

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Моллаева Мария Романовна

**Системы доставки комплексов металлов и мезо-тетрафенилпорфиринов на
основе полимерных частиц для каталитической терапии**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в лаборатории количественной онкологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук

Научный руководитель: **Никольская Елена Дмитриевна**
кандидат химических наук

Официальные оппоненты: **Марквичева Елена Арнольдовна** – доктор химических наук, ГНЦ ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, главный научный сотрудник, руководитель лаборатории биомедицинских материалов

Кусков Андрей Николаевич – доктор химических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», заведующий кафедрой технологии химико-фармацевтических и косметических средств

Ле-Дейген Ирина Михайловна – кандидат химических наук, ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, доцент кафедры химической энзимологии

Защита диссертации состоится « » _____ 2024 г. в 15:00 на заседании диссертационного совета МГУ 014.4 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 11 Б, ауд. 202.

E-mail: d50100159@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/014.4/2900>

Автореферат разослан « » _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук

И.К. Сакодынская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Злокачественные новообразования являются одними из основных причин гибели населения в большинстве стран мира: по оценкам Всемирной Организации Здравоохранения, каждый год регистрируется около 10 миллионов смертельных случаев. В связи с чем, многими исследовательскими группами разрабатываются новые подходы к повышению эффективности препаратов для лечения опухолевых заболеваний.

Актуальной задачей является создание препаратов избирательного действия, а также разработка комбинаций цитотоксических препаратов для комплексного применения (полихимиотерапия), оптимизация протоколов применения химиотерапии и поиск новых свойств у существующих фармакологических средств с целью уменьшения побочных эффектов.

Все больше исследовательских работ посвящены изучению окислительно-восстановительных механизмов, участвующих в клеточной пролиферации и гибели опухолевых тканей. Повышенный интерес сопряжен с поиском новых эффективных препаратов, механизм действия которых основан на формировании активных форм кислорода (АФК). Известно, что увеличение уровня АФК в злокачественных новообразованиях приводит к окислительному стрессу в клетках и их последующей гибели.

Металлопорфирины (MeП) являются перспективными индукторами АФК, широко используются в качестве катализаторов реакций эпоксидирования, гидроксирования, фотоокисления и окисления [1]. В медицине MeП находят применение в качестве агентов для фотодинамической терапии, а также каталитической терапии – перспективного метода лечения опухолевых заболеваний, основанного на образовании АФК в результате взаимодействия MeП с субстратом окисления, например, аскорбиновой кислотой (АК). Стоит отметить, что высокая токсичность и сложность в применении ограничивают использование гидрофобных MeП в качестве объектов исследования. Однако, разработки последних лет в области доставки лекарственных средств открывают широкие возможности использования гидрофобных соединений, в том числе MeП, и представляют большую актуальность для создания новых препаратов на их основе. Преимуществом гидрофобных MeП является высокая цитотоксическая активность, вследствие чего требуются более низкие концентрации MeП.

Комплексы железа (III), марганца (III), кобальта (II), никеля (II) и мезо-тетрафенилпорфиринов являются эффективными катализаторами химических реакций, исследуются для применения в медицине и могут вступать в окислительно-восстановительную реакцию с АК [2-4]. В связи с чем, разработка каталитических систем на основе комплексов Mn (III), Fe (III), Co (II) и Ni (II) с мезо-тетрафенилпорфиринами представляется перспективным

направлением в терапии опухолевых заболеваний.

Поскольку в водных средах растворимость выбранных MeП крайне низкая, требуется их солюбилизация. Один из методов улучшения солюбилизации – включение субстанции в наночастицы (НЧ). Данный подход дает дополнительное преимущество, поскольку использование частиц позволяет снизить неспецифическую токсичность, повысить биодоступность субстанций и селективность их накопления в тканях-мишенях за счет эффекта повышенной проницаемости и удержания. Сополимер молочной и гликолевой кислот (ПМГК) широко применяется в качестве носителя для создания систем доставки препаратов, поскольку он не вызывает аллергических реакций, разлагается на продукты, вовлеченные в метаболизм, биосовместим и обеспечивает пролонгированное высвобождение исследуемой субстанции в органе-мишени. ПМГК активно используется в составе лекарственных препаратов, представленных на мировом фармацевтическом рынке [5].

Данная работа посвящена разработке и оптимизации технологии получения MeП-содержащих ПМГК частиц с помощью методологии Бокса-Бенкена и исследованию их противоопухолевой активности. Включение MeП в ПМГК частицы способствует снижению неспецифической токсичности MeП и дозы вводимого вещества, а также может обеспечить применение наноформы MeП в комбинации с АК в каталитической терапии опухолевых заболеваний.

Стоит отметить, что в литературе представлены преимущественно исследования биологических свойств водорастворимых MeП, в то время как эффективность гидрофобных MeП изучена недостаточно. Работы о включении гидрофобных MeП в ПМГК частицы также представлены недостаточно широко: Pt-порфирины включали в ПМГК для измерения уровня кислорода *in vitro* [6] и применения в тераностике [7], ПМГК частицы, содержащие Zn-порфирин [8] и In-порфирин [9], исследовали на цитотоксическую активность. Таким образом, данные о разработке и получении полимерных частиц, содержащих гидрофобные MeП, разработке каталитической системы на их основе и изучении активности в отношении культур опухолевых клеток и на животных моделях представляются перспективными для дальнейшей реализации в лечении злокачественных новообразований.

Целью работы являлась разработка каталитических систем, состоящих из комбинации аскорбиновой кислоты и частиц, содержащих гидрофобные металлокомплексы мезо-тетрафенилпорфиринов, и исследование их биологической активности.

Для достижения цели работы поставлены следующие **задачи**:

1. Разработка и оптимизация методов получения полимерных частиц, содержащих гидрофобные металлокомплексы тетрафенилпорфиринов с Fe (III), Mn (III), Co (II), Ni (II).

2. Анализ физико-химических свойств полимерных частиц, содержащих металлопорфирины, и оценка кинетики высвобождения металлопорфиринов из частиц.

3. Исследование биологической активности металлопорфиринов и частиц, содержащих металлопорфирины, в комбинации с аскорбиновой кислотой *in vitro*.

4. Оценка противоопухолевых свойств наиболее эффективной каталитической системы, исследование биораспределения субстанции и частиц *in vivo*.

Научная новизна

Впервые разработаны и оптимизированы методы получения частиц на основе сополимера молочной и гликолевой кислот, содержащих комплексы Fe (III), Mn (III), Co (II), Ni (II) и мезо-тетрафенилпорфиринов. Обнаружены закономерности влияния параметров получения полимерных частиц (массового соотношения вещества к полимеру, концентрации стабилизатора дисперсии, соотношения органической и водной фаз) на конечные физико-химические характеристики. Сравнение оптимизированных методов получения частиц выявило диапазоны изменения параметров получения частиц, которые могут оказаться универсальными и использоваться для получения частиц с другими металлопорфиринами. Предложена стратегия оценки цитотоксической активности комбинации частиц, содержащих металлопорфирины, и аскорбиновой кислоты. Впервые показано, что частицы, содержащие комплексы мезо-тетрафенилпорфиринов с Fe (III), Mn (III), Ni (II), Co (II), в сочетании с аскорбиновой кислотой проявляют активность в отношении линий опухолевых клеток MCF-7, K562, HeLa, SK-OV-3. Продемонстрирована более высокая цитотоксическая активность комбинации частиц, содержащих Mn-мезо-тетрафенилпорфирин, и аскорбиновой кислоты по сравнению с другими исследуемыми каталитическими системами. Показано, что механизм действия комбинации частиц, содержащих Mn-мезо-тетрафенилпорфирин, и аскорбиновой кислоты основан на образовании активных форм кислорода, что приводит к апоптотическому типу гибели клеток линии MCF-7. Показано, что каталитическая система на основе аскорбиновой кислоты и частиц, содержащих Mn-мезо-тетрафенилпорфирин, эффективно ингибирует рост опухолевых клеток карциномы молочной железы линии 4T1 у мышей линии BALB/c.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты оптимизации методов получения частиц, содержащих комплексы мезо-тетрафенилпорфиринов с Fe (III), Mn (III), Ni (II), Co (II), могут послужить основой для разработки технологии получения и оптимизации полимерных частиц, содержащих металлопорфирины, для применения в диагностике и лечении различных заболеваний, в том числе злокачественных новообразований. В диссертационной работе продемонстрирована возможность использования комплексов мезо-тетрафенилпорфиринов с Fe (III), Mn (III), Ni (II),

Со (II) и их полимерных форм в комбинации с аскорбиновой кислотой для применения в противоопухолевой терапии. Методы определения цитотоксической активности, уровня активных форм кислорода и апоптоза после совместной инкубации аскорбиновой кислоты и частиц с металлопорфиринами могут быть использованы в качестве рекомендаций по оценке каталитической активности системы на основе полимерных частиц. Разработанные частицы, содержащие Mn-мезо-тетрафенилпорфирин, в присутствии аскорбиновой кислоты эффективно ингибировали рост опухолевых клеток карциномы молочной железы линии 4T1 у мышей линии BALB/c и в большей степени накапливались в опухолевой ткани, чем субстанция, поэтому могут быть рекомендованы для дальнейших исследований *in vivo* в качестве компонента для каталитической терапии.

