

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ім. О.В. ПАЛЛАДІНА

Курільченко Ірина Юріївна

УДК 577.336:547.9+57.085.2

**ФЛУОРЕСЦЕНТНЕ МІЧЕННЯ НАНОРОЗМІРНИХ КОНТЕЙНЕРІВ ДЛЯ
ВІЗУАЛІЗАЦІЇ ЇХ ВЗАЄМОДІЇ З БІОЛОГІЧНИМИ ОБ'ЄКТАМИ**

03.00.20 - біотехнологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата біологічних наук

Київ – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті сцинтиляційних матеріалів Науково-технологічного комплексу "Інститут монокристалів" НАН України

Науковий керівник: чл.-кор. НАН України, доктор фізико-математичних наук, професор **Малюкін Юрій Вікторович**, заступник директора з наукової роботи Інституту сцинтиляційних матеріалів НАН України

Офіційні опоненти: чл.-кор. НАН України, доктор біологічних наук, професор **Співак Микола Якович**, завідувач відділу проблем інтерферону та імуномодуляторів Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

доктор біологічних наук, старший науковий співробітник **Демченко Олександр Петрович**, завідувач лабораторією нанобіотехнологій Інституту біохімії імені О. В. Палладіна НАН України.

Захист відбудеться " 23 " травня 2016 р. о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.240.01 в Інституті біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за адресою: 01030, м. Київ, вул. Леонтовича, 9.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України (м. Київ, вул. Леонтовича, 9).

Автореферат розісланий " " квітня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук

Карлова Н.П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. На сьогоднішній день стало зрозуміло, що суттєвий прогрес у боротьбі з такою проблемою людства, як злоякісні новоутворення та різноманітні інфекційні захворювання пов'язаний не тільки з пошуком нових лікарських засобів, арсенал яких уже й так доволі великий, а з розробкою нових методів прицільної (таргетної) доставки лікарських засобів саме в потрібне місце організму, обминаючи неушкоджені, здорові органи та клітини з використанням сучасних нанобіотехнологій [Parveen et al., 2012; Nichols, 2012]. Таргетна доставка різних сполук здійснюється за допомогою спеціальних носіїв (контейнерів), розміром від декількох до сотень нанометрів, що надає їм змогу проникати в клітини та тканини завдяки, наприклад, механізму пасивного накопичення та утримання ("Enhanced Penetration and Retention" effect) [Nichols et al., 2012; Freitas et al., 2005]. Сьогодні в якості нанорозмірних контейнерів найбільш активно використовують ліпосомальні везикули (ліпосоми) та полімерні міцели [Torchilin, 2007; Vamrungsap, 2012; Parveen et al., 2012]. Ці наноконтейнери є біосумісними, дозволяють контролювати вилучення активної речовини та здійснювати таргетну доставку у потрібне місце також шляхом модифікації поверхні контейнера різними функціональними групами. Капсулювання лікарських засобів у подібних контейнерах дозволяє також ефективно вирішувати питання, пов'язані з їх токсичністю, небажаним впливом на здорові органи та тканини, гідрофобністю багатьох лікарських засобів і т.ін. [Petros, et al., 2010; Zhang, 2008].

Однак, незважаючи на вказані переваги "контейнерних" форм лікарських засобів, залишається ще багато питань стосовно взаємодії наноконтейнера з біологічними об'єктами різних типів, залежності від типу біооб'єкта механізму проникнення в нього контейнера та швидкості вилучення активної речовини. Для більш ефективного використання контейнерних форм лікарських засобів та інших активних речовин ці питання потребують всебічного вивчення та мають актуальний характер для сучасної біології, фармакології та медицини. Здійснити це можливо також із залученням флуоресцентних методів, таких як флуоресцентна мікроскопія та мікроспектроскопія.

Флуоресцентні методи передбачають застосування флуоресцентних міток та зондів - специфічних молекул-флуорофорів, які ковалентно (мітки) або нековалентно (зонди) зв'язуються з об'єктом дослідження. У якості флуоресцентних зондів традиційно дуже широко використовують органічні барвники та флуоресцюючі протеїни [Владимиров, 1980; Hauglang, 2002; Johnson, 1998; Wang, 2006]. Традиційний підхід, так званий метод одноканальної реєстрації, передбачає застосування одного флуорофору та дозволяє візуалізувати об'єкт дослідження, у тому числі, наноконтейнер, та простежити зміни, що з ним відбувається в часі, контролюючи зміну таких параметрів флуоресценції зонду, як інтенсивність флуоресценції, анізотропія загасання флуоресценції, час життя флуоресценції [Лакович, 1986; Demchenko, 2013; Valeur, 2002]. Однак, методи маркування, що базуються на детекції флуоресценції в одному каналі, тобто на

одній довжині хвилі, мають суттєві недоліки з точки зору їх використання для дослідження взаємодії наноконтейнеру з біоб'єктами в динаміці. По-перше, детектування зміни інтенсивності флуоресценції має низьке аналітичне значення, тому що цей параметр суттєво залежить від мікрооточення флуорофору, тобто аналіз цих змін потребує калібрування. Вимірювання анізотропії флуоресценції й часу життя флуоресценції вимагають складних приладів і аналізу, а тому широко не застосовуються. Крім того, висока концентрація флуорофорів у методах, що засновані на гасінні флуоресценції, не є бажаною в біологічних експериментах.

Метод λ -ратіометрії (реєстрація інтенсивності флуоресценції на двох або більше довжинах хвилі) дозволяє проводити аналіз зміни сигналу флуоресценції одночасно в декількох каналах [Demchenko, 2010]. Він оснований на різних механізмах, що призводять до спектроскопічних змін, включаючи безвипромінювальне перенесення енергії електронного збудження (Förster Resonance Energy Transfer, FRET) [Clegg, 1996; Лакович, 1986; Valeur, 2002]. Ратіометричне детектування інтенсивності флуоресценції на фіксованих довжинах хвиль базується на використанні рутинного спектроскопічного та мікроскопічного обладнання та забезпечує самовідносні ратіометричні вимірювання, які є неможливими за використання одноканальної реєстрації. Тому розробка методу маркування, а в деяких випадках і кодування наноконтейнерів для довгострокового моніторингу їх взаємодії з біологічними об'єктами, що заснований на λ -ратіометричному підході, є дуже перспективним напрямком досліджень, важливим для медичної та фармакологічної практики.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконувалась відповідно до тематичних планів науково-дослідних робіт Інституту сцинтиляційних матеріалів НАН України в рамках держбюджетної теми «Дослідження механізмів взаємодії флуорофорів у нанокластерах різної будови» (Близнец-5, 2009-2011 рр., номер держреєстрації № 0109U005402), НДР «Багатофункціональні нанолюмінофори для біомедичних застосувань» (2009-2010 рр., № Держреєстрації 0109U005914), НДР «Розробка нових люмінесцентних матеріалів для застосування в нанобіотехнологіях» (2011-2012 рр. № Держреєстрації 0111U008840) Державної цільової науково-технічної та соціальної програми «Наука в університетах» та НДР «Розроблення методу люмінесцентного маркування ліпосомних наноконтейнерів для діагностики їх взаємодії з живими клітинами» (2012 р. № Держреєстрації 0112U008216).

Мета і завдання дослідження. Метою дисертаційної роботи була розробка методів флуоресцентного мічення органічних наноконтейнерів (ліпосом і міцел) для візуалізації, "кодування" та моніторингу їх взаємодії з біологічними об'єктами у динаміці.

Для досягнення поставленої мети необхідно було розв'язати *такі завдання*:

1. Відпрацювати експериментальну методику дослідження утворення комплексів між флуоресцентним зондом (органічним барвником) і ліпосомою та розрахувати термодинамічні параметри цього процесу.

2. Розробити методику інкорпорування декількох флуоресцентних зондів у наноконтейнер (міцелу або ліпосому).

3. Установити оптимальні концентрації барвників для FRET-мічення наноконтейнерів.

4. Вивчити особливості безвипромінювального перенесення енергії електронного збудження між декількома флуорофорами в нанооб'ємі міцел та ліпосом.

