

На правах рукописи

Цюпка Дарья Владиславовна

**Тушение люминесценции квантовых точек
митоксантроном:
закономерности и аналитическое применение**

1.4.2. Аналитическая химия
1.4.4. Физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Саратов — 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Горячева Ирина Юрьевна

Официальные оппоненты:

Шишов Андрей Юрьевич
доктор химических наук, доцент, профессор кафедры аналитической химии Института химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет»

Прихожденко Екатерина Сергеевна

кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник — заведующий лабораторией медицинского оборудования в области ин витро диагностики Института биофизики будущего Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный технический университет»

Защита состоится 12 февраля 2026 года в 14 часов 00 мин. на заседании диссертационного совета 24.2.392.03, созданного на базе ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского» по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83, корп. 1, Институт химии СГУ.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке имени В.А. Артисевич ФГБОУ ВО «СГУ имени Н.Г. Чернышевского» (410012, г. Саратов, ул. Университетская, д. 42) и на сайте <https://www.sgu.ru/research/dissertation-council/24-2-392-03/kandidatskaya-dissertaciya-syurka-d-v>

Автореферат разослан «___» _____ 2025 года

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор химических наук, доцент

Русанова Татьяна Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Аналитические решения, основанные на явлении тушения люминесценции, представляют собой мощный инструмент современной аналитической химии. Их ключевые преимущества — высокая чувствительность, обусловленная регистрацией изменения сигнала на фоне низкого шума, экспрессность и простота технической реализации. Это открывает перспективы для определения широкого круга соединений, особенно в системах с предсказуемой матрицей, где влияние конкурентных процессов тушения может быть учтено или исключено.

Существенного повышения эффективности методик люминесцентного детектирования удается достичь за счет использования полупроводниковых нанокристаллов — квантовых точек (**КТ**). КТ обладают комплексом фотофизических свойств, по многим параметрам превосходящих характеристики традиционных органических люминофоров. Широкополосное поглощение, узкое симметричное испускание, исключительная фотостабильность и высокий квантовый выход (**КВ**) люминесценции позволяют значительно повысить чувствительность, воспроизводимость и надежность анализа на основе тушения люминесценции.

Практическая значимость разработки таких высокочувствительных методик ярко проявляется в задаче определения различных классов соединений. Митоксантрон (**МИТ**) — синтетический цитостатический препарат из группы антрациклиновых антибиотиков, разработанный как аналог доксорубицина со схожим механизмом действия, но потенциально меньшей кардиотоксичностью. Однако, как и многие цитостатики, МИТ вызывает серьезные побочные эффекты из-за воздействия на здоровые клетки и вариабельности фармакокинетики у разных пациентов. Высокая стоимость и трудоемкость хроматографии — «золотого стандарта» — ограничивают ее применение для персонализации терапии. Это создает потребность в альтернативных методах, одним из которых может стать подход на основе тушения люминесценции КТ.

Таким образом, проведение систематического исследования, направленного на установление механизма тушения люминесценции КТ под действием МИТ, является актуальной междисциплинарной задачей. Полученные фундаментальные знания о природе и закономерностях данного взаимодействия станут основой для целенаправленной разработки селективной и чувствительной аналитической методики, применимой в реальных условиях. Решение этой задачи позволит не только углубить фундаментальные знания о механизмах взаимодействия «наноматериал-лекарство» на стыке физической и аналитической химии, но и создать практический инструмент для определения МИТ в биологических средах с высокой чувствительностью и небольшим временем анализа.

Цель диссертационной работы состояла в выявлении закономерностей тушения люминесценции квантовых точек (**КТ**) митоксантроном (**МИТ**) и разработке способа его определения в плазме крови человека. Для достижения поставленной цели решены следующие задачи:

- Установить количественные характеристики и закономерности тушения люминесценции КТ (тройные AgInS/ZnS, сплавные CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS с различными поверхностными лигандами) в присутствии МИТ путем изучения кинетики в стационарном и время-разрешенном режимах;
- Исследовать влияние химической природы поверхностного лиганда КТ CdZnSeS/ZnS (тиогликолевая (**ТГК**), меркаптопропионовая (**МПК**) и дигидролипоевая (**ДГЛК**) кислоты) на эффективность тушения люминесценции в присутствии МИТ в водной среде и плазме крови;
- Сравнить количественные характеристики тушения люминесценции различных типов КТ в присутствии МИТ и определить наиболее перспективные КТ для последующего применения в анализе;
- Разработать и аprobировать методику определения МИТ в образцах плазмы крови, валидировать методику высокоэффективной жидкостной хроматографии с УФ-детектированием (**ВЭЖХ-УФ**).

Методы исследования. Для решения поставленных в работе задач применяли комплекс физико-химических и биологических методов исследования: люминесцентную спектроскопию (стационарную и время-разрешенную), абсорбционную спектрофотометрию, метод динамического и электрофоретического рассеяния света, ВЭЖХ–УФ для валидации методики на реальных образцах, цитотоксический анализ для оценки биобезопасности наночастиц, а также другие методы, например, просвечивающую электронную (ПЭМ) и оптическую микроскопию.

Научная новизна исследования состоит в следующем:

- Проведено сравнительное исследование механизма тушения люминесценции КТ (тройных AgInS/ZnS, сплавных CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS с различными поверхностными лигандами) в присутствии МИТ. Установлены количественные характеристики взаимодействия (константы связывания, тушения), выявлены ключевые закономерности влияния химического состава ядра и природы лиганда на эффективность тушения; оценены вклады статического и динамического тушения;
- Изучено влияние биологической матрицы (плазмы крови человека) на процесс тушения люминесценции КТ МИТ. Установлен характер и степень матричных эффектов, разработаны подходы к их учету и нивелированию, что позволило обеспечить определение МИТ без трудоемкой пробоподготовки;

— Установлена корреляция «структура-свойство» для КТ различного химического состава, что позволяет целенаправленно выбирать и проектировать наноматериалы для создания методик определения других биологически активных молекул.

Практическая значимость работы:

— Разработана и валидирована люминесцентная методика определения МИТ в плазме крови человека с высокой чувствительностью, селективностью и воспроизводимостью на основе тушения люминесценции КТ CdZnSeS/ZnS, стабилизированных ДГЛК; показана сопоставимость результатов с референтным методом ВЭЖХ–УФ;

— Продемонстрирована возможность прямого определения МИТ в сложной биологической матрице (плазме крови человека) с минимальной пробоподготовкой, что упрощает и ускоряет процедуру анализа по сравнению с хроматографическими методами;

— Оценена цитотоксичность КТ и продемонстрирована возможность их безопасного применения в качестве аналитических реагентов в клинической лабораторной диагностике, что является необходимым этапом для дальнейшего внедрения разработанного метода в практику;

— Полученные результаты могут быть использованы в клинической практике для мониторинга концентрации МИТ в крови пациентов, получающих химиотерапию, а также в научных исследованиях для изучения взаимодействия лекарственных препаратов с наноматериалами.

На защиту автор выносит:

I. Результаты сравнительного исследования тушения люминесценции КТ (AgInS/ZnS и CdZnSeS, CdZnSeS/ZnS) МИТ, установленные количественные характеристики их взаимодействия (константы связывания, тушения) и предложенную схему взаимодействия КТ и МИТ.

II. Критерии выбора перспективных КТ для определения МИТ на основе влияния химической природы поверхностного лиганда (МПК, ДГЛК, ТГК) КТ CdZnSeS/ZnS на эффективность тушения их люминесценции МИТ, а также результаты оценки влияния плазмы крови на аналитический сигнал.

III. Разработанную и валидированную методику определения МИТ в плазме крови человека на основе тушения люминесценции КТ CdZnSeS/ZnS с поверхностным лигандом ДГЛК, аналитические характеристики и результаты апробации на реальных образцах и сравнения с референтным методом ВЭЖХ-УФ, подтверждающие применимость методики.

Личный вклад соискателя заключается в: постановке основных целей и задач исследования; планировании и непосредственном проведении экспериментов, включая получение, обработку и интерпретацию спектроскопических данных (стационарная и времязарезщенная люминесценция, УФ-видимая спектроскопия); построении графических зависимостей (Штерна-Фольмера и др.), расчете констант связывания и тушения; обработке

кинетических данных; изучении взаимодействия КТ и МИТ в модельных средах и плазме крови; оценке цитотоксичности; разработке и валидации люминесцентной методики определения МИТ; статистической обработке аналитических данных; обобщении и анализе всех полученных результатов, формулировании выводов; представлении результатов на всероссийских и международных конференциях; написании текста диссертации и подготовке научных публикаций по теме работы.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 работ в изданиях, входящих в перечень ВАК, библиографические базы данных Web of Science и Scopus, ряд материалов конференций.

