

На правах рукописи

Крисько Татьяна Константиновна

ТВЕРДОФАЗНЫЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ НА ОСНОВЕ
ФУЛЛЕРЕНОВ ДЛЯ ГЕНЕРАЦИИ СИНГЛЕТНОГО КИСЛОРОДА В
ВОДНЫХ СРЕДАХ

*Специальности: 01.04.05 – Оптика
и 02.00.04 – Физическая химия*

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Санкт-Петербург
2008

Работа выполнена в Федеральном Государственном унитарном предприятии «Научно-производственной корпорации «Государственном оптическом институте им. С.И. Вавилова»

Научные руководители: доктор физико-математических наук,
профессор Белоусова Инна Михайловна

кандидат химических наук
Муравьева Татьяна Дмитриевна

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,
профессор Холмогоров Владимир Евгеньевич

доктор технических наук, профессор
Василевский Александр Михайлович

Ведущая организация - Санкт-Петербургский Государственный
университет

Защита диссертации состоится «25» февраля 2009 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д407.001.01 во ФГУП «НПК «ГОИ им. С.И. Вавилова» по адресу: 199034, Санкт-Петербург, Биржевая линия, 12

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУП «НПК «ГОИ им. С.И. Вавилова»

Автореферат разослан «__» _____ 2009 г

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор физико-математических наук,
профессор

Данилов В. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы: Исследование различных фотосенсибилизаторов и условий протекания фотосенсибилизируемых химических реакций является актуальным научным направлением.

В настоящей работе рассматривается вопрос использования фотосенсибилизатора для возбуждения синглетного кислорода, который в настоящее время находит широкое применение, в первую очередь в биологии и медицине.

Актуальным применением реакции фотосенсибилизированного окисления органических соединений в биологии и медицине является метод фотодинамической инактивации болезнетворных организмов (вирусы, бактерии, простейшие и т.д.) в донорской крови и продуктах крови. Действительно, передача инфекций при переливании плазмы донорской крови и использовании лечебных препаратов, полученных из нее, является одним из путей заражения пациентов гепатитами, ВИЧ и другими особо опасными инфекциями. Тем более, что в последние годы в группу заболеваний, передающихся при гемотрансфузиях, попали еще более 30 “новых” инфекционных болезней человека и, видимо, эта группа будет постоянно увеличиваться.

Поэтому стратегической задачей службы крови всех стран мира является обеспечение минимального уровня риска передачи гемотрансмиссивных инфекций при введении реципиентам донорской плазмы и препаратов из нее. В связи с этим в службе крови по регламенту Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) был введен ряд новых инактивационных технологий, позволяющих снизить риск заражения инфекционными заболеваниями при трансфузии и терапии.

К наиболее перспективным инактивационным технологиям относится фотодинамическое воздействие, которое заключается в активации светом в присутствии кислорода вводимого в плазму фотосенсибилизатора, генерации активных форм кислорода (в том числе синглетного кислорода) и последующего разрушения ими инфекционных агентов.

В качестве фотосенсибилизаторов в настоящее время используются водорастворимые красители, в основном метиленовый синий. Следует отметить, что данная технология реализуется в установках импортного производства, в России технология инактивации практически не используется.

Однако, несмотря на высокую эффективность этого метода, он имеет существенные недостатки, которые заключаются в необходимости последующего удаления красителя из инактивированной плазмы, что реализуется с помощью специально разработанных селективных фильтров в небольших объемах плазмы. К тому же данный метод не может быть применен для инактивации пулированной плазмы, идущей на переработку на лечебные препараты, из-за невозможности полного удаления красителя из больших объемов вязкой биологической жидкости.

Создание нового класса высокоэффективных твердофазных фотосенсибилизаторов позволит осуществлять инактивацию плазмы в гетерогенных условиях, что обеспечит простоту полного извлечения реагента после процесса инактивации и тем самым гарантию отсутствия нежелательных примесей в целевой плазме. Такие фотосенсибилизаторы с успехом могут применяться как в процессах инактивации небольших объемов плазмы из дозы донорской крови, так в случае инактивации пулированной плазмы для получения из нее лечебных препаратов.

Изучение структурных особенностей твердофазных фотосенсибилизаторов и связанной с ними эффективности генерации активных форм кислорода, позволит создать оптимальные фотосенсибилизаторы, на основе которых могут быть разработаны отечественные высоко эффективные методы инактивации гемотрансмиссивных инфекций в плазме донорской крови и препаратах на ее основе.

Цель работы и задачи исследования: Настоящая работа посвящена созданию новых твердофазных фотосенсибилизаторов на основе фуллеренов, обладающих способностью генерировать синглетный кислород в водных средах, селективно воздействовать на вирусы, быть фотостабильными и легко извлекаемыми из биологических жидкостей после фотовоздействия.

Первая задача настоящего исследования - создание фотостабильной, легко извлекаемой, простой в технологии изготовления, малотоксичной твердофазной композиции на основе фуллерена для целей фотодинамической инактивации вирусов в плазме и препаратах плазмы крови.

Вторая задача настоящего исследования – изучение способности твердофазных фотосенсибилизаторов на основе C_{60} к генерации синглетного кислорода в водной среде.

Третья задача настоящего исследования – оценка потенциальных возможностей использования твердофазных фотосенсибилизаторов на основе фуллеренов для фотодинамической инактивации вирусов *in vitro*.

Методы исследования: рентгеноструктурный анализ; спектрофотометрия; элементный анализ; электронная микроскопия; динамическое светорассеяние; импульсная люминесценция; фотохимический метод определения синглетного кислорода; экспериментальное моделирование фотосенсибилизированного разрушения оболочечных вирусов в водных средах.

Научная новизна диссертационной работы заключается в следующих положениях:

1. Обнаружена и исследована генерация синглетного кислорода высоко агрегированным фуллереном C_{60} в водных средах.
2. Разработан твердофазный фотосенсибилизатор синглетного кислорода на основе фуллерена C_{60} , обеспечивающий эффективную инактивацию

оболочечных вирусов в водных средах и легкое извлечение сенсibilизирующего агента после процедуры инактивации.

3. Разработан новый способ получения высоко аморфизованного (67%) твердофазного фуллерена.
4. Предложена модификация фотохимического метода обнаружения $^1\text{O}_2$ в водных средах, обеспечивающая высокочувствительные измерения синглетного кислорода, образованного в результате взаимодействия невозбужденного молекулярного кислорода с фотовозбужденным твердофазным сенсibilизатором.

Практическая ценность работы состоит в создании нового типа твердофазного фотосенсibilизатора, использование которого в процессах инактивации гемотрасмиссивных инфекций в плазме донорской крови позволит разработать отечественную технологию получения патоген-безопасной плазмы донорской крови и препаратов из нее, что позволит снизить риск распространения особо опасных инфекций.