5. Дослідити вплив фізико-хімічних властивостей та структури молекул барвників на ефективність FRET між ними в нанооб'ємі.

6. Розробити метод оцінки накопичення флуоресцентних зондів у клітинах.

7. Оцінити ефективність розроблених FRET-композицій та методу λ -ратіометрії для маркування ліпосомальних контейнерів при дослідженні їх взаємодії з клітинами різних типів у динаміці.

Об'єкт дослідження – флуоресцентне маркування ліпосомальних наноконтейнерів.

Предмет дослідження – міжмолекулярна взаємодія органічних барвників у нанооб'ємі міцел та ліпосом, безвипромінювальне перенесення енергії електронного збудження між декількома флуоресцентними зондами в нанооб'ємі.

Методи дослідження – спектрофотометрія; флуоресцентна спектроскопія та спектроскопія збудження флуоресценції; лазерна флуоресцентна спектроскопія з часовим розділенням (корельований у часі підрахунок поодиноких фотонів); флуоресцентна мікроскопія та мікроспектроскопія.

Наукова новизна отриманих результатів. Показано, що утворення комплексів "ліпосома – органічний барвник" є довільним, невідновним та енергетично вигідним процесом, який регулюється переважно гідрофобною взаємодією, що дозволяє використовувати досліджені барвники для надійного довгострокового мічення міцел та ліпосом. Запропоновано підходи до флуоресцентного мічення та «кодування» органічних наноконтейнерів (міцел та ліпосом), які засновані на застосуванні FRET різної ефективності між декількома молекулами органічних барвників, що інкорпоруються в наноконтейнер. Вперше показано, що концентрування барвників у ліпідних бішарах ліпосом або в міцелах створює необхідні умови для реалізації ефективного FRET не тільки між барвниками, що характеризуються значними величинами інтегралів перекриття спектрів, але й для пар з менш відповідними характеристиками за їх низькі вихідні концентрації в розчинах ($\sim 10^{-5}$ M). Встановлено, що при створенні FRET-композицій для маркування наноконтейнерів треба враховувати здатність флуоресцентних зондів взаємодіяти один з одним в нанооб'ємі, що може впливати на їх спектроскопічні властивості. Вперше показано, що за однакові концентрації барвників у ліпосомах фосфатіділхоліну (ФХ), діаметр яких у 20 разів більший ніж діаметр міцел додецилсульфата натрію (ДСН) (100 и 5 нм відповідно), FRET між парами барвників є більш ефективним, що пов'язано з меншою кількістю ліпосом у розчині і як наслідок - більшою локальною концентрацією барвників у ліпосомі, що дозволяє використовувати менші вихідні концентрації барвників.

Розроблено метод оцінки накопичення флуоресцентних зондів у клітинах за зміною загальної яскравості зображень. Вперше запропоновано метод λ -ратіометричної оцінки ефективності взаємодії нанорозмірного контейнеру, що містить барвники, з клітинами різних типів у динаміці з використанням мікроспектроскопії.

Практичне значення отриманих результатів полягає в з'ясуванні особливостей взаємодії флуорофорів у нанооб'ємі та впливу цієї взаємодії на їх спектральні характеристики. Методи FRET-мічення та «кодування» нанооб'єктів, запропоновані в роботі, можуть бути використані при розробці нових наноконтейнерних форм лікарських засобів, проведенні фармакокінетичних досліджень та тестуванні їх взаємодії з різними біологічними об'єктами в експериментах *in vitro* та *in vivo*. Запропоновано метод λ -ратіометричної оцінки ефективності взаємодії FRET-мічених наноконтейнерів (міцел та ліпосом) має перспективу для застосування в якості тест-системи для відстеження, доставки активної речовини в живу клітину за допомогою наноконтейнерів в експериментах *in vitro*. Також отримані нові фундаментальні дані стосовно взаємодії молекул в нанооб'ємі можуть бути використані при розробці нових нанорозмірних гібридних флуоресцентних матеріалів для використання в нанобіотехнології.

Особистий внесок здобувача. Усі наведені в дисертації результати отримані автором особисто та у співавторстві. Вибір об'єктів дослідження, постановку мети роботи та наукових завдань проведено спільно з науковим керівником чл.-кор. НАН України, д.ф.-м.н., професором Ю.В. Малюкіним. Автором дисертації проведено детальне дослідження взаємодії обраних флуоресцентних зондів (поліметинових барвників) із ліпосомними везикулами у водних розчинах, розраховано термодинамічні параметри утворення комплексів «ліпосома–барвник». Відпрацьовано методику введення декількох барвників у наноконтейнери, що досліджувались (міцели та ліпосоми), та вивчено особливості взаємодії барвників у нанооб'ємі. Досліджено накопичення флуоресцентних зондів, що були інкорпоровані у ліпосомні везикули, клітинами різних типів та клітинними органелами та проаналізована ефективність використання методу λ -ратіометрії в цілому для моніторингу взаємодії у системі «наноконтейнер – жива клітина» в експериментах *in vitro* у динаміці.

Клітини та клітинні лінії виділялись спільно з к.б.н. Кавок Н.С. Аналіз флуоресцентних зображень та даних, отриманих за допомогою методу мікроспектроскопії, здійснено спільно з д.ф.-м.н. Єфімовою С.Л. Спільно з співавторами з Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.Е. Кавецького здійснено оцінку ефективності накопичення барвників чутливими та резистентними клітинами раку молочної залози людини. Внесок авторки полягає в отриманні флуоресцентних зображень та спектрів флуоресценції. Разом із співавторами та науковим керівником проводились

обговорення, систематизація та інтерпретація одержаних результатів, підготовка до публікації наукових праць та доповідей на наукових конференціях.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертаційного дослідження доповідались та були обговорені на таких міжнародних та вітчизняних конференціях: XX International School-Seminar of Galyna Puchkovska "Spectroscopy of Molecules and Crystals", Crimea (Ukraine), 2011; ЛЮМКОС: Вторая научно-техническая конференция "Люминесцентные процессы в конденсированных средах", Харьков (Украина), 2011; XII съезд онкологов Украины, Киев (Украина), 2011; 9-th International Conference "Electronic processes in organic materials", Lviv (Ukraine), 2013.

Публікації. Основні результати дисертації опубліковані в 11 наукових працях, серед яких: 7 статей у міжнародних та вітчизняних фахових наукових виданнях та тези 4 доповідей на конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, 4 глав, висновків та переліку використаних літературних джерел, який містить 157 посилань. Повний обсяг дисертації складає 141 сторінку, дисертація містить 53 рисунки та 3 таблиці.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Огляд літератури. В огляді літератури проаналізовано сучасний стан нанобіотехнологій у фармації, біології та медицині. Розглянуто та проаналізовано типи наноконтейнерів, що використовуються або мають потенціал до використання в якості складових «наноліків». Особлива увага приділяється ліпосомальним везикулам та полімерним міцелам, що утворюються у розчинах завдяки ефекту самозбирання. Наведено дані стосовно механізмів націленої доставки за допомогою наноносіїв. У розділі також наведено дані стосовно сучасного уявлення про будову клітинних мембран, їх основних функцій, розглянуто основні механізми взаємодії ліпосомальних наноконтейнерів із живими клітинами. Проаналізовано сучасний стан використання флуоресцентних методів для візуалізації та дослідження біооб'єктів, представлено розширений критичний огляд робіт, присвячених флуоресцентному міченню ліпосомальних наноконтейнерів.

Матеріали та методи досліджень. В якості нанорозмірних контейнерів використовували ліпосоми ФХ та міцели ДСН (рис.1). Для флуоресцентного мічення ліпосомом ФХ та міцел ДСН застосовували органічні барвники, структурні формули яких наведено на рис.1. Водно-міцелярні розчини, що містять барвники різної концентрації, готували за наступною схемою. У скляний флакон додавали необхідну кількість вихідного розчину потрібного барвника в хлороформі концентрацією 1×10^{-3} М (одного або декількох) та навіску ДСН, розраховану таким чином, щоб його концентрація в отриманому розчині була більшою за критичну концентрацію міцелоутворення (ККМ, для ДСН = 8×10^{-3} М), що гарантує утворення у воді сферичних агрегатів - міцел ДСН. Після повного випарювання хлороформу додавали бідистильовану воду, розчин

нагрівали до $\sim 80^\circ\text{C}$, ретельно перемішували до повного розчинення компонентів та повільно охолоджували до кімнатної температури.