Достоверность полученных результатов подтверждается применением комплекса современных физико-химических и аналитических методов исследования, соответствием между полученными результатами, а также отсутствием противоречий с литературными данными, апробацией полученных данных на всероссийских и международных конференциях, публикацией основных положений диссертационного исследования в профильных высокорейтинговых реферируемых журналах.

Апробация работы. Основные результаты диссертационного исследования были доложены на всероссийских и международных конференциях: Saratov Fall Meeting-23,25: «International Symposium Optics and Biophotonics» (Россия, Саратов, 2023 и 2025); Всероссийская конференция с международным участием «Биохимия человека 2024» (Россия, Москва, 2024); VII Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием (Россия, Краснодар, 2025); Ежегодная Всероссийская научная школа-семинар «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине - 2025» (Россия, Саратов, 2025).

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературных данных, экспериментальной части, изложения полученных результатов и их обсуждения (3 главы), заключения и списка литературных источников. В тексте содержатся таблицы, схемы, диаграммы и графические иллюстрации. Работа представлена на 138 страницах, включает 33 рисунка и 9 таблиц.

Финансовая поддержка осуществлялась в рамках гранта Российского фонда фундаментальных исследований «Углеродные наночастицы и материалы на их основе» (№ 16–13–10195), «Разработка методов определения концентрации цитостатических препаратов в биологических жидкостях и системах контролируемого высвобождения» (№ 21–73–10046), «Аналитические люминесцентные методы для отслеживания релиза инкапсулированного доксорубицина» (№ 23–13–00380), и стипендии Президента Российской Федерации для аспирантов и адъюнктов (SPN.2024.01080).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обоснована актуальность проведенных исследований, сформулированы основные цели и задачи, описана научная новизна и практическая значимость полученных результатов, а также сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

В **Главе 1** представлен анализ литературных данных, посвященный полупроводниковым КТ и явлению тушения люминесценции. Подробно рассмотрены методы синтеза и модификации поверхности КТ, их люминесцентные свойства и классификация. Приведен обзор механизмов тушения люминесценции и существующих примеров применения КТ в аналитических системах на основе этого явления. Особое внимание уделено МИТ как перспективному объекту для анализа и существующим методам его определения.

В **Главе 2** приведены сведения об использованных реагентах, материалах и оборудовании. Подробно описаны методики исследования тушения люминесценции КТ в присутствии МИТ, включая спектрофотометрию, анализ времени жизни люминесценции и работу с биологическими образцами. Описаны подходы к расчету параметров тушения и аналитических характеристик, а также оценка цитотоксичности КТ.

Глава 3 посвящена изучению влияния химического состава и размеров КТ на эффективность тушения их люминесценции в присутствии МИТ. В ходе исследования проведено сравнительное изучение различных типов наноматериалов: тройных КТ AgInS/ZnS, синтезированных водным методом, и сплавных КТ CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS, полученных высокотемпературным металлоорганическим синтезом. Для КТ AgInS/ZnS дополнительно проведено фракционирование, позволившее получить серию образцов с размерами от 4 до 7 нм и максимумами люминесценции в диапазоне 558–630 нм (рис. 1). В качестве поверхностных лигандов использовали молекулы ТГК, содержащие тиоловые группы для связывания с поверхностью КТ карбоксильные группы для стабилизации в водной среде и формирования монослойного гидрофильного покрытия. КТ AgInS/ZnS и CdZnSeS/ZnS обладают высокой колloidной стабильностью и отрицательным зарядом (табл. 1).

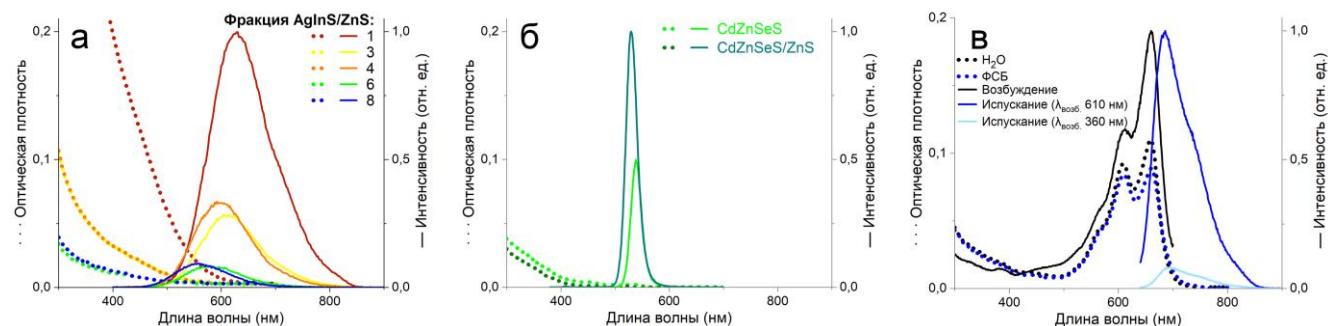


Рисунок 1. Спектры поглощения и испускания ($\lambda_{\text{возб.}} = 360 \text{ нм}$) (а) фракций КТ AgInS/ZnS; (б) сплавных КТ CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS; (в) спектры поглощения в воде и ФСБ, испускания ($\lambda_{\text{возб.}} = 360 \text{ и } 610 \text{ нм}$) и возбуждения ($\lambda_{\text{исп.}} = 685 \text{ нм}$) МИТ. Пунктирная линия — спектры поглощения, сплошная — испускания и возбуждения.

Таблица 1. Характеристики КТ AgInS/ZnS, CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS

Образец КТ	Размер ^a , нм	ζ -потенциал ^b , мВ	$\lambda_{\text{исп.}}^{\text{в}}$, нм	КВ ^г , %	$E_g^{\text{д}}$, эВ
AgInS/ZnS					
1 ^e	7±0,3	-35±6	630	28	2,40
3	7±0,3	-41±5	606	32	2,44
4	6±0,3	-43±7	592	38	2,48
6	4±0,2	-55±5	578	43	2,51
8	4±0,2	-60±7	558	18	2,61
CdZnSeS	6±0,4	-30±10	538	42	5,25
CdZnSeS/ZnS	7±0,2	-32±11	532	57	5,30

Примечания:

а — значения диаметра по данным ПЭМ;

б — на основе данных электрофоретического рассеяния света;

в — $\lambda_{\text{возб.}} = 360$ нм;

г — относительный КВ рассчитан с использованием кумарина 153 (КВ = 0,53) в качестве стандарта;

д — оптическая ширина запрещенной зоны;

е — номер фракции AgInS/ZnS.

Установлено, что все исследованные КТ демонстрируют концентрационно-зависимое тушение люминесценции при добавлении МИТ в диапазоне 1–5000 нМ, при этом форма спектра и длина волны максимума испускания остаются неизменными. Это свидетельствует о том, что структура нанокристаллов КТ не изменяется. Для определения констант Штерна-Фольмера (K_{SF}) выбраны диапазоны концентраций МИТ 1–1000 нМ для фракций КТ AgInS/ZnS и 1–500 нМ для КТ CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS ($R^2 > 0,97$), поскольку при более высоких концентрациях МИТ наблюдаются отклонения от линейности (рис. 2).

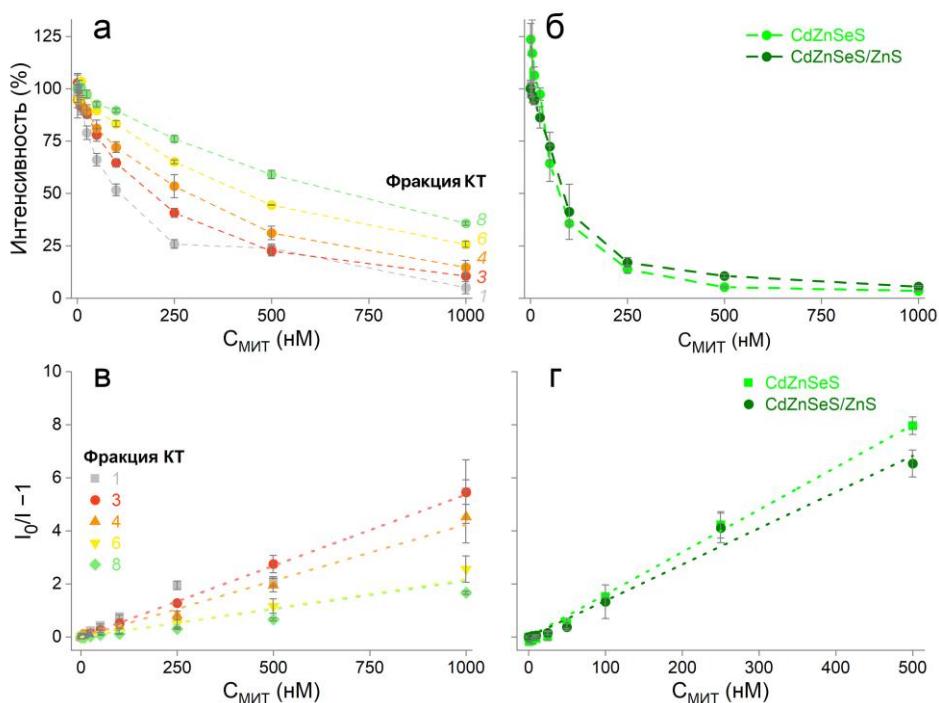


Рисунок 2. Профили тушения люминесценции (а, б), графики Штерна-Фольмера (в, г) фракций КТ AgInS/ZnS (слева), CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS (справа) в присутствии МИТ.

