. И. / Мицеллообразование в растворах поверхностно-активных веществ. // СПб.: Химия. – 1992.
56. Antonietti M. and Förster S. / Vesicles and Liposomes: A Self-Assembly Principle Beyond Lipids. // *Adv. Mater.* – 2003. – V. 15. – № 16. – P. 1323–1333.
57. Won Y.-Y., Brannan A. K., Davis H. T., and Bates F. S. / Cryogenic Transmission Electron Microscopy (Cryo-TEM) of Micelles and Vesicles Formed in Water by Poly(ethylene oxide)-Based Block Copolymers. // *J. Phys. Chem. B.* – 2002. – V. 106. – № 13. – P. 3354–3364.
58. Lee J. S. and Feijen J. / Polymersomes for drug delivery: Design, formation and characterization. // *J. Control. Release.* – 2012. – V. 161. – № 2. – P. 473–483.
59. Nagarajan R. / Solubilization of hydrocarbons and resulting aggregate shape transitions in aqueous solutions of Pluronic® (PEO–PPO–PEO) block copolymers. // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* – 1999. – V. 16. – № 1–4. – P. 55–72.
60. Bryskhe K., Jansson J., Topgaard D., Schillén K., and Olsson U. / Spontaneous Vesicle Formation in a Block Copolymer System. // *J. Phys. Chem. B.* – 2004. – V. 108. – № 28. – P. 9710–9719.
61. Mortensen K. and Pedersen J. S. / Structural Study on the Micelle Formation of Poly(ethylene oxide)-Poly(propylene oxide)-Poly(ethylene oxide) Triblock Copolymer in Aqueous Solution. // *Macromolecules.* – 1993. – V. 26 – P. 805–812.
62. Zhou Z. and Chu B. / Light-scattering study on the association behavior of triblock polymers of ethylene oxide and propylene oxide in aqueous solution. // *J. Colloid Interface Sci.* – 1988. – V. 126. – № 1. – P. 171–180.
63. Goldmints I., von Gottberg F. K., Smith K. A., and Hatton T. A. / Small-Angle Neutron Scattering Study of PEO–PPO–PEO Micelle Structure in the Unimer-to-Micelle Transition Region. // *Langmuir.* – 1997. – V. 13. – № 14. – P. 3659–3664.
64. Lopes J. R. and Loh W. / Investigation of Self-Assembly and Micelle Polarity for a Wide Range of Ethylene Oxide–Propylene Oxide–Ethylene Oxide Block Copolymers in Water. // *Langmuir.* – 1998. – V. 14. – № 4. – P. 750–756.
65. Budkina O. A., Demina T. V., Dorodnykh T. Y., Melik-Nubarov N. S., and Grozdova I. D. / Cytotoxicity of nonionic amphiphilic copolymers. // *Polym. Sci. Ser. A.* – 2012. – V. 54. – № 9. – P. 707–717.
66. Rassing J. and Attwood D. / Ultrasonic velocity and light-scattering studies on the polyoxyethylene–polyoxypropylene copolymer Pluronic F127 in aqueous solution. // *Int. J. Pharm.* – 1982. – V. 13. – № 1. – P. 47–55.
67. Ruthstein S., Potapov A., Raitsimring A. M., and Goldfarb D. / Double Electron Electron Resonance as a Method for Characterization of Micelles. // 2005. – V. 123 – P. 22843–22851.
68. Kostarelos K., Tadros T. F., and Luckham P. F. / Physical Conjugation of (Tri-) Block Copolymers to Liposomes toward the Construction of Sterically Stabilized Vesicle Systems. // *Langmuir.* – 1999. – V. 15. – № 2. – P. 369–376.
69. Kostarelos K., Luckham P. F., and Tadros T. F. / Addition of Block Copolymers to Liposomes Prepared Using Soybean Lecithin. Effects on Formation, Stability and the Specific Localization of the Incorporated Surfactants Investigated. // *J. Liposome Res.* – 1995. – V. 5. – № 1. – P. 117–130.
70. Hurter P. N. P., Scheutjens J. M. H. M., Hatton T. A., Mean-field B. C. M. A. S., Hurter P. N. P., Scheutjens J. M. H. M., and Hatton T. A. / Molecular Modeling of Micelle Formation and Solubilization in Block Copolymer Micelles. 1. A Self-Consistent Mean-Field Lattice Theory. // *Macromolecules.* – 1993. – V. 26. – № 21. – P. 5592–5601.
71. Hurter P. N., Scheutjensjps M. H. M., and Hatton T. A. / Molecular Modeling of Micelle Formation and Solubilization in Block Copolymer Micelles. 2. Lattice Theory for Monomers with Internal Degrees of Freedom. // *Macromolecules.* – 1993. – V. 26. – № 19. – P. 5030–5040.

72. Su Y.-L., Wang J., and Liu H.-Z. / Melt, hydration, and micellization of the PEO-PPO-PEO block copolymer studied by FTIR spectroscopy. // *J. Colloid Interface Sci.* – 2002. – V. 251. – № 2. – P. 417–23.
73. Torchilin V. P. / Micellar nanocarriers: Pharmaceutical perspectives. // *Pharm. Res.* – 2007. – V. 24. – № 1. – P. 1–16.
74. Zhang W., Shi Y., Chen Y., Yu S., Hao J., Luo J., Sha X., and Fang X. / Enhanced antitumor efficacy by Paclitaxel-loaded Pluronic P123/F127 mixed micelles against non-small cell lung cancer based on passive tumor targeting and modulation of drug resistance. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2010. – V. 75. – № 3. – P. 341–353.
75. Zhang W., Shi Y., Chen Y., Hao J., Sha X., and Fang X. / The potential of Pluronic polymeric micelles encapsulated with paclitaxel for the treatment of melanoma using subcutaneous and pulmonary metastatic mice models. // *Biomaterials.* – 2011. – V. 32. – № 25. – P. 5934–5944.
76. Munshi N., Rapoport N., and Pitt W. G. / Ultrasonic activated drug delivery from Pluronic P-105 micelles. // *Cancer Lett.* – 1997. – V. 118. – № 1. – P. 13–19.
77. Tran T. T.-D., Tran P. H.-L., Lim J., Park J. B., Choi S.-K., and Lee B.-J. / Physicochemical principles of controlled release solid dispersion containing a poorly water-soluble drug. // *Ther. Deliv.* – 2010. – V. 1. – № 1. – P. 51–62.
78. Singh R., Tønnesen H. H., Kristensen S., and Berg K. / The influence of Pluronic® on dark cytotoxicity, photocytotoxicity, localization and uptake of curcumin in cancer cells: studies of curcumin and curcuminoids XLIX. // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2013. – V. 12. – № 3. – P. 559–575.
79. Heo J., Lim C.-K., Kim Y., Cho H.-J., Lee Y.-D., Maeng J., Ahn D.-R., Lee S., Bang J., Park S. Y., and Kim S. / Fluorogenic nanoreactor assembly with boosted sensing kinetics for timely imaging of cellular hydrogen peroxide. // *Chem. Commun.* – 2016. – V. 52. – № 6. – P. 1131–1134.
80. Lim C.-K., Lee Y.-D., Na J., Oh J. M., Her S., Kim K., Choi K., Kim S., and Kwon I. C. / Chemiluminescence-Generating Nanoreactor Formulation for Near-Infrared Imaging of Hydrogen Peroxide and Glucose Level in vivo. // *Adv. Funct. Mater.* – 2010. – V. 20. – № 16. – P. 2644–2648.
81. Lee Y.-D. D., Lim C.-K. K., Singh A., Koh J., Kim J., Kwon I. C., and Kim S. / Dye/peroxalate aggregated nanoparticles with enhanced and tunable chemiluminescence for biomedical imaging of hydrogen peroxide. // *ACS Nano.* – 2012. – V. 6. – № 8. – P. 6759–6766.
82. Singh A., Seo Y. H., Lim C. K., Koh J., Jang W. D., Kwon I. C., and Kim S. / Biolighted Nanotorch Capable of Systemic Self-Delivery and Diagnostic Imaging. // *ACS Nano.* – 2015. – V. 9. – № 10. – P. 9906–9911.
83. Zhen X., Zhang C., Xie C., Miao Q., Lim K. L., and Pu K. / Intraparticle Energy Level Alignment of Semiconducting Polymer Nanoparticles to Amplify Chemiluminescence for Ultrasensitive in Vivo Imaging of Reactive Oxygen Species. // *ACS Nano.* – 2016. – V. 10. – № 6. – P. 6400–6409.
84. Tadros T. F. / Emulsion Formation, Stability, and Rheology. // , *Emulsion Formation and Stability*, First Edit. . Wiley-VCH, P. 1–75, 2013.
85. Olsson U. and Wennerström H. / Globular and bicontinuous phases of nonionic surfactant films. // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 1994. – V. 49. – № C. – P. 113–146.
86. He L., Wang G., and Zhang Q. / An alternative paclitaxel microemulsion formulation: hypersensitivity evaluation and pharmacokinetic profile. // *Int. J. Pharm.* – 2003. – V. 250. – № 1. – P. 45–50.
87. Puglia C., Cardile V., Panico A. M., Crasci L., Offerta A., Caggia S., Drechsler M., Mariani P., Cortesi R., and Esposito E. / Evaluation of Monooleine Aqueous Dispersions as Tools for Topical Administration of Curcumin: Characterization, In Vitro and Ex-Vivo Studies. // *J. Pharm. Sci.* – 2013. – V. 102. – № 7. – P. 2349–2361.
88. Castro C. I. and Briceno J. C. / Perfluorocarbon-based oxygen carriers: review of products and trials. // *Artif. Organs.* – 2010. – V. 34. – № 8. – P. 622–634.