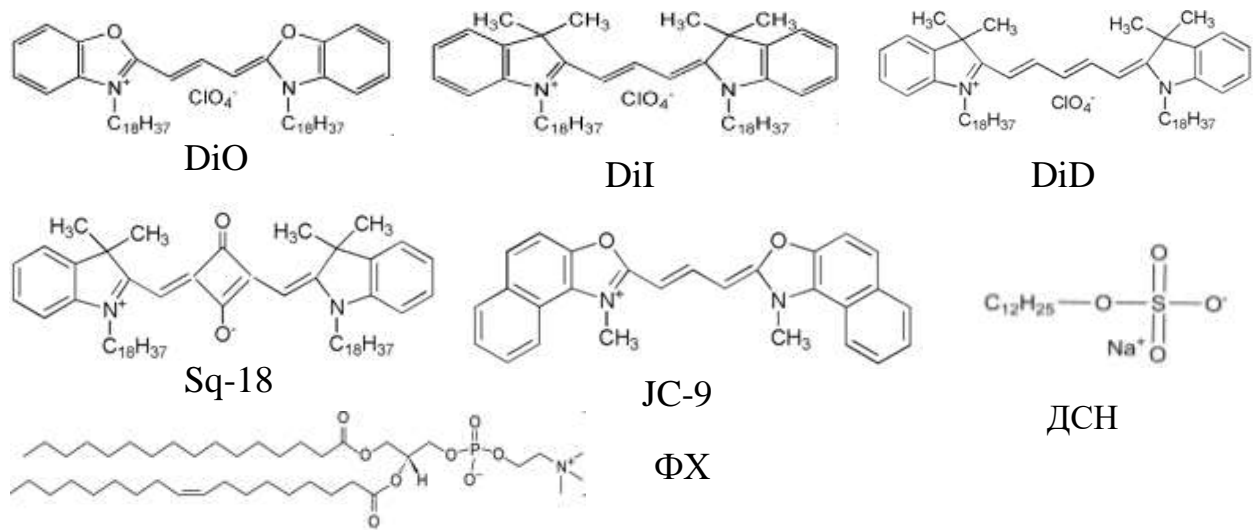


Рис.1. Структурні формули барвників та ПАР, що досліджувались.

Для приготування одношарових ліпосом, що містять барвники, використовували метод екструзії [Mui B., 2003]. Необхідні кількості вихідних розчинів ФХ (40 мг/мл) та барвників у хлороформі (1×10^{-3} М) змішували в скляному флаконі та висушували за допомогою роторного випарювача. Сформовану ліпідну плівку, що містить барвники, гідратували бідистильованою водою. Далі отриману суспензію мультишарових ліпосом багаторазово пропускали крізь полікарбонатний фільтр із розмірами пор 100 нм (Avanti Polar Lipids, Inc., США), за допомогою мініекструдера (Avanti Polar Lipids, Inc., США). Остаточний рівень концентрації ФХ у розчині склав 1×10^{-3} М, концентрацію барвників та їх кількість варіювали.

Спектри поглинання вимірювались на спектрофотометрі Specord 200 (Analytic Jena, Німеччина) за двохпроменевою оптичною схемою. Використовувались кювети з довжиною оптичного шляху 0,2; 0,5 або 1 см. При дослідженні спектрів поглинання при різних температурах кювети термостатували.

Вимірювання спектрів флуоресценції та збудження флуоресценції проводилось на спектрофлуорометрі Lumina (Thermo Scientific, USA), який забезпечував корекцію отриманих спектрів відносно спектральної чутливості. Для дослідження часів загасання флуоресценції барвників у різних середовищах (розчинниках, міцелах та ліпосомах) застосовували спектрометр із часовим розділенням FluoTime 2000 (PicoQuant, Німеччина), який працює за методикою корельованого в часі підрахунку поодиноких фотонів (Time-Correlated Single Photon Counting, TCSPC) із апаратною функцією (Instrumental Response Function, IRF) 100 пс. Для збудження флуоресценції застосовували лазерні пікосекундні

діодні голівки з $\lambda_{\text{макс}} = 439$ та 531 нм (PicoQuant, Німеччина). Обробка отриманих даних здійснювалась за допомогою програмного пакету FluoFitPro (PicoQuant, Німеччина).

Флуоресцентні зображення клітин отримували за допомогою флуоресцентного мікроскопу Olympus IX71, обладнаного цифровою камерою Olympus C-5060. Для збудження флуоресценції застосовували фільтри BP 460–490 та BP 510-550. Для реєстрації спектрів флуоресценції з окремих клітин (метод мікроспектроскопії) флуоресцентний мікроскоп був обладнаний волоконно-оптичним спектральним детектором USB 4000 (Ocean Optics, США).

Ефективність накопичення барвників у клітинах за різні часи інкубації клітин із ліпосомами міченими барвниками оцінювалась використовуючи отримані флуоресцентні зображення за спеціально розробленим методом, який заснований на аналізі яскравісної складової зображення. Аналіз зображення здійснювався за допомогою програмного забезпечення для аналізу растрових зображень (Adobe Photoshop). Оцінювали середньозважений рівень яскравості зображення відносно власної флуоресценції клітини (аутофлуоресценції), яку приймали за нульову точку.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження ефективності взаємодії гідрофобних поліметинових барвників з ліпосомами ФХ у водних розчинах. На першому етапі роботи досліджували флуоресцентні властивості барвників, інкорпорованих в ліпідний бішар ліпосоми ФХ або у наноб'єм міцели ДСН, та здійснювали підбір композицій для флуоресцентного мічення органічних наноконтейнерів з метою дослідження їх взаємодії з біооб'єктами в динаміці.

Усі обрані барвники є гідрофобними. Вони добре розчиняються в органічних розчинниках, таких як ДМФА, хлороформ, етанол, та утворюють флуоресціюючі розчини. Додавання в розчин барвників в етанолі води, призводить до суттєвої трансформації спектрів поглинання (уширення спектру, зменшення інтенсивності, поява нових смуг) та повного гасіння флуоресценції. Подібна трансформація спектрів пояснюється утворенням у водних розчинах нелюмінесцюючих асоціатів барвників. Однак, у водних розчинах, що містять міцели ДСН або ліпосоми ФХ, спостерігається відновлення спектру поглинання та флуоресценції барвників, завдяки сольбілізації барвників міцелами або вбудові в ліпідний бішар ліпосом, що запобігає їх агрегації. Крім того, спектри виявляють довгохвильовий зсув (сольватохромний ефект), що для цих барвників вказує на їх менше полярне оточення. Про це свідчать також і часи загасання флуоресценції, які в неполярних середовищах є більш довгими, наприклад, для DiO в етанолі $\tau = 0,3$ нс, в міцелярному розчині $\tau = 0,44$ нс, у ліпосомах $\tau = 0,42$ нс. Для DiI ці значення становлять 0,37, 0,54 та 0,42 нс; для JC-9 - 0,57 нс, 0,75 та 0,84 нс, відповідно.

Ці дані однозначно свідчать про утворення комплексів "органічний барвник - наноконтейнер (міцела/ліпосома)". У роботі проведено дослідження ефективності комплексоутворення, для чого оцінено константи зв'язування органічних барвників DiO, DiI, DiD з ліпосомами ФХ та розраховано термодинамічні параметри комплексоутворення (енергія Гібса ΔG^0 , ентальпія ΔH^0 , ентропія ΔS^0). Константи зв'язування розраховано з використанням модифікованого рівняння Скотта:

$$\frac{[K][\Phi X]l}{A - A_0} = \frac{[K] + [\Phi X]}{\varepsilon - \varepsilon_0} + \frac{1}{K_{zg}(\varepsilon - \varepsilon_0)}, \quad (1)$$

де $[K]$ і $[\Phi X]$ - концентрація барвника та ФХ, відповідно; A , A_0 , ε , ε_0 - оптична густина розчину та коефіцієнт молярної екстинкції барвника не зв'язаного та зв'язаного з ліпосоною ФХ; K_{zg} - константа зв'язування; l - довжина оптичного шляху.