Методология и методы исследования

Для решения поставленных задач в работе был использован комплекс химических, физико-химических и биологических методов исследования. Для получения частиц, содержащих металлопорфирины, использовали методы одинарного эмульгирования и преципитации. Характеризацию частиц проводили с использованием методов динамического рассеивания света, электрофоретического рассеивания света, спектрофотометрии, просвечивающей электронной микроскопии, ИК-спектроскопии. Для оценки активности каталитической системы применяли методы световой микроскопии, МТТ-тест, проточную цитофлуориметрию, TUNEL анализ. Противоопухолевую активность оценивали с использованием самок мышей линии BALB/c.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Варьирование параметров получения полимерных частиц, содержащих комплексы Fe (III), Mn (III), Co (II), Ni (II) и мезо-тетрафенилпорфиринов, позволяет получить частицы с высоким значением общего содержания вещества и низким размером частиц.
2. Включение Mn-мезо-тетрафенилпорфирина в полимерные частицы обеспечивает более эффективное формирование активных форм кислорода и высокую цитотоксическую активность металлопорфирина в комбинации с аскорбиновой кислотой.
3. Цитотоксический эффект комбинации аскорбиновой кислоты и частиц, содержащих Mn-мезо-тетрафенилпорфирин, достигается за счет образования активных форм кислорода, которые способствуют повреждению митохондрий и фрагментации ДНК, что приводит к гибели клетки посредством апоптоза.
4. Совместное использование комбинации аскорбиновой кислоты и полимерных частиц с Mn-мезо-тетрафенилпорфирином способствует эффективному торможению роста опухоли *in vivo*. Полученные частицы, содержащие Mn-мезо-тетрафенилпорфирин, демонстрировали более эффективное накопление в опухоли по сравнению с субстанцией.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием высокоточного оборудования, а также статистической обработкой полученных результатов. Результаты работы были доложены на IX Всероссийской научной молодежной школе-конференции «Химия, физика, биология: пути интеграции» (Москва, Россия 2022), Открытом конкурсе-конференции научно-исследовательских работ по химии элементоорганических соединений и полимеров «ИНЭОС OPEN CUP» (Москва, Россия 2021), SfRBM & MCW Redox Biology Symposium (Индианаполис, США 2021), 45th FEBS congress. «Molecules of Life: Towards New Horizons» (Любляна, Словения 2021), SfRBM 27th Annual Conference (Индианаполис, США 2020), V Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, Россия 2019), 43rd FEBS congress «Biochemistry forever» (Прага, Чешская Республика 2018), X Международной конференции молодых ученых по химии «Менделеев 2017» (Санкт-Петербург, Россия 2017), V Международной конференции «Супрамолекулярные системы на поверхности раздела» (Туапсе, Россия 2017), XX международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, Россия 2016), XIII международной молодежной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2016» (Москва, Россия 2016).

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 5 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Scopus/Web of Science, и 11 тезисов докладов на международных и российских конференциях.

Личный вклад автора

Автором был лично проведен комплекс работ по получению и оптимизации метода получения частиц, содержащих металлопорфирины, анализу их физико-химических характеристик. Разработана методика оценки общего содержания металлопорфиринов в частицах, а также их степени включения в частицы. Разработаны подходы к определению цитотоксической активности металлопорфиринов и частиц, содержащих металлопорфирины, в комбинации с аскорбиновой кислотой; проведению исследований с помощью проточной цитофлуориметрии; оценке окислительного стресса в клетках. Эксперименты *in vivo* выполнены при непосредственном участии автора. Автор вносил вклад в постановку задач исследования, планирование экспериментов и интерпретацию результатов исследования. На защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении которых роль соискателя была определяющей. Автор выполнял основную роль при оформлении текста, графического материала статей и их подаче в журнал.

Связь работы с государственными программами

Часть результатов получена в рамках гранта РФФИ (18-29-09022\20).

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 122 страницах машинописного текста, содержит 22 таблицы и 35 рисунков. Список литературы включает 249 ссылок.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Оптимизация процесса получения НЧ, содержащих MeП

Для получения частиц с наилучшими физико-химическими характеристиками необходимо провести подбор технологических параметров и выявить какие из них оказывают наибольшее влияние на конечные показатели НЧ.

Методология Бокса-Бенкена позволяет исследовать взаимосвязь между параметрами процесса (независимыми переменными) и характеристиками полученного продукта (переменными отклика; зависимыми переменными). Преимуществами данной методики являются относительно небольшое количество экспериментов, возможность многофакторного анализа и выявление наиболее подходящих условий и прогнозов отклика.

Ранее проведенные исследования выявили значимое влияние массы полимера, концентрации стабилизатора эмульсии и соотношения органической/водной фаз на содержание активного вещества в частицах и их средний размер [10]. ПМГК был выбран в качестве носителя для создания системы доставки MeП, поскольку он не вызывает аллергических реакций, и разлагается на продукты, вовлеченные в метаболизм [5]. В качестве стабилизатора эмульсии использовали поливиниловый спирт, поскольку, согласно литературным данным, он является наиболее применяемым стабилизатором формирующихся полимерных частиц [11]. В качестве органической фазы использовали хлороформ (для получения частиц с FeП или MnП), хлористый метилен (для NiП) и ацетон (для CoП). Преципитация и одинарное эмульгирование являются одними из самых распространенных технологий получения НЧ благодаря своей простоте и воспроизводимости [12]. Исходя из используемой органической фазы, частицы, содержащие FeП, MnП и NiП, получали методом одинарного эмульгирования, а частицы с CoП – методом преципитации (рис. 1).

Таким образом, с помощью методологии Бокса-Бенкена рассчитаны условия получения MeП-НЧ, такие как количество ПМГК в органическом растворителе (X_1), концентрация поливинилового спирта (ПВС) (X_2), соотношение органической и водной фазы (O/W) (X_3), позволяющие достигнуть максимального общего содержания вещества в частицах (OC) (Y_1) и

минимального среднего размера частиц (РЧ) (Y_2).