Для фракций AgInS/ZnS K_{SV} составили $(0,16\text{--}0,54)\times 10^7 \text{ M}^{-1}$ (табл. 2), причем значение K_{SV} снижается с уменьшением размера нанокристаллов. Для КТ CdZnSeS на низких концентрациях МИТ (1–10 нМ) наблюдается увеличение интенсивности люминесценции, связанное, предположительно, с пассивацией поверхностных дефектов. Для КТ CdZnSeS/ZnS наблюдается наибольшая эффективность тушения в присутствии МИТ ($K_{SV} = 1,4\times 10^7 \text{ M}^{-1}$).

Таблица 2. Константы Штерна-Фольмера ($K_{sv}\times 10^{-7}, \text{ M}^{-1}$)

Фракция AgInS/ZnS					CdZnSeS	CdZnSeS/ZnS
1	3	4	6	8		
$0,54\pm 0,02$	$0,54\pm 0,01$	$0,43\pm 0,02$	$0,25\pm 0,01$	$0,160\pm 0,002$	$1,6\pm 0,2$	$1,4\pm 0,2$

Для установления механизма тушения люминесценции исследовали изменение времени жизни люминесценции КТ при различных концентрациях тушителя. В случае статического тушения время жизни люминесценции в присутствии тушителя не изменяется ($\tau_0/\tau=1$), а зависимость I_0/I от концентрации тушителя линейна во всем диапазоне. Для всех фракций КТ AgInS/ZnS изменения времени жизни в отсутствие и присутствии МИТ оказались статистически незначимыми (рис. 3а). Во всем диапазоне концентраций МИТ отношение τ_0/τ составило $1,03\pm 0,04$, что указывает на незначительные изменения времени жизни люминесценции КТ. Эти данные указывают на преимущественно статический механизм тушения для всех фракций КТ AgInS/ZnS.

Для КТ CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS изменения времени жизни люминесценции наблюдались во всем диапазоне концентраций МИТ (рис. 3б). Для КТ CdZnSeS при 5 нМ МИТ отмечено увеличение времени жизни люминесценции (аналогично интенсивности испускания), а затем (>10 нМ МИТ) уменьшение. Полученные данные предполагают наличие динамического механизма тушения, однако рассчитанные бимолекулярные константы тушения (k_q) имеют высокий порядок значений ($\approx 10^{14} \text{ M}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$), что значительно превышает теоретический предел константы для водных растворов ($\approx 10^{10} \text{ M}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$). Это расхождение свидетельствует о минимальном вкладе динамического тушения и подтверждает преобладание статического механизма.

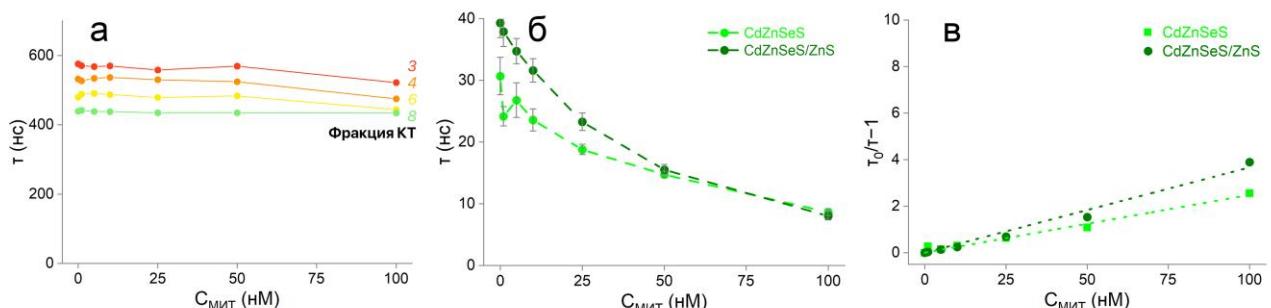


Рисунок 3. Изменение времени жизни люминесценции (а) для фракций КТ AgInS/ZnS, (б) КТ CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS в присутствии МИТ и (в) графики Штерна-Фольмера.

На основании анализа литературных данных и полученных экспериментальных результатов можно сделать вывод, что доминирующим механизмом является фотоиндуцированный перенос электрона (ФПЭ), а не резонансный перенос энергии. Это подтверждается: 1) окислительно-восстановительными свойствами МИТ как акцептора электронов; 2) отсутствием достаточного спектрального перекрытия между люминесценцией КТ и поглощением МИТ; 3) статическим характером тушения с аномально высокими значениями k_q , характерными для ФПЭ.

Для количественной оценки взаимодействия между КТ и МИТ были рассчитаны константы связывания ($K_{св}$), используя метод тушения люминесценции (двойное логарифмическое уравнение Штерна-Фольмера). Рассчитанные $K_{св}$ для КТ с МИТ имеют высокие значения $\approx 10^7 \text{ M}^{-1}$, превышают $K_{св}$ для систем МИТ–альбумин и МИТ–ДНК. То есть, между КТ и МИТ может образоваться более сильный комплекс, что потенциально будет ингибировать взаимодействие с белками, ДНК и другими компонентами биологических жидкостей. Предположительно МИТ может преимущественно связываться с КТ, создавая предпосылки для его аналитического определения в биожидкостях.

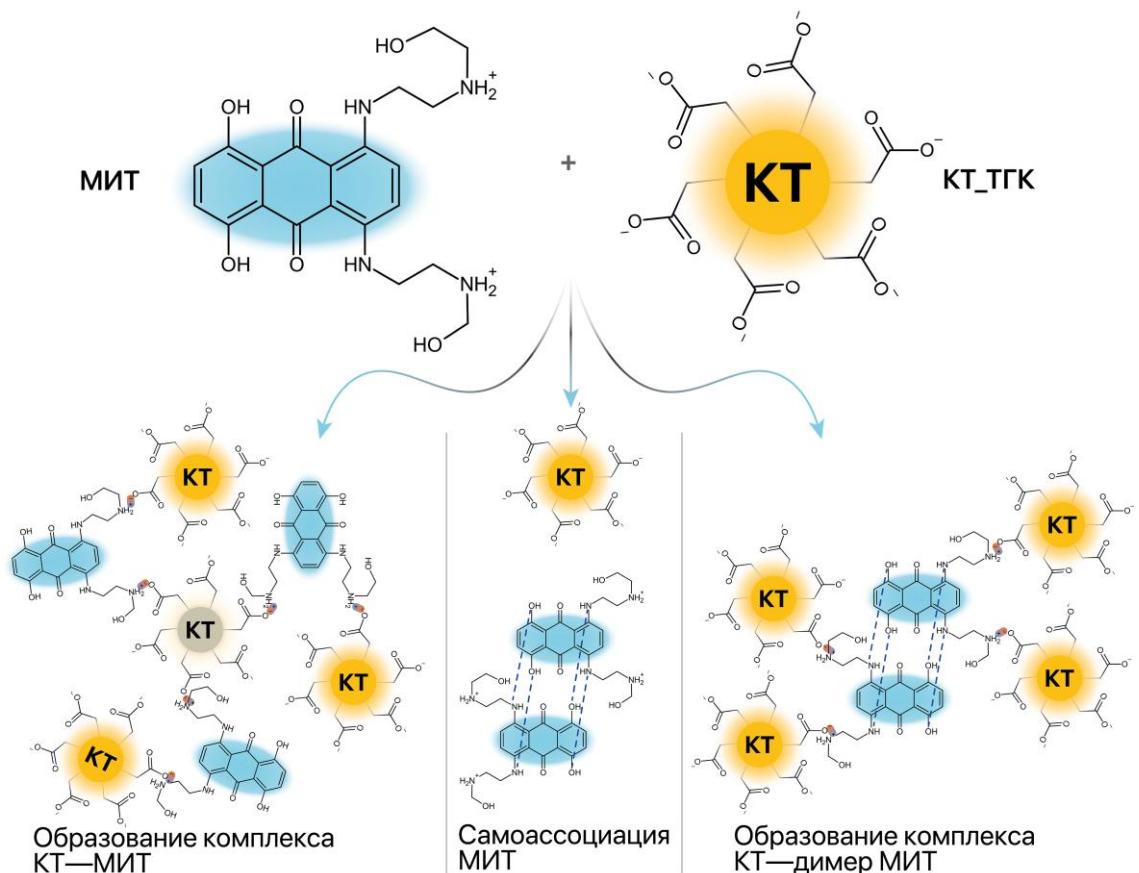


Рисунок 4. Схема взаимодействия МИТ с КТ.