Константу зв'язування визначено графічно за залежністю $[K][\Phi X]l/(A - A_0)$ від $[K] + [\Phi X]$ для серії розчинів, що містять барвник постійної концентрації (1×10^{-6} М) при змінній концентрації ФХ (2×10^{-5} - 1×10^{-3} М). Для всіх барвників залежності виявились лінійними, що дозволило отримати константи зв'язування, розраховані за тангенсом кута нахилу прямих (Табл.1).

Термодинамічні параметри комплексоутворення (ΔG^0 , ΔH^0 та ΔS^0) були розраховані з використанням значення K_{zg} при різних температурах стандартними методами.

Аналіз отриманих параметрів дає змогу зробити висновок, що комплексоутворення "барвник - ліпосома ФХ" є енергетично вигідним процесом ($\Delta G^0 < 0$), який пов'язаний з переходом барвника у водних розчинах з агрегованої форми до мономерної при потраплянні в ліпідні бішари ліпосом. Позитивні значення ΔS^0 свідчать про гідрофобну взаємодію між барвниками та ліпосомами ФХ. У свою чергу негативні значення ΔH^0 вказують на наявність електростатичної взаємодії між барвниками та ліпосомами ФХ, однак, для того, щоб внесок цієї взаємодії був помітним, значення ΔH^0 повинно бути не на багато менше або дорівнювати нулю. Відносно великі значення ΔH^0 , отримані для комплексів, що досліджувались, можуть бути пов'язані з внеском ван-дер-ваальсових взаємодій у процес комплексоутворення. Отримані великі значення констант зв'язування K_{zg} (Табл.1) і розраховані долі барвників, що зв'язались з ліпосомами (0,97 – 0,99 %) свідчать про те, що процес комплексоутворення є дуже ефективним, а обрані флуоресцентні зонди – перспективні кандидати для флуоресцентного мічення наноконтейнерів.

Підбір FRET – композицій для флуоресцентного мічення наноконтейнерів. Для флуоресцентного мічення наноконтейнерів, застосувували

від одного барвника, до декількох різних барвників, між молекулами якими здійснюється FRET. Було здійснено також підбір тандемних барвників для створення FRET-композицій, вивчено ефективність FRET в наноб'ємі міцел ДСН та ліпосом ФХ та проведено порівняльний аналіз для пар барвників, які наведені в Табл.2.

Таблиця 1

Константи зв'язування та термодинамічні параметри комплексоутворення "барвник - ліпосома ФХ"

Барвник	T, (К)	$K_{зв}$, л·мол ⁻¹	ΔG° , кДж·мол ⁻¹	ΔH° , кДж·мол ⁻¹	ΔS° , Дж·мол ⁻¹ град ⁻¹
DiO	288	$7,16 \times 10^4$	-26,75	-15,64	38,56
	298	$5,0 \times 10^4$	-26,79		37,40
	308	$4,74 \times 10^4$	-27,55		38,66
	318	$3,68 \times 10^4$	-27,78		38,15
DiI	288	$13,6 \times 10^4$	-28,28	-20,71	26,29
	298	$9,4 \times 10^4$	-28,35		25,63
	308	$6,85 \times 10^4$	-28,49		25,26
	318	$6,13 \times 10^4$	-29,13		26,45
DiD	288	$10,0 \times 10^4$	-27,56	-6,71	72,40
	298	$8,38 \times 10^4$	-28,07		71,67
	308	$8,17 \times 10^4$	-28,94		72,19
	318	$7,57 \times 10^4$	-29,68		72,24

Параметрами, що аналізувались, були величина інтегралу перекриття спектру флуоресценції донора зі спектром поглинання акцептора (J , М⁻¹см³), ферстеровський радіус переносу для пар барвників (R_0 , Å), які визначались із спектральних даних за відомими рівняннями. Із спектрів флуоресценції за допомогою рівняння Штерна-Фольмера оцінювали ефективність гасіння флуоресценції донора при варіюванні концентрації акцептора ($K_{шф}$, М⁻¹):

$$F_0 / F = 1 + K_{шф} [Q], \quad (2)$$

де F_0 та F - інтенсивність флуоресценції донора у відсутності та за наявності акцептора відповідно, $[Q]$ - концентрація акцептора.

Ефективність FRET для кожної пари барвників оцінювали за гасінням флуоресценції донора $E = 1 - F / F_0$, а використовуючи рівняння $E = R_0^6 / (R_0^6 + r^6)$, розраховували відстань між донором та акцептором у наноб'ємі (r , Å). Отримані параметри наведено у Табл.2.

Було також проаналізовано вплив структури барвників та їх фізичних властивостей, а також розміру контейнера на ефективність FRET у парах барвників, за однакової концентрації барвників та ПАР у розчинах. Було встановлено, що в наноб'ємі міцел ДСН та ліпосом ФХ спостерігається ефективний безвипромінювальний перенос енергії електронного збудження не

тільки між барвниками, що мають відповідні значення J і R_0 (пари DiO/DiI, DiI/DiD, DiI/Sq-18) але й парами, які мають менш відповідні параметри (пари DiO/DiD, DiO/Sq-18), що пояснюється вимушеним концентруванням барвників у нанооб'ємі за малі вихідні концентрації барвників ($\sim 10^{-5}$ M).

Таблиця 2.

Параметри FRET і константи гасіння ($K_{ШФ}$) для пар барвників^{а)} у міцелах ДСН і ліпосомах ФХ

Донор	Акцептор	Інтеграл перекриття спектрів J , $M^{-1}cm^3 \times 10^{-13}$		Ферстеровський радіус R_0 , Å		Ефективність $FRET$ E , %		Відстань між донором та акцептором r , Å		Константа Штерна-Фольмера $K_{ШФ}$, $M^{-1} \times 10^5$	
		ДСН	ФХ	ДСН	ФХ	ДСН	ФХ	ДСН	ФХ	ДСН	ФХ
DiO	DiI	4.0	2.1	47	42	93	93	32	28	4.0	10.1
DiO	JC-9	1.0	1.2	37	38	32	90	42	25	0.2	6.0
DiO	DiD	0.6	0.2	34	29	66	86	30	21	2.3	5.12
DiO	Sq-18	0.1	0.008	25	17	54	80	24	13	0.4	3.5
DiI	DiD	5.3	2.1	44	39	92	93	29	25	3.8	13.2
DiI	Sq-18	2.0	0.3	37	27	57	86	35	20	0.4	6.5
JC-9	DiD	2.0	0.7	45	38	48	67	46	34	0.3	1.7
JC-9	Sq-18	0.5	0.07	36	25	10	27	52	30	0.03	0.4

^{а)}Концентрації барвників у всіх розчинах становлять 3×10^{-5} M.

Також показано, що здатність барвника JC-9 утворювати димери в міцелах та ліпосомах призводить до його низької ефективності як донора та акцептора енергії, тому в парах JC-9/DiD та JC-9/Sq18 FRET є не таким ефективним, як можна було очікувати виходячи з параметрів J і R_0 . Всупереч передбаченням, міжмолекулярна взаємодія між барвниками DiO та Sq-18 призводить до більш ефективного FRET як у міцелах, так і в ліпосомах для цієї пари, ніж це можна очікувати з розрахованих параметрів J і R_0 (Табл.2). Також привертає на себе увагу те, що параметри J і R_0 для всіх пар у ліпосомах ФХ є меншими, отримана ефективність FRET (E) у ліпосомах є більшою (Табл.2). Здійснені розрахунки концентрацій міцел ДСН ($d=5$ nm) та ліпосом ФХ ($d=100$ nm), а також співвідношень кількості молекул барвників, що припадає на 1 міцелу та ліпосому

показують, що у розчині кількість ліпосом є у 2000 разів меншою. Тобто, якщо за обрані концентрації барвників на одну міцелу припадає в середньому 2 молекули барвника, відстань між якими, враховуючи максимальне віддалення однієї від іншої, буде 50 Å, то на одну ліпосому припадає вже 3600 молекул, відстань між якими становить майже 44 Å. Ці розрахунки корелюють з даними, отриманими в експерименті для різних пар барвників. Як видно з Табл.2, величини r для пар барвників у ліпосомах менші, ніж у міцелах. Цей факт і пояснює більш ефективний FRET між парами барвників у ліпосомах ФХ, який суттєво залежить від відстані між донорами та акцепторами енергії електронного збудження.