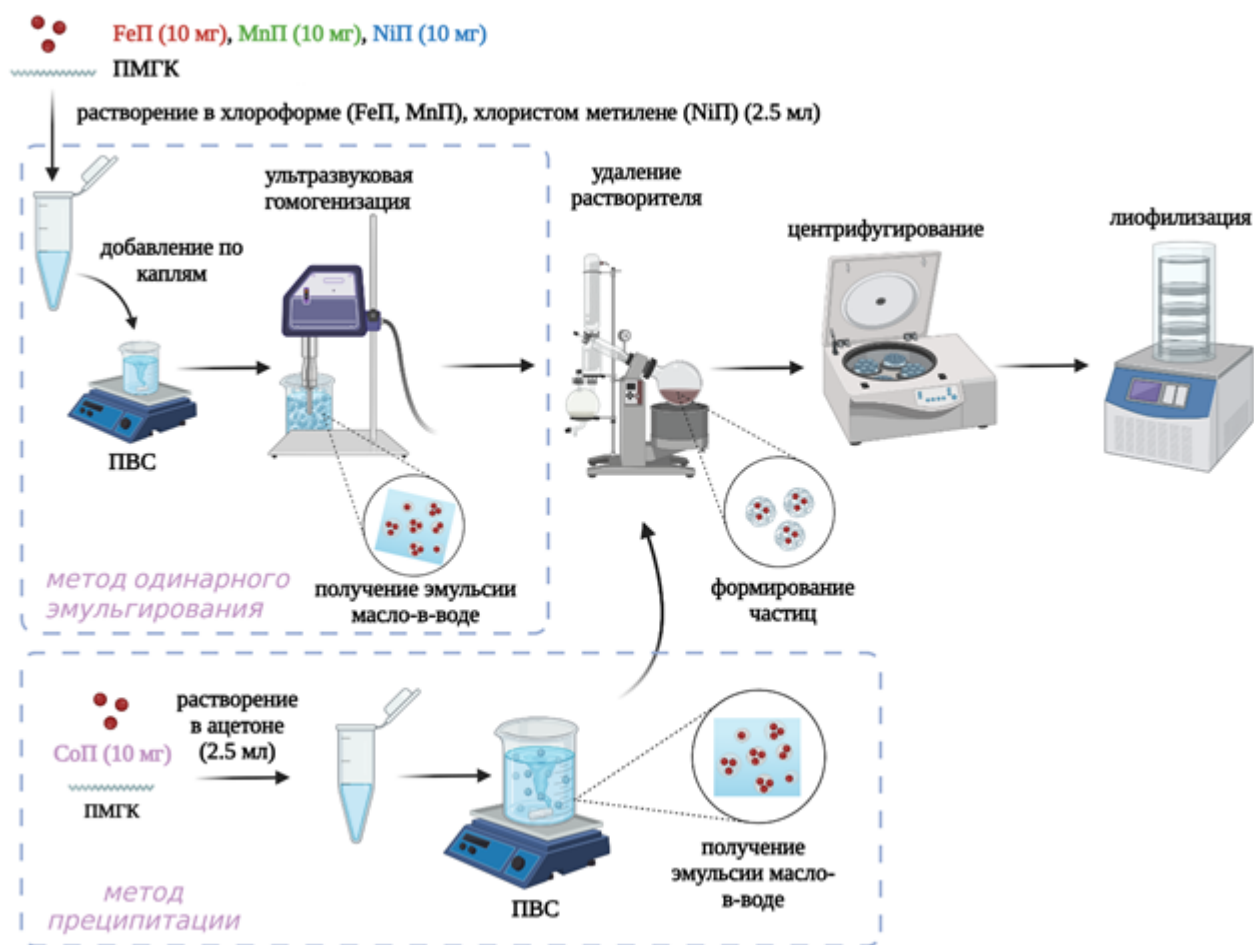


Рисунок 1. Схема получения НЧ, содержащих MeП, методами одинарного эмульгирования и преципитации.

В таблице 1 представлены числовые значения исследуемых параметров, которые были использованы при получении партий НЧ, содержащих MeП.

Количество экспериментов определялось в соответствии с уравнением 1:

$$N = 2 * k(k-1) + C_0 \quad (1),$$

где N – количество партий НЧ (результат: 17), k – количество факторов (3), C_0 – количество центральных точек (5).

По результатам, приведенным в таблице 1, можно заключить, что варьирование параметров оказывает значительное влияние на ОС (ОС полученных частиц находилось в широком диапазоне от 2% до 20%, таблица 1, зависимые переменные Y_1) и РЧ (РЧ находился в широком диапазоне от 270 нм до 700 нм, таблица 1, зависимые переменные Y_2).

По результатам 17 экспериментов для каждого MeП строили математическую модель для анализа влияния параметров и предсказания численных значений с помощью теста ANOVA. С помощью выбранной модели получали двух-, трехмерные диаграммы поверхности отклика, которые позволили выявить характер влияния каждого варьируемого параметра или их

взаимодействия на конечные характеристики НЧ.

Таблица 1. Планирование эксперимента по оптимизации получения NiП-НЧ по методологии Бокса-Бенкена, основанное на 2-х уровневой 3-х факторной системе с пятью повторами центральных параметров.

Партия НЧ	варьируемые параметры			параметры отклика	
	X_1 , ПМГК, мг	X_2 , ПВС, %	X_3 , O/W (об./об.)	Y_1 , общее содержание, %	Y_2 , размер частиц, нм
1	25	1.3	0.13	5±0	395±4
2	25	1.3	0.13	14±1	376±10
3	45	2.0	0.13	3±1	350±7
4	45	0.5	0.13	3±0	272±4
5	5	1.3	0.20	7±1	372±7
6	5	0.5	0.13	3±0	370±4
7	25	2.0	0.05	3±0	454±10
8	5	2.0	0.13	5±1	435±11
9	25	1.3	0.13	3±1	338±6
10	45	1.3	0.05	2±0	557±7
11	25	2.0	0.20	5±1	338±5
12	25	1.3	0.13	3±1	345±8
13	25	0.5	0.20	3±1	230±2
14	5	1.3	0.05	20±2	341±6
15	25	0.5	0.05	3±1	419±4
16	45	1.3	0.20	5±1	409±2
17	25	1.3	0.13	4±1	700±20

Для всех анализируемых НЧ с MeП была подобрана квадратичная модель, её адекватность подтверждалась коэффициентом детерминации и p -значением. На основе диаграмм поверхности отклика (рис. 2) было установлено, что некоторые факторы оказывали схожее влияние на РЧ и ОС несмотря на то, что MeП-НЧ были получены по разным методикам. Рисунок 2А,В,Г демонстрирует, что уменьшение объема водной фазы способствует повышению ОС вещества в частицы (зеленые области на поверхностях отклика), что может быть вызвано снижением диффузии растворителя в водную фазу и сохранением массы MeП внутри НЧ. Также отмечалось, что при одновременном уменьшении массы полимера и объема водной фазы происходило повышение ОС (рис. 2А,В,Г, зеленые области на поверхностях отклика), что указывает на антагонистический эффект взаимодействия массы ПМГК и соотношения O/W.

Рисунок 2Д,Е иллюстрирует влияние O/W и ПВС на РЧ, содержащих CoП и MnП, по типу «купола». Возможно, взаимодействие параметров ПВС и O/W оказывало влияние на вязкость водной фазы [13]. Таким образом, были выявлены эффекты, которые исследуемые параметры оказывали на характеристики MeП-НЧ и которые могут быть использованы при разработке НЧ с тетрапиррольными макрогетероциклическими соединениями.

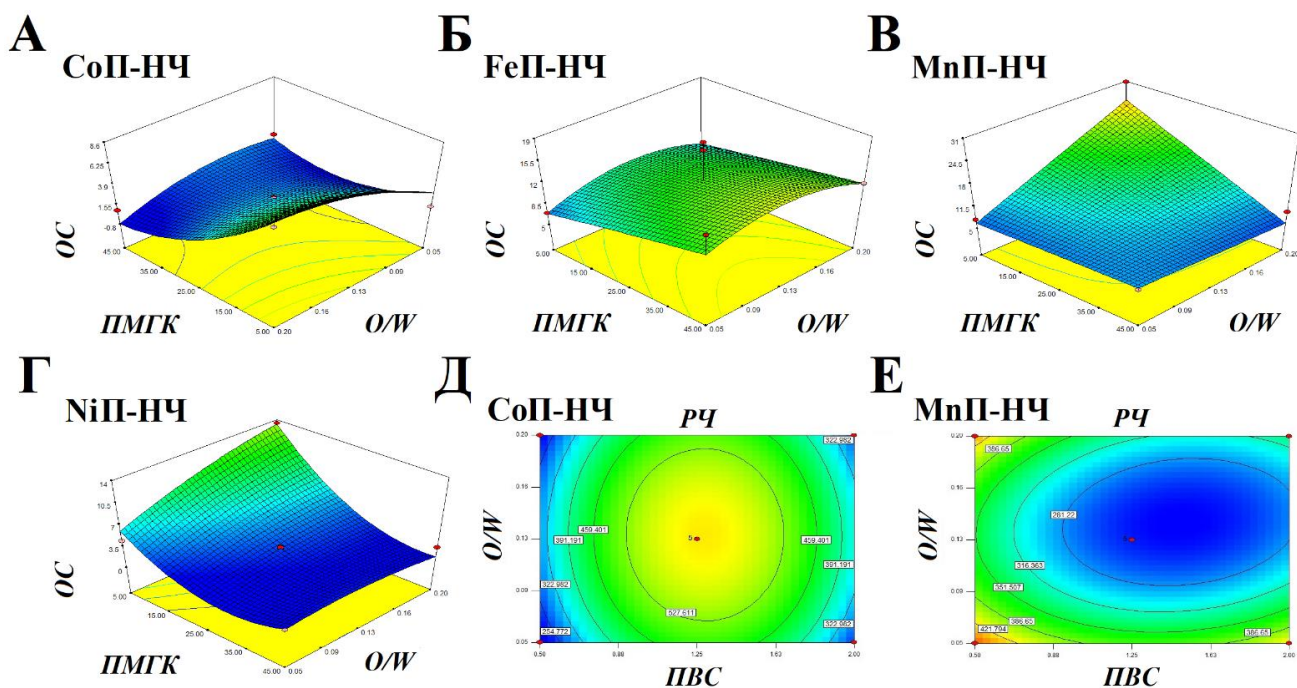


Рисунок 2. Двух- и трехмерные графики поверхности отклика, описывающие эффект взаимодействия ПМГК (мг) и O/W (об/об) на ОС СоП (А), ОС FeП (Б), ОС MnП (В) и ОС NiП в НЧ (Г), а также действие O/W (об/об) и ПВС (%) на РЧ СоП (Д) и РЧ MnП (Е).