Установленное число сайтов связывания указывает на возможность образования комплексов МИТ:КТ типов 1:1 и 2:1. Важно отметить, что использованный подход предполагает

упрощенную модель взаимодействия, в рамках которой считается, что одна молекула тушителя связывается с одним сайтом (лигандом) на поверхности КТ. В реальности, многоцентровой характер поверхности КТ может допускать более сложные взаимодействия, например, возможно связывание нескольких молекул МИТ на поверхности одной КТ и наличие вклада объемных эффектов и неоднородности поверхности нанокристалла. На основании спектроскопических данных и микроскопических наблюдений предложена схема взаимодействия, включающая электростатические силы и агрегацию частиц (рис. 4).

Установлено, что тушение люминесценции КТ CdZnSeS/ZnS демонстрирует меньшую подверженность матричным эффектам, чем в случае КТ AgInS/ZnS. В присутствии бычьего сывороточного альбумина для КТ CdZnSeS/ZnS наблюдается лишь незначительное снижение K_{SV} (с $1,4 \times 10^7$ до $1,0 \times 10^7$ M $^{-1}$), тогда как для КТ AgInS/ZnS K_{SV} уменьшается в 5 раз. Полученные данные подтверждают возможность применения методики с использованием КТ CdZnSeS/ZnS для прямого определения МИТ в биологических жидкостях.

В Главе 4 проведено комплексное исследование влияния химической структуры поверхностных лигандов на процессы тушения люминесценции КТ CdZnSeS/ZnS в присутствии МИТ. В работе использовали КТ, стабилизированные ТГК, МПК и ДГЛК, что позволило оценить роль стерических и координационных факторов во взаимодействии с анализом.

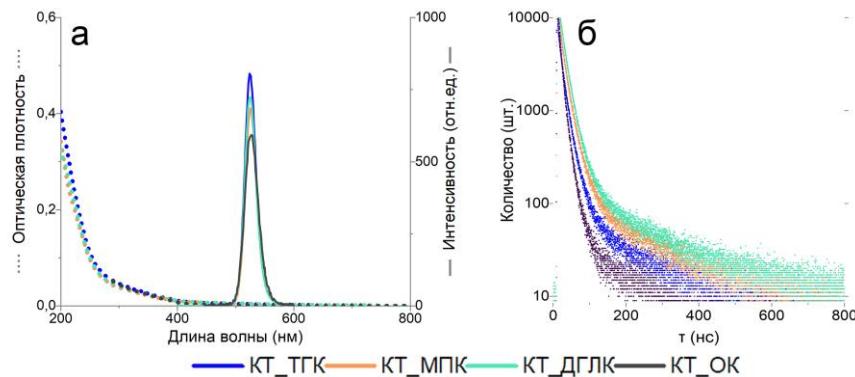


Рисунок 5. Спектры поглощения и испускания (а) и кривые затухания люминесценции (б) для КТ CdZnSeS/ZnS с различными лигандами: олеиновая кислота (OK) (в толуоле), ТГК, МПК и ДГЛК (в воде).

Характеризация модифицированных КТ подтвердила сопоставимость их основных физико-химических параметров (рис. 5, табл.3). Все образцы демонстрировали близкие значения ζ -потенциала и квантового выхода люминесценции (51–57%), что свидетельствовало об их коллоидной стабильности и пригодности для сравнительного анализа. Ключевым различием являлось большее среднее время жизни люминесценции для КТ_ДГЛК (43 нс) по сравнению с КТ_ТГК (23 нс) и КТ_МПК (27 нс), что предположительно связано с бидентатным характером координации молекулы ДГЛК с поверхностью нанокристалла.

Таблица 3. Характеристики КТ CdZnSeS/ZnS с различными лигандами: ОК (в толуоле), ТГК, МПК и ДГЛК (в воде): размер, ζ -потенциал, максимум испускания, KB и среднее время жизни люминесценции.

Образец КТ	Размер ^a , нм	ζ -потенциал, мВ	$\lambda_{\text{исп.}}^{\text{б}}$, нм	KB ^c , %	$\tau_{\text{ср.}}^{\text{г}}$, нс
КТ_ОК		—		46	29±6
КТ_ТГК		−30±11		57	23±1
КТ_МПК	7,0±0,2	−27±6	525	51	27±2
КТ_ДГЛК		−21±4		53	43±4

Примечания:

а — значения диаметра по данным ПЭМ (рис. 21);

б — $\lambda_{\text{возб.}} = 360$ нм;

в — относительный KB рассчитан с использованием кумарина 153 (KB = 0,53) в качестве стандарта;

г — среднее время жизни люминесценции.

Детальное изучение тушения люминесценции КТ в присутствии МИТ в водном растворе выявило зависимость тушения люминесценции от природы лиганда. В диапазоне концентраций МИТ 1–500 нМ наблюдалось постепенное уменьшение интенсивности люминесценции всех КТ при сохранении формы спектров испускания (рис. 6).

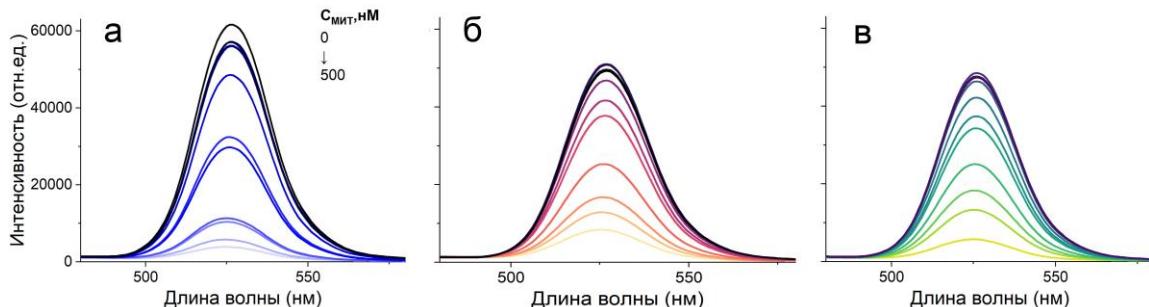


Рисунок 6. Спектры испускания ($\lambda_{\text{возб.}} = 360$ нм) КТ CdZnSeS/ZnS с различными лигандами: ТГК (а), МПК (б) и ДГЛК (в) в присутствии МИТ в воде.

Анализ зависимостей Штерна-Фольмера показал их линейный характер ($R^2 > 0,96$) и позволил установить следующий ряд возрастания K_{SV} : КТ_МПК ($0,9 \times 10^7$ М $^{-1}$) < КТ_ДГЛК ($1,5 \times 10^7$ М $^{-1}$) < КТ_ТГК ($2,7 \times 10^7$ М $^{-1}$) (рис. 7). Полученные данные свидетельствуют о существенном влиянии стерических факторов на взаимодействие между лигандами КТ и молекулами МИТ.

Исследование кинетики затухания люминесценции в время-разрешенном режиме выявило сложный, гетерогенный характер процесса тушения. Многоэкспоненциальный профиль затухания люминесценции анализировали в рамках трехкомпонентной модели, где наиболее значительные изменения при добавлении МИТ наблюдались для медленной компоненты (τ_3), связанной с поверхностными состояниями на границе раздела наночастица–лиганд–окружающая среда (рис. 8, 9).

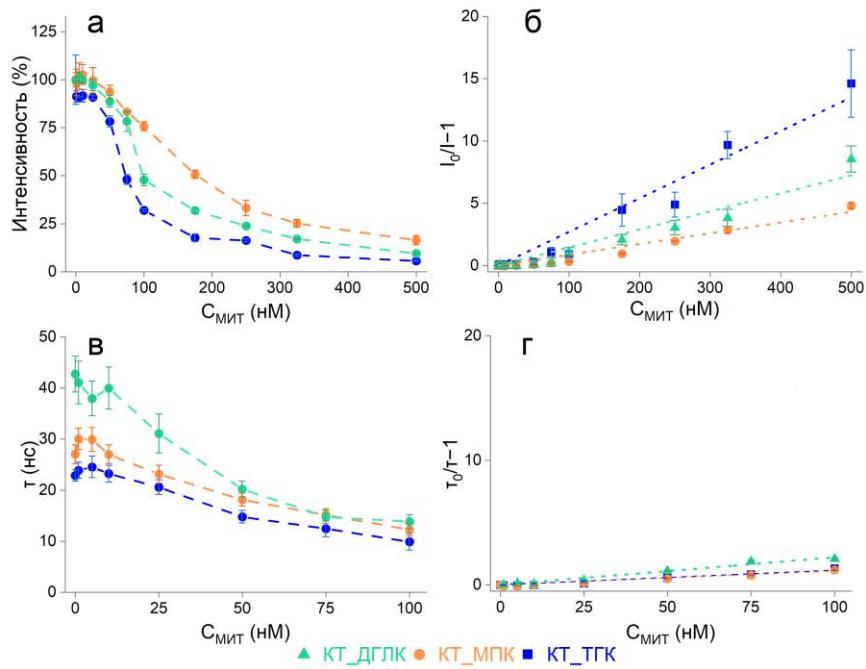


Рисунок 7. Профили тушения люминесценции (а) и изменение времени жизни люминесценции (в) КТ в присутствии МИТ; графики Штерна–Фольмера для интенсивности люминесценции (б) и времени жизни люминесценции (г). КТ $\text{CdZnSeS}/\text{ZnS}$ с различными лигандами: ТГК (синий), МПК (оранжевый) и ДГЛК (зеленый) в воде.