89. Alexandridis P., Olsson U., and Lindman B. / Self-Assembly of Amphiphilic Block Copolymers: The (EO)₁₃(PO)₃₀(EO)₁₃-Water-p-Xylene System. // *Macromolecules*. – 1995. – V. 28. – № 23. – P. 7700–7710.
90. Causse J., Oberdisse J., Jestin J., Lagerge S., Charles I., Cnrs G., Ii M., Bataillon P. E., Cedex M., Laboratoire L., Cea-cnrs U. M. R., Saclay C. E. A., Cedex G., Umr- C., Ii M., Bataillon P. E., Cedex M., and C B. S. / Small-Angle Neutron Scattering Study of Solubilization of Tributyl Phosphate in Aqueous Solutions of L64 Pluronic Triblock Copolymers contamination. // 2010. – V. 26. – № 9. – P. 15745–15753.
91. Bailey D. L. and O'connor F. M. / Siloxane-oxyalkylene block copolymers. // . Google Patents, USA, 1958.
92. Kanner B., Reid W. G., and Petersen I. H. / Synthesis and Properties of Siloxane-Polyether Copolymer Surfactants. // *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.* – 1967. – V. 6. – № 2. – P. 88–92.
93. Srividhya M., Chandrasekar K., Baskar G., and Reddy B. S. R. / Physico-chemical properties of siloxane surfactants in water and their surface energy characteristics. // *Polymer (Guildf)*. – 2007. – V. 48. – № 5. – P. 1261–1268.
94. Kickelbick G., Bauer J., Hüsing N., Andersson M., and Holmberg K. / The binary phase behavior of short-chain PDMS-b-PEO diblock copolymers in aqueous solutions in dependence of the PDMS chain length—a combined polarized optical microscopy, ²H NMR and SAXS study. // *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* – 2005. – V. 254. – № 1–3. – P. 37–48.
95. Lin Y. and Alexandridis P. / Self-Assembly of an Amphiphilic Siloxane Graft Copolymer in Water. // *J. Phys. Chem. B*. – 2002. – V. 106. – № 42. – P. 10845–10853.
96. Lin Y. and Alexandridis P. / Cosolvent Effects on the Micellization of an Amphiphilic Siloxane Graft Copolymer in Aqueous Solutions. // *Langmuir*. – 2002. – V. 18. – № 11. – P. 4220–4231.
97. Moan J. and Peng Q. / An outline of the hundred-year history of PDT. // *Anticancer Res.* – 2003. – V. 23. – № 5A. – P. 3591–3600.
98. Узденский А. Б. / Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии. // СПб.: Наука. – 2010. – 327 p.
99. Dougherty T. J., Kaufman J. E., Goldfarb A., Weishaupt K. R., Boyle D., and Mittleman A. / Photoradiation Therapy for the Treatment of Malignant Tumors. // *Cancer Res.* – 1978. – V. 38. – P. 2628–2635.
100. Dougherty T. J., Grindey G. B., Fiel R., Weishaupt K. R., and Boyle D. G. / Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. // *J Natl Cancer Inst.* – 1975. – V. 55. – № 1. – P. 115–121.
101. Lakowicz J. R. / *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. // 3rd ed. Boston, MA: Springer US. – 2006.
102. Zhao J., Wu W., Sun J., and Guo S. / Triplet photosensitizers: from molecular design to applications. // *Chem. Soc. Rev.* – 2013. – V. 42. – № 12. – P. 5323.
103. Ormond A. and Freeman H. / Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy. // *Materials (Basel)*. – 2013. – V. 6. – № 3. – P. 817–840.
104. Lovell J. F., Liu T. W. B., Chen J., and Zheng G. / Activatable photosensitizers for imaging and therapy. // *Chem. Rev.* – 2010. – V. 110. – № 5. – P. 2839–2857.
105. Abrahamse H. and Hamblin M. R. / New photosensitizers for photodynamic therapy. // *Biochem. J.* – 2016. – V. 473. – № 4. – P. 347–364.
106. Girotti A. W. / Photodynamic lipid peroxidation in biological systems. // *Photochem. Photobiol.* – 1990. – V. 51. – № 4. – P. 497–509.
107. Krasnovsky A. A. / Singlet Molecular Oxygen in Photobiochemical Systems: IR Phosphorescence Studies. // *Membr. Cell Biol.* – 1998. – V. 12. – № 5. – P. 665–690.
108. Foote C. S. / Photosensitized oxidation and singlet oxygen: Consequences in biological systems. // , *Free Radicals in Biology Vol II*, V. 35. Academic Press, New York, P. 3–22, 1976.
109. Schmidt W. / The Study of Basic Photochemical and Photophysical Properties of Membrane-Bound Flavins: The Indispensable Prerequisite for the Elucidation of Primary Physiological Blue Light Action. // , *Blue Light Effects in Biological Systems. Proceedings in Life Sciences*. Springer,

- Berlin, Heidelberg, P. 81–94, 1984.
110. Baker A. and Kanofsky J. R. / Quenching of singlet oxygen by biomolecules from L1210 leukemia cells. // *Photochem. Photobiol.* – 1992. – V. 55. – № 4. – P. 523–528.
 111. Kanofsky J. R. / Quenching of singlet oxygen by human red cell ghosts. // *Photochem. Photobiol.* – 1991. – V. 53. – № 1. – P. 93–99.
 112. Moan J. / On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. // *J. Photochem. Photobiol. B.* – 1990. – V. 6 – P. 343–347.
 113. Moan J. and Berg K. / The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. // *Photochem. Photobiol.* – 1991. – V. 53. – № 4. – P. 549–553.
 114. Hélène C. / Photosensitized Cross-Linking of Proteins to Nucleic Acids. // *, Aging, Carcinogenesis, and Radiation Biology*. Boston, MA: Springer US, P. 149–163, 1976.
 115. I B.-H. E. / Factors affecting the photokilling of cultured Chinese hamster cells by phthalocyanines. // *Radiat Res.* – 1985. – V. 103. – № 3. – P. 403–409.
 116. Ueda J., Takeshita K., Matsumoto S., Yazaki K., Kawaguchi M., and Ozawa T. / Singlet oxygen-mediated hydroxyl radical production in the presence of phenols: whether DMPO- $\cdot\text{OH}$ formation really indicates production of $\cdot\text{OH}$?. // *Photochem. Photobiol.* – 2003. – V. 77. – № 2. – P. 165–70.
 117. Ding H., Yu H., Dong Y., Tian R., Huang G., Boothman D. A., Sumer B. D., and Gao J. / Photoactivation switch from type II to type I reactions by electron-rich micelles for improved photodynamic therapy of cancer cells under hypoxia. // *J. Control. Release.* – 2011. – V. 156. – № 3. – P. 276–280.
 118. Hu J., Tang Y., Elmenoufy A. H., Xu H., Cheng Z., and Yang X. / Nanocomposite-Based Photodynamic Therapy Strategies for Deep Tumor Treatment. // *Small.* – 2015. – V. 11. – № 44. – P. 5860–5887.
 119. Lucky S. S., Soo K. C., and Zhang Y. / Nanoparticles in photodynamic therapy. // *Chem. Rev.* – 2015. – V. 115. – № 4. – P. 1990–2042.
 120. Li Y., Zhou Q., Deng Z., Pan M., Liu X., Wu J., Yan F., and Zheng H. / IR-780 Dye as a Sonosensitizer for Sonodynamic Therapy of Breast Tumor. // *Sci. Rep.* – 2016. – V. 6. – № 1. – P. 25968.
 121. Yumita N., Nishigaki R., Umemura K., and Umemura S. / Hematoporphyrin as a Sensitizer of Cell-damaging Effect of Ultrasound. // *Japanese J. Cancer Res.* – 1989. – V. 80. – № 3. – P. 219–222.
 122. Li Q., Wang X., Wang P., Zhang K., Wang H., Feng X., and Liu Q. / Efficacy of Chlorin e6-Mediated Sono-Photodynamic Therapy on 4T1 Cells. // *Cancer Biother. Radiopharm.* – 2014. – V. 29. – № 1. – P. 42–52.
 123. Shi H., Liu Q., Qin X., Wang P., and Wang X. / Pharmacokinetic study of a novel sonosensitizer chlorin-e6 and its sonodynamic anti-cancer activity in hepatoma-22 tumor-bearing mice. // *Biopharm. Drug Dispos.* – 2011. – V. 32. – № 6. – P. 319–332.
 124. Hou W., Xia F., Alves C. S., Qian X., Yang Y., and Cui D. / MMP2-Targeting and Redox-Responsive PEGylated Chlorin e6 Nanoparticles for Cancer Near-Infrared Imaging and Photodynamic Therapy. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2016. – V. 8. – № 2. – P. 1447–1457.
 125. Deepagan V. G., You D. G., Um W., Ko H., Kwon S., Choi K. Y., Yi G. R., Lee J. Y., Lee D. S., Kim K., Kwon I. C., and Park J. H. / Long-Circulating Au-TiO₂ Nanocomposite as a Sonosensitizer for ROS-Mediated Eradication of Cancer. // *Nano Lett.* – 2016. – V. 16. – № 10. – P. 6257–6264.
 126. Castano A. P., Demidova T. N., and Hamblin M. R. / Mechanisms in photodynamic therapy: Part three—Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* – 2005. – V. 2. – № 2. – P. 91–106.
 127. Breskey J. D., Lacey S. E., Vesper B. J., Paradise W. A., Radosevich J. A., and Colvard M. D. / Photodynamic Therapy: Occupational Hazards and Preventative Recommendations for Clinical Administration by Healthcare Providers. // *Photomed. Laser Surg.* – 2013. – V. 31. – № 8. – P. 398–407.