Далее применяли метод многокритериальной оптимизации, на основе которого были получены прогнозируемые данные, удовлетворяющие условиям оптимизации: минимальный РЧ и максимальное ОС. Прогнозируемые данные получали по условиям, представленным в таблице 2. По указанным условиям получали НЧ, содержащие MeП, и анализировали на ОС и РЧ, сравнивали экспериментальные и прогнозируемые данные (табл. 2). Стоит отметить, что для получения НЧ, содержащих MnП, NiП и СоП, были предсказаны условия, имеющие схожие значения параметров: массы ПМГК (5-7 мг); концентрации ПВС (1.4-2%); соотношения O/W (1:5 – 1:7). В процессе оптимизации FeП-НЧ, оптимальные масса полимера и соотношение O/W сильно отличались от других MeП, что может объясняться более высокой агрегационной способностью FeП, требующей повышения вязкости органической фазы и стабилизации частиц [14].

В свою очередь, предсказание описанных выше условий получения НЧ может быть связано со схожими характеристиками MeП, например, растворимостью в органическом растворителе или водной фазе. Rouhani и соавторы получали оптимизированные ПМГК частицы, содержащие ZnП, с тем же значением O/W [15], так же, как Lorenzoni и коллеги, которые оптимизировали Ga (III)-фталоцианин-содержащие ПМГК частицы [16]. Данные результаты могут свидетельствовать об универсальности некоторых параметров для создания НЧ, содержащих тетрапиррольные макрогетероциклические соединения.

На основе предсказанных условий получали оптимизированные МеП-НЧ, анализировали их физико-химические характеристики и сравнивали значения ОС и РЧ с предсказанными. Согласно результатам, представленным в таблице 2, экспериментально полученные значения РЧ и ОС были достаточно близки к предсказанным, а относительно небольшие погрешности свидетельствовали о достоверности и воспроизводимости выбранных квадратичных моделей.

Таблица 2. Сравнение экспериментальных и прогнозируемых данных для НЧ, содержащих МеП, полученных с помощью методологии Бокса-Бенкена.

МеП	условия	отклик	экспериментальные данные	прогнозируемые данные	отн. погрешность, %
NiП-НЧ	X_1 : 5 мг X_2 : 1.47% X_3 : 1:7	Y_1 , %	11	10	-10
		Y_2 , нм	323	297	-9
CoП-НЧ	X_1 : 7.2 мг X_2 : 2% X_3 : 1:5	Y_1 , %	9	10	15
		Y_2 , нм	345	411	16
MnП-НЧ	X_1 : 5 мг X_2 : 1.42% X_3 : 1:5.6	Y_1 , %	28	23	-27
		Y_2 , нм	205	247	17
FeП-НЧ	X_1 : 45 мг X_2 : 2% X_3 : 1:20	Y_1 , %	14	14	-5
		Y_2 , нм	236	232	-2

На основе полученных данных можно сделать вывод о том, что методология Бокса-Бенкена была эффективно использована для разработки и оптимизации технологии получения НЧ на основе ПМГК, содержащих МеП.

2. Анализ полученных частиц, содержащих МеП

Оптимизированные МеП-НЧ были также проанализированы на степень включения МеП в НЧ, дзета-потенциал и индекс полидисперсности (ИПД) (табл. 3).

Таблица 3. ОС, степень включения, РЧ, дзета-потенциал и ИПД НЧ, содержащих NiП, CoП, FeП и MnП.

МеП-НЧ	общее содержание, %мас.	степень включения, %мас.	размер частиц, нм	дзета-потенциал, мВ	ИПД
NiП-НЧ	11±1	24±1	323±10	-15±2	0.17
CoП-НЧ	9±1	80±2	345±16	-11±2	0.19
MnП-НЧ	28±2	80±2	205±10	+18±2	0.14
FeП-НЧ	14±1	82±3	236±13	-18±7	0.15

MnП-НЧ обладали наибольшими ОС и степенью включения (СВ), а также наименьшими значениями РЧ и ИПД по сравнению с другими частицами. Размер всех полученных частиц

находился в диапазоне 200-350 нм, что способствует свободному перемещению частиц по кровотоку к местам опухолевой локализации, избегая при этом выведения почками.

СоП-НЧ, FeП-НЧ и NiП-НЧ имели отрицательный дзета-потенциал за счет наличия концевых карбоксильных групп ПМГК, а также небольшого количества ПВС на поверхности частиц, в то время как заряд поверхности MnП-НЧ был положительным. Данный эффект, вероятно, можно объяснить присутствием MnП на поверхности НЧ за счет образования ионов димеров MnП, которые могут связываться с поверхностью НЧ [17]. ИПД составил менее 0.20, что указывает на моодисперсное распределение частиц по размеру.

Результаты, полученные методом просвечивающей электронной микроскопии, подтверждали сферическую форму частиц и коррелировали с данными динамического светорассеяния (рис. 3).

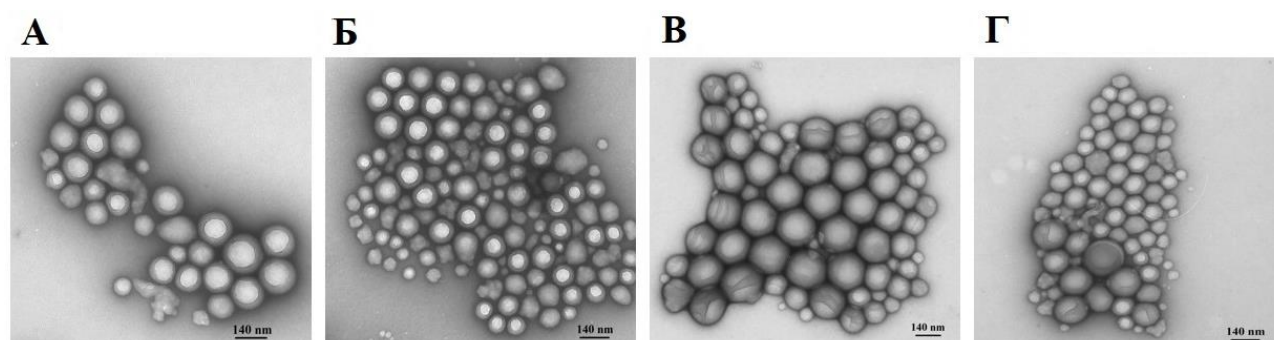


Рисунок 3. Микрофотографии НЧ, содержащих СоП (А), MnП (Б), NiП (В) и FeП (Г), полученные методом просвечивающей электронной микроскопии.

Для исследования взаимодействий между ПМГК и MeП, был использован метод ИК-спектроскопии в диапазоне от 4000 см^{-1} – 400 см^{-1} при комнатной температуре (рис. 4).

Анализ ПМГК показал наличие полос поглощения, соответствующих функциональным группам полимера: OH, C-H, C=O, C-O. В ИК-спектрах MeП полосы в области $1580\text{-}1600\text{ см}^{-1}$ характеризовали валентные колебания C-N группы, а интенсивные полосы в области $999\text{-}1012\text{ см}^{-1}$ на спектрах MnП, FeП и СоП и 1007 см^{-1} на спектре NiП, по-видимому, характеризовали Fe-N (рис. 4А,1а), Mn-N (рис. 4А,1б), Ni-N (рис. 4А,1в), Со-N (рис. 4А,1г) связи. При анализе ИК-спектров MeП-НЧ наблюдалось взаимодействие OH групп ПМГК с MeП, что видно из смещения характеризующих валентных колебаний из области 3500 см^{-1} в $3288\text{-}3399\text{ см}^{-1}$. Полученные данные могут свидетельствовать о наличии взаимодействий между ПМГК и MeП, формирующихся в процессе образования НЧ.

Далее проводили анализ высвобождения MeП из полимерных частиц (рис. 4Б). НЧ, содержащие MnП и FeП, демонстрировали схожий двухфазный профиль высвобождения. В течение первых 15 мин отмечалось быстрое высвобождение MnП и FeП из НЧ. Через 25-50 ч наблюдался выход на плато концентраций MnП и FeП, что может способствовать

продолгованному высвобождению веществ из НЧ и их более длительному противоопухолевому эффекту.