На підставі отриманих результатів було розроблено композиції з двоступеневим каскадним FRET між трьома органічними барвниками для флуоресцентного маркування наноконтейнерів. Застосовуючи барвники з різною

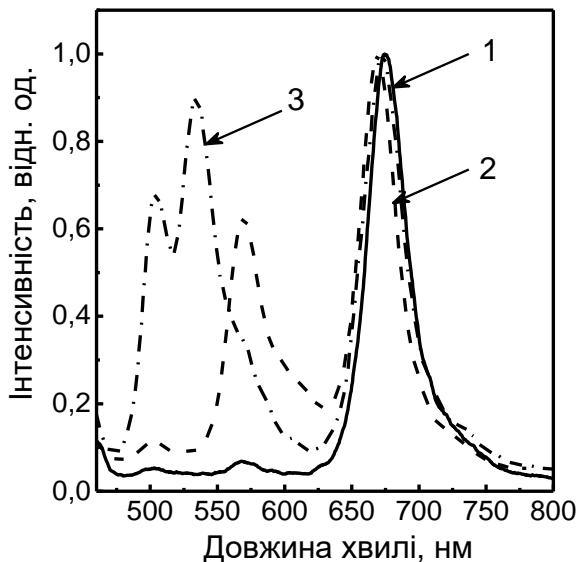


Рис.2. Спектри флуоресценції каскадних композицій в ліпосомах ФХ: DiO/DiI/DiD (1), DiO/DiI/Sq-18 (2) і DiO/JC-9/DiD (3). Концентрації кожного барвника 3×10^{-5} М. Спектри нормовані відносно флуоресценції другого акцептора.

ефективністю FRET можна здійснювати флуоресцентне маркування та кодування з набором різних спектральних смуг (рис.2) відповідно до завдань, що вирішуються у експерименті.

Застосування методу λ -ратіометрії й FRET-мічення ліпосом для візуалізації та дослідження взаємодії ліпосом з живими клітинами в динаміці. Другий етап дисертаційної роботи присвячено практичному використанню ідей, що були запропоновані вище. Розвинуто λ -ратіометричні підходи до детектування взаємодії FRET-мічених ліпосом із живими клітинами за допомогою мікроспектроскопії. Метод засновано на порівняльному аналізі сигналу флуоресценції на двох довжинах хвиль (максимумі випромінювання донора та акцептора відповідно). Основну ідею використання методу λ -ратіометрії проілюстровано на рис.3. Ліпосоми ФХ було помічено FRET-парою DiO (донор) /DiI (акцептор). При збудженні в смугу поглинання донора DiO завдяки FRET спостерігається інтенсивна смуга флуоресценції акцептора DiI з $\lambda_{\text{макс}}=570$ нм (рис.3, крива1), який на цій довжині хвилі майже не збуджується

(рис.3, крива 2). Якщо відбувається руйнування ліпідного бішару мембрани, наприклад, при додаванні до розчину органічного розчинника або при злитті ліпідної мембрани з мембраною клітини, це призводить до зменшення ефективної концентрації барвників та як наслідок призводить до збільшення відстані між донором (DiO) та акцептором (DiI), у спектрі спостерігається перерозподіл

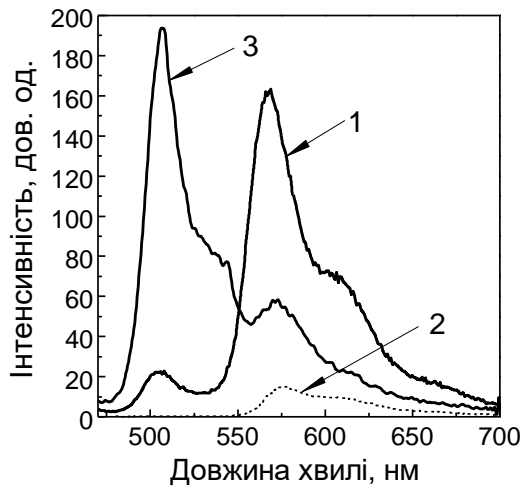


Рис.3. Спектри флуоресценції суспензії ліпосом: 1 – FRET-ліпосоми; 2 – DiI-мічені ліпосоми; 3 – FRET-ліпосоми у бінарному розчині ДМФА:вода (1:1).

інтенсивностей смуг донора ($\lambda_{\text{макс}}=506$ нм) та акцептора (рис.3, крива 3). Суттєву залежність ефективності FRET від відстані між донором та акцептором, яку можна детектувати в експерименті, тобто перерозподіл відносних інтенсивностей флуоресценції донора та акцептора енергії електронного збудження у FRET-композиціях було застосовано в якості "сигнальної системи" (λ -ратіометричного сигналу), що дозволило відстежити в динаміці процес взаємодії ліпосоми з живими клітинами.

Дослідження взаємодії FRET-ліпосом з клітинами різних типів і клітинними органелами. У дисертаційній роботі проводилось тестування запропонованої "сигнальної системи" на модельних системах мембран клітин та дослідження взаємодії FRET-мічених ліпосом з клітинами різних типів і клітинними органелами: ізольовані клітини гепатоцитів та клітини кісткового мозку щурів, культура фібробластів мишей та ізольовані ядра гепатоцитів щурів. Параметрами, що аналізувались, були відносна інтенсивність флуоресценції донора $I_{DiO}/(I_{DiO} + I_{DiI})$ та акцептора $I_{DiI}/(I_{DiO} + I_{DiI})$ у загальному сигналі флуоресценції як функція часу. Де I_{DiO} та I_{DiI} - інтенсивності флуоресценції DiO та DiI зареєстровані в максимумах відповідних смуг.

Аналіз перерозподілу в часі відносної інтенсивності смуг флуоресценції донора та акцептора та зміни загальної яскравості флуоресцентних зображень клітин різних типів та ядер гепатоцитів за різні часи інкубації з FRET-ліпосомами однозначно вказують на суттєві відмінності в характері взаємодії ліпосом із різним типом об'єктів (рис.4). Так, при інкубації *клітин гепатоцитів* з FRET-ліпосомами спостерігається поступове збільшення долі флуоресценції донора DiO в загальному сигналі флуоресценції, яке займає приблизно 4 години (рис.4 а, 4в,

крива 1), що пояснюється збільшенням відстані між донором та акцептором унаслідок злиття ліпідних мембран ліпосом з клітинною мембраною та виходом барвників у мембрану клітини. При більш тривалій інкубації гепатоцитів з FRET-ліпосомами (протягом 24 годин) не було виявлено будь-яких істотних змін у відносній інтенсивності флуоресценції барвників, що вказує на закінчення процесу виходу молекул барвників у клітинну мембрану (рис.4в, крива 1).