128. Nishiyama N., Morimoto Y., Jang W. D., and Kataoka K. / Design and development of dendrimer photosensitizer-incorporated polymeric micelles for enhanced photodynamic therapy. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2009. – V. 61. – № 4. – P. 327–338.
129. Li J., Zhang W., Hu Z., Jiang X.-J., Ngai T., Lo P.-C., Zhang W., and Chen G. / Novel phthalocyanine and PEG-methacrylates based temperature-responsive polymers for targeted photodynamic therapy. // *Polym. Chem.* – 2013. – V. 4. – № 3. – P. 782–788.
130. Jenkins S. V., Srivatsan A., Reynolds K. Y., Gao F., Zhang Y., Heyes C. D., Pandey R. K., and Chen J. / Understanding the interactions between porphyrin-containing photosensitizers and polymer-coated nanoparticles in model biological environments. // *J. Colloid Interface Sci.* – 2016. – V. 461 – P. 225–231.
131. Bechet D., Couleaud P., Frochot C., Viriot M.-L., Guillemin F., and Barberi-Heyob M. / Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. // *Trends Biotechnol.* – 2008. – V. 26. – № 11. – P. 612–621.
132. Master A. M., Rodriguez M. E., Kenney M. E., Oleinick N. L., and Gupta A. Sen / Delivery of the photosensitizer Pc 4 in PEG–PCL micelles for in vitro PDT studies. // *J. Pharm. Sci.* – 2010. – V. 99. – № 5. – P. 2386–2398.
133. Knop K., Mingotaud A.-F., El-Akra N., Violleau F., and Souchard J.-P. / Monomeric pheophorbide(a)-containing poly(ethyleneglycol-b- ϵ -caprolactone) micelles for photodynamic therapy. // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2009. – V. 8. – № 3. – P. 396.
134. da Volta Soares M., Oliveira M. R., dos Santos E. P., de Brito Gitirana L., Barbosa G. M., Quaresma C. H., and Ricci-Júnior E. / Nanostructured delivery system for zinc phthalocyanine: preparation, characterization, and phototoxicity study against human lung adenocarcinoma A549 cells. // *Int. J. Nanomedicine.* – 2011. – V. 6 – P. 227–38.
135. Shieh M.-J., Peng C.-L., Chiang W.-L., Wang C.-H., Hsu C.-Y., Wang S.-J. J., and Lai P.-S. / Reduced Skin Photosensitivity with meta -Tetra(hydroxyphenyl)chlorin-Loaded Micelles Based on a Poly(2-ethyl-2-oxazoline)- b -poly(d , l -lactide) Diblock Copolymer in Vivo. // *Mol. Pharm.* – 2010. – V. 7. – № 4. – P. 1244–1253.
136. Mondon K., Zeisser-Labouèbe M., Gurny R., and Möller M. / MPEG-hexPLA Micelles as Novel Carriers for Hypericin, a Fluorescent Marker for Use in Cancer Diagnostics. // *Photochem. Photobiol.* – 2011. – V. 87. – № 2. – P. 399–407.
137. Hofman J.-W., Carstens M. G., van Zeeland F., Helwig C., Flesch F. M., Hennink W. E., and van Nostrum C. F. / Photocytotoxicity of mTHPC (Temoporfin) Loaded Polymeric Micelles Mediated by Lipase Catalyzed Degradation. // *Pharm. Res.* – 2008. – V. 25. – № 9. – P. 2065–2073.
138. Barel A., Jori G., Perin A., Romandini P., Pagnan A., and Biffanti S. / Role of high-, low- and very low-density lipoproteins in the transport and tumor-delivery of hematoporphyrin in vivo. // *Cancer Lett.* – 1986. – V. 32. – № 2. – P. 145–150.
139. Li B., Moriyama E. H., Li F., Jarvi M. T., Allen C., and Wilson B. C. / Diblock Copolymer Micelles Deliver Hydrophobic Protoporphyrin IX for Photodynamic Therapy. // *Photochem. Photobiol.* – 2007. – V. 83. – № 6. – P. 1505–1512.
140. da Silva A. R., Inada N. M., Rettori D., Baratti M. O., Vercesi A. E., and Jorge R. A. / In vitro photodynamic activity of chloro(5,10,15,20-tetraphenylporphyrinato)indium(III) loaded-poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles in LNCaP prostate tumour cells. // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* – 2009. – V. 94. – № 2. – P. 101–112.
141. Bachor R., Shea C. R., Belmonte S. J., and Hasan T. / Free and Conjugated Chlorin E 6 in the Photodynamic Therapy of Human Bladder Carcinoma Cells. // *J. Urol.* – 1991. – V. 146. – № 6. – P. 1654–1658.
142. Bachor R., Shea C. R., Gillies R., and Hasan T. / Photosensitized destruction of human bladder carcinoma cells treated with chlorin e6-conjugated microspheres. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 1991. – V. 88. – № 4. – P. 1580–1584.
143. Jeong H., Huh M., Lee S. J., Koo H., Kwon I. C., Jeong S. Y., and Kim K. / Photosensitizer-Conjugated Human Serum Albumin Nanoparticles for Effective Photodynamic Therapy. // *Theranostics.* – 2011. – V. 1 – P. 230–239.

144. Chin W. W. L., Heng P. W. S., Thong P. S. P., Bhuvaneswari R., Hirt W., Kuenzel S., Soo K. C., and Olivo M. / Improved formulation of photosensitizer chlorin e6 polyvinylpyrrolidone for fluorescence diagnostic imaging and photodynamic therapy of human cancer. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2008. – V. 69. – № 3. – P. 1083–93.
145. Chowdhary R. K., Chansarkar N., Sharif I., Hioka N., and Dolphin D. / Formulation of Benzoporphyrin Derivatives in Pluronics[®]. // *Photochem. Photobiol.* – 2003. – V. 77. – № 3. – P. 299.
146. Sezgin Z., Yuksel N., and Baykara T. / Investigation of pluronic and PEG-PE micelles as carriers of meso-tetraphenyl porphine for oral administration. // *Int. J. Pharm.* – 2007. – V. 332. – № 1–2. – P. 161–167.
147. Blázquez-Castro A. / Direct $^{1}O_2$ optical excitation: A tool for redox biology. // *Redox Biol.* – 2017. – V. 13. – № April. – P. 39–59.
148. Schweitzer C. and Schmidt R. / Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. // *Chem. Rev.* – 2003. – V. 103. – № 5. – P. 1685–1757.
149. Ogilby P. R. / Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. // *Chem. Soc. Rev.* – 2010. – V. 39. – № 8. – P. 3181.
150. Paterson M. J., Christiansen O., Jensen F., Ogilby P., and R E. / Overview of Theoretical and Computational Methods Applied to the Oxygen-Organic Molecule Photosystem. // *Photochem. Photobiol.* – 2006. – V. 82 – P. 1136–1160.
151. Wu H., Song Q., Ran G., Lu X., and Xu B. / Recent developments in the detection of singlet oxygen with molecular spectroscopic methods. // *TrAC Trends Anal. Chem.* – 2011. – V. 30. – № 1. – P. 133–141.
152. Gomes A., Fernandes E., and Lima J. L. F. C. / Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. // *J. Biochem. Biophys. Methods.* – 2005. – V. 65. – № 2–3. – P. 45–80.
153. Kostka M., Zimcik P., Miletin M., Klemra P., Kopecky K., and Musil Z. / Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines. // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* – 2006. – V. 178. – № 1. – P. 16–25.
154. Ohyashiki T., Nunomura M., and Katoh T. / Detection of superoxide anion radical in phospholipid liposomal membrane by fluorescence quenching method using 1,3-diphenylisobenzofuran. // *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* – 1999. – V. 1421. – № 1. – P. 131–139.
155. Umezawa N., Tanaka K., Urano Y., Kikuchi K., Higuchi T., and Nagano T. / Novel fluorescent probes for singlet oxygen. // *Angew. Chemie-International Ed.* – 1999. – V. 38. – № 19. – P. 2899–2901.
156. Tanaka K., Miura T., Umezawa N., Urano Y., Kikuchi K., Higuchi T., and Nagano T. / Rational Design of Fluorescein-Based Fluorescence Probes. Mechanism-Based Design of a Maximum Fluorescence Probe for Singlet Oxygen. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2001. – V. 123. – № 11. – P. 2530–2536.
157. Singlet Oxygen Sensor Green Reagent, Product Information. // *Molecular Probes/Invitrogen.* – 2004. – 1-2 p.
158. Pedersen S. K., Holmehave J., Blaikie F. H., Gollmer A., Breitenbach T., Jensen H. H., and Ogilby P. R. / Aarhus sensor green: A fluorescent probe for singlet oxygen. // *J. Org. Chem.* – 2014. – V. 79. – № 7. – P. 3079–3087.
159. Gollmer A., Arnbjerg J., Blaikie F. H., Pedersen B. W., Breitenbach T., Daasbjerg K., Glasius M., and Ogilby P. R. / Singlet Oxygen Sensor Green[®]: photochemical behavior in solution and in a mammalian cell. // *Photochem.* – 2011. – V. 87. – № 3. – P. 671–679.
160. Shen Y., Lin H., Huang Z., Xiao L., Chen D., Li B., and Xie S. / Kinetic analysis of singlet oxygen generation in a living cell using Singlet Oxygen Sensor Green. // *, Proc. SPIE*, V. 7845 . P. 78451F–78451F–6, 2010.
161. Flors C., Fryer M. J., Waring J., Reeder B., Bechtold U., Mullineaux P. M., Nonell S., Wilson M. T., and Baker N. R. / Imaging the production of singlet oxygen in vivo using a new fluorescent sensor, Singlet Oxygen Sensor Green. // *J. Exp. Bot.* – 2006. – V. 57. – № 8. – P. 1725–1734.
162. Rác M., Křupka M., Binder S., Sedlářová M., Matušková Z., Ra Ška M., and Pospíšil P. /