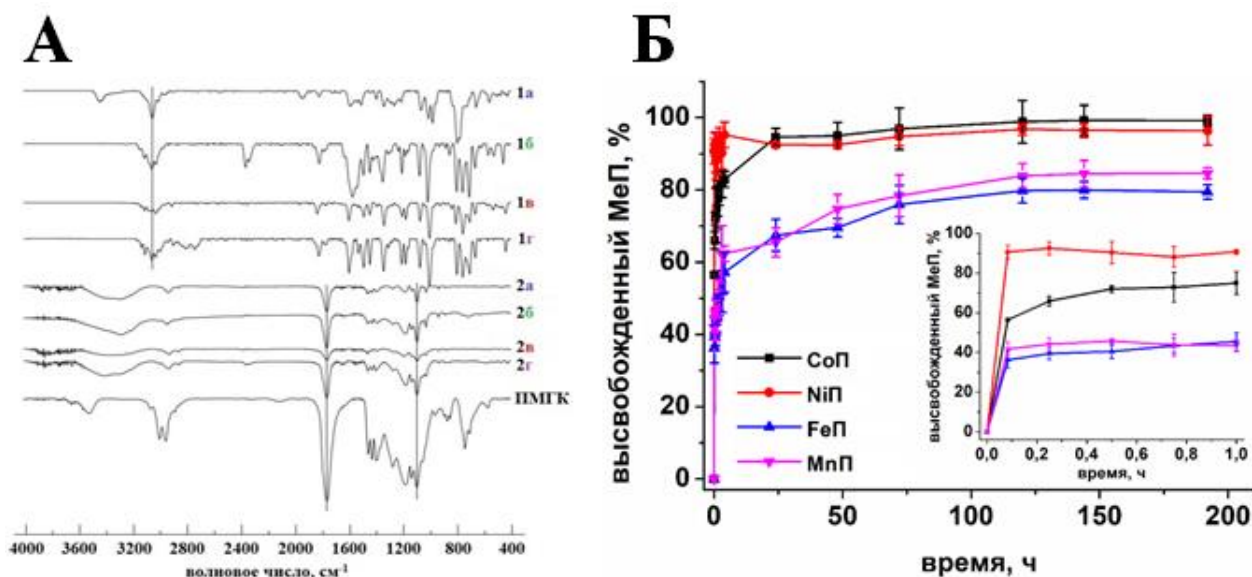


Рисунок 4. ИК-спектры NiП (1А), MnП (1Б), FeП (1В), СоП (1Г), НЧ, содержащих NiП (2А), MnП (2Б), FeП (2В), СоП (2Г) и ПМГК (А). Профиль высвобождения MeП из полимерной матрицы в фосфатно-солевом буфере при pH 7.4 и температуре 37 °С (Б).

Схожий профиль высвобождения FeП и MnП, может быть обусловлен использованием одинакового растворителя при получении НЧ, схожими РЧ и довольно высокими ОС по сравнению с NiП и СоП.

Характер высвобождения СоП из полимерной матрицы также соответствовал двухфазному профилю, где в первые 30 мин наблюдалось быстрое высвобождение, которое сменялось на замедленное. Стоит отметить, что высвобождение СоП и NiП протекало гораздо быстрее, чем для FeП и MnП, что может объясняться схожестью РЧ и ОС сравниваемых пар.

В свою очередь, резкое высвобождение NiП могло быть связано с низким ОС и, вероятно, с адсорбцией NiП на поверхности частиц. Тем не менее, такие профили высвобождения должны способствовать быстрому накоплению свободного MeП во внутриклеточном пространстве и сокращению интервала введения АК для достижения противоопухолевого эффекта.

3. Исследование цитотоксической активности каталитической системы на основе АК и полимерных частиц с металлопорфиринами *in vitro*

Для исследования цитотоксической активности MeП и наночастиц с MeП в комбинации с АК проводили эксперименты *in vitro* в отношении клеток линий MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека), HeLa (карцинома шейки матки человека), SK-OV-3 (аденокарцинома яичника человека) и K562 (хроническая миелогенная лейкемия человека). В таблице 6 приведены значения IC50 – концентрации, при которой наблюдается гибель 50%

клеток. Значения IC50 определяли по графику зависимости выживаемости клеток (%) от концентрации образцов.

Выживаемость клеток определяли с помощью стандартного МТТ анализа [18] по уравнению 2:

$$\text{Выживаемость} = (\text{Аобразца} / \text{Аконтр}) * 100\% \quad (2),$$

где Аобразца – значение оптической плотности клеток, инкубированных с экспериментальными образцами; Аконтр – значение оптической плотности контрольных клеток, инкубированных только в культуральной среде.

Исследования показали, что MeП и MeП-НЧ без добавления аскорбиновой кислоты проявляли слабую цитотоксическую активность (табл. 4). Каталитические системы в составе свободных MeП или MeП-НЧ и АК проявляли цитотоксическую активность в отношении всех выбранных клеточных линий. Значения IC50 для каталитических систем FeП/FeП-НЧ + АК были сопоставимы для каждого типа клеток, что указывает на сохранение каталитической активности FeП в НЧ. Таблица 4 четко демонстрирует более высокую цитотоксичность комбинации MnП-НЧ+АК по сравнению с MnП+АК. Стоит отметить, что каталитическая система на основе MnП и MnП-НЧ обладала более высокой активностью по сравнению с другими MeП. NiП и CoП проявляли схожую активность в комбинации с АК как в свободной, так и полимерной форме.

Таблица 4. Данные IC50 (указана концентрация по MeП, мкМ) для каталитической системы MeП/АК. Молярное соотношение MeП к АК составило 1:20.

Линия клеток/ Каталитическая система	MCF-7	HeLa	K562	SK-OV-3
	IC50, мкМ			
FeП	68.8	56.3	21.1	37.0
FeП-НЧ	77.6	61.5	45.8	41.0
FeП+АК	55.2	42.5	1.8	3.8
FeП-НЧ+АК	36.2	33.7	1.2	3.2
MnП	29.4	35.2	72.9	47.8
MnП-НЧ	36.7	32.3	82.3	42.2
MnП+АК	2.7	0.9	0.9	2.1
MnП-НЧ+АК	0.9	0.4	0.2	0.6
CoП	28.5	15.9	43.3	23.6
CoП-НЧ	21.3	11.5	42.6	20.1
CoП+АК	5.1	0.4	15.0	4.4
CoП-НЧ+АК	4.4	2.9	3.0	18.5
NiП	31.3	17.7	32.5	26.3
NiП-НЧ	28.0	15.5	35.5	24.3
NiП+АК	3.4	0.5	11.1	3.7
NiП-НЧ+АК	7.4	2.7	2.4	16.3

Полученные результаты могут указывать на то, что комбинации NiП-НЧ+АК и СоП-НЧ+АК обладают схожими каталитическими характеристиками, а FeП-НЧ+АК проявляет более низкую активность, чем MnП-НЧ+АК. Таким образом, комбинация АК и MnП-НЧ является наиболее перспективной для применения в каталитической терапии злокачественных новообразований.

Способность индуцировать окислительный стресс с помощью комбинации АК с MnП и MnП-НЧ была оценена с помощью 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин диацетата, окисленная форма которого обладает флуоресцентными свойствами (2',7'-дихлорофлуоресцеин, ДХФ), в отличие от исходной. На рисунке 5 представлено наложение гистограмм интенсивности флуоресценции ДХФ в клетках MCF-7 после инкубации с каталитическими системами; числовые значения указывают на среднюю интенсивность флуоресценции ДХФ, рассчитанную из гистограмм.

Включение MeП в НЧ (рис. 5А) способствовало повышению уровня АФК по сравнению со свободными субстанциями, что, вероятно, может быть связано с более эффективным поглощением НЧ клетками. В свою очередь, инкубация с АК индивидуально приводила к незначительному увеличению интенсивности флуоресценции ДХФ и была ниже, чем в комбинации с MeП. Интенсивность флуоресценции ДХФ была существенно выше после инкубации с MnП+АК и MnП-НЧ+АК по сравнению с остальными каталитическими системами (значения средней интенсивности флуоресценции составили 51 и 80, соответственно) (рис. 5), что свидетельствует об эффективной индукции АФК и подтверждается данными МТТ теста. Таким образом, было показано, что при включении MeП в полимер сохраняется их функциональная активность.

Поскольку Mn-содержащие комбинации проявляли наибольшую цитотоксическую активность, а также способствовали значительному повышению АФК по сравнению с остальными комбинациями, было решено проводить последующие эксперименты по уточнению механизма действия в отношении данной системы.

Супероксид анион является важным побочным продуктом клеточного метаболизма. Способность MnП/MnП-НЧ и АК индуцировать образование митохондриального супероксид аниона была оценена с помощью флуоресцентной метки MitoSOX Red в клетках линии MCF-7. Было установлено, что в ходе каталитической реакции между MnП и АК происходит образование супероксид аниона (значения средней интенсивности флуоресценции составили 68) (рис. 5В). Интенсивность флуоресценции MitoSOX Red была значительно выше для комбинации АК и MnП-НЧ, что согласуется с результатами оценки уровня АФК (значения средней интенсивности флуоресценции составили 233). Таким образом, можно предположить, что происходило более

эффективное поглощение клетками МнП-НЧ, которые в комбинации с АК формировали АФК, в том числе супероксид анион, повреждающие клеточные компартменты.