Защищаемые положения:

1. Способность агрегированных фуллеренов при их возбуждении видимым светом в водных средах генерировать синглетный кислород.
2. Твердофазный фотосенсibilизатор на основе фуллерена, при облучении видимым светом генерирующий синглетный кислород в водных средах.
3. Фотостабильность твердофазных фотосенсibilизаторов на основе фуллеренов в условиях облучения, характерных для процесса фотодинамической инактивации вирусов (длительность облучения ≤ 2 ч., 100 мВт/см^2 , видимый диапазон спектра).
4. Фотодинамическая инактивация оболочечных вирусов в водных средах при использовании твердофазных фотосенсibilизаторов на основе фуллеренов.

Апробация работы. Результаты работы прошли апробацию на международных конференциях, на которых были представлены следующие доклады:

1. Belousova I.M., Belousov V.P., Danilov O.B., Ermakov A.V., Kiselev V.M., Kris'ko T.K., Kris'co A.V., Mironova N.G., Murav'eva T.D. Photosensitizers, based fullerenes and fullerene-like nanostructures for biology medicine // *8th International Conference on Solar Energy and Applied Photochemistry "Solar – 05"*, Book of abstracts, p. 66-67. February 20-25, 2005, Luxor, Egypt.
2. Belousova I.M., Belousov V.P., Danilov O.B., Ermakov A.V., Kiselev V.M., Kris'ko T.K., Kris'ko A.V., Mironova N.G., Murav'eva T.D. Photosensitizers on the base of fullerenes and fullerene-like nanostructures for biology medicine // *7th Biennial International Workshop on Fullerenes and Atomic Clusters, Book of abstracts*, p. 217. June 27-July 1, 2005, St-Petersburg, Russia.

3. Zarubaev V.V., Anfimov P.M., Rylkov V.V., Murav'eva T.D., Kris'ko T.K., Sirotkin A.K., Starodubzev A.M., Belousova I.M. and Kiselev O.I. Photodynamic inactivation of influenza virus with fullerene suspensions in allantoic fluid // *7th Biennial International Workshop on Fullerenes and Atomic Clusters, Book of abstracts*, p. 245. June 27-July 1, 2005, St.-Petersburg, Russia.
4. Piotrovsky L.B., Sirotkin A.K., Zarubaev V.V., Poznyakova L.N., Murav'eva T.D., Kris'ko T.K., Belousova I.M. and Kiselev O.I. Pristine fullerene C₆₀: different water soluble forms - different mechanisms of biological action // *7th Biennial International Workshop on Fullerenes and Atomic Clusters, Book of abstracts*, p. 240. June 27-July 1, 2005, St.-Petersburg, Russia.
5. Белоусова И.М., Белоусов В.П., Крисько А.В., Крисько Т.К., Муравьева Т.Д., Сироткин А.К. Фотосенсибилизаторы на основе фуллеренов и фуллереноподобных наноструктур для биологии и медицины // *IX Межд. конференция ICHMS – 2005, Водородное материаловедение и химия углеродных наноматериалов. Сборник тезисов*, с. 661, Сентябрь 5-11, 2005, Севастополь-Крым-Украина.
6. Kislyakov I.M., Belousova I.M., Videnichev D.A., Danilov O.B., Kiselev V.M., Kris'ko T.K., Murav'eva T.D. Solid-phase fullerene-like nanostructures as singlet-oxygen sensitizers in liquid media // *XII Conference on Laser Optics. Technical Program*, p. 35, June 26-30, 2006, St.-Petersburg, Russia.
7. Bagrov I.V., Belousova I.M., Kiselev V.M., Kislyakov I.M., Krisko T.K., Murav'eva T.D. Visible light action on optical and photochemical properties of fullerene C₆₀ coatings // *XIII Conference on Laser Optics. Technical Program*, p. 75, June 23-28, 2008, St.-Petersburg, Russia.
8. Belousova I.M., Belousov V.P., Kiselev V.M., Murav'eva T.D., Kislyakov I.M., Starodubtzev A.M., Krisko T.K., Bagrov I.V. Structural and optical properties of solid-phase C₆₀ nanoparticles in aqueous suspensions // *XIII Conference on Laser Optics. Technical Program*, p. 75, June 23-28, 2008, St.-Petersburg, Russia.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 работ в реферируемых журналах, список которых приведен в конце автореферата.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, заключения, списка литературы из 111 наименований и трех приложений; изложена на 172 страницах и содержит 48 рисунков и 3 таблицы.

Личное участие автора заключается в разработке и приготовлении исследуемых композиций для всех видов исследований и их спектральном анализе; разработке фотохимического метода определения синглетного кислорода, образованного твердофазными фотосенсибилизаторами; определении и анализе сенсibiliзирующей способности и фотостабильности исследуемых композиций; анализе экспериментальных результатов, в том

числе биологических, с целью определения оптимального фотосенсибилизатора, отвечающего конкретному применению реакции фотоокисления.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Первая глава. Фуллерен и фотодинамическая инактивация вирусов

В первой главе представлен обзор литературы, посвященный вопросам возможности и особенностей применения фуллерена в качестве сенсибилизирующего агента в фотодинамических процессах, в частности инактивации вирусов. На основании анализа литературных данных сформулированы основные задачи настоящей работы.

Прежде всего, обоснована необходимость инактивации вирусов в плазме и препаратах плазмы крови, проведен выбор метода инактивации. Показано, что, благодаря селективности воздействия, фотодинамическая инактивация вирусов может являться одним из наиболее перспективных методов очистки плазмы донорской крови и препаратов плазмы крови. В основе фотодинамической инактивации вирусов лежат реакции фотосенсибилизированного окисления органических соединений активными формами кислорода: супероксидным анион-радикалом $O_2^{\bullet-}$ и гидроксильным радикалом OH^{\bullet} (механизм I типа) или синглетным кислородом 1O_2 (механизм II типа). В водных системах протекание фотореакции типа I определяется возбуждением сенсибилизатора как в триплетное ($^3P^*$), так и в синглетное ($^1P^*$) возбужденное состояние в присутствии электронодонорных соединений, в то время как генерация синглетного кислорода обуславливается только наличием состояния ($^3P^*$). Оба типа фотодинамических реакций протекают одновременно, конкурируя между собой в зависимости от относительной концентрации кислорода, фотоокисляемой молекулы и pH среды, концентрации окисляющих агентов.

Однако, применение в качестве фотосенсибилизатора активных форм кислорода традиционного водорастворимого красителя (например, метиленового синего) может ограничить использование метода при множественной трансфузии плазмы крови и обработке препаратов плазмы крови благодаря наличию в целевых продуктах нежелательных примесей. Устранению этого недостатка может способствовать разработка принципиально нового подхода к фотодинамической инактивации вирусов, основанного на использовании твердофазных фуллеренсодержащих фотосенсибилизаторов, которые могут быть легко удалены из реакционной смеси после процедуры инактивации. Кроме того, было показано, что молекулы фуллерена C_{60} могут составить конкуренцию традиционно используемым в фотодинамике красителям, т.к. обладают: широким спектром поглощения; высоким квантовым выходом синглетного кислорода в отсутствие агрегации ($\cong 1$);

превалированием процесса образования синглетного кислорода молекулярным фуллереном над обратным процессом тушения синглетного кислорода фуллереном; низкой токсичностью; высокой фотохимической стабильностью.