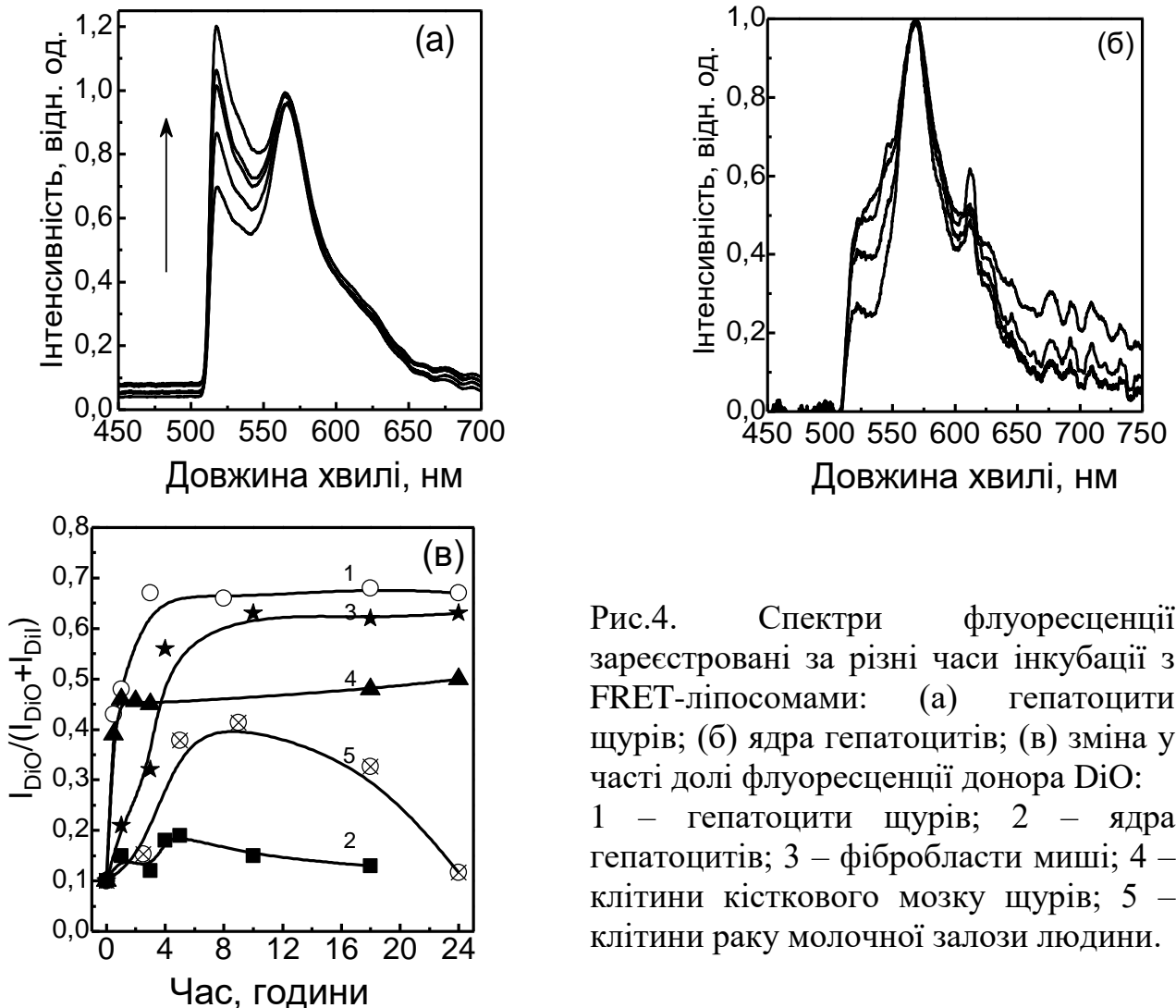


Рис.4. Спектри флуоресценції зареєстровані за різні часи інкубації з FRET-ліпосомами: (а) гепатоцити щурів; (б) ядра гепатоцитів; (в) зміна у часті долі флуоресценції донора DiO: 1 – гепатоцити щурів; 2 – ядра гепатоцитів; 3 – фібробласти миші; 4 – клітини кісткового мозку щурів; 5 – клітини раку молочної залози людини.

На відміну від клітин гепатоцитів, *ізолювані ядра*, незважаючи на те, що мають ядерну мембрану, не виявили помітного перерозподілу в часі відносних інтенсивностей флуоресценції донора й акцептора. За 20 годин спостереження параметр $I_{DiI} / (I_{DiO} + I_{DiI})$ практично не змінюється (рис.4б, 4в, крива 2). Відсутність перерозподілу в часі інтенсивності донора й акцептора на тлі збільшення загальної яскравості флуоресцентних зображень може свідчити про проникнення інтактних ліпосом у мембрану через ядерні пори.

Клітини фібробластів миші, - лінія, що виявляє динаміку накопичення ліпосом, схожу з динамікою накопичення ліпосом гепатоцитами, але трохи повільнішою в перші 3 години експерименту. Рис.4в, крива 3 показує поступове збільшення долі флуоресценції DiO $I_{DiO} / (I_{DiO} + I_{DiI})$ протягом приблизно 5 годин,

подальше збільшення часу інкубації клітин не призводить до значних змін у перерозподілі відносних інтенсивностей флуоресценції DiO та DiI.

Клітини кісткового мозку щурів виявляють різке збільшення відносної інтенсивності флуоресценції донора DiO $I_{DiO}/(I_{DiO} + I_{DiI})$ у загальному сигналі флуоресценції протягом першої години інкубації клітин з FRET-ліпосомами, що вказує на ефективну інтерналізацію ліпосом клітинами кісткового мозку в цей інтервал часу (рис.4в, крива 4). Але збільшення часу інкубації клітин з FRET-ліпосомами (до 24 годин) не призводить до подальшого перерозподілу відносних інтенсивностей флуоресценції DiO та DiI.

Отже, ми можемо зробити висновок, що FRET-маркування ліпосом надає змогу виявити відмінності в динаміці та ефективності їх взаємодії з клітинами, це пов'язано з різним складом компонентів плазматичних мембран клітин різних типів, їх різною в'язкістю, метаболічною та функціональною активністю клітин, а також, можливо, різними механізмами взаємодії ліпосом з клітинами різних типів. Отримані дані свідчать про чутливість запропонованої "сигнальної системи" до характеру взаємодії ліпосоми з різними типами клітинних мембран та можуть застосовуватися для її вивчення.

Дослідження взаємодії FRET-ліпосом з чутливими та резистентними клітинами раку молочної залози людини. FRET-маркування ліпосом на основі

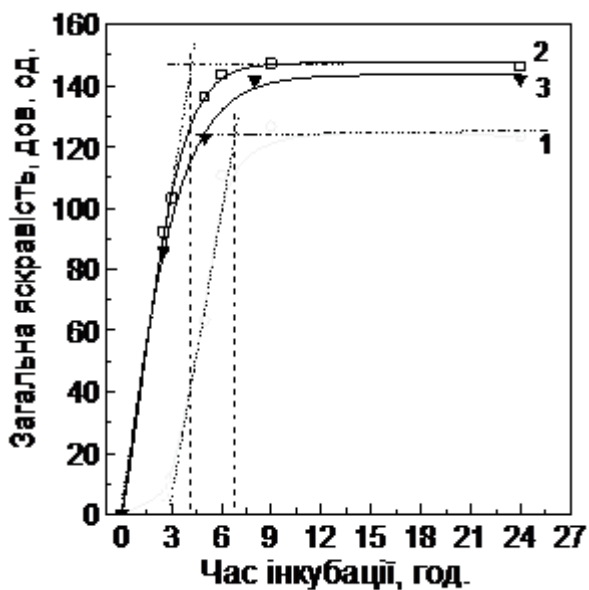


Рис.5. Зміна загальна яскравість зображень клітин в залежності від часу інкубації з FRET-ліпосомами: MCF-7 (1), MCF-7/Dox (2), MCF-7/DDP (3).

барвників DiO та DiI використовувалося в експериментах з дослідження взаємодії ліпосом з чутливими (MCF-7) та резистентними до доксорубіцину (MCF-7/Dox) та цисплатину (MCF-7/DDP) клітинами раку молочної залози людини. Ці експерименти було виконано спільно з Інститутом експериментальної патології, онкології та радіобіології ім. Р.П. Кавецького НАН України (Київ). Аналіз флуоресцентних зображень, перерозподілу відносної інтенсивності смуг донора та акцептора, зареєстровані в різні часові інтервали інкубації клітин з FRET-ліпосомами, а також зміни загальної яскравості зображень протягом інкубації (рис.5) дозволили встановити суттєву різницю в характері взаємодії з ліпосомами чутливих та резистентних клітин, особливо помітні на початковому етапі (0 - 4 часи інкубації) та при більш тривалій інкубації (10-24 години). Встановлено більш ефективну взаємодію резистентних MCF-7/Dox і MCF-7/DDP клітин з ліпосомами: час насичення клітин ліпосомами коротший (~ 4 год., для чутливих клітин ~7

год.), однак, кількість барвника, тобто ліпосом, що накопичились у клітинній мембрані, більше (рис.5). Швидкість виходу молекул барвників з ліпосом та ефективність їх інтерналізації клітинами є також більшими. Крім того, довгострокова інкубація чутливих клітин MCF-7 з FRET-ліпосомами приводить до відновлення FRET сигналу, тобто флуоресценції $DiO \ I_{DiO}/(I_{DiO} + I_{Dil})$ знову зменшується (рис.3в, крива 5). Для резистентних клітин цей ефект не спостерігається. Відновлення FRET-сигналу пояснюється концентруванням барвників у ендоцитозних везикулах клітини після їх інтерналізації, що викликає зменшення донорно-акцепторної відстані.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі було розроблено методи флуоресцентного мічення органічних наноконтейнерів (ліпосом і міцел) для їх візуалізації, "кодування" та моніторингу взаємодії з біологічними об'єктами в динаміці.