- Oxidative damage of u937 human leukemic cells caused by hydroxyl radical results in singlet oxygen formation. // PLoS One. – 2015. – V. 10. – № 3. – P. 1–19.
163. Berghoff B. A., Glaeser J., Nuss A. M., Zobawa M., Lottspeich F., and Klug G. / Anoxygenic photosynthesis and photooxidative stress: A particular challenge for Roseobacter. // Environ. Microbiol. – 2011. – V. 13. – № 3. – P. 775–791.
 164. Song B., Wang G., and Yuan J. / A new europium chelate-based phosphorescence probe specific for singlet oxygen. // Chem. Commun. – 2005. – P. 3553–3555.
 165. Tan M., Song B., Wang G., and Yuan J. / A new terbium(III) chelate as an efficient singlet oxygen fluorescence probe. // Free Radic. Biol. Med. – 2006. – V. 40. – № 9. – P. 1644–1653.
 166. Song B., Wang G., Tan M., and Yuan J. / A europium (III) complex as an efficient singlet oxygen luminescent probe. // J. Am. Chem. Soc. – 2006. – V. 128. – № iii. – P. 13442–13450.
 167. Liu Y. J. and Wang K. Z. / Visible-light-excited singlet-oxygen luminescence probe based on Re(CO)3Cl(aeip). // Eur. J. Inorg. Chem. – 2008. – № 33. – P. 5214–5219.
 168. Mano C. M., Prado F. M., Massari J., Ronsein G. E., Martinez G. R., Miyamoto S., Cadet J., Sies H., Medeiros M. H. G., Bechara E. J. H., and Di Mascio P. / Excited singlet molecular O2 ((1)Δg) is generated enzymatically from excited carbonyls in the dark. // Sci. Rep. – 2014. – V. 4 – P. 5938.
 169. Martinez G. R., Garcia F., Catalani L. H., Cadet J., Oliveira M. C. B., Ronsein G. E., Miyamoto S., Medeiros M. H. G., and Mascio P. Di / Synthesis of a hydrophilic and non-ionic anthracene derivative, the N,N'-di-(2,3-dihydroxypropyl)-9,10-anthracenedipropanamide as a chemical trap for singlet molecular oxygen detection in biological systems. // Tetrahedron. – 2006. – V. 62. – № 46. – P. 10762–10770.
 170. Nardello V., Aubry J. M., Johnston P., Bulduk I., De Vries A. H. M., and Alsters P. L. / Facile preparation of the water-soluble singlet oxygen traps anthracene-9,10-divinylsulfonate (AVS) and anthracene-9,10-diethylsulfonate (AES) via a Heck reaction with vinylsulfonate. // Synlett. – 2005. – № 17. – P. 2667–2669.
 171. Castañeda F., Zanolco A. L., Meléndrez M., Günther G., and Lemp E. / Synthesis of 2-(n-(N,N,N-trimethyl)-n-alkyl)-5-alkylfuryl halides. Useful probes for studying singlet oxygen dynamics and equilibria in microcompartmentalized systems. // J. Photochem. Photobiol. A Chem. – 2004. – V. 168. – № 3. – P. 175–183.
 172. Probes for Reactive Oxygen Species, Including Nitric Oxide. // , *The Molecular Probes® Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and labeling Technologies*, 11th ed. . 2010.
 173. Giorgio M, Trinei M, Migliaccio E P. P. et al / Hydrogen peroxide: a metabolic by-product or a common mediator of ageing signals?. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. – 2007. – V. 8. – № 9. – P. 722–728.
 174. Augusto O. and Miyamoto S. / Oxygen Radicals and Related Species. // , *Principles of Free Radical Biomedicine*, V. 1 . P. 1–23, 2012.
 175. Lu C., Song G., and Lin J.-M. M. / Reactive oxygen species and their chemiluminescence-detection methods. // Trends Anal. Chem. – 2006. – V. 25. – № 10. – P. 985–995.
 176. Liou G.-Y. and Storz P. / Reactive oxygen species in cancer. // Free Radic. Res. – 2010. – V. 44. – № 5. – P. 479–496.
 177. Wardman P. / Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects. // Free Radic. Biol. Med. – 2007. – V. 43. – № 7. – P. 995–1022.
 178. Sies H., Berndt C., and Jones D. P. / Oxidative Stress. // Annu. Rev. Biochem. – 2017. – V. 86. – № 1. – P. 715–748.
 179. Burdon R. H. / Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. // Free Radic. Biol. Med. – 1995. – V. 18. – № 4. – P. 775–794.
 180. Klaunig J. E. and Kamendulis L. M. / The role of oxidative stress in carcinogenesis. // Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. – 2004. – V. 44. – № 1. – P. 239–267.
 181. Balaban R. S., Nemoto S., and Finkel T. / Mitochondria, oxidants, and aging. // Cell. – 2005. – V. 120. – № 4. – P. 483–495.

182. Martino C. F. and Castello P. R. / Modulation of hydrogen peroxide production in cellular systems by low level magnetic fields. // PLoS One. – 2011. – V. 6. – № 8. – P. 1–6.
183. Wagner B. A., Evig C. B., Reszka K. J., Buettner G. R., and Burns C. P. / Doxorubicin increases intracellular hydrogen peroxide in PC3 prostate cancer cells. // Arch. Biochem. Biophys. – 2005. – V. 440. – № 2. – P. 181–190.
184. Mizutani H., Tada-Oikawa S., Hiraku Y., Kojima M., and Kawanishi S. / Mechanism of apoptosis induced by doxorubicin through the generation of hydrogen peroxide. // Life Sci. – 2005. – V. 76. – № 13. – P. 1439–1453.
185. Alexandre J., Hu Y., Lu W., Pelicano H., and Huang P. / Novel action of paclitaxel against cancer cells: Bystander effect mediated by reactive oxygen species. // Cancer Res. – 2007. – V. 67. – № 8. – P. 3512–3517.
186. Simons A. L., Ahmad I. M., Mattson D. M., Dornfeld K. J., and Spitz D. R. / 2-Deoxy-D-glucose combined with cisplatin enhances cytotoxicity via metabolic oxidative stress in human head and neck cancer cells. // Cancer Res. – 2007. – V. 67. – № 7. – P. 3364–3370.
187. Rhee S. G. / H₂O₂, a Necessary Evil for Cell Signaling. // Science (80-.). – 2006. – V. 312. – № 5782. – P. 1882–1883.
188. Bonekamp N. A., Völkl A., Fahimi H. D., and Schrader M. / Reactive oxygen species and peroxisomes: Struggling for balance. // BioFactors. – 2009. – V. 35. – № 4. – P. 346–355.
189. Szatrowski T. P. and Nathan C. F. / Production of Large Amounts of Hydrogen Peroxide by Human Tumor Cells1. // Cancer Res. – 1991. – V. 51. – № 3. – P. 794–798.
190. Zieba M., Suwalski M., Kwiatkowska S., Piasecka G., Grzelewskarzyskowska I., Stolarek R., and Nowak D. / Comparison of hydrogen peroxide generation and the content of lipid peroxidation products in lung cancer tissue and pulmonary parenchyma. // Respir. Med. – 2000. – V. 94. – № 8. – P. 800–805.
191. Ruch W., Cooper P. H., and Baggiolini M. / Assay of H₂O₂ production by macrophages and neutrophils with homovanillic acid and horse-radish peroxidase. // J. Immunol. Methods. – 1983. – V. 63. – № 3. – P. 347–357.
192. López-Lázaro M. and Lopez-Lazaro M. / A new view of carcinogenesis and an alternative approach to cancer therapy. // Mol. Med. – 2010. – V. 16. – № 3–4. – P. 1.
193. Montero a J. and Jassem J. / Cellular redox pathways as a therapeutic target in the treatment of cancer. // Drugs. – 2011. – V. 71. – № 11. – P. 1385–1396.
194. Richter C. and Kass G. E. N. / Oxidative stress in mitochondria: Its relationship to cellular Ca²⁺ homeostasis, cell death, proliferation, and differentiation. // Chem. Biol. Interact. – 1991. – V. 77. – № 1. – P. 1–23.
195. Aykin-Burns N., Ahmad I. M. M., Zhu Y., Oberley L. W. W., and Spitz D. R. R. / Increased levels of superoxide and H₂O₂ mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation. // Biochem. J. – 2009. – V. 418. – № 1. – P. 29–37.
196. Gatenby R. A. and Gillies R. J. / Why do cancers have high aerobic glycolysis?. // Nat. Rev. Cancer. – 2004. – V. 4. – № 11. – P. 891–899.
197. López-Lázaro M. / Dual role of hydrogen peroxide in cancer: Possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. // Cancer Lett. – 2007. – V. 252. – № 1. – P. 1–8.
198. Cossarizza A., Ferraresi R., Troiano L., Roat E., Gibellini L., Bertoncelli L., Nasi M., and Pinti M. / Simultaneous analysis of reactive oxygen species and reduced glutathione content in living cells by polychromatic flow cytometry. // Nat. Protoc. – 2009. – V. 4. – № 12. – P. 1790–1797.
199. Khan a U., Mei Y. H., and Wilson T. / A proposed function for spermine and spermidine: protection of replicating DNA against damage by singlet oxygen. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1992. – V. 89. – № 23. – P. 11426–7.
200. Rosen G. M. and Freeman B. A. / Detection of superoxide generated by endothelial cells. // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1984. – V. 81. – № 23. – P. 7269–7273.
201. Gray B. and Carmichael A. J. / Kinetics of superoxide scavenging by dismutase enzymes and manganese mimics determined by electron spin resonance. // Biochem J. – 1992. – V. 281. – № 3. – P. 795–802.

202. Poyer J., Floyd R., Mccay P., Janzen E., and Davis E. / Spin-trapping of the trichloromethyl radical produced during enzymic NADPH oxidation in the presence of carbon tetrachloride or bromotrichloromethane. // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* – 1978. – V. 539. – № 3. – P. 402–409.
203. Harbour J. R., Chow V., and Bolton J. R. / An Electron Spin Resonance Study of the Spin Adducts of OH and HO₂ Radicals with Nitrones in the Ultraviolet Photolysis of Aqueous Hydrogen Peroxide Solutions. // *Can. J. Chem.* – 1974. – V. 52. – № 20. – P. 3549–3553.
204. Okado-Matsumoto A. and Fridovich I. / Assay of Superoxide Dismutase: Cautions Relevant to the Use of Cytochrome c, a Sulfonated Tetrazolium, and Cyanide. // *Anal. Biochem.* – 2001. – V. 298. – № 2. – P. 337–342.
205. Tan A. S. and Berridge M. V. / Superoxide produced by activated neutrophils efficiently reduces the tetrazolium salt, WST-1 to produce a soluble formazan: a simple colorimetric assay for measuring respiratory burst activation and for screening anti-inflammatory agents. // *J. Immunol. Methods.* – 2000. – V. 238. – № 1–2. – P. 59–68.
206. Babior B. M., Kipnes R. S., and Curnutte J. T. / Biological Defense Mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. // *J. Clin. Invest.* – 1973. – V. 52. – № 3. – P. 741–744.
207. Winterbourn C. C. / The challenges of using fluorescent probes to detect and quantify specific reactive oxygen species in living cells. // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* – 2014. – V. 1840. – № 2. – P. 730–738.
208. Setsukinai K., Urano Y., Kakinuma K., Majima H. J., and Nagano T. / Development of Novel Fluorescence Probes That Can Reliably Detect Reactive Oxygen Species and Distinguish Specific Species. // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – № 5. – P. 3170–3175.
209. Price M., Reiners J. J., Santiago A. M., and Kessel D. / Monitoring singlet oxygen and hydroxyl radical formation with fluorescent probes during photodynamic therapy. // *Photochem. Photobiol.* – 2009. – V. 85. – № 5. – P. 1177–1181.
210. Olmos Y., Valle I., Borniquel S., Tierrez A., Soria E., Lamas S., and Monsalve M. / Mutual dependence of Foxo3a and PGC-1 α in the induction of Oxidative stress genes. // *J. Biol. Chem.* – 2009. – V. 284. – № 21. – P. 14476–14484.
211. IJsselmuiden A. J., Musters R. J., de Ruiter G., van Heerebeek L., Alderse-Baas F., van Schilfgaarde M., Leyte A., Tangelder G.-J., Laarman G. J., and Paulus W. J. / Circulating white blood cells and platelets amplify oxidative stress in heart failure. // *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* – 2008. – V. 5. – № 12. – P. 811–820.
212. Mohanty J. ., Jaffe J. S., Schulman E. S., and Raible D. G. / A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. // *J. Immunol. Methods.* – 1997. – V. 202. – № 2. – P. 133–141.
213. Towne V., Will M., Oswald B., and Zhao Q. / Complexities in horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of dihydroxyphenoxazine derivatives: appropriate ranges for pH values and hydrogen peroxide concentrations in quantitative analysis. // *Anal. Biochem.* – 2004. – V. 334. – № 2. – P. 290–296.
214. Bleier L., Wittig I., Heide H., Steger M., Brandt U., and Dröse S. / Generator-specific targets of mitochondrial reactive oxygen species. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2015. – V. 78 – P. 1–10.
215. Guilbault G. G., Brignac P. J., and Zimmer M. / Homovanillic acid as a fluorometric substrate for oxidative enzymes. Analytical applications of the peroxidase, glucose oxidase, and xanthine oxidase systems. // *Anal. Chem.* – 1968. – V. 40. – № 1. – P. 190–196.
216. Barja G. / The Quantitative Measurement of H₂O₂ Generation in Isolated Mitochondria. // *J. Bioenerg. Biomembr.* – 2002. – V. 34. – № 3. – P. 227–233.
217. Zhao H., Joseph J., Fales H. M., Sokoloski E. A., Levine R. L., Vasquez-Vivar J., and Kalyanaraman B. / Detection and characterization of the product of hydroethidine and intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2005. – V. 102. – № 16. – P. 5727–5732.
218. Zielonka J., Zielonka M., Sikora A., Adamus J., Joseph J., Hardy M., Ouari O., Dranka B. P., and