Анализ литературы показал, что для создания твердофазных фотосенсибилизаторов на основе фуллеренов целесообразнее использовать немодифицированный фуллерен. В свою очередь получение твердофазной композиции, содержащей мономеры немодифицированного фуллерена, представляется достаточно сложной задачей. Поэтому было важно выяснить вопрос, касающийся влияния агрегации молекул на время жизни возбужденных состояний фуллерена и, таким образом, на эффективность генерации активных форм кислорода, приводящих к инактивации вирусов. Приведенный в настоящей главе анализ исследований по данной проблеме показал, что: (1) агрегация молекул C_{60} способствует уменьшению времен жизни состояний ($^3P^*$) и ($^1P^*$) фуллерена; (2) для каждого конкретного вида агрегатов фуллерена необходимо отдельно решать вопрос об эффективности тушения возбужденных состояний в кластере, поскольку она зависит от степени агрегации и силы взаимодействия фуллеренов в агрегате.

В связи с этим было рассмотрено влияние уменьшения времен жизни состояний ($^3P^*$) и ($^1P^*$) фуллерена на эффективность генерации синглетного кислорода. На основании немногочисленных, но непротиворечивых и очевидных, литературных данных показано, что самотушение возбужденных состояний фуллерена при агрегации приводит к снижению квантового выхода синглетного кислорода.

Кроме того, был изучен вопрос о генерации радикалов фуллерена при агрегации C_{60} , приводящих к образованию радикалов кислорода (реакция типа I). Показано, что фуллерен, находясь в возбужденном состоянии в присутствии эффективных доноров электронов, является прекрасным акцептором электронов. Таким образом, фотовозбуждение неагрегированного C_{60} способствует передаче электрона от донора к $^3C_{60}^*$ с образованием анион-радикала $C_{60}^{\bullet-}$ ($C_{60}^{\bullet-}$). Что касается агрегированного фуллерена, то несмотря на снижение времен жизни возбужденных состояний, C_{60} , находясь в неполярном растворителе в присутствии достаточного количества доноров электронов, также способен к эффективной генерации $C_{60}^{\bullet-}$.

Таким образом, показано, что наличие долгоживущего триплетного состояния фуллерена при облучении в водных средах способствует генерации синглетного кислорода (в условиях отсутствия электронодонорных соединений) и всех видов активных форм кислорода (в присутствии электронодонорных соединений).

В свою очередь для проведения эффективного технологического процесса селективной инактивации вирусов агрегированный фуллерен должен обладать не только высокой сенсibiliзирующей способностью, но также избирательным воздействием на вирусы и достаточно высокой фотостабильностью. Кроме того, при работе с биологической жидкостью

следует учитывать большую вязкость среды и влияние ее биологических компонентов на ход процесса инактивации. Перспектива применения твердофазных фотосенсибилизаторов на основе фуллеренов для инактивации вирусов в биологических жидкостях (например, в плазме крови) приводит к необходимости изучения вышеупомянутых факторов.

Вторая глава. Разработка и получение твердофазных фотосенсибилизаторов на основе фуллеренов. Изучение их структурных свойств

В данной главе описано изготовление и исследование структурных свойств твердофазных фотосенсибилизаторов на основе фуллеренов. Для этого на основании литературного обзора были сформулированы основные требования, предъявляемые нами к твердофазным фуллеренсодержащим фотосенсибилизаторам, пригодным к использованию в процессе очистки плазмы и препаратов плазмы крови: простота получения и воспроизводимость физико-химических свойств; возможность сохранения высокой эффективности генерации активных форм кислорода фуллеренами в гетерогенных условиях; химическая и физическая устойчивость твердофазных фуллеренсодержащих фотосенсибилизаторов под действием излучения в водных средах; хорошая смачиваемость водными средами; полная извлекаемость фотосенсибилизаторов из биологической среды после процедуры фотодинамического воздействия; технологичность их практического использования в процессах инактивации вирусов; высокая способность к инактивации вирусов в биологических жидкостях, обладающих высокой вязкостью.

Для выполнения этих требований были предложены, изготовлены и исследованы: (1) раздробленный кристаллический фуллерен и его водная суспензия; (2) «аморфный» фуллерен и его водная суспензия; (3) пластины с нанесенным на них слоем фуллерена; (4) микрочастицы силикагеля с нанесенным на них слоем фуллерена и их водная суспензия.

Для исследования структуры твердофазных фотосенсибилизаторов были использованы: рентгеноструктурный анализ; спектрофотометрия; элементный анализ; электронная микроскопия; динамическое светорассеяние. Также было показано, что для качественного определения степени агрегации фуллерена с успехом может применяться спектральный анализ.

Приготовленная суспензия раздробленного кристаллического фуллерена, полученная в процессе обработки суспензии кристаллического фуллерена ультразвуком, характеризовалась большой неоднородностью частиц по размеру, а процесс ее получения – недостаточной воспроизводимостью.

В связи с этим, был предложен способ получения суспензии фуллерена в воде, характеризующийся узким распределением частиц по размеру. В качестве первой стадии процесса был взят способ получения водного мицеллярного

раствора фуллерена по методу Г.В. Андриевского¹. Были оптимизированы условия получения устойчивого мицеллярного раствора фуллерена в воде, а также разработаны и предложены современные и более информативные условия изучения таких растворов методом электронной микроскопии.

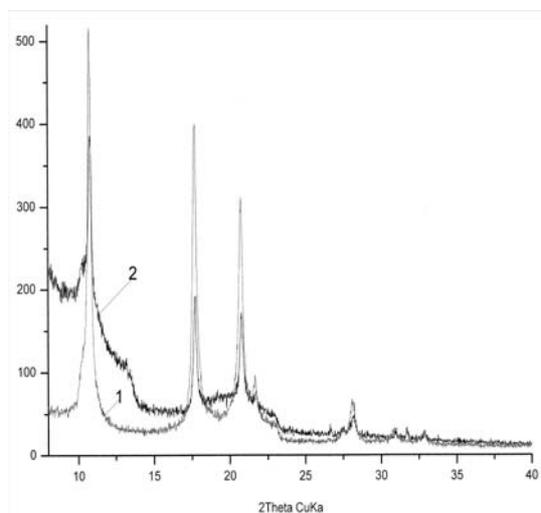


Рис.1 Рентгенограмма лиофильно высушенных частиц суспензии раздробленного кристаллического фуллерена (1) и модифицированного водного мицеллярного раствора фуллерена (2)

Принимая во внимание тот факт, что процессы инактивации вирусов происходят в среде, содержащей определенное количество неорганических солей, было изучено поведение и свойства мицеллярного раствора фуллерена при добавлении в водный раствор физиологического количества хлористого натрия (0.9 %). В результате такой модификации гидратная оболочка мицелл разрушается, и мицеллярный раствор превращается в суспензию однородных по размеру частиц фуллерена. Методом электронной микроскопии было показано, что средний размер таких

частиц приблизительно составляет 20-30 нм.