Основними науковими та практичними результатами є такі:

1. Встановлено, що у водних розчинах досліджені органічні барвники утворюють стійкі комплекси з молекулярними наноконтейнерами (ліпосомами) переважно за рахунок гідрофобної взаємодії. Комплекси «ліпосома – барвник» характеризуються значними константами зв'язування та майже 100% зв'язуванням барвників у розчинах, що дозволяє використовувати їх для FRET-мічення та кодування наноконтейнерів.

2. Знайдено, що концентрування кількох барвників в міцелі або в ліпосомі дозволяє створювати FRET-композиції для флуоресцентного мічення наноконтейнерів із різним набором смуг флуоресценції.

3. Показано, що при однакових вихідних концентраціях барвників у розчинах, що містять ліпосоми фосфатиділхоліну або міцели додецилсульфата натрію, FRET між парами барвників є більш ефективним у ліпосомах, що пов'язано з більшою локальною концентрацією барвників у ліпосомах, ніж у міцелах.

4. Експериментально доведено, що FRET-мічення наноконтейнерів дає змогу спостерігати взаємодію між ліпосомами та живими клітинами в динаміці, оскільки "сигнальна система" на базі явища FRET є дуже чутливою до зміни відстані між молекулами - донорами та акцепторами енергії електронного збудження, яка має місце при виході барвників з ліпідного бішару ліпосоми при її взаємодії з клітиною. Ця чутливість дозволяє відстежувати особливості взаємодії "ліпосома - клітина" для клітин, що характеризуються різним складом компонентів мембран клітин, їх різною функціональною та метаболічною активністю.

5. Розроблено методіку оцінювання накопичення флуоресцентних зондів у клітині за зміною загальної яскравості флуоресцентних зображень, що отримані за різні часи інкубування клітин із міченими ліпосомами.

6. Запропоновано метод λ -раціометричної оцінки ефективності взаємодії FRET-мічених наноконтейнерів із клітинами різних типів у динаміці з

використанням мікроспектроскопії, яка дозволяє уникнути ансамблевого усереднення та проводити дослідження на рівні поодиноких клітин або груп клітин. Метод може бути також адаптований для аналізу ефективності доставки активної речовини в живу клітину за допомогою пристроїв, що реєструють флуоресцентні сигнали на фіксованих довжинах хвиль (планшетні рідери, проточні цитофлуориметри, тощо).

ПЕРЕЛІК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Yefimova S.L. Nano-scale liposomal container with a “signal system” for substances delivering in living cells / S.L. Yefimova, A.S. Lebed', G.Ya. Guralchuk, A.V. Sorokin, **I.Yu. Kurilchenko**, N.S. Kavok, Yu.V. Malyukin // Biopolymers and Cell. - 2011. - V.27, № 1. - P.47-52. *(Автором опрацьована література за даною темою, досліджено можливість оснащення ліпосомних контейнерів «сигнальною системою» для відстеження взаємодії ліпосом з клітинами. Вивчено, із застосуванням FRET, процес входження гідрофобних флуоресцентних зондів у клітину гетатоцитів щурів, стаття підготовлена до друку).*
2. Yefimova S.L. Comparative study of dye-loaded liposome accumulation in sensitive and resistant human breast cancer cells / S.L. Yefimova, **I.Yu. Kurilchenko**, T.N. Tkacheva, V.A. Rozhkov, A.V. Sorokin et al. // Experimental Oncology. - 2012. - V.34, № 2. - P. 101-106. *(Автором опрацьована література за даною темою, було проведено дослідження ефективності взаємодії FRET-мічених ліпосом з чутливими та резистентними клітинами рака молочної залози людини, стаття підготовлена до друку).*
3. **Курильченко І.Ю.** Исследование взаимодействия гидрофобных полиметиновых красителей с липосомами в водных растворах методом оптической спектроскопии / И.Ю. Курильченко, С.Л. Ефимова, Т.Н. Ткачева, Н.С. Кавок, А.В. Сорокин, Ю.В. Малюкин // Біофізичний Вісник. – 2012. – 28, № 1. – С.20-29. *(Автором опрацьована література за даною темою, за допомогою методу оптичної спектроскопії досліджено взаємодію барвників з ліпосомами ФХ, розраховані константи зв'язування барвників з ліпосомами ФХ та термодинамічні параметри утворення комплексів, стаття підготовлена до друку).*
4. Ефимова С.Л. Спектроскопия взаимодействия молекул красителей в нанобъеме / С.Л. Ефимова, Т.Н. Ткачева, **И.Ю. Курильченко**, А.В. Сорокин, Ю.В. Малюкин // Журнал прикладной спектроскопии. - 2012. - Т.79, № 6. – С.913-920. *(Автором опрацьована література за даною темою, здійснений підбір барвників для створення FRET-композицій в наноб'ємі міцел ДСН та ліпосом ФХ, проаналізовано вплив структури барвників та їх фізичних властивостей на ефективність FRET, стаття підготовлена до друку).*
5. Yefimova S. L. Microspectroscopic study of liposome-to-cell interaction revealed by Förster resonance energy transfer / Svetlana L. Yefimova, **Irina Yu. Kurilchenko**, Tatyana N. Tkacheva, Nataliya S. Kavok, Igor N.Todor, Nataliya Yu. Lukianova,

- Vasyl F.Chekhun, Yuriy V. Malyukin // Journal of Fluorescence. – 2014. – v.24, № 2. – P. 403-409. *(Автором опрацьована література за даною темою, проведене дослідження взаємодії наноконтейнерів з живими клітинами, в тому числі і клітинами рака молочної залози людини, стаття підготовлена до друку).*
6. Масалов А.А. Особенности люминесценции в нанодисперсных материалах / А.А. Масалов, А.В. Сорокин, С.Л. Ефимова, **И.Ю. Курильченко**, Ю.В. Малюкин // Наноструктурное материаловедение. - 2011. - №1. С.- 3-15. *(Автором опрацьована література за даною темою, проведено дослідження що до особливостей взаємодії флуорофорів в наноб'ємі та явища FRET між ними, стаття підготовлена до друку).*
 7. Ефимова С.Л. Флуоресцентное мечение наноразмерных контейнеров для доставки веществ внутрь живой клетки / С.Л. Ефимова, Т.Н. Ткачева, **И.Ю. Курильченко**, А.В. Сорокин // Сб. «Функциональные материалы для сцинтилляционной техники и биомедицины» - Харьков: ИСМА, 2012. – С.305-323. *(Автором опрацьована література за даною темою, проаналізовані вимоги до вибору тандемних флуорофорів для створення багато каскадних FRET-композицій, стаття підготовлена до друку).*
 8. Yefimova S.L. Fluorescence resonance energy transfer as a tool to study dye-to-dye interaction in nano-scale volume / S.L. Yefimova, T.N. Tkacheva, **I.Yu. Kurilchenko**, I.A. Borovoy, A.V. Sorokin, Yu.V. Malyukin // XX International School-Seminar of Galyna Puchkovska "Spectroscopy of Molecules and Crystals", 20-27 September 2011: book of abstract - Crimea (Ukraine), 2011. - P.166. *(Автором опрацьована література за даною темою, досліджено взаємодію органічних барвників в наноконтейнерах, липосомах ФХ та міцелах ДСН, стаття підготовлена до друку).*
 9. Ткачева Т.Н. Флуоресцентное мечение наноразмерных "контейнеров"/ Т.Н. Ткачева, **И.Ю. Курильченко**, С.Л. Ефимова, А.В. Сорокин, Ю.В. Малюкин // ЛЮМКОС: Вторая научно-техническая конференция "Люминесцентные процессы в конденсированных средах", 14-18 ноября 2011: Сборник тезисов докладов - Харьков (Украина), 2011. - С.21. *(Автором опрацьована література за даною темою, підібрані оптимальні концентрації флуорофорів для мічення наноконтейнерів, стаття підготовлена до друку).*
 10. Чехун В.Ф. Использование флуоресцентной микроскопии и микроспектроскопии для визуализации взаимодействия липосом с чувствительными и резистентными опухолевыми клетками / В.Ф. Чехун, Н.Ю. Лукьянова, Н.О. Безденежных, И.Н. Тодор, С.Л. Ефимова, **И.Ю. Курильченко**, Т.Н. Ткачева, Ю.В. Малюкин // XII съезд онкологов Украины, 20-22 сентября 2011, Киев (Украина): Спец. выпуск II журнала "Клиническая онкология. - Морион, Киев (Украина), 2011. - С. 707. *(Автором опрацьована література за даною темою, досліджено що резистентні клітини MCF-7/DOX та DCF-7/DDP більш ефективно взаємодіють з липосомами, стаття підготовлена до друку).*