- Kalyanaraman B. / Global profiling of reactive oxygen and nitrogen species in biological systems: High-throughput real-time analyses. // *J. Biol. Chem.* – 2012. – V. 287. – № 5. – P. 2984–2995.
219. Robinson K. M., Janes M. S., and Beckman J. S. / The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging. // *Nat. Protoc.* – 2008. – V. 3. – № 6. – P. 941–947.
 220. Maeda H., Yamamoto K., Nomura Y., Kohno I., Hafsi L., Ueda N., Yoshida S., Fukuda M., Fukuyasu Y., Yamauchi Y., and Itoh N. / A design of fluorescent probes for superoxide based on a nonredox mechanism. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2005. – V. 127. – № 1. – P. 68–69.
 221. Sharma M. K. and Buettner G. R. / Interaction of vitamin C and vitamin E during free radical stress in plasma: An ESR study. // *Free Radic. Biol. Med.* – 1993. – V. 14. – № 6. – P. 649–653.
 222. Zhu H., Bannenberg G. L., Moldéus P., and Shertzer H. G. / Oxidation pathways for the intracellular probe 2',7'-dichlorofluorescein. // *Arch. Toxicol.* – 1994. – V. 68. – № 9. – P. 582–587.
 223. Oyama Y., Hayashi A., Ueha T., and Maekawa K. / Characterization of 2',7'-dichlorofluorescein fluorescence in dissociated mammalian brain neurons: estimation on intracellular content of hydrogen peroxide. // *Brain Res.* – 1994. – V. 635. – № 1–2. – P. 113–117.
 224. LeBel C. P., Ischiropoulos H., and Bondy S. C. / Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. // *Chem. Res. Toxicol.* – 1992. – V. 5. – № 2. – P. 227–231.
 225. Afzal M., Matsugo S., Sasai M., Xu B., Aoyama K., and Takeuchi T. / Method to overcome photoreaction, a serious drawback to the use of dichlorofluorescein in evaluation of reactive oxygen species. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – V. 304. – № 4. – P. 619–624.
 226. Bilski P., Belanger A. G., and Chignell C. F. / Photosensitized oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein: Singlet oxygen does not contribute to the formation of fluorescent oxidation product 2',7'-dichlorofluorescein. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2002. – V. 33. – № 7. – P. 938–946.
 227. Böhmer R. H., Trinkle L. S., and Stanek J. L. / Dose effects of LPS on neutrophils- in a whole blood flow cytometric assay of phagocytosis and oxidative burst. // *Cytometry.* – 1992. – V. 13. – № 5. – P. 525–531.
 228. Yuan L. / An Evaluation of the Effects of Cytokines on Intracellular Oxidative Production in Normal Neutrophils by Flow Cytometry. // *Exp. Cell Res.* – 1993. – V. 209. – № 2. – P. 375–381.
 229. Glebska J. and Koppenol W. H. / Peroxynitrite-mediated oxidation of dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2003. – V. 35. – № 6. – P. 676–682.
 230. Burkitt M. J. and Wardman P. / Cytochrome c Is a Potent Catalyst of Dichlorofluorescein Oxidation: Implications for the Role of Reactive Oxygen Species in Apoptosis. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2001. – V. 282. – № 1. – P. 329–333.
 231. Karlsson M., Kurz T., Brunk U. T., Nilsson S. E., and Frennesson C. I. / What does the commonly used DCF test for oxidative stress really show?. // *Biochem. J.* – 2010. – V. 428. – № 2. – P. 183–190.
 232. Wrona M. and Wardman P. / Properties of the radical intermediate obtained on oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein, a probe for oxidative stress. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2006. – V. 41. – № 4. – P. 657–667.
 233. Myhre O., Andersen J. M., Aarnes H., and Fonnum F. / Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. // *Biochem. Pharmacol.* – 2003. – V. 65. – № 10. – P. 1575–1582.
 234. Tsuchiya M., Suematsu M., and Suzuki H. / In Vivo visualization of oxygen radical-dependent photoemission. // *Methods Enzymol.*, V. 233. – № 1985. . P. 128–140, 1994.
 235. Suematsu M., Kato S., Ishii H., Asako H., Yanagisawa T., Suzuki H., Oshio C., and Tsuchiya M. / Intralobular heterogeneity of carbon tetrachloride-induced oxidative stress in perfused rat liver visualized by digital imaging fluorescence microscopy. // *Lab. Invest.* – 1991. – V. 64. – № 2. – P. 167–173.
 236. Suematsu M., Schmid-Schonbein G. W., Chavez-Chavez R. H., Yee T. T., Tamatani T., Miyasaka M., Delano F. A., and Zweifach B. W. / In vivo visualization of oxidative changes in microvessels during neutrophil activation. // *Am. J. Physiol.* – 1993. – V. 264. – № 3 Pt 2. – P. H881–91.

237. Rota C., Fann Y. C., and Mason R. P. / Phenoxyl free radical formation during the oxidation of the fluorescent dye 2',7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase. Possible consequences for oxidative stress measurements. // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274. – № 40. – P. 28161–28168.
238. Ubezio P. and Civoli F. / Flow Cytometric Detection of Hydrogen Peroxide Production Induced By Doxorubicin in Cancer Cells. // *Free Radic. Biol. Med.* – 1994. – V. 16. – № 4. – P. 509–516.
239. Schwarzer C., Illek B., Suh J. H., Remington S. J., Fischer H., and Machen T. E. / Organelle redox of CF and CFTR-corrected airway epithelia. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2007. – V. 43. – № 2. – P. 300–316.
240. Thornber K., Colomba a, Ceccato L., Delsol G., Payraastre B., and Gaits-Iacovoni F. / Reactive oxygen species and lipoxygenases regulate the oncogenicity of NPM-ALK-positive anaplastic large cell lymphomas. // *Oncogene.* – 2009. – V. 28. – № 29. – P. 2690–2696.
241. Kirkland R. a, Saavedra G. M., and Franklin J. L. / Rapid activation of antioxidant defenses by nerve growth factor suppresses reactive oxygen species during neuronal apoptosis: evidence for a role in cytochrome c redistribution. // *J. Neurosci.* – 2007. – V. 27. – № 42. – P. 11315–26.
242. Dooley C. T., Dore T. M., Hanson G. T., Jackson W. C., Remington S. J., and Tsien R. Y. / Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – № 21. – P. 22284–22293.
243. Lukyanov K. A. and Belousov V. V. / Genetically encoded fluorescent redox sensors. // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* – 2014. – V. 1840. – № 2. – P. 745–756.
244. Gutscher M., Sobotta M. C., Wabnitz G. H., Ballikaya S., Meyer A. J., Samstag Y., and Dick T. P. / Proximity-based Protein Thiol Oxidation by H₂O₂-scavenging Peroxidases. // *J. Biol. Chem.* – 2009. – V. 284. – № 46. – P. 31532–31540.
245. Belousov V. V., Fradkov A. F., Lukyanov K. A., Staroverov D. B., Shakhbazov K. S., Terskikh A. V., and Lukyanov S. / Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. // *Nat. Methods.* – 2006. – V. 3. – № 4. – P. 281–286.
246. Ermakova Y. G., Bilan D. S., Matlashov M. E., Mishina N. M., Markvicheva K. N., Subach O. M., Subach F. V., Bogeski I., Hoth M., Enikolopov G., and Belousov V. V. / Red fluorescent genetically encoded indicator for intracellular hydrogen peroxide. // *Nat. Commun.* – 2014. – V. 5 – P. 5222.
247. Dickinson B. C., Huynh C., and Chang C. J. / A palette of fluorescent probes with varying emission colors for imaging hydrogen peroxide signaling in living cells. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2010. – V. 132. – № 16. – P. 5906–5915.
248. Halliwell B. and Gutteridge J. M. C. / *Free Radicals in Biology and Medicine.* // 5th ed. Oxford: Oxford University Press. – 2015. – 906 p.
249. Ciscato L. F. M. L., Augusto F. A., Weiss D., Fernando H., Brandl H., and Zimmermann T. / The chemiluminescent peroxyoxalate system: state of the art almost 50 years from its discovery. // 2012. – V. 2012. – № iii. – P. 391–430.
250. Seliger H. H. / Single photon counting and spectroscopy of low intensity chemiluminescent reactions. // *Liquid scintillation counting recent. Recent applications and development. Volume II. Sample preparation and applications.*, V. II. Academic Press, Inc., P. 281–319, 1980.
251. Lee D., Khaja S., Velasquez-Castano J. C., Dasari M., Sun C., Petros J., Taylor W. R., and Murthy N. / In vivo imaging of hydrogen peroxide with chemiluminescent nanoparticles. // *Nat. Mater.* – 2007. – V. 6. – № 10. – P. 765–769.
252. Hananya N., Eldar Boock A., Bauer C. R., Satchi-Fainaro R., and Shabat D. / Remarkable Enhancement of Chemiluminescent Signal by Dioxetane-Fluorophore Conjugates: Turn-ON Chemiluminescence Probes with Color Modulation for Sensing and Imaging. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2016. – V. 138. – № 40. – P. 13438–13446.
253. Green O., Eilon T., Hananya N., Gutkin S., Bauer C. R., and Shabat D. / Opening a Gateway for Chemiluminescence Cell Imaging: Distinctive Methodology for Design of Bright Chemiluminescent Dioxetane Probes. // *ACS Cent. Sci.* – 2017. – V. 3. – № 4. – P. 349–358.
254. Laptev R., Nisnevitch M., Siboni G., Malik Z., and Firer M. a / Intracellular chemiluminescence activates targeted photodynamic destruction of leukaemic cells. // *Br. J. Cancer.* – 2006. – V. 95.