Структура лиофильно высушенных частиц полученных суспензий фуллерена была изучена рентгенографическим методом, полученные рентгенограммы представлены на рис.1. На рентгенограмме четко видны пики, характеризующие кристаллический фуллерен, вместе с гало, которые могут трактоваться как характеристика аморфной составляющей полученных порошков. Таким образом, методом модификации водного мицеллярного раствора C_{60} получена дисперсная фуллереновая композиция, представляющая собой аморфный фуллерен (67%) с примесью кристаллического фуллерена (33%) и методом ультразвуковой обработки суспензии кристаллического фуллерена – кристаллический фуллерен (60%) с примесью аморфного фуллерена (40%).

Однако оказалось, что ни суспензия раздробленного кристаллического фуллерена, ни суспензия условно названного «аморфным» фуллерена не могут обеспечить достаточную технологичность их практического использования в процессах инактивации вирусов. Они характеризовались недостаточно хорошей извлекаемостью и постепенным снижением инактивационной активности

¹ Andrievsky G.V., Kosevich M.V., Vovk O.M., Shelkovsky V.S. and Vashchenko L.A., On the Production of an Aqueous Colloidal Solution of Fullerenes // Journal of the Chemical Society, Chemical Communications. - 1995. – Vol. 12. - P. 1281-1282

вследствие укрупнения мелких частиц фотосенсибилизатора в вязких биологических средах.

В связи с этим было предложено создать фотосенсибилизаторы на основе фуллеренсодержащих покрытий. Такие структуры не подвержены агрегации в процессе фотодинамического воздействия в вязких биологических средах. Были разработаны фуллеренсодержащие покрытия на пластинах. Однако при использовании пластин с покрытием фуллерена в биологических экспериментах наблюдалась невысокая степень инактивации вируса. По всей видимости, это может объясняться незначительной площадью поверхности, содержащей фуллерен.

С целью увеличения рабочей площади поверхности твердофазных сенсбилизаторов был предложен и разработан способ нанесения покрытия из фуллерена на частицы силикагеля. В качестве матрицы был выбран микропористый силикагель марки КСК отечественного производства. Методом элементного анализа на содержание углерода было установлено, что покрытие из фуллерена на частицах силикагеля составляет в среднем 3-4 % вес. к весу всей композиции.

Полученные фуллеренсодержащие поверхности, в первую очередь микрочастицы силикагеля с нанесенным на них фуллереном, наилучшим образом соответствуют сформулированным нами характеристикам оптимального фотосенсибилизатора по совокупности параметров хорошей смачиваемости водными средами, простоты получения и воспроизводимости физико-химических свойств. Кроме того, по результатам спектрального анализа показано, что во всех разработанных композициях фуллерен находится в агрегированном виде.

Третья глава. Генерация синглетного кислорода твердофазными фотосенсибилизаторами на основе фуллерена

В настоящей главе описаны результаты обнаружения синглетного кислорода, образованного в результате облучения твердофазных фуллеренсодержащих фотосенсибилизаторов в водной среде. Изучение эффективности генерации синглетного кислорода одновременно позволяет качественно судить об образовании триплетного возбужденного состояния фуллерена, а также сделать выводы о потенциальных возможностях исследуемых композиций в качестве фотосенсибилизаторов для инактивации вирусов в модельной водной среде, не содержащей электронодонорных соединений.

Прежде всего, по наблюдению люминесценции синглетного кислорода на длине волны 1270 нм было установлено образование синглетного кислорода в суспензиях фуллеренсодержащих микрочастиц («аморфный» фуллерен, раздробленный кристаллический фуллерен и силикагель, покрытый фуллереном), и на поверхности покрытий фуллерена на стеклянной/кварцевой

подложке. Было определено время жизни синглетного кислорода в воде (2-3 мкс) и тяжелой воде (43 мкс). На примере облучения суспензии микрокристаллического фуллерена было показано, что интенсивность люминесценции прямо пропорциональна интенсивности возбуждающего импульса.

Однако оказалось, что определению количества образуемого кислорода люминесцентным методом мешают многочисленные систематические ошибки, поэтому было предложено обратиться к высоко чувствительному фотохимическому методу количественного определения $^1\text{O}_2$ в водных средах, предложенному Kraljic and Mohsni¹. В качестве «ловушки» синглетного кислорода в этом методе выступает аминокислота – гистидин, в качестве индикатора синглетного кислорода – п-нитрозодиметиланилин (RNO), характеризующийся интенсивной полосой поглощения с максимумом $\lambda_m = 440$ нм и полушириной $\Delta\lambda_{1/2}(\text{FWHM}) = 75$ нм. При реакциях, протекающих по такой схеме, падение оптической плотности раствора, регистрируемой на длине волны 440 нм, $\Delta D(440) < 0$, должно быть прямо пропорционально увеличению концентрации синглетного кислорода, наработанного за время наблюдения.

Поскольку выбранный нами метод был первоначально разработан для растворов, то при применении его к твердофазным сенсбилизаторам были учтены некоторые дополнительные факторы: возможная сорбция молекул RNO на твердофазном образце, его нагрев в процессе облучения и связанная с ним термодесорбция RNO обратно в раствор, оседание образца в процессе облучения. Была создана установка непрерывного измерения изменения оптической плотности раствора (рис 2).

Запись сигналов велась на компьютере с использованием двухканальной осциллографической приставки в режиме самописца. Отношение амплитуд $I_{\text{max}}/I_{0\text{max}}$ этих двух сигналов выражало собой зависимость пропускания системы от времени $T(t)$. Начальный участок (первые 1–3 минуты) аппроксимации этой зависимости позволяет рассчитать скорость уменьшения оптической плотности раствора, связанного с наработкой синглетного кислорода:

$$\Delta D/\Delta t = -\lg[T(t+\Delta t)/T(t)]/\Delta t. \quad (1)$$

Дополнительный контроль результатов осуществлялся сравнением спектров пропускания смесей до и после облучения, записываемых независимо на спектрофотометре в каждом опыте.

¹ Kraljic I., Mohsni S. Et. A New Method for the Detection of Singlet Oxygen in Aqueous Solutions // Photochemistry and Photobiology. – 1978. – Vol. 28. – P. 577-581.

Количественное определение абсолютного значения концентрации синглетного кислорода для исследуемых фотосенсибилизаторов было предложено выполнить путем сравнения получаемых значений $\Delta D/\Delta t$ с величиной этого эффекта в растворе эталонного сенсибилизатора, для которого квантовый выход синглетного кислорода хорошо известен. В опытах в качестве эталонного сенсибилизатора был использован краситель метиленовый синий.