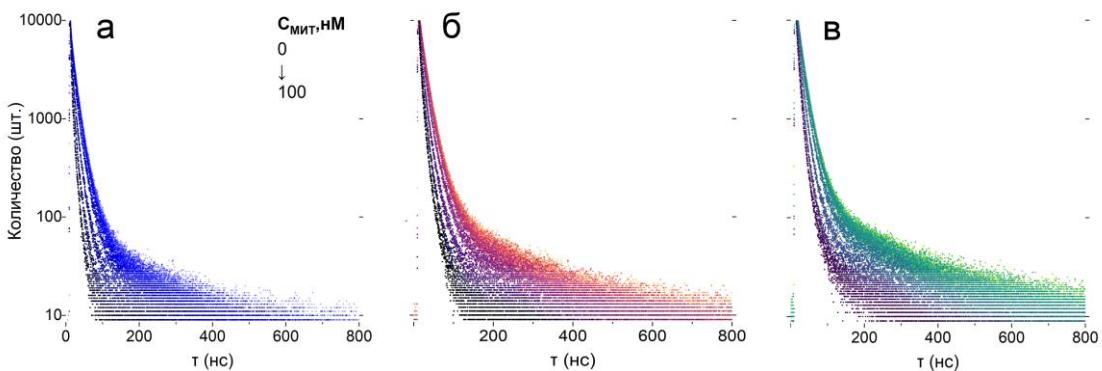


Рисунок 8. Кривые затухания люминесценции КТ $\text{CdZnSeS}/\text{ZnS}$ с различными лиганндами: ТГК (а), МПК (б) и ДГЛК (в) в присутствии МИТ в воде.

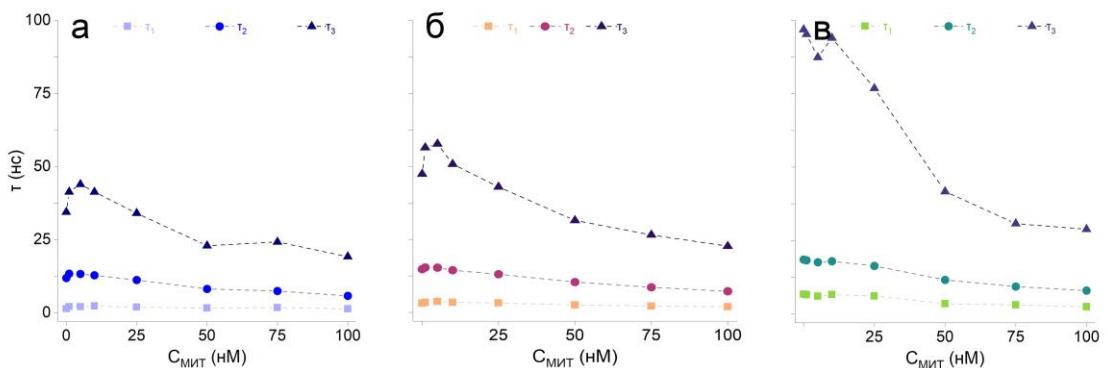


Рисунок 9. Мультиэкспоненциальное распределение времени жизни КТ $\text{CdZnSeS}/\text{ZnS}$ с различными лиганндами: ТГК (а), МПК (б) и ДГЛК (в) в присутствии МИТ в воде.

Сравнение стационарных (I_0/I) и динамических (τ_0/τ) зависимостей Штерна–Фольмера показало их близкое соответствие при концентрациях МИТ ниже 100 нМ, что указывает на доминирование динамического механизма тушения. При более высоких концентрациях МИТ наблюдается расхождение зависимостей, свидетельствующее о возрастающем вкладе статического тушения за счет образования комплексов между МИТ и КТ в основном состоянии. О статическом характере тушения также свидетельствуют рассчитанные бимолекулярные константы тушения ($k_q > 10^{14} \text{ M}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$), значительно превышающие теоретически возможное значение.

Изучение процесса тушения люминесценции в плазме крови человека, разбавленной водой в 50 раз (конечное разведение в системе плазма–МИТ–КТ) показало существенные различия с процессом в воде. В отсутствие тушителя интенсивность люминесценции всех КТ в плазме снижалась на 25–39% по сравнению с водными растворами, при этом форма спектров испускания оставалась неизменной (рис. 10). Наиболее значительное снижение эффективности тушения люминесценции наблюдалось для КТ_МПК (K_{SV} уменьшилась до $0,06 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$), для КТ_ТГК K_{SV} снизилась в 2,5 раза. Наибольшую устойчивость к матричным эффектам продемонстрировали КТ_ДГЛК, сохранившие эффективность тушения на уровне тушения в водном растворе ($K_{SV} = 1,9 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$). При переходе в плазму крови время жизни люминесценции КТ_ТГК и КТ_МПК изменяется незначительно, тогда как для КТ_ДГЛК зарегистрировано снижение на ~46%. У всех КТ наблюдается уменьшение интенсивности люминесценции, но статистически значимое изменение времени жизни характерно только для КТ_ДГЛК, преимущественно за счет компоненты τ_3 , что свидетельствует о влиянии взаимодействия лигандов с компонентами плазмы на процессы рекомбинации.

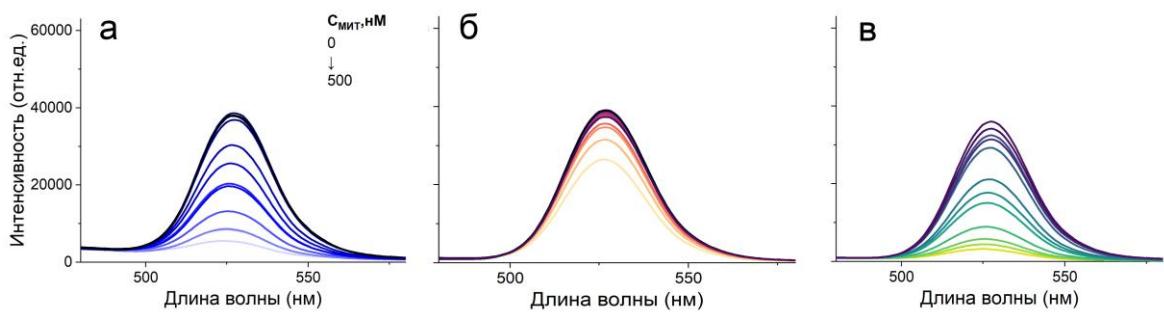


Рисунок 10. Спектры испускания ($\lambda_{\text{возб.}} = 360 \text{ нм}$) КТ CdZnSeS/ZnS с различными лигандами: ТГК (а), МПК (б) и ДГЛК (в) в присутствии МИТ в плазме крови.

В расширенном диапазоне концентраций МИТ 1–500 нМ (рис. 12) кинетические кривые демонстрируют монотонное уменьшение времени жизни для всех КТ. Изменения τ_3 в плазме менее выражены, чем в воде, но остаются значительными по сравнению с τ_1 и τ_2 (рис. 13). Менее выраженная эффективность тушения люминесценции в плазме, предположительно обусловлена преобладанием вклада внутренних процессов рекомбинации (τ_1 и τ_2), в то время как вклад

поверхностных эффектов (τ_3) минимизируется стабилизирующим воздействием компонентов плазмы крови.