- № 2. – P. 189–196.
255. Lee J. and Seliger H. H. / Spectral characteristics of the excited states of the product of the chemiluminescence of luminol. // *Photochem. Photobiol.* – 1970. – V. 11. – № 4. – P. 247–258.
 256. White E. and Bursey M. / Chemiluminescence of luminol: The chemical reaction. // *J. Am. Chem. Soc.* – 1964. – V. 86. – № 6. – P. 940–941.
 257. Lee J. and Seliger H. H. / Quantum yields of the luminol chemiluminescence reaction in aqueous and aprotic solvents. // *Photochem. Photobiol.* – 1972. – V. 15. – № 643. – P. 227–237.
 258. Lee J. and Seliger H. H. / Absolute spectral sensitivity of phototubes and the application to the measurement of the absolute quantum yields of chemiluminescence and bioluminescence. // *Photochem. Photobiol.* – 1965. – V. 4. – № 6. – P. 1015–1048.
 259. Faulkner K. and Fridovich I. / Luminol and lucigenin as detectors for $O_2^{\bullet-}$. // *Free Radic. Biol. Med.* – 1993. – V. 15. – № 4. – P. 447–451.
 260. Schroeder H. R. and Yeager F. M. / Chemiluminescence yields and detection limits of some isoluminol derivatives in various oxidation systems. // *Anal. Chem.* – 1978. – V. 50. – № 8. – P. 1114–1120.
 261. Brundrett R. B. and White E. H. / Synthesis and chemiluminescence of derivatives of luminol and isoluminol. // *J. Am. Chem. Soc.* – 1974. – V. 96. – № 24. – P. 7497–7502.
 262. Schuster G. B. and Schmidt S. P. / Chemiluminescence of Organic Compounds. // *Adv. Phys. Org. Chem.* – 1982. – V. 18. – P. 187–238.
 263. Li Y., Zhu H., Kuppasamy P., Roubaud V., Zweier J. L., and Trush M. A. / Validation of Lucigenin (Bis- N -methylacridinium) as a Chemilumigenic Probe for Detecting Superoxide Anion Radical Production by Enzymatic and Cellular Systems. // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273. – № 4. – P. 2015–2023.
 264. Sohn H.-Y., Keller M., Gloe T., Crause P., and Pohl U. / Pitfalls of using lucigenin in endothelial cells: Implications for NAD(P)H dependent superoxide formation. // *Free Radic. Res.* – 2000. – V. 32. – № 3. – P. 265–272.
 265. Silva S. M., Casallanovo F., Oyamaguchi K. H., Ciscato L. F. L. M., Stevani C. V., and Baader W. J. / Kinetic studies on the peroxyoxalate chemiluminescence reaction: determination of the cyclization rate constant. // *Luminescence.* – 2002. – V. 17. – № 5. – P. 313–320.
 266. Schuster G. B. / Chemiluminescence of organic peroxides. Conversion of ground-state reactants to excited-state products by the chemically initiated electron-exchange luminescence mechanism. // *Acc. Chem. Res.* – 1979. – V. 12. – № 10. – P. 366–373.
 267. Stevani C. V., Silva S. M., and Baader W. J. / Studies on the Mechanism of the Excitation Step in Peroxyoxalate Chemiluminescence. // *European J. Org. Chem.* – 2000. – V. 2000. – № 24. – P. 4037–4046.
 268. Koike R., Kato Y., Motoyoshiya J., Nishii Y., and Aoyama H. / Unprecedented chemiluminescence behaviour during peroxyoxalate chemiluminescence of oxalates with fluorescent or electron-donating aryloxy groups. // *Luminescence.* – 2006. – V. 21. – № 3. – P. 164–173.
 269. Ciscato L. F. M. L., Bartoloni F. H., Bastos E. L., and Baader W. J. / Direct Kinetic Observation of the Chemiexcitation Step in Peroxyoxalate Chemiluminescence. // *J. Org. Chem.* – 2009. – V. 74. – № 23. – P. 8974–8979.
 270. Bos R., Barnett N. W., Dyson G. A., Lim K. F., Russell R. a., and Watson S. P. / Studies on the mechanism of the peroxyoxalate chemiluminescence reaction. // *Anal. Chim. Acta.* – 2004. – V. 502. – № 2. – P. 141–147.
 271. Chandross E. A. / A new chemiluminescent system. // *Tetrahedron Lett.* – 1963. – V. 4. – № 12. – P. 761–765.
 272. Rauhut M. M., Roberts B. G., and Semsel A. M. / A Study of Chemiluminescence from Reactions of Oxalyl Chloride, Hydrogen Peroxide, and Fluorescent Compounds. // *J. Am. Chem. Soc.* – 1966. – V. 88. – № 15. – P. 3604–3617.
 273. Rauhut M. M., Bollyky L. J., Roberts B. G., Loy M., Whitman R. H., Iannotta A. V., Semsel A. M., and Clarke R. A. / Chemiluminescence from Reactions of Electronegatively Substituted Aryl

- Oxalates with Hydrogen Peroxide and Fluorescent Compounds. // *J. Am. Chem. Soc.* – 1967. – V. 89. – № 25. – P. 6515–6522.
274. Maulding D. R., Clarke R. A., Roberts B. G., and Rauhut M. M. / Chemiluminescence from reactions of electrophilic oxamides with hydrogen peroxide and fluorescent compounds. // *J. Org. Chem.* – 1968. – V. 33. – № 1. – P. 250–254.
 275. Tseng S., Mohan A. G., Haines L. G., and Vizcarra L. S. / Efficient Peroxyoxalate Chemiluminescence from Reactions of N-(Trifluoromethylsulfonyl)oxamides with Hydrogen Peroxide and Fluorescers'. // *J. Org. Chem.* – 1979. – V. 44. – № 23. – P. 4113–4116.
 276. Motoyoshiya J., Sakai N., Imai M., Yamaguchi Y., Koike R., Takaguchi Y., and Aoyama H. / Peroxyoxalate chemiluminescence of N,N'-bistosyl-1H,4H-quinoxaline-2,3-dione and related compounds. Dependence on electronic nature of fluorophores. // *J. Org. Chem.* – 2002. – V. 67. – № 21. – P. 7314–7318.
 277. Neuvonen H. / Neutral hydrolysis and imidazole-catalysed decomposition of bis(4- nitrophenyl) oxalate. 1,l'-Oxalyl-diimidazole as an intermediate. // 1995. – P. 945–949.
 278. Darken L. S. / The Ionization Constants of Oxalic Acid at 25° from Conductance Measurements. // *J. Am. Chem. Soc.* – 1941. – V. 63. – № 4. – P. 1007–1011.
 279. Alvarez F. J., Parekh N. J., Matuszewski B., Givens R. S., Higuchi T., and Schowen R. L. / Multiple intermediates generate fluorophore-derived light in the oxalate/peroxide chemiluminescence system. // *J. Am. Chem. Soc.* – 1986. – V. 108. – № 20. – P. 6435–6437.
 280. Imai K., Nawa H., Tanaka M., and Ogata H. / Novel aryl oxalate esters for peroxyoxalate chemiluminescence reactions. // *Analyst.* – 1986. – V. 111. – № 2. – P. 209.
 281. Grayeski M. L., Woolf E. J., and Helly P. J. / Quantitation of enzymatically generated hydrogen peroxide based on aqueous peroxyoxalate chemiluminescence. // *Anal. Chim. Acta.* – 1986. – V. 183. – № C. – P. 207–215.
 282. Orlović M., Schowen R. L., Givens R. S., Alvarez F., Matuszewski B., and Parekh N. / A Simplified Model for the Dynamics of Chemiluminescence in the Oxalate-Hydrogen Peroxide System: Toward a Reaction Mechanism. // *J. Org. Chem.* – 1989. – V. 54. – № 15. – P. 3606–3610.
 283. Lee J. H., Rock J. C., Park S. B., Schlautman M. A., and Carraway E. R. / Study of the characteristics of three high-energy intermediates generated in peroxyoxalate chemiluminescence (PO-CL) reactions. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* – 2002. – № 4. – P. 802–809.
 284. Garcia-Campana A. M. / Chemiluminescence in Analytical Chemistry. // New York: Marcel Dekker, Inc. – 2001.
 285. Stevani C. V, Lima D. F., Toscano V. G., and Baader W. J. / Kinetic studies on the peroxyoxalate chemiluminescent reaction: imidazole as a nucleophilic catalyst. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* – 1996. – № 5. – P. 989.
 286. Stevani C. V and Baader W. J. / Kinetic studies on the chemiluminescent decomposition of an isolated intermediate in the peroxyoxalate reaction. // *J. Phys. Org. Chem.* – 1997. – V. 10. – № 8. – P. 593–599.
 287. Boaro A. and Bartoloni F. H. / Peroxyoxalate High-Energy Intermediate is Efficiently Decomposed by the Catalyst Imidazole. // *Photochem. Photobiol.* – 2016. – V. 92. – № 4. – P. 546–551.
 288. Kang J., Zhang Y., Han L., Tang J., Wang S., and Zhang Y. / Utilizing the chemiluminescence of 2-substituted-4,5-di(2-furyl)-1H-imidazole-H₂O₂-Cu²⁺ system for the determination of Cu²⁺. // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* – 2011. – V. 217. – № 2–3. – P. 376–382.
 289. Ana M. Garcia-Campana W. R. G. B. / Chemiluminescence In Analytical Chemistry. // 2001. – 636 p.
 290. Okamoto H., Owari M., Kimura M., and Satake K. / Preparation of a crown-ether-modified lophine peroxide as a guest-sensitive novel chemiluminophore and modulation of its chemiluminescence by metal cations. // *Tetrahedron Lett.* – 2001. – V. 42. – № 42. – P. 7453–7455.
 291. Nakashima K., Fukuzaki Y., Nomura R., Shimoda R., Nakamura Y., Kuroda N., Akiyama S., and