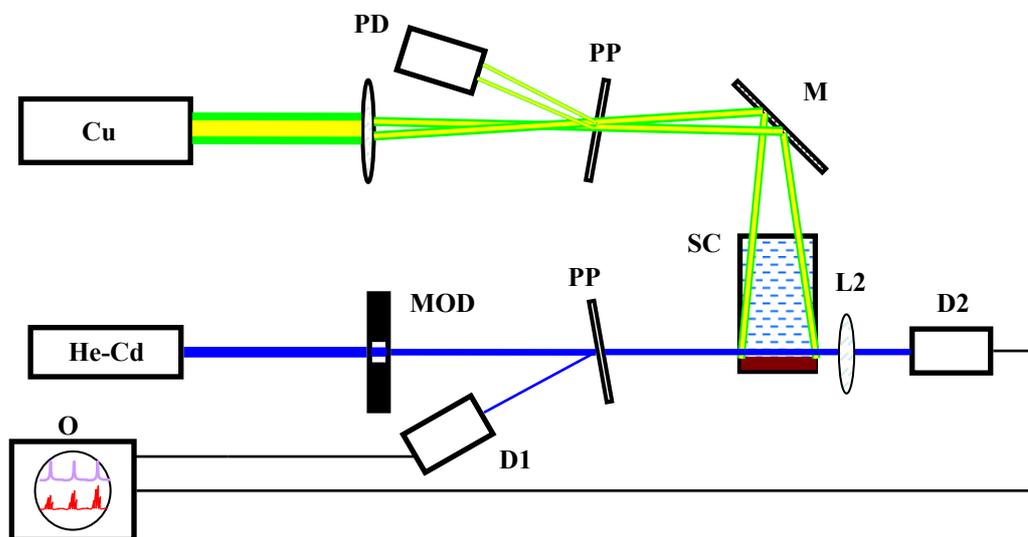


Рис. 2. Экспериментальная установка по наблюдению наработки синглетного кислорода в водном растворе фотохимическим методом. Cu – источник возбуждающего излучения (510 и 578 нм с соотношением интенсивностей 3:2; 15 кГц; 1 Вт/см²); L1, L2 – линзы; PP – плоско-параллельные пластины; M – зеркало; He-Cd – источник зондирующего излучения (441.5 нм; < 1 мВт); MOD – частотный модулятор; SC – образец; D1 – детектор опорного излучения; D2 – детектор прошедшего излучения; PD – измеритель мощности

Расчет абсолютного значения стационарной концентрации синглетного кислорода $n[{}^1\text{O}_2]$ был выполнен для раствора метиленового синего по формуле:

$$n[{}^1\text{O}_2] = n_a[h\nu] \cdot \phi({}^1\text{O}_2) \cdot \tau({}^1\text{O}_2), \quad (2)$$

где $n_a[h\nu]$ – количество квантов возбуждающего излучения, поглощенных единицей объема вещества в единицу времени; $\phi({}^1\text{O}_2)$ – интегральный квантовый выход генерации синглетного кислорода исследуемым фотосенсибилизатором; $\tau({}^1\text{O}_2)$ – время жизни синглетного кислорода в среде.

Концентрация поглощенных квантов с учетом поглощения в толстом слое вещества определялась по формуле:

$$n_a[h\nu] = \frac{1}{hc \cdot H} \int I(\lambda) \cdot (1 - e^{-D(\lambda) \cdot H}) \cdot \lambda d\lambda, \quad (3),$$

где $I(\lambda)$ – распределение интенсивности в спектре возбуждающего светодиода; $D(\lambda)$ – спектр оптической плотности сантиметрового слоя раствора; H – высота столба облучаемой жидкости.

Для расчета было принято эффективное время жизни синглетного кислорода с учетом присутствия в растворе гистидина - $\tau = 1.2$ мкс; интегральный квантовый выход генерации синглетного кислорода метиленовым синим в воде в диапазоне длин волн 550-700 нм - 0.52.

Рассчитанное значение $n[{}^1\text{O}_2]$ соответствует полученной из опыта величине скорости изменения оптической плотности $\Delta D(440)/\Delta t$ раствора метиленового синего. Концентрации синглетного кислорода в других образцах определены по измеренным скоростям $\Delta D(440)/\Delta t$ пропорционально этому соответствию.

Опираясь на экспериментальные данные (таблица 1), была построена зависимость стационарной концентрации синглетного кислорода, приведенной к плотности мощности 100 мВт/см^2 , от эффективной концентрации фуллерена (рисунок 3). Точки соответствуют изученным фуллеренсодержащим образцам. Кроме того, для облегчения сравнения сенсibiliзирующих свойств исследуемых композиций была введена удельная величина $[{}^1\text{O}_2]$, которая представляет собой отношение стационарной концентрации синглетного кислорода к средней концентрации фотосенсибилизатора в растворе.

Таблица 1.

Результаты измерений стационарной концентрации синглетного кислорода $[{}^1\text{O}_2]$, фотосенсибилизированного в водной среде исследуемыми системами, при $I = \text{мВт/см}^2$.

№	Фотосенсибилизатор	Средняя концентрация, $10^{16} \cdot \text{см}^{-3}$	$[{}^1\text{O}_2]$, $10^8 \cdot \text{см}^{-3}$	Удельная $[{}^1\text{O}_2] \times 10^8$
1	Теоретическое значение для мономера C_{60}	8.40	1200.0	142.86
2	Раздробленные кристаллы C_{60}	2.50	1.9	0.76
3	Частицы «аморфного» C_{60}	12.00	12.0	1.00
4	Микрочастицы силикагеля с C_{60}	8.40	9.5	1.13
5	Вакуумное напыление C_{60} на кварцевой пластинке, $L = 5$ нм	0.09	0.0	-
6	Вакуумное напыление C_{60} на кварцевой пластинке, $L = 77.5$ нм	1.70	1.5	0.88
7	Вакуумное напыление C_{60} на кварцевой пластинке, $L = 1350$ нм	25.00	15.0	0.60

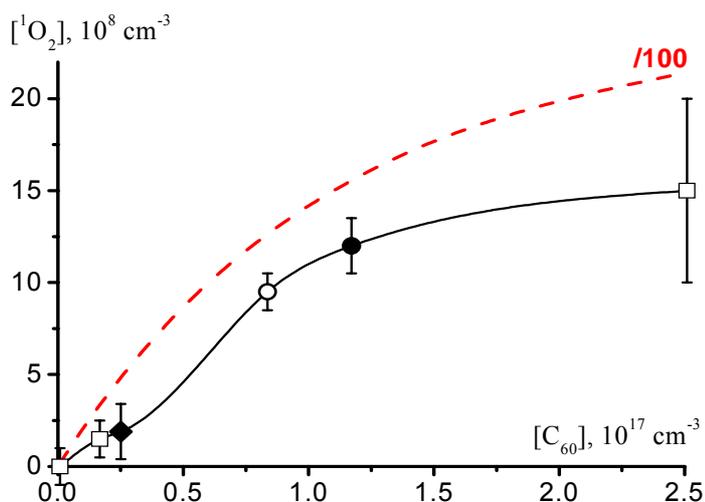


Рис. 3. Зависимость стационарной концентрации синглетного кислорода от средней концентрации фотосенсибилизатора в водной системе. \square – вакуумное напыление разной толщины; \blacklozenge – суспензия раздробленного кристаллического фуллерена; \bullet – суспензия «аморфного» фуллерена; \circ – суспензия микрочастиц силикагеля, покрытых фуллереном. Пунктирная линия соответствует псевдораствору фуллерена.