11. Yefimova S.L. Fluorescent labeling of nano-scale carriers for studying the nanocarrier interaction with living cells in dynamics / Yefimova S.L., Tkacheva T.M., Sorokin A.V., **Kurilchenko I.Yu.**, Malyukin Yu.V. // 9-th International Conference “Electronic processes in organic materials”, May 20-24 2013: Book of abstract.- Lviv (Ukraine), 2013. – p. 27. (*Автором опрацьована література за даною темою, проаналізовано можливість використання методу λ-раціометрії для оцінки ефективності взаємодій наноконтейнерів з клітинами різних типів*).

АНОТАЦІЯ

Курільченко І.Ю. Флуоресцентне мічення нанорозмірних контейнерів для візуалізації їх взаємодії з біологічними об'єктами. – на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата біологічних наук за спеціальністю 03.00.20 – біотехнологія. – Інститут біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України, Київ, 2016.

Дисертаційну роботу присвячено розробці методу флуоресцентного маркування нанорозмірних контейнерів (ліпосоми та міцели ПАР) для довгострокового моніторингу їх взаємодії з живими клітинами в експериментах *in vitro*. Метод засновано на використанні явища безвипромінювального перенесення енергії електронного збудження (Förster Resonance Energy Transfer, FRET) між декількома флуоресцентними зондами, що інкорпоровані в наноконтейнер, та λ-раціометричної детекції сигналу флуоресценції донора та акцептора енергії електронного збудження із застосуванням мікроспектроскопії. У роботі детально вивчено взаємодію флуоресцентних зондів (молекул поліметинових та скварайнового барвників) та FRET між барвниками в наноб'ємі ліпосом фосфатиділхоліну (ФХ) та міцел додецилсульфата натрію (ДСН). Встановлено, що при створенні FRET-композицій для маркування наноконтейнерів треба враховувати здатність флуоресцентних зондів взаємодіяти один з одним у наноб'ємі, що може впливати на їх спектроскопічні властивості. Розроблено методику оцінки накопичення флуоресцентних зондів у клітинах за зміною загальної яскравості зображень. Продемонстровано, що FRET-маркування ліпосом надає змогу виявити відмінності в динаміці та ефективності взаємодії наноконтейнерів із клітинами, що пов'язано з різним складом компонентів плазматичних мембран клітин різних типів, їх різною в'язкістю, метаболічною та функціональною активністю клітин.

Ключові слова: наноконтейнер, флуоресцентний зонд, безвипромінювальне перенесення енергії електронного збудження, мікроспектроскопія

АННОТАЦИЯ

Курильченко И.Ю. Флуоресцентное мечение наноразмерных контейнеров для визуализации их взаимодействия с биологическими объектами. – на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Институт биохимии м. А.В. Палладина НАН Украины, Киев, 2016.

Диссертационная работа посвящена разработке метода флуоресцентного мечения наноразмерных контейнеров (липосомы и мицеллы ПАВ), используемых для доставки лекарственных или диагностических соединений внутрь живой клетки, для долгосрочного мониторинга взаимодействия наноконтейнера с клетками в экспериментах *in vitro*. Метод основан на использовании явления безызлучательного переноса энергии электронного возбуждения (Förster Resonance Energy Transfer, FRET) между несколькими флуоресцентными зондами, инкорпорированными в наноконтейнеры, и λ -рatiометрической детекции сигнала флуоресценции донора и акцептора энергии электронного возбуждения с применением микроспектроскопии. В работе детально изучено взаимодействие флуоресцентных зондов (молекул полиметиновых и сквараинового красителей) и FRET между красителями в нанобъеме липосом фосфатидилхолина (ФХ) и мицелл додецилсульфата натрия (ДСН). Установлено, что в водных растворах исследованные органические красители образуют устойчивые комплексы с молекулярными наноконтейнерами (липосомами) преимущественно за счет гидрофобного взаимодействия, характеризующиеся почти 100% связыванием красителей. Показано, что концентрирование нескольких красителей в нанобъеме мицеллы или липосомы позволяет создавать FRET-композиции с разным набором полос флуоресценции в зависимости от эффективности FRET. Установлено, что при создании FRET-композиций для мечения наноконтейнеров необходимо учитывать способность флуоресцентных зондов взаимодействовать друг с другом в нанобъеме, что может влиять на их спектроскопические свойства. Разработана методика оценки накопления флуоресцентных зондов в клетках по изменению общей яркости флуоресцентных изображений.

Продемонстрировано, что FRET-мечение наноконтейнеров позволяет отслеживать взаимодействие липосом с живыми клетками в динамике, поскольку «сигнальная система» на основе явления FRET является очень чувствительной к изменению расстояния между донорами и акцепторами энергии электронного возбуждения, которое имеет место при выходе красителей из липидного бислоя липосомы при взаимодействии с клеткой. Эта чувствительность позволяет отслеживать особенности взаимодействия «липосома – клетка» для клеток, которые характеризуются разным составом компонентов клеточной мембраны, разной функциональной и метаболической активностью.

Ключевые слова: наноконтейнер, флуоресцентный зонд, безызлучательный перенос энергии электронного возбуждения, микроспектроскопия

ABSTRACT

Kurilchenko I.Yu. Fluorescent labeling of nano-scale carriers for tracing their interaction with biological objects. – Right of manuscript.

Thesis for the scientific degree of Candidate of Biological Sciences by speciality 03.00.20 – biotechnology. – O.V. Palladin Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, 2016

The thesis is devoted to the development of the method of fluorescent labeling of nano-scale carriers (surfactant liposomes and micelles) for long-time tracing of the nanocarriers interaction with living cells *in vitro* experiments. The method is based on the effect of Förster Resonance Energy Transfer (FRET) between several fluorescent probes preloaded in the nanocarrier and λ -ratiometric detection of energy donor and acceptor fluorescence signals using microspectroscopy technique. The interaction of fluorescent probes (polymethine and squaraine dyes) interaction in a nanovolume of phosphatidylcholine (PC) liposomes and sodium dodecylsulfate (SDS) micelles has been studied in detail. It has been found that the ability of the fluorescent probes to interact with each other in the nanovolume should be taken into consideration for creation of labeling FRET-pairs. The evaluation methods for fluorescent probes accumulation in cells using total fluorescent image brightness has been developed. It has been shown that liposome FRET-labeling allows the differences in dynamics and efficiency of the nanocarriers interaction with cells to be detected, which associated with the different composition of cell plasma membranes for different cells, their different viscosity, cell metabolic and functional activity.

Key words: nano-scale carrier, fluorescent probe, Förster Resonance Energy Transfer, microspectroscopy