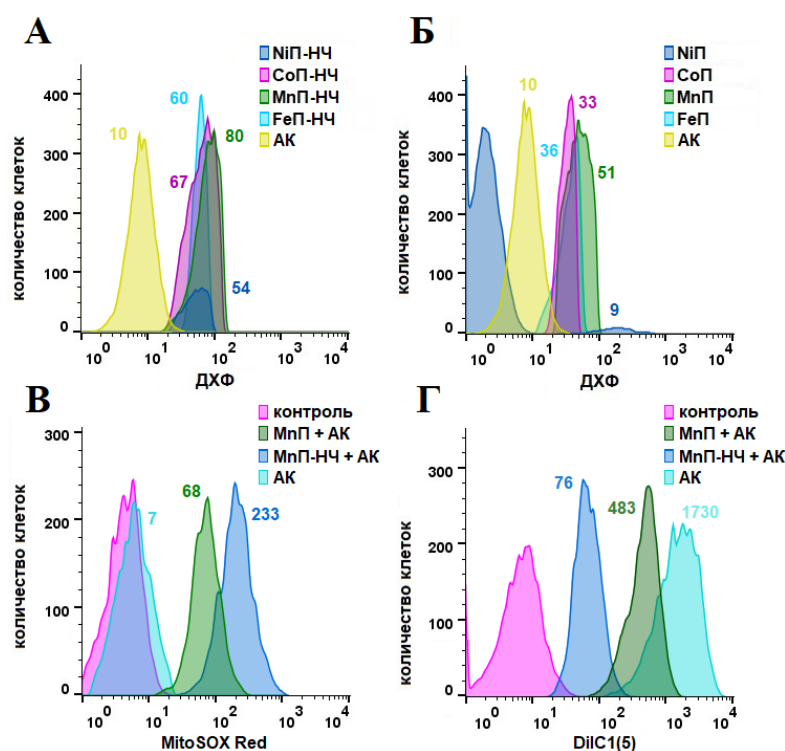


Рисунок 5. Уровень внутриклеточных АФК в клетках MCF-7 после инкубации с комбинацией АК (60 мкМ) и MeП-НЧ (3 мкМ) (А), комбинацией АК (60 мкМ) и MeП (3 мкМ) оцененный методом проточной цитофлуориметрии (Б). Образование супероксид аниона в клетках MCF-7, стимулированного комбинацией МнП/МнП-НЧ (3 мкМ) и АК (60 мкМ) определенное методом проточной цитофлуориметрии (В). Митохондриальный потенциал в клетках MCF-7, инкубированных с комбинацией МнП/МнП-НЧ (3 мкМ) и АК (60 мкМ) оцененный методом проточной цитофлуориметрии (Г). Контроль – нелеченные клетки без добавления флуорофора. Числовые значения – средняя интенсивность флуоресценции реагента в образце.

Поскольку митохондрии играют важнейшую роль в качестве источников энергии, регуляторов клеточной пролиферации и гибели клеток, любые изменения в мембранном потенциале могут привести к их повреждению. Изменения митохондриального потенциала после инкубации с МнП+АК и МнП-НЧ+АК регистрировали с использованием флуоресцентного зонда DiIC1(5) в клетках линии MCF-7. Инкубация с АК не приводила к значительным изменениям потенциала мембраны митохондрий, о чем свидетельствовала высокая интенсивность флуоресценции DiIC1(5). Использование комбинации МнП-НЧ+АК (значения средней интенсивности флуоресценции составили 76) приводило к более выраженному снижению потенциала мембраны по сравнению с МнП+АК (значения средней интенсивности флуоресценции составили 483) (рис. 5Г). Вероятно, высокий уровень АФК, формируемый

комбинацией MnII-НЧ+АК, приводил к снижению потенциала мембраны митохондрий, что активировало программируемую гибель клеток.

Для анализа механизма гибели клеток MCF-7 проводили двойное окрашивание аннексином V/пропидий иодидом после инкубации с каталитическими системами. Для выявления клеток в состоянии раннего апоптоза использовался аннексин V, который связывается с фосфатидилсеринем в присутствии кальция. Пропидий иодид – маркер некроза, который проникает в клетку через проницаемую мембрану и не способен окрашивать живые и ранние апоптотические клетки из-за неповрежденной плазматической мембраны [19].

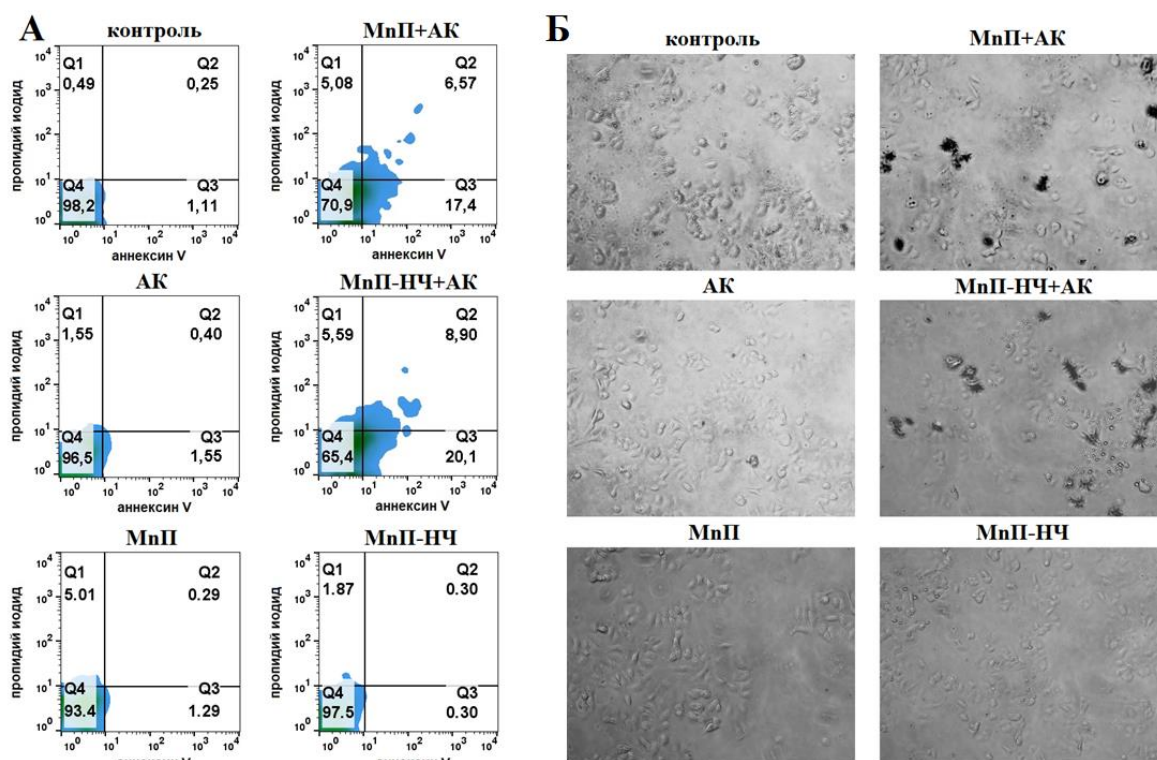


Рисунок 6. Анализ апоптотических и некротических популяций клеток линии MCF-7 после 24 ч инкубации с MnII/MnII-НЧ (3 мкМ) и АК (60 мкМ), проведенный методом проточной цитофлуориметрии (А). Оценка фрагментации ДНК в клетках линии MCF-7 после инкубации с MnII/MnII-НЧ (3 мкМ) и АК (60 мкМ) (Б) в течении 24 ч методом TUNEL анализа.

Как показано на рисунке 6А, клетки, проинкубированные с каталитической системой, разделены на четыре квадранта (Q1, Q2, Q3 и Q4). В квадранте Q1 клетки, которые окрашены положительно только пропидий иодидом, что указывает на некроз; в квадранте Q2 клетки положительно окрашены аннексином V и пропидий иодидом и представляют позднюю апоптотическую популяцию. В квадранте Q3 клетки окрашены положительно только на аннексин V и указывают на раннюю апоптотическую популяцию. Неокрашенные клетки являются живыми и представлены в квадранте Q4.