На этом же графике была отложена кривая (пунктир), полученная расчетом по формулам (2) и (3) в предположении, что фуллерен находится в воде в виде мономеров. Учитывая нерастворимость C_{60} в воде, такая идеальная ситуация была нами названа псевдораствор фуллерена.

Сенсибилизирующая способность молекул C_{60} в псевдорастворе показывает максимальные возможности фуллерена как генератора синглетного кислорода в водной среде. Для расчета взято сечение поглощения фуллерена, полученное из спектров растворов в CCl_4 , и время жизни синглетного

кислорода, характерное для водной среды.

Сравнение экспериментальной и теоретической кривых показало, что:

- введение понятия средней концентрации сенсибилизатора и применение ее при анализе эффективности генерации синглетного кислорода приводит к теоретически описываемой форме концентрационной зависимости;
- обнаружение синглетного кислорода, сенсибилизированного твердофазными фуллеренсодержащими композициями, свидетельствует об образовании достаточно долгоживущего триплетного возбужденного состояния агрегированного фуллерена;
- чем больше фуллерена в системе, тем больше концентрация получаемого синглетного кислорода;
- количество синглетного кислорода, вырабатываемое твердофазными фуллерен-содержащими фотосенсибилизаторами в воде приблизительно на два порядка меньше, чем то количество, которое могли бы производить отдельные молекулы фуллерена (псевдораствор).
- перспектива увеличения эффективности генерации синглетного кислорода твердофазными фотосенсибилизаторами на основе фуллеренов предполагает стремление к получению твердофазных композиций с

поверхностным монослоем фуллерена, содержащим C_{60} в неагрегированном состоянии.

Анализ удельных значений $[^1O_2]$ дополнительно показал, что:

1. использование вакуумно-напыленных покрытий C_{60} с толщинами 1350 нм и 5 нм и частиц нераздробленного кристаллического фуллерена в качестве фотосенсибилизаторов синглетного кислорода нецелесообразно;
2. оптимальная толщина слоя агрегированного фуллерена, обеспечивающая эффективное возбуждение молекул сенсибилизатора, составляет приблизительно от 30 до 300 нм;
3. агрегаты фуллерена, подобные с точки зрения их структурных особенностей, в различных твердофазных сенсибилизаторах обладают практически одинаковой эффективностью образования синглетного кислорода.

Сходство фотосенсибилизирующих свойств твердофазных фуллереновых композиций (2-4, 6 в таблице 1), на наш взгляд, не является случайным совпадением, а определяется сходством их структурных и физических особенностей. В самом деле, все рассматриваемые здесь покрытия и частицы отличаются единством состава: они содержат только C_{60} , находящийся в агрегированном виде. На рисунке 4 представлены спектры всех четырех композиций в сравнении со спектром фуллерена в растворе CCl_4 . Анализ спектров показывает, что эти твердофазные композиции характеризуются схожей степенью агрегации фуллерена. То же самое справедливо и в отношении толщин покрытий и размеров частиц. На наш взгляд, это величины

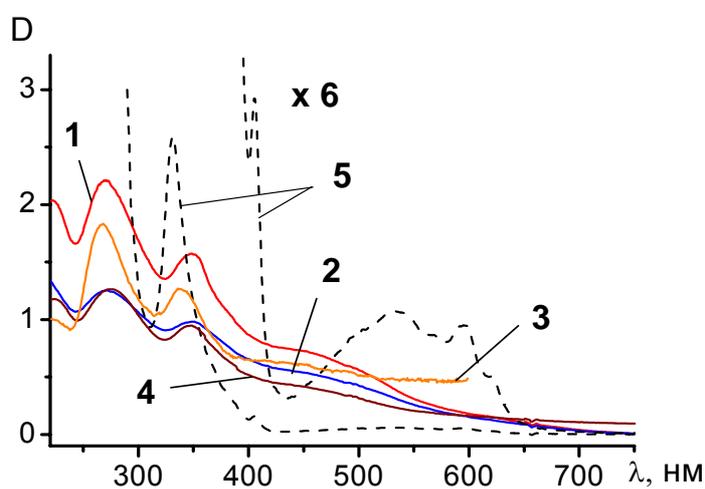


Рис. 4. Спектры поглощения фуллерена в твердофазных фуллерен-содержащих системах сравнительно со спектром раствора фуллерена. 1 – суспензия аморфного фуллерена; 2 – суспензия раздробленного кристаллического фуллерена; 3 – микрочастицы силикагеля, покрытые фуллереном; 4 – вакуумное напыление на кварце, $L = 77.5$ нм; 5- раствор C_{60} в CCl_4

одного порядка, причем отвечающие условиям оптимального возбуждения фуллерена: толщина покрытия, полученного вакуумным напылением фуллерена на кварце, в данном случае составляет 77.5 нм; диаметр агрегата «аморфного» фуллерена равен 20-30 нм, с учетом возможной агломерации – около 100 нм; толщина агрегатов C_{60} на поверхности силикагеля по нашим теоретическим расчетам (при равномерном распределении фуллерена по поверхности) может составлять до 50 нм; средний размер частиц раздробленного

кристаллического фуллерена приблизительно равен 300 нм. Небольшие отличия в величине удельной стационарной концентрации синглетного кислорода для этих фотосенсибилизаторов, на наш взгляд, могут объясняться несколько различной величиной удельной поверхности и степени ее дефектности, что отражается на концентрации поверхностных локализованных экситонов, по-видимому, обуславливающих процесс генерации синглетного кислорода.

Кроме того, нами было проведено сравнение количества полученного синглетного кислорода при замене среды с H_2O на D_2O при прочих равных условиях, которое подтвердило факт образования синглетного кислорода в реакционной смеси. Действительно, время жизни синглетного кислорода в H_2O (2-3 мкс) с учетом тушения синглетного состояния O_2 гистидином по нашим оценкам составляет $\tau_1 = 1.2$ мкс, а в D_2O (43 мкс) уменьшается за счет гистидина до $\tau_2 = 1.9$ мкс, следовательно, использование D_2O вместо H_2O должно привести к увеличению эффекта в $\tau_2/\tau_1 = 1.58$ раза, что хорошо согласуется с полученными экспериментальными данными и не зависит от концентрации C_{60} (таблица 2).

Таблица 2.