- Irgum K. / Fluorescence and chemiluminescence properties of newly developed lophine analogues. // *Dye. Pigment.* – 1998. – V. 38. – № 1–3. – P. 127–136.
292. Ward W. W. and Cormier M. J. / In vitro energy transfer in Renilla bioluminescence. // *J. Phys. Chem.* – 1976. – V. 80. – № 20. – P. 2289–2291.
 293. Kaskova Z. M., Tsarkova A. S., and Yampolsky I. V. / 1001 lights: luciferins, luciferases, their mechanisms of action and applications in chemical analysis, biology and medicine. // *Chem. Soc. Rev.* – 2016. – V. 45. – № 21. – P. 6048–6077.
 294. Posner G. H., Lever J. R., Miura K., Lisek C., Seliger H. H., and Thompson A. / A chemiluminescent probe specific for singlet oxygen. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1984. – V. 123. – № 2. – P. 869–873.
 295. Zhang G., Li X., Ma H., Zhang D., Li J., and Zhu D. / A selective and sensitive chemiluminescence reaction of 4,4'(5')-bis[2-(9-anthryloxy)ethylthio]tetrathiafulvalene with singlet oxygen. // *Chem. Commun.* – 2004. – V. 422. – № 18. – P. 2072–2073.
 296. Li X., Zhang G., Ma H., Zhang D., Li J., and Zhu D. / 4,5-Dimethylthio-4'-[2-(9-anthryloxy)ethylthio]tetrathiafulvalene, a Highly Selective and Sensitive Chemiluminescence Probe for Singlet Oxygen. // *J. Am. Chem. Soc.* – 2004. – V. 126. – № 37. – P. 11543–11548.
 297. Lu C., Song G., and Lin J.-M. / Reactive oxygen species and their chemiluminescence-detection methods. // *TrAC Trends Anal. Chem.* – 2006. – V. 25. – № 10. – P. 985–995.
 298. Schaap A. P., Chen T., Handley R. S., DeSilva R., and Giri B. P. / Chemical and enzymatic triggering of 1,2-dioxetanes. 2: fluoride-induced chemiluminescence from tert-butyl dimethylsilyloxy-substituted dioxetanes. // *Tetrahedron Lett.* – 1987. – V. 28. – № 11. – P. 1155–1158.
 299. Schaap A. P., Handley R. S., and Giri B. P. / Chemical and enzymatic triggering of 1,2-dioxetanes. 1: Aryl esterase-catalyzed chemiluminescence from a naphthyl acetate-substituted dioxetane. // *Tetrahedron Lett.* – 1987. – V. 28. – № 9. – P. 935–938.
 300. Schaap A. P., Sandison M. D., and Handley R. S. / Chemical and enzymatic triggering of 1,2-dioxetanes. 3: alkaline phosphatase-catalyzed chemiluminescence from an aryl phosphate-substituted dioxetane. // *Tetrahedron Lett.* – 1987. – V. 28. – № 11. – P. 1159–1162.
 301. Zheng X., Sun S., Zhang D., Ma H., and Zhu D. / A new chemiluminescence probe for singlet oxygen based on tetrathiafulvalene-anthracene dyad capable of performing detection in water/alcohol solution. // *Anal. Chim. Acta.* – 2006. – V. 575. – № 1. – P. 62–67.
 302. Lippert A. R. / Unlocking the Potential of Chemiluminescence Imaging. // *ACS Cent. Sci.* – 2017. – V. 3. – № 4. – P. 269–271.
 303. Phillip M. J., McMahon J. D., O'Hara M. D., Hetzel F. W., Amsterdamsky C., and Schaap A. P. / Effects of hematoporphyrin (HPD) and a chemiluminescence system on the growth of transplanted tumors in C3H/HeJ mice. // *Prog. Clin. Biol. Res.* – 1984. – V. 170. – P. 563–569.
 304. Phillip M. J. and Maximuke P. P. / Chemiluminescence and Hematoporphyrin Derivative: a Novel Therapy for Mammary Adenocarcinomas in Mice. // *Oncology.* – 1989. – V. 46. – № 4. – P. 266–272.
 305. Carpenter S., Fehr M. J., Kraus G. A., Petrich J. W., John D., Carpenter S., Fehr M. J., Kraus G. A., and Petrich J. W. / Chemiluminescent activation of the antiviral activity of hypericin: a molecular flashlight. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1994. – V. 91. – № 25. – P. 12273–12277.
 306. Theodossiou T., Hothersall J. S., Woods E. a, Okkenhaug K., Jacobson J., and MacRobert A. J. / Firefly luciferin-activated rose bengal: in vitro photodynamic therapy by intracellular chemiluminescence in transgenic NIH 3T3 cells. // *Cancer Res.* – 2003. – V. 63. – № 8. – P. 1818–21.
 307. Kim Y. R., Kim S., Choi J. W., Choi S. Y., Lee S. H., Kim H., Hahn S. K., Koh G. Y., and Yun S. H. / Bioluminescence-activated deep-tissue photodynamic therapy of cancer. // *Theranostics.* – 2015. – V. 5. – № 8. – P. 805–817.
 308. Derfus A. M., Chan W. C. W., and Bhatia S. N. / Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots. // *Nano Lett.* – 2004. – V. 4. – № 1. – P. 11–18.
 309. Bancirova M. and Lasovský J. / The photodynamic effect: The comparison of chemiexcitation by

- luminol and phthalhydrazide. // *Luminescence*. – 2011. – V. 26. – № 6. – P. 410–415.
310. Chen T. C., Huang L., Liu C. C., Chao P. J., and Lin F. H. / Luminol as the light source for in situ photodynamic therapy. // *Process Biochem.* – 2012. – V. 47. – № 12. – P. 1903–1908.
 311. Lim C. K., Lee Y. D., Na J., Oh J. M., Her S., Kim K., Choi K., Kim S., and Kwon I. C. / Chemiluminescence-generating nanoreactor formulation for near-infrared imaging of hydrogen peroxide and glucose level in vivo. // *Adv. Funct. Mater.* – 2010. – V. 20. – № 16. – P. 2644–2648.
 312. Steijger O. M. M., van Mastbergen H. M. M., and Holthuis J. J. M. J. M. / Chemiluminescence of bis(2,4,6-trichlorophenyl) oxalate in aqueous micellar systems. // *Anal. Chim. Acta.* – 1989. – V. 217. – № C. – P. 229–237.
 313. Lee D., Erigala V. R., Dasari M., Yu J., Dickson R. M., and Murthy N. / Detection of hydrogen peroxide with chemiluminescent micelles. // *Int. J. Nanomedicine.* – 2008. – V. 3. – № 4. – P. 471–6.
 314. Park H., Kim S. S., Kim S. S., Song Y., Seung K., Hong D., Khang G., and Lee D. / Antioxidant and anti-inflammatory activities of hydroxybenzyl alcohol releasing biodegradable polyoxalate nanoparticles. // *Biomacromolecules.* – 2010. – V. 11. – № 8. – P. 2103–2108.
 315. Kim S., Park H., Song Y., Hong D., Kim O., Jo E., Khang G., and Lee D. / Reduction of oxidative stress by p-hydroxybenzyl alcohol-containing biodegradable polyoxalate nanoparticulate antioxidant. // *Biomaterials.* – 2011. – V. 32. – № 11. – P. 3021–3029.
 316. Kim S. S., Seong K., Kim O., Kim S. S., Seo H., Lee M., Khang G., and Lee D. / Polyoxalate nanoparticles as a biodegradable and biocompatible drug delivery vehicle. // *Biomacromolecules.* – 2010. – V. 11. – № 3. – P. 555–560.
 317. Lee E., Kim S., Seong K., Park H., Seo H., Khang G., and Lee D. / A Biodegradable and Biocompatible Drug-Delivery System Based on Polyoxalate Microparticles. // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* – 2011. – V. 22. – № 13. – P. 1683–1694.
 318. Babu S., Uppu S., Claville M. O., and Uppu R. M. / Prooxidant actions of bisphenol A (BPA) phenoxyl radicals: implications to BPA-related oxidative stress and toxicity. // *Toxicol. Mech. Methods.* – 2013. – V. 23. – № 4. – P. 273–280.
 319. Armarego W. L. F. and Chai C. L. L. / *Purification of Laboratory Chemicals: Fifth Edition.* // 5th ed. 2003. – 609 p.
 320. ГОСТ 14870-77. Межгосударственный Стандарт. Продукты химические. Методы определения воды. // . Москва: Стандартинформ, P. 1–14, 2005.
 321. Каламбет Ю. А. and Михайлова К. В. / Оценка величины шума и ее использование при обработке хроматографического сигнала. // *Лабораторный журнал.* – 2002. – V. 1. – № 1. – P. 32–35.
 322. Bugrin V. S., Kozlov M. Y., Baskin I. I., and Melik-Nubarov N. S. / Intermolecular interactions governing solubilization in micelles of poly(alkylene oxide) surfactants. // *Polym. Sci. Ser. A.* – 2007. – V. 49. – № 4. – P. 463–472.
 323. Kozlov M. Y., Melik-Nubarov N. S., Batrakova E. V., and Kabanov A. V. / Relationship between Pluronic Block Copolymer Structure, Critical Micellization Concentration and Partitioning Coefficients of Low Molecular Mass Solutes. // *Macromolecules.* – 2000. – V. 33. – № 9. – P. 3305–3313.
 324. Abraham M. H., Ibrahim A., Zissimos A. M., Zhao Y. H., Comer J., and Reynolds D. P. / Application of hydrogen bonding calculations in property based drug design. // *Drug Discov. Today.* – 2002. – V. 7. – № 20. – P. 1056–1063.
 325. Mosmann T. / Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. // *J. Immunol. Methods.* – 1983. – V. 65. – № 1–2. – P. 55–63.
 326. Kaczara P., Sarna T., and Burke J. M. / Dynamics of H₂O₂ availability to ARPE-19 cultures in models of oxidative stress. // *Free Radic. Biol. Med.* – 2010. – V. 48 – P. 1064–1070.
 327. Lowry O. H., Rosenbrought N. J., Farr A. L., and Randall R. J. / Protein measurement with the Folin phenol reagent. // *J. Biol. Chem.* – 1951. – V. 193 – P. 265–275.