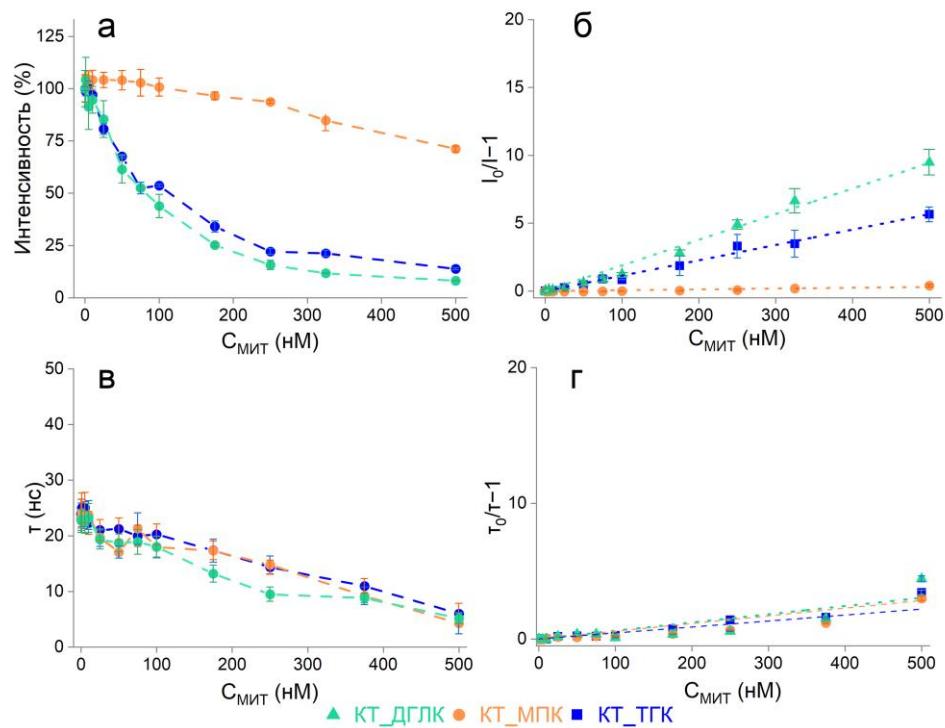


Рисунок 11. Профили тушения люминесценции (а) и изменение времени жизни люминесценции (в) КТ в присутствии МИТ; графики Штерна–Фольмера для интенсивности люминесценции (б) и времени жизни люминесценции (г). КТ CdZnSeS/ZnS с различными лигандами: ТГК (синий), МПК (оранжевый) и ДГЛК (зеленый) в плазме крови.

Рассчитанные значения k_q в плазме ($>10^{14} \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$) сохраняют высокий порядок (табл. 4). Снижение может происходить в результате изменения состояния лигандов на поверхности КТ, а также адсорбция белков плазмы на поверхности или вблизи нанокристаллов, что создает стерические препятствия, ограничивающие диффузию и затрудняющие доступ молекул МИТ к поверхности КТ.

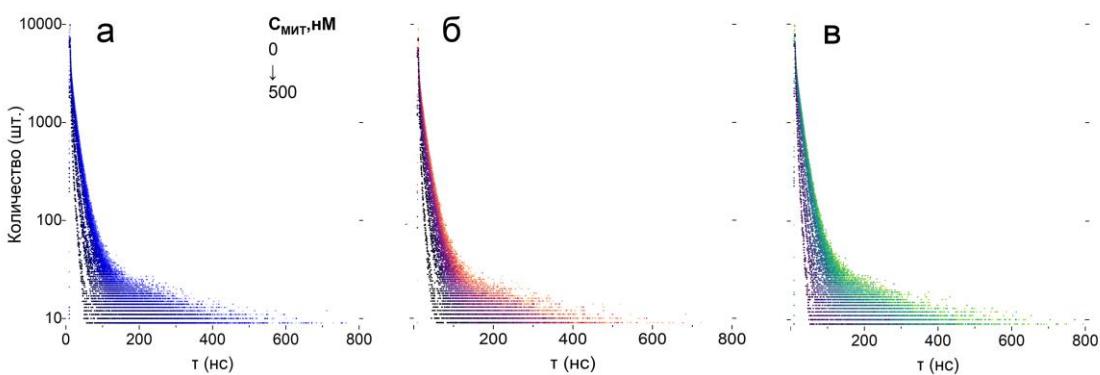


Рисунок 12. Кривые затухания люминесценции КТ CdZnSeS/ZnS с различными лигандами: ТГК (а), МПК (б) и ДГЛК (в) в присутствии МИТ в плазме крови.

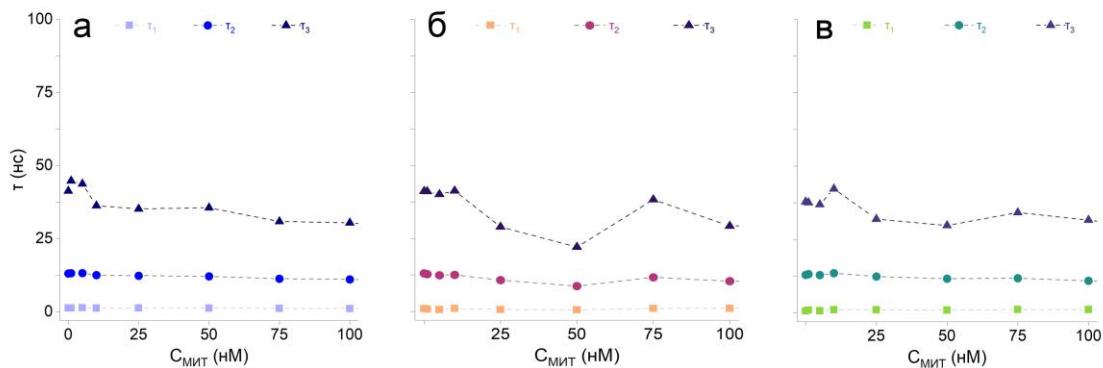


Рисунок 13. Мультиэкспоненциальное распределение времени жизни КТ CdZnSeS/ZnS с различными лигандами: ТГК (а), МПК (б) и ДГЛК (в) в присутствии МИТ в плазме крови.

Таблица 4. Константы Штерна-Фольмера (K_{SV}) и бимолекулярные константы скорости (k_q) для КТ с различными лигандами в присутствии МИТ в воде и плазме крови.

КТ	$K_{SV} \times 10^{-7}, M^{-1}$	$k_q \times 10^{-14}, M^{-1} \cdot c^{-1}$
<i>В воде</i>		
КТ_ТГК	2,7±0,3	5,2±0,2
КТ_МПК	0,9±0,3	4,1±0,2
КТ_ДГЛК	1,5±0,2	5,2±0,4
<i>В плазме крови</i>		
КТ_ТГК	1,1±0,3	2,4±0,05
КТ_МПК	0,06±0,005	2,6±0,2
КТ_ДГЛК	1,9±0,4	1,9±0,1

Полученные результаты позволяют заключить, что природа поверхностного лиганда является критическим фактором, определяющим эффективность тушения люминесценции КТ в присутствии МИТ. Установленные закономерности демонстрируют преимущество бидентатного лиганда ДГЛК, который обеспечивает не только высокую эффективность тушения в водном растворе, но и наибольшую устойчивость к матричным эффектам плазмы крови. Таким образом, КТ_ДГЛК, представляют наибольшую перспективность для разработки аналитических систем определения МИТ в биологических средах.

Глава 5 посвящена апробации и валидации разработанной люминесцентной методики определения МИТ с использованием КТ_ДГЛК. Согласно полученным данным (рис. 14), градиуровочные зависимости линейны в диапазоне 5–500 нМ (5–260 нг/мл) в плазме крови человека, разбавленной водой в 50 раз (полное разбавление в системе плазма–МИТ–КТ) и 2,5–260 нг/мл в водном растворе, что полностью охватывая терапевтический диапазон концентраций МИТ. Основные аналитические характеристики представлены в таблице 5: в плазме крови достигнуты предел обнаружения 3,6 нг/мл и предел количественного определения 12 нг/мл при коэффициенте детерминации $R^2 = 0,99$.

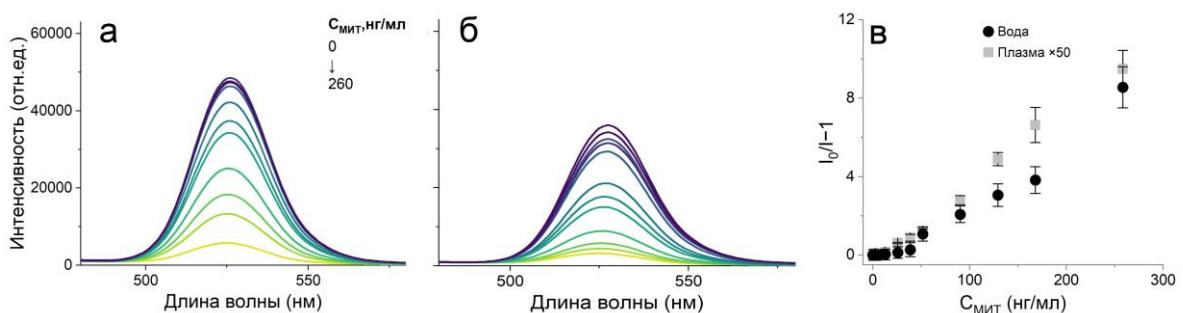


Рисунок 14. Спектры испускания ($\lambda_{\text{возб.}} = 360 \text{ нм}$) КТДГЛК в присутствии МИТ в воде (а) и плазме крови (б), градуировочные зависимости определения МИТ.