Изменение стационарной концентрации синглетного кислорода, образованного фуллереном, нанесенным на микрочастицы силикагеля, при замене среды

Эффективная концентрация C_{60} , мг/мл	$[^1O_2](D_2O) / [^1O_2](H_2O)$
3.27	1.58
1.63	1.68

Поскольку, как упоминалось ранее, в водной среде, не содержащей электронодонорных соединений, возбужденный C_{60} будет способствовать образованию только синглетного кислорода, то изучение эффективности генерации 1O_2 поможет оценить потенциальные возможности исследуемой композиции в качестве фотосенсибилизатора для инактивации вирусов в такой модельной среде.

Проведенные нами расчеты учитывали экспериментальные условия, отвечающие реальному процессу эффективной фотодинамической инактивации вирусов: облучение видимым диапазоном спектра с плотностью мощности 100 мВт/см², концентрация фуллерена - 2.7 мг/мл (соответствует условиям полученной нами полной инактивации вирусов гриппа частицами силикагеля с нанесенным на них фуллереном), концентрация метиленового синего - $3.7 \cdot 10^{-4}$ мг/мл (соответствует стандартной процедуре «Терафлекс» фирмы MasoPharma, Франция). Расчеты показали, что в данных условиях величина стационарной концентрации синглетного кислорода, нарабатываемой в водной среде твердофазным фотосенсибилизатором на основе фуллерена, ($2.6 \cdot 10^{10}$ см⁻³) не уступает и даже превышает упомянутую величину для метиленового синего ($0.6 \cdot 10^{10}$ см⁻³), используемого трансфузиологами в настоящее время. Таким

образом, мы можем предположить, что сенсibiliзирующей способности фуллерена, нанесенного на микрочастицы силикагеля, достаточно для проведения эффективного технологического процесса инактивации вирусов в водной среде, не содержащей электронодонорных соединений.

Наилучшей среди исследованных композиций с точки зрения создания высокой стационарной концентрации синглетного кислорода в процессе фотодинамической инактивации вирусов была признана твердофазная композиция, представляющая собой частицы силикагеля с нанесенным на них фуллереном.

Четвертая глава. Изучение фотостабильности твердофазных фотосенсибилизаторов на основе фуллеренов

В настоящей главе была изучена фотостабильность покрытий фуллерена на стеклянных пластинах и микрочастицах силикагеля по сравнению с эталонным фотосенсибилизатором (метиленовым синим). Для выяснения возможных механизмов убыли фуллерена при облучении твердофазные покрытия были исследованы как в водной среде, так и на воздухе. Интенсивность, спектральный состав и максимальная длительность облучения были выбраны из условия соответствия параметрам облучения, применявшемся нами при экспериментальном моделировании реального технологического процесса инактивации вирусов твердофазными фотосенсибилизаторами на основе фуллеренов.

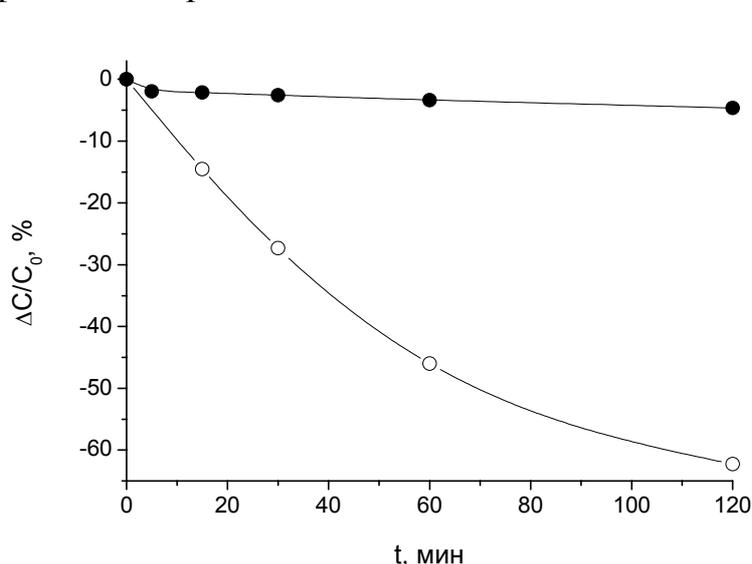
Фотостабильность определялась двумя способами:

1. по изменению спектров поглощения суспензии или раствора фотосенсибилизатора в H_2O в результате облучения;
2. по изменению эффективности генерации синглетного кислорода ($^1\Delta O_2$) в результате предварительного облучения фотосенсибилизатора.

Анализ полученных результатов показал, что при длительном (2-3 часа) облучении интенсивным (100 мВт/см^2) источником видимого диапазона фуллереновые покрытия в воде более фотостабильны, чем раствор метиленового синего. Об этом свидетельствуют как данные измерения спектров поглощения (рис. 5), так и результаты регистрации эффективности образования синглетного кислорода. Кроме того, наблюдается корреляция хода зависимости изменения спектра поглощения при облучении с ходом зависимости снижения сенсibiliзирующей способности при тех же условиях для каждого из фотосенсибилизаторов.

Фотодеградация фуллеренового покрытия происходит только в приповерхностном слое, что является причиной несоответствия абсолютных значений изменений эффективности генерации синглетного кислорода фуллереном, нанесенным на микрочастицы силикагеля, ($\sim 30\%$ за 2 часа) и убыли фуллерена, наблюдаемой по спектру ($\sim 5\%$ за 2 часа).

Несмотря на то, что фотостабильность фуллереновых покрытий, как оказалось, не зависит от среды, механизмы убыли фуллерена в составе покрытий на воздухе и в воде различны: предположительный превалирующий механизм убыли фуллерена на воздухе – окисление, в воде – фотополимеризация.



Высокая фотостабильность покрытий фуллерена C₆₀ как в водной, так и в газовой среде обуславливает перспективность их применения в фотодинамической терапии.

Рис. 5. Относительное уменьшение концентрации фотосенсибилизаторов в зависимости от времени облучения: ● – суспензия микрочастиц силикагеля с фуллереновым покрытием, ○ – раствор метиленового синего.

Пятая глава. Изучение принципиальных возможностей твердофазных фотосенсибилизаторов на основе фуллеренов для фотодинамической инактивации вирусов *in vitro*

В настоящей главе приводятся экспериментальные доказательства тропности агрегированного фуллерена к оболочечным вирусам и эффективной инактивации оболочечных вирусов *in vitro* (в физиологическом растворе и реальной биологической жидкости - аллантоисной жидкости куриного эмбриона) твердофазными фотосенсибилизаторами на основе фуллеренов. Кроме того, выполнен окончательный выбор оптимального твердофазного фотосенсибилизатора на основе фуллерена в соответствии с основными требованиями, предъявляемым нами к твердофазным фотосенсибилизаторам, пригодным к использованию в установках по очистке плазмы и препаратов плазмы крови.