Установлено, что инкубация с АК, MnП и MnП-НЧ практически не приводила к появлению апоптотических популяций, в то время как комбинация MnП-НЧ+АК стимулировала схожее количество ранних апоптотических популяций (20%) с MnП+АК (17%) (рис. 6А).

Известно, что фрагментация ДНК является маркером апоптоза, поэтому для подтверждения механизма гибели клеток MCF-7, вызванной каталитической системой, был проведен TUNEL анализ (рис. 6Б) [20]. Результаты экспериментов показали, что MnП+АК, и MnП-НЧ+АК эффективно индуцировали повреждение ДНК, а АК, MnП и MnП-НЧ не вызывали подобных эффектов. На основании полученных результатов можно заключить, что включение MnП в НЧ способствует повышению противоопухолевой активности комбинации MnП-НЧ+АК, а механизм действия каталитической системы заключается в образовании АФК, в том числе супероксид аниона, которые повреждают ДНК и митохондрии и приводят к активации апоптоза.

4. Исследование противоопухолевых свойств каталитической системы на основе АК и MnП-НЧ *in vivo*

При исследовании острой токсичности комбинаций MnП и АК, а также MnП-НЧ и АК были определены значения LD50 на мышах линии BALB/c с привитой аденокарциномой линии 4Т1. Полученные значения LD50 – 62.7 мг/кг для комбинации MnП и АК, и 141.4 мг/кг для комбинации MnП-НЧ и АК, свидетельствовали о значительном снижении острого токсического действия включенного в НЧ MnП.

Следующий этап работы заключался в оценке противоопухолевого эффекта MnП и MnП-НЧ индивидуально и в комбинации с АК в эксперименте *in vivo* на модели подкожно привитой карциномы молочной железы мыши 4Т1 на мышах линии BALB/c (рис. 7).

Лечение животных начинали через 24 ч после подкожной инокуляции мышам суспензии опухолевых клеток 4Т1 в количестве $2 \cdot 10^5$ клеток. MnП и MnП-НЧ вводили двум группам мышей внутривенно в двух дозах (5 мг/кг и 50 мг/кг), АК – внутрибрюшинно (в массовом соотношении 1 к 20 соответственно). Проводили 2-х кратное введение: на 1-ые и 7-ые сутки после прививки опухолевых клеток. Введение комбинаций MnП+АК и MnП-НЧ+АК в двух дозах способствовало существенному снижению роста опухоли. Как показано на рис. 7, при использовании физиологического раствора и индивидуально введенных АК в дозах 1000 мг/кг и 100 мг/кг, MnП в дозе 50 мг/кг, MnП-НЧ в дозе 50 мг/кг не наблюдалось уменьшения роста опухоли. Следует отметить, что значимых различий в противоопухолевой эффективности каталитической системы АК и MnП/MnП-НЧ в дозах 5 мг/кг и 50 мг/кг на данной модели нет, что может свидетельствовать о том, что дозы 5 мг/кг достаточно для реализации эффекта.

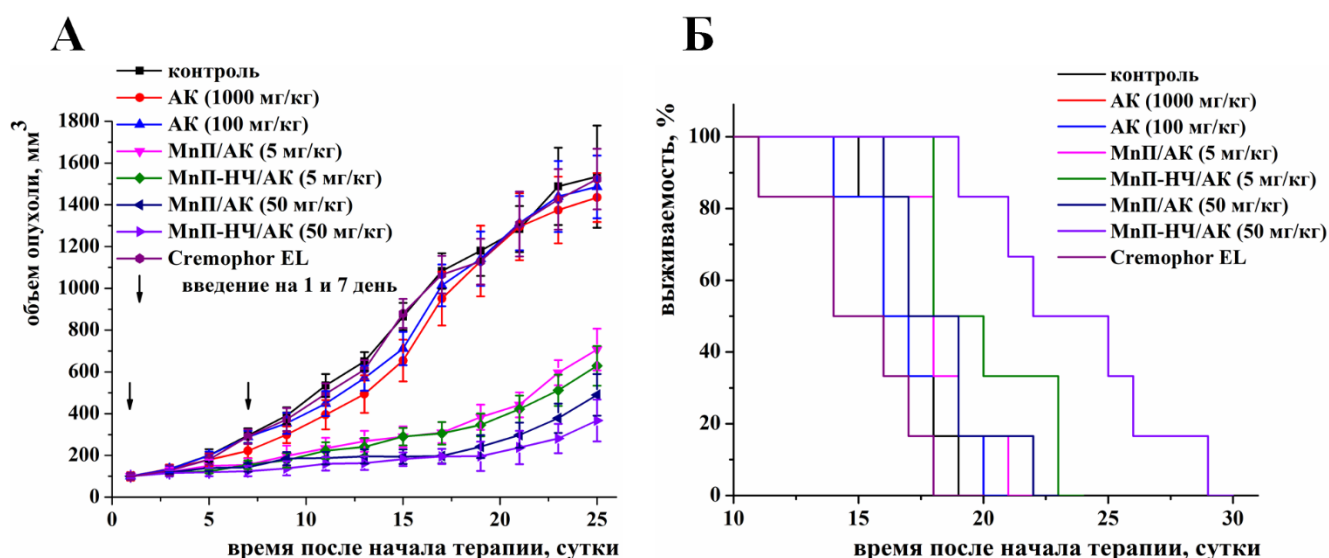


Рисунок 7. Динамика роста опухолей у мышей BALB/c с привитой аденокарциномой линии 4Т1 после внутривенного введения MnП и MnП-НЧ в дозах 5 мг/кг или 50 мг/кг, а также внутрибрюшинного введения АК в дозе 100 или 1000 мг/кг. Интервал между введением MnП и АК составил 2 ч. Стрелки указывают на времена введения субстанций. В каждой группе было по 6 животных (А). График выживаемости животных с привитой опухолью линии 4Т1 после внутривенного введения MnП и MnП-НЧ в дозах 5 мг/кг или 50 мг/кг, а также внутрибрюшинного введения АК в дозе 100 или 1000 мг/кг (Б).

Результаты исследования выживаемости животных показали, что в группах, лечение которых проводили комбинацией MnП-НЧ и АК, наблюдается значительное увеличение средней продолжительности жизни (УСПЖ) по сравнению с группами, получавшими субстанцию совместно с АК. Наиболее выраженный эффект УСПЖ в 39.6 % наблюдался для группы, получавшей комбинацию MnП-НЧ+АК в дозе 50 мг/кг (табл. 5).

Таблица 5. Увеличение средней продолжительности жизни (УСПЖ, %) мышей линии BALB/c с привитой опухолью молочной железы линии 4Т1 после внутривенного введения MnП и MnП-НЧ в дозах 5 мг/кг или 50 мг/кг, а также внутрибрюшинного введения АК в дозах 100 или 1000 мг/кг.

Группа	АК, 100 мг/кг	АК, 1000 мг/кг	MnП+АК, 5 мг/кг	MnП-НЧ+АК, 5 мг/кг	MnП+АК, 50 мг/кг	MnП-НЧ+АК, 50 мг/кг	Раствор Cremophor EL
УСПЖ, %	1.9	2.2	9.4	18.9	9.4	39.6	-10.1

Исследование биораспределения проводили на мышах линии BALB/c с привитой опухолью молочной железы линии 4Т1 (после достижения объема ~300 мм³) через 24 ч после введения MnП-НЧ и MnП в дозе 25 мг/кг (рис. 8).

Как видно из рисунка 8, через 24 ч после введения препаратов, MnП-НЧ в несколько раз более эффективно накапливались в опухоли, чем субстанция. При этом наблюдается

характерный для полимерных НЧ и гидрофобных субстанций профиль биораспределения по органам, в том числе и высокий уровень накопления в органах выведения (печень, селезенка, почки). Таким образом, полученные MnII-НЧ в большей степени накапливались в опухолевой ткани, чем субстанция, что может способствовать увеличению противоопухолевого эффекта при проведении терапии.