Таблица 5. Сводные аналитические характеристики методики определения МИТ.

Аналитическая характеристика	Водная среда	Плазма крови
Линейный диапазон, нг/мл	2,5–260	5–260
ПО, нг/мл	2,1	3,6
ПКО, нг/мл	7	12
$\operatorname{tg} \alpha^*$, отн.ед. \cdot мл/нг	0,028	0,037
R^2	0,96	0,99

* — тангенс угла наклона градуировочной зависимости

Исследование селективности (рис. 15) подтвердило отсутствие интерференции со стороны широкого спектра соединений: ионов, биомолекул, аминокислот, антибиотиков и противоопухолевого препарата бортезомиба. Только добавление МИТ приводило к выраженному и воспроизведимому тушению люминесценции, что однозначно свидетельствует о высокой селективности взаимодействия КТ–МИТ.

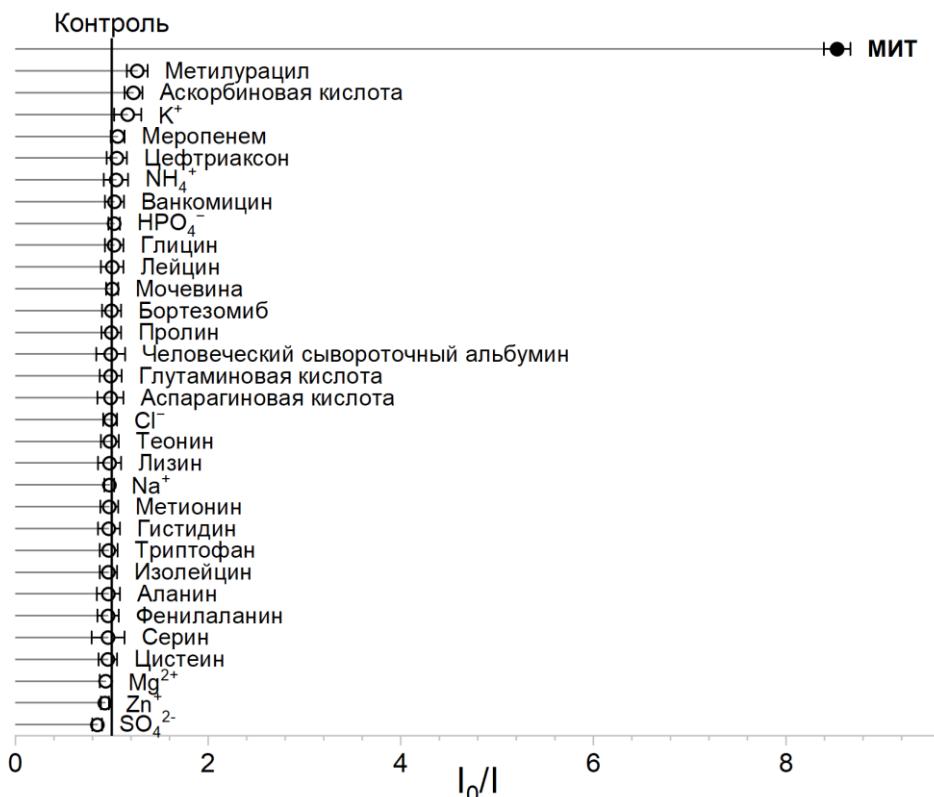


Рисунок 15. Влияние потенциальных интерферентов на интенсивность люминесценции КТДГЛК. Концентрация ионов 10 мМ; различных биомолекул, антибиотиков (цефтриаксона, ванкомицина, меропенема) и бортезомиба 10 мкМ; МИТ 500 нМ.

Для валидации методики в условиях, приближенных к реальным, проведено определение МИТ в образцах плазмы крови. Анализ выполняли как в цельной крови с последующим выделением плазмы, так и непосредственно в плазме, что позволило оценить влияние матрицы.

Согласно полученным данным (табл. 6), разработанная методика демонстрирует высокую точность (степень извлечения 88–105%) и воспроизводимость ($S_r \leq 16\%$). Заниженное значение степени извлечения (88%) для самой низкой концентрации МИТ в плазме может быть связано с матричными эффектами на пороге обнаружения методики. Для всех остальных концентраций степень извлечения находилась в приемлемом диапазоне 93–105%, что подтверждает отсутствие систематической погрешности, а также полноту высвобождения аналита на этапе пробоподготовки. Для оценки правильности, образцы плазмы были проанализированы также с использованием референтного метода — ВЭЖХ–УФ. Сравнительные данные демонстрируют хорошую сходимость результатов, полученных двумя независимыми методами. Парный t-тест Стьюдента подтвердил отсутствие статистически значимых различий между методами ($p > 0,05$).

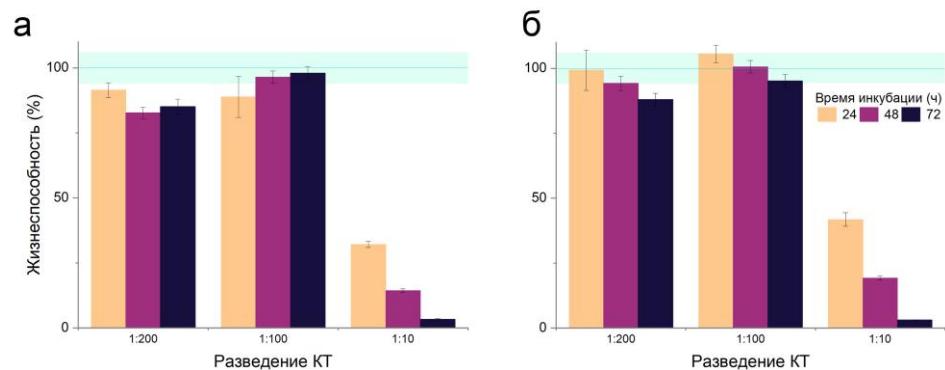
Таким образом, проведенные исследования подтверждают практическую применимость, точность и надежность разработанной люминесцентной методики для количественного определения МИТ в сложных биологических образцах и перспективна для клинического применения.

Таблица 6. Анализ МИТ в образцах плазмы крови человека ($n = 5$).

Введено мкг/мл	ВЭЖХ–УФ			Разработанная методика		
	Найдено, мкг/мл	Степень извлечения (%)	S_r (%)	Найдено, мкг/мл	Степень извлечения (%)	S_r (%)
<i>Плазма</i>						
0,85	0,80	95	12,4	0,75	88	16,0
1,4	1,35	96	5,9	1,30	93	7,7
2,3	2,25	98	2,3	2,41	105	5,0
3,5	3,45	99	2,0	3,37	96	4,5
5,3	4,97	94	2,5	5,18	98	3,9
<i>Цельная кровь</i>						
1,5	1,46	97	0,6	1,42	95	10,5
2,2	2,17	99	0,8	2,07	94	4,8
3,1	3,19	103	4,4	3,24	104	4,6
4,6	4,80	104	4,4	4,66	101	3,2
5,5	6,05	110	5,8	5,44	99	1,8

Оценка цитотоксичности *in vitro* на клеточных линиях L929 и 4T1 (рис. 16) показала отсутствие статистически значимого снижения жизнеспособности клеток при рабочих разведениях КТ_ДГЛК (1:200) в течение 72 часов (рис. 16). Цитотоксические эффекты наблюдались только при 10-кратном превышении рабочей концентрации, что подтверждает безопасность применения наноматериалов в лабораторной диагностике. Таким образом,

разработанная методика демонстрирует высокую чувствительность, селективность и точность, а также безопасность при рабочих концентрациях, что подтверждает ее готовность к применению для мониторинга концентраций МИТ в клинической практике.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Выявлены закономерности тушения люминесценции квантовых точек (КТ) — тройных AgInS/ZnS, сплавных CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS, стабилизированных тиогликолевой (ТГК), меркаптопропионовой (МПК) и дигидролипоевой (ДГЛК) кислотами — в присутствии митоксантрона (МИТ). На основе выявленных закономерностей разработан подход к высокочувствительному люминесцентному определению МИТ в плазме крови человека.