Работа по инактивации оболочечных вирусов *in vitro* была проведена в НИИ Гриппа РАМН совместно коллективом ФГУП «НПК «ГОИ им. С.И. Вавилова», НИИ Гриппа РАМН и Институтом экспериментальной медицины РАМН с участием автора в части изготовления твердофазных фотосенсибилизаторов и анализа результатов.

Проведенные эксперименты показали зависимость наблюдаемых процессов инактивации оболочечных вирусов (например, см. рис. 6) от концентраций фуллерена и кислорода, а также дозы освещения. Таким образом, деструктивное действие

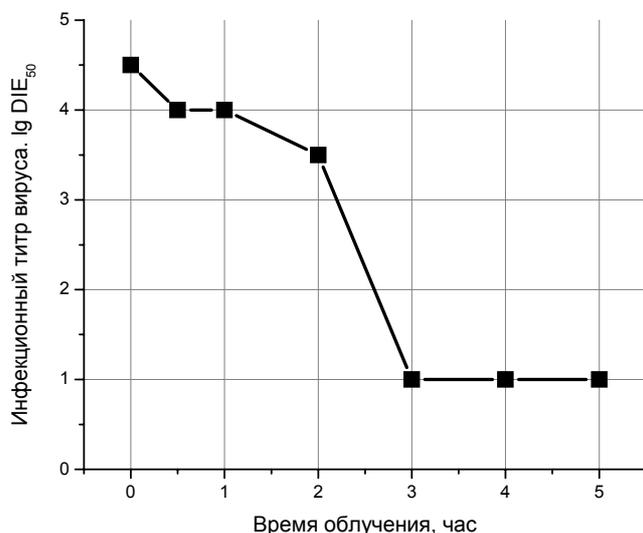


Рис.6. Инактивация вируса гриппа (A/PR/8/34 (H0N1)) в физиологическом растворе. Фотосенсибилизатор – фуллерен, нанесенный на частицы силикагеля. Содержание фуллерена – 1.8 мг/мл, удельная интенсивность облучения – 82 мВт/см³. Облучение - 100 мВт/см² в диапазоне длин волн 400-850 нм. Погрешность определения инфекционного титра вируса – 0.5

твердофазных фотосенсибилизаторов на основе фуллеренов было связано с образованием активных форм кислорода, прежде всего синглетного кислорода.

Полученные твердофазные композиции, представляющие собой частицы силикагеля с нанесенным на них слоем фуллерена, представляются оптимальной композицией, т.к. отличаются высокой прочностью нанесенного слоя, воспроизводимостью свойств независимо от партии получения, хорошей смачиваемостью в воде, кроме того, характеризуются высокой эффективностью

генерации синглетного кислорода и инактивации оболочечных вирусов, а также удобством при работе с ними и при извлечении их из вязких биологических жидкостей.

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ И РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

1. Разработаны твердофазные фотосенсибилизаторы на основе фуллерена для генерации синглетного кислорода в водных, в том числе биологических, средах. Показано, что твердофазные фотосенсибилизаторы, представляющие собой микрочастицы силикагеля с нанесенным на них фуллереном C_{60} , обладают рядом положительных свойств: простотой получения, воспроизводимостью физико-химических свойств, хорошей смачиваемостью водными средами, большой активной поверхностью, фотостабильностью, технологичностью практического использования в процессах инактивации вирусов. Главное преимущество таких твердофазных систем – возможность извлечения фотосенсибилизатора из биологической среды после фотодинамического воздействия.
2. Разработана фотохимическая методика обнаружения синглетного кислорода, с помощью которой впервые удалось измерить концентрацию 1O_2 , генерируемого твердофазными фотосенсибилизаторами на основе фуллеренов в водных системах и выявить существенное влияние агрегации молекул фуллеренов на генерацию синглетного кислорода для всех фуллеренсодержащих структур.
3. На основании результатов изучения генерации синглетного кислорода проведено сопоставление стационарных концентраций 1O_2 , создаваемых суспензией микрочастиц силикагеля с нанесенным на них фуллереном и раствором метиленового синего. Показано, что сенсибилизирующей способности фуллерена, нанесенного на микрочастицы силикагеля, достаточно для проведения эффективного технологического процесса инактивации вирусов в модельной водной среде, не содержащей электронодонорных соединений.
4. В ходе биологических экспериментов показано, что твердофазные фотосенсибилизаторы на основе фуллеренов за счет образования 1O_2 , эффективно инактивируют оболочечные вирусы в водной среде, не содержащей электронодонорных соединений. Такие сенсибилизаторы проявляют высокую способность к инактивации вирусов гриппа в биологических жидкостях, обладающих высокой вязкостью.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Белоусов В.П., Белоусова И.М., Крисько А.В., Крисько Т.К., Муравьева Т.Д., Сироткин А.К.. Водный мицеллярный раствор C_{60} : получение, некоторые свойства и способность к генерации синглетного кислорода // Журнал общей химии. – 2006. – Т. 76, № 2. – С. 265-272.
2. Belousova I.M., Danilov O.B., Kiselev V.M., Kislyakov I.M., Kris'ko T.K., Murav'eva T.D., Videnichev D.A. Solid-phase Fullerene-like Nanostructures as Singlet Oxygen Photosensitizers in Liquid Media // SPIE. Proceedings. – 2007, Vol. 6613, P. 66130C-1 – 66130C-12.
3. Zarubaev V.V., Belousova I.M., Kiselev O.I., Piotrovsky L.B., Anfimov P.M., Krisko T.C., Muraviova T.D., Rylkov V.V., Starodubcev A.M., Sirotkin A.C. Photodynamic Inactivation of Influenza Virus with Fullerene C_{60} Suspension in Allantoic Fluid // Photodiagnosis and Photodynamic therapy. – 2007. – Vol. 4. – P. 31-35.
4. Sirotkin A.K., Zarubaev V.V., Poznyakova L.N., Dumpis M.A., Muravieva T.D., Krisko T.K., Belousova I.M., Kiselev O.I., Piotrovsky L.B. Pristine Fullerene C_{60} : Different Water Soluble Forms – Different Mechanisms of Biological Action // Fullerene, Nanotubes and Carbon Nanostructures. – 2006. – Vol. 14, No 2-3. – P. 327-333
5. Багров И.В., Белоусова И.М., Ермаков А.В., Киселев В.М., Кисляков И.М., Крисько Т.К., Муравьева Т.Д. Фотостабильность покрытия фуллерена C_{60} как твердофазного фотосенсибилизатора синглетного кислорода // Оптика и спектроскопия. - 2008. – Т. 105, № 5. – С. 787-793.
6. Белоусова И. М., Белоусов В.П., Киселев В.М., Муравьева Т.Д., Кисляков И.М., Сироткин А.К., Стародубцев А.М., Крисько Т.К., Багров И.В., Ермаков А.В. Структурные и оптические свойства твердофазных фотосенсибилизаторов синглетного кислорода на основе водных суспензий фуллерена // Оптика и спектроскопия. – 2008. – Т. 105, № 5. – 777-786.