328. Rota C., Chignell C. F., and Mason R. P. / Evidence for free radical formation during the oxidation of 2'-7'-dichlorofluorescein to the fluorescent dye 2'-7'-dichlorofluorescein by horseradish peroxidase: Possible implications for oxidative stress measurements. // *Free Radic. Biol. Med.* – 1999. – V. 27. – № 7–8. – P. 873–881.
329. Cohn C. A., Simon S. R., and Schoonen M. A. A. / Comparison of fluorescence-based techniques for the quantification of particle-induced hydroxyl radicals. // *Part. Fibre Toxicol.* – 2008. – V. 5. – № 1. – P. 2.
330. Drahonovsky J. and Vacek Z. / Dissoziationskonstanten und austauscherchromatographie chlorierter phenole. // *Collect. Czech. Chem. Commun.* – 1971. – V. 36. – № 10. – P. 3431–3440.
331. Нам Е. В., Жирнов А. Е., Литманович Е. А., Мелик-Нубаров Н. С., and Гроздова И. Д. / Влияние модификации флуоресцентными группами на физико-химические свойства полиалкиленоксидов. // *Высокомолек. Соед. Серия А.* – 2010. – V. 52 – P. 1578–1584.
332. Yang L., Alexandridis P., Steytler D. C., Kositz M. J., and Holzwarth J. F. / Small-Angle Neutron Scattering Investigation of the Temperature-Dependent Aggregation Behavior of the Block Copolymer Pluronic L64 in Aqueous Solution †. // *Langmuir.* – 2000. – V. 16. – № 23. – P. 8555–8561.
333. Zhou Z. and Chu B. / Anomalous micellization behavior and composition heterogeneity of a triblock ABA copolymer of (A) ethylene oxide and (B) propylene oxide in aqueous solution. // *Macromolecules.* – 1988. – V. 21. – № 8. – P. 2548–2554.
334. Павлов Д. Н., Дородных Т. Ю., Заборова О. В., and Мелик-Нубаров Н. С. / Взаимодействие сополимеров диметилсилоксана и окиси этилена с модельными мембранами и раковыми клетками. // *Высокомол. Соед. Серия А.* – 2009. – V. 51. – № 3. – P. 428–435.
335. Pavlov D. N., Dorodnykh T. Y., Zaborova O. V., and Melik-Nubarov N. S. / Interaction of copolymers of dimethylsiloxane and ethylene oxide with model membranes and cancerous cells. // *Polym. Sci. Ser. A.* – 2009. – V. 51. – № 3. – P. 295–301.
336. Saito S. / Cloud points of poly(propylene oxide) and poly(vinyl methylether) in the presence of polymeric acids. // *Colloids and Surfaces.* – 1986. – V. 19 – P. 351–357.
337. Nam E. V., Zhirnov A. E., Litmanovich E. A., Melik-Nubarov N. S., and Grozdova I. D. / The effect of modification with fluorescent groups on the physicochemical characteristics of poly(alkylene oxides). // *Polym. Sci. Ser. A.* – 2010. – V. 52. – № 9. – P. 907–913.
338. Field E. A., Price C. J., Sleet R. B., George J. D., Marr M. C., Myers C. B., Schwetz B. A., and Morrissey R. E. / Developmental toxicity evaluation of diethyl and dimethyl phthalate in rats. // *Teratology.* – 1993. – V. 48. – № 1. – P. 33–44.
339. Moghimi S. M. and Hunter A. C. / Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. // *Trends Biotechnol.* – 2000. – V. 18. – № 10. – P. 412–420.
340. Rauhut M. M. M. / Chemiluminescence from concerted peroxide decomposition reactions. // *Acc. Chem. Res.* – 1969. – V. 2. – № 3. – P. 80–87.
341. Chattopadhyay A. and London E. / Fluorimetric Determination of Critical Micelle Concentration Avoiding Interference from Detergent Charge. // *Anal. Biochem.* – 1984. – V. 139 – P. 408–412.
342. Hanaoka N., Givens R. S., Schowen R. L., and Kuwana T. / Stopped-flow determination of the parameters affecting the application of peroxyoxalate chemiluminescence to high-performance liquid chromatographic detection. // *Anal. Chem.* – 1988. – V. 60. – № 20. – P. 2193–2197.
343. Silva S. M., Wagner K., Weiss D., Beckert R., Stevani C. V, and Baader W. J. / Studies on the chemiexcitation step in peroxyoxalate chemiluminescence using steroid-substituted activators. // *Luminescence.* – 2002. – V. 17. – № 6. – P. 362–369.
344. Lee J. H., Rock J. C., Schlautman M. a., and Carraway E. R. / Characteristics of key intermediates generated in uncatalyzed bis(2,4-dinitrophenyl) oxalate (DNPO) chemiluminescence reactions. // *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2.* – 2002. – № 10. – P. 1653–1657.
345. Catherall C. L. R., Palmer T. F., and Cundall R. B. / Chemiluminescence from reactions of bis(pentachlorophenyl)oxalate, hydrogen peroxide and fluorescent compounds. Kinetics and mechanism. // *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2.* – 1984. – V. 80. – № 7. – P. 823.

346. Dougherty T. J., Gomer C. J., Henderson B. W., Jori G., Kessel D., Korbelik M., Moan J., and Peng Q. / Photodynamic therapy. // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1998. – V. 90. – № 12. – P. 889–905.
347. Engst P., Kubát P., and Jirsa M. / The influence of D₂O on the photophysical properties of meso-tetra (4-sulphonatophenyl) porphine, Photosan III and tetrasulphonated aluminium and zinc phthalocyanines. // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* – 1994. – V. 78. – № 3. – P. 215–219.
348. Claudy P., Letoffe J. M., Camberlain Y., and Pascault J. P. / Glass transition of polystyrene versus molecular weight. // *Polym. Bull.* – 1983. – V. 9–9. – № 4–5. – P. 208–215.
349. Xu L., Selin V., Zhuk A., Ankner J. F., and Sukhishvili S. A. / Molecular Weight Dependence of Polymer Chain Mobility within Multilayer Films. // *ACS Macro Lett.* – 2013. – V. 2. – № 10. – P. 865–868.
350. Osbild S., Brault L., Battaglia E., and Bagrel D. / Resistance to cisplatin and adriamycin is associated with the inhibition of glutathione efflux in MCF-7-derived cells. // *Anticancer Res.* – 2006. – V. 26. – № 5 A. – P. 3595–3600.
351. Chernyak B. V., Izyumov D. S., Lyamzaev K. G., Pashkovskaya A. A., Pletjushkina O. Y., Antonenko Y. N., Sakharov D. V., Wirtz K. W. A., and Skulachev V. P. / Production of reactive oxygen species in mitochondria of HeLa cells under oxidative stress. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2006. – V. 1757 – P. 525–534.
352. Dröge W. / Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. // *Physiol. Rev.* – 2002. – V. 82 – P. 47–95.
353. Halliwell B., Clement M. V., Ramalingam J., and Long L. H. / Hydrogen peroxide. Ubiquitous in cell culture and in vivo?. // *IUBMB Life.* – 2000. – V. 50. – № 4–5. – P. 251–257.
354. Mathai S., Smith T. A., and Ghiggino K. P. / Singlet oxygen quantum yields of potential porphyrin-based photosensitisers for photodynamic therapy. // *Photochem. Photobiol. Sci.* – 2007. – V. 6. – № 9. – P. 995–1002.
355. Ricchelli F., Gobbo S., Jori G., Salet C., and Moreno G. / Temperature-Induced Changes in Fluorescence Properties as a Probe of Porphyrin Microenvironment in Lipid Membranes: 2. The Partition of Hematoporphyrin and Protoporphyrin in Mitochondria. // *Eur. J. Biochem.* – 1995. – V. 233. – № 1. – P. 165–170.
356. Brouwer A. M. / Standards for photoluminescence quantum yield measurements in solution (IUPAC Technical Report). // *Pure Appl. Chem.* – 2011. – V. 83. – № 12. – P. 2213–2228.
357. Okamoto M., Kawai K., Reznikoff C. A., and Oyasu R. / Transformation in vitro of a nontumorigenic rat urothelial cell line by hydrogen peroxide. // *Cancer Res.* – 1996. – V. 56. – № 20. – P. 4649–4653.
358. Polytaichou C., Hatziapostolou M., and Papadimitriou E. / Hydrogen peroxide stimulates proliferation and migration of human prostate cancer cells through activation of activator protein-1 and up-regulation of the heparin affin regulatory peptide gene. // *J. Biol. Chem.* – 2005. – V. 280. – № 49. – P. 40428–40435.
359. Di Monte D., Bellomo G., Thor H., Nicotera P., and Orrenius S. / Menadione-induced cytotoxicity is associated with protein thiol oxidation and alteration in intracellular Ca²⁺ homeostasis. // *Arch. Biochem. Biophys.* – 1984. – V. 235. – № 2. – P. 343–50.
360. Mitsopoulos P. and Suntres Z. E. / Cytotoxicity and gene array analysis of alveolar epithelial A549 cells exposed to paraquat. // *Chem. Biol. Interact.* – 2010. – V. 188. – № 3. – P. 427–36.
361. Kim K. S., Lee D., Song C. G., and Kang P. M. / Reactive oxygen species-activated nanomaterials as theranostic agents. // *Nanomedicine.* – 2015. – V. 10. – № 17. – P. 2709–2723.
362. Maximova E. D., Zhiryakova M. V., Faizuloev E. B., Nikonova A. A., Ezhov A. A., Izumrudov V. A., Orlov V. N., Grozdova I. D., and Melik-Nubarov N. S. / Cationic nanogels as Trojan carriers for disruption of endosomes. // *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* – 2015. – V. 136 – P. 981–988.
363. Kitamura N., Imabayashi S., and Tazuke S. / Exciplex quenching by quaternary ammonium salts in chloroform. // *Chem. Lett.* – 1983. – V. 12. – № 4. – P. 455–458.