2. Проведено сравнительное исследование механизма тушения люминесценции КТ различного химического состава (тройных AgInS/ZnS и сплавных CdZnSeS, CdZnSeS/ZnS) в присутствии МИТ. Установлена зависимость эффективности тушения люминесценции от размера и состава КТ. Для тройных КТ AgInS/ZnS наблюдается увеличение константы Штерна-Фольмера (K_{SV}) с ростом размера нанокристаллов. Наибольшая эффективность тушения ($K_{SV} = (0,54 \pm 0,01) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$) зафиксирована для частиц размером 7 нм (фракция 3). Рассчитанные K_{SV} имеют близкие значения ($K_{SV} = (1,6 \pm 0,2) \times 10^7$ и $(1,4 \pm 0,2) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ для КТ с оболочкой и без, соответственно). Для частиц без оболочки (CdZnSeS) наблюдаются отклонения от линейности в области низких концентраций МИТ, что связано с особенностями поверхностных процессов и затрудняет корректную количественную оценку.

3. Предложен механизм взаимодействия в системе МИТ с КТ. Методами стационарной и время-разрешенной флуориметрии показано, что тушение люминесценции происходит преимущественно по статическому механизму. Ключевую роль в процессе играет электростатическое взаимодействие между положительно заряженной молекулой МИТ и отрицательно заряженной поверхностью КТ с высокими константами связывания ($K_{св.} \approx (0,7-1,3) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$). На основании анализа литературных данных и экспериментальных результатов установлено, что доминирующим механизмом тушения люминесценции КТ является фотоиндуцированный перенос электрона (ФПЭ). Основными доказательствами служат: выраженные окислительно-восстановительные свойства МИТ как акцептора электронов, отсутствие спектрального перекрывания, необходимого для Ферсторовского резонансного переноса энергии, а также статический характер тушения с высокими константами скорости ($k_q > 10^{10} \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$), что соответствует критериям ФПЭ.

4. Выявлено влияние природы поверхностного лиганда КТ CdZnSeS/ZnS на эффективность тушения люминесценции в присутствии МИТ. В водной среде K_{SV} увеличиваются по ряду МПК < ДГЛК < ТГК ($K_{SV} = (0,9 \pm 0,3) \times 10^7$, $(1,5 \pm 0,2) \times 10^7$ и $(2,7 \pm 0,3) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, соответственно). Однако в присутствии плазмы крови человека наибольшую устойчивость к неспециальному тушению и наибольшую эффективность показали КТ, стабилизированные ДГЛК ($K_{SV} = (1,9 \pm 0,4) \times 10^7 \text{ M}^{-1}$). Это связано с бидентатным характером координации лиганда, обеспечивающим прочное закрепление на поверхности КТ.

5. Разработан и валидирован люминесцентный подход к определению МИТ в плазме крови человека на основе тушения люминесценции КТ CdZnSeS/ZnS, стабилизированных ДГЛК, исключающий трудоемкую пробоподготовку. Предел обнаружения составил 3,6 нг/мл, линейный диапазон — 5–260 нг/мл. Продемонстрирована хорошая сходимость с результатами ВЭЖХ-УФ при анализе образцов плазмы крови, содержащих МИТ.

6. Установлено отсутствие цитотоксического действия КТ CdZnSeS/ZnS *in vitro* в рабочих концентрациях, что подтверждает перспективность их безопасного применения в клинической лабораторной диагностике.

Таким образом, разработанная методика определения МИТ не требует сложной пробоподготовки и может быть реализована в рутинных лабораторных и клинических исследованиях с высокой точностью. Кроме того, возможность надежного детектирования низких концентраций МИТ в плазме крови позволяет сократить объем образца, взятого у пациента, и минимизировать этапы пробоподготовки, связанные с концентрированием. Мы предполагаем, что полученные данные позволяют приблизить разработанную методику к практическому применению не только для мониторинга концентрации МИТ в крови пациентов, проходящих химиотерапию, но и для исследований систем с пролонгированным высвобождением препарата.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Tsyupka, D.V.** Luminescence quenching of alloyed quantum dots for mitoxantrone detection: in search of the ideal thioligand / D.V. Tsyupka, D.D. Drozd, P.S. Pidenko, E.A. Khudina, K.Yu. Presnyakov, D.G. Koganova, D.A. Kornilov, O.A. Goryacheva, I.Yu. Goryacheva // Microchemical Journal. — 2025. — (219). — P. 115919.
2. **Tsyupka, D.V.** Anthracycline antibiotics detection using turn-off luminescent nanosensors / D.V. Tsyupka, Y.A. Podkolodnaya, E.A. Khudina, D.G. Koganova, O.A. Goryacheva, A.M. Abramova, I.Y. Goryacheva // TrAC Trends in Analytical Chemistry. — 2024. — (177). — P. 117774.
3. **Tsyupka, D.V.** Luminescence behavior of colloid quantum dots in the presence anthracycline antibiotic mitoxantrone: Surface interaction and luminescence quenching, size and composition dependence, potential for clinical study / D.V. Tsyupka, E.A. Mordovina, T.S. Ponomaryova, D.D. Drozd, I.Y. Goryacheva, O.A. Goryacheva // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. — 2023. — (671). — P. 131648.
4. Goryacheva, O.A. Current trends and challenges in the mitoxantrone measuring in biofluids and new pharmaceutical systems / O.A. Goryacheva, P.S. Pidenko, A.V. Markin, N.E. Markina, **D.V. Tsyupka**, E.A. Mordovina, T.D. Ponomaryova, S.A. Meshcheryakova, D.A. Kornilov, P.D. Strokin, D.D. Drozd, Y.A. Podkolodnaya, A.A. Kovyrshina, I.V. Morozova, T.V. Shelekhova, I.Y. Goryacheva // TrAC Trends in Analytical Chemistry. — 2023. — (169). — P. 117373.
5. **Tsyupka, D.V.** High-fluorescent product of folic acid photodegradation: Optical properties and cell effect / D.V. Tsyupka, E.A. Mordovina, O.A. Sindeeva, A.V. Sapelkin, G.B. Sukhorukov, I.Y.

Goryacheva // Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. — 2021. — (407). — P. 113045.

6. **Цюпка, Д.В.** Определение антрациклиновых антибиотиков на основе тушения люминесценции квантовых точек / Д.В. Цюпка, Е.А. Худина, Д.Д. Дрозд, О.А. Горячева, И.Ю. Горячева // VII Всероссийский симпозиум «Разделение и концентрирование в аналитической химии и радиохимии» с международным участием. — Краснодар. — 21–27 сентября 2025.
7. **Tsyupka, D.V.** Detection of anthracycline antibiotics based on quantum dot luminescence quenching / D.V. Tsypka, E.A. Khudina, D.D. Drozd, D.G. Koganova, D.A. Kornilov, O.A. Goryacheva, I.Yu. Goryacheva // XXIX Saratov Fall Meeting 2025. — Saratov. — 29 September – 3 October 2025.
8. **Цюпка, Д.В.** Квантовые точки в контроле терапии: люминесцентный мониторинг антрациклинов / Д.В. Цюпка, Е.А. Худина, Д.Д. Дрозд, Д.А. Корнилов, О.А. Горячева, И.Ю. Горячева // Ежегодная Всероссийская научная школа-семинар «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине - 2025». — Саратов. — 19–20 ноября 2025.
9. **Tsyupka, D.V.** The story of how mitoxantrone chose his friends: Surface interaction and semiconductor quantum dots luminescence quenching for mitoxantrone detection / D.V. Tsypka, E.A. Mordovina, T.S. Ponomaryova, D.D. Drozd, I.Yu. Goryacheva, O.A. Goryacheva // XXVII Saratov Fall Meeting 2023. — Saratov, Russia. — 25–29 September 2023.
10. **Цюпка, Д.В.** Люминесцентные наносенсоры для мониторинга антрациклиновых антибиотиков / Д.В. Цюпка, Е.А. Худина, О.А. Горячева, И.Ю. Горячева // Всероссийская конференция с международным участием «Биохимия человека 2024». — Москва. — 17–19 октября 2024.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность:

своему научному руководителю, Горячевой Ирине Юрьевне, за помощь и поддержку оказанные в течение всего периода учебы и работы под ее руководством, а также за экспертное руководство, неизменную поддержку и терпение на всем пути этого исследования;

Худиной Е.А. за проведение плодотворных совместных исследований, а также за многолетнюю всестороннюю поддержку и помощь;

Дрозду Д.Д. за предоставленные образцы КТ CdZnSeS и CdZnSeS/ZnS, а также проведение совместных исследований, эмоциональную и информационную поддержку и помощь;

Пономаревой Т.С. и Оломской В.В. за предоставленные образцы КТ AgInS/ZnS;

Горячевой О.А. за плодотворные дискуссии и обмен мнениями в рамках подготовки результатов работы;

Пиденко П.С. за помощь в проведении экспериментов по валидации разработанной методики;

Преснякову К.Ю. за помощь с графической визуализацией данных;

а также остальным коллегам и соавторам за ценные советы и плодотворное сотрудничество.