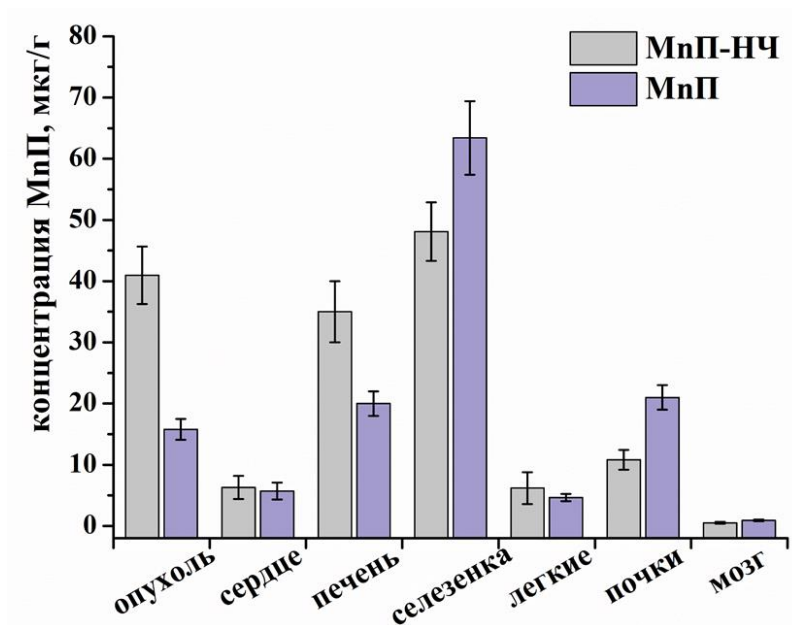


Рисунок 8. Биораспределение MnII по органам на мышах BALB/c через 24 ч после внутривенного введения MnII и MnII-НЧ в дозе 25 мг/кг.

Резюмируя совокупность полученных результатов, стоит отметить выраженную противоопухолевую эффективность препаратов на основе MnII: значимое влияние каталитической системы на основе MnII/MnII-НЧ и АК на динамику роста опухоли в сравнении с контрольной группой, выраженное УСПЖ групп, получавших частицы, содержащие MnII, а также менее выраженное острое токсическое воздействие комбинации MnII-НЧ+АК на организм здоровых животных.

Таким образом, полученная каталитическая система MnII-НЧ+АК обладает существенной противоопухолевой эффективностью и её перспективность должна быть исследована в последующих экспериментах с различными типами опухолевых моделей.

Заключение

При разработке и оптимизации метода получения НЧ необходимо учитывать такие параметры как размер частиц (РЧ) и общее содержание (ОС), поскольку НЧ размером менее 800 нм накапливаются в опухолевых тканях, а значение ОС влияет на дозу вводимого препарата. Таким образом, избирательное накопление в опухолевых тканях и снижение дозы лекарственного средства являются решающими параметрами для уменьшения токсических эффектов. Оптимизацию получения НЧ проводили с использованием методологии Бокса-

Бенкена, в качестве задачи оптимизации были выбраны условия низкого РЧ и максимального ОС. В процессе оптимизации было выявлено, что для каждого MeП параметры (масса ПМГК, концентрация ПВС, соотношение O/W фаз) оказывали различное влияние на РЧ и ОС. Однако, диапазон изменения этих параметров для NiП, MnП и CoП был довольно узким. Предполагается, что оптимизированный метод получения данных MeП может быть использован для включения других тетрапиррольных макрогетероциклических соединений.

Результаты ИК-спектроскопии выявили наличие взаимодействий между ПМГК и MeП, формирующихся в процессе образования НЧ. Профиль высвобождения MeП из НЧ был двухфазным, характеризовался резким всплеском с последующим замедленным высвобождением MeП в течении 200 ч. Аналогичные результаты были описаны для НЧ, содержащих гидрофобные лекарственные препараты.

Установлено, что НЧ, содержащие MnП, FeП и CoП, эффективно индуцировали гибель опухолевых клеток. Наиболее активные комбинации MnП+АК и MnП-НЧ+АК демонстрировали увеличение внутриклеточного уровня АФК, индукцию апоптоза за счет повреждения ДНК и митохондрий, а также значительное торможение роста опухоли в экспериментах *in vivo*. Результаты *in vivo* исследования биораспределения свидетельствовали о более высоком накоплении MnП-НЧ в опухоли по сравнению с MnП. Таким образом, полученные MnП-НЧ в комбинации с АК представляются перспективными лекарственными средствами для каталитической терапии опухолевых заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны методы получения частиц, содержащих комплексы Fe (III), Mn (III), Ni (II), Co (II) и *мезо*-тетрафенилпорфиринов. Оптимизация условий позволила получить частицы с низким размером (200-345 нм) и высоким общим содержанием металлопорфирина в частицах (9-29%).

2. Определены физико-химические характеристики частиц: выявлены сферическая форма частиц и наличие взаимодействий между полимером и металлопорфирином. Выявлены двухфазные профили высвобождения металлопорфиринов из частиц.

3. Исследуемые комбинации аскорбиновой кислоты и частиц, содержащих металлопорфирины, демонстрировали цитотоксическую активность в отношении опухолевых линий клеток MCF-7, K562, SK-OV-3 и HeLa. Комбинация аскорбиновой кислоты и частиц, содержащих Mn-*мезо*-тетрафенилпорфирин, способствовала повышению уровня активных форм кислорода, повреждению ДНК и митохондрий, стимулировала апоптоз.

4. Комбинация аскорбиновой кислоты и частиц, содержащих Mn-*мезо*-тетрафенилпорфирин, обладала выраженной противоопухолевой эффективностью *in vivo*.

Включение Мп-мезо-тетрафенилпорфирина в частицы способствовало его более эффективному накоплению в опухоли по сравнению со свободной субстанцией.

Список использованной литературы

1. Groves J. T. Reactivity and mechanisms of metalloporphyrin catalyzed oxidations //Journal of Porphyrins and Phthalocyanines. – 2000. – V. 4. – №. 4. – P. 350-352.
2. Mansuy D., Fontecave M., Battioni J. P. Intermediate formation of a σ -alkyl iron (III) complex in the reduction of 4-nitrobenzyl chloride catalysed by iron (II)-prophyrins //Journal of the Chemical Society, Chemical Communications. – 1982. – №. 5. – P. 317-319.
3. Deng K., Zhou J., Li X. Noncovalent nanohybrid of cobalt tetraphenylporphyrin with graphene for simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine, and uric acid //Electrochimica Acta. – 2013. – V. 114. – P. 341-346.
4. Wang X. Y. et al. Cobalt (II) and nickel (II) ions as promoters of free radicals in vivo: detected directly using electron spin resonance spectrometry in circulating blood in rats //Archives of biochemistry and biophysics. – 1993. – V. 306. – №. 2. – P. 402-406.
5. Operti M. C. et al. PLGA-based nanomedicines manufacturing: Technologies overview and challenges in industrial scale-up //International Journal of Pharmaceutics. – 2021. – V. 605. – P. 120807.
6. Pandey G. et al. Fluorescent biocompatible platinum-porphyrin-doped polymeric hybrid particles for oxygen and glucose biosensing //Scientific reports. – 2019. – V. 9. – №. 1. – P. 5029.
7. Vepris O. et al. Optically coupled PtOEP and DPA molecules encapsulated into PLGA-nanoparticles for cancer bioimaging //Biomedicines. – 2022. – V. 10. – №. 5. – P. 1070.
8. Dantas K. C. F., Rosário J. S., Silva-Caldeira P. P. Polymeric nanosystems applied for metal-based drugs and photosensitizers delivery: the state of the art and recent advancements //Pharmaceutics. – 2022. – V. 14. – №. 7. – P. 1506.
9. Smith C. B. et al. Photodynamic therapy of inorganic complexes for the treatment of cancer //Photochemistry and Photobiology. – 2022. – V. 98. – №. 1. – P. 17-41.
10. El-Hammadi M. M., Arias J. L. Recent Advances in the Surface Functionalization of PLGA-Based Nanomedicines //Nanomaterials. – 2022. – V. 12. – №. 3. – P. 354.
11. Zhi K. et al. PLGA nanoparticle-based formulations to cross the blood-brain barrier for drug delivery: From R&D to cGMP //Pharmaceutics. – 2021. – V. 13. – №. 4. – P. 500.
12. Mir M., Ahmed N., ur Rehman A. Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2017. – V. 159. – P. 217-231.
13. Jonderian A., Maalouf R. Formulation and in vitro interaction of rhodamine-B loaded PLGA nanoparticles with cardiac myocytes //Frontiers in pharmacology. – 2016. – V. 7. – P. 458.

14. Burnham B. F., Zuckerman J. J. Complex formation between porphyrins and metal ions //Journal of the American Chemical Society. – 1970. – V. 92. – №. 6. – P. 1547-1550.
15. Rouhani H. et al. Zinc protoporphyrin polymeric nanoparticles: potent heme oxygenase inhibitor for cancer therapy //Pharmaceutical research. – 2014. – V. 31. – №. 8. – P. 2124-2139.
16. Lorenzoni D., Souto C.A.Z., Araujo M.B., de Souza Berger C., da Silva L.C.D., Baratti M.O., Ribeiro J.N., Endringer D.C., Guimaraes M.C.C., da Silva A.R. PLGA-PEG nanoparticles containing gallium phthalocyanine: Preparation, optimization and analysis of its photodynamic efficiency on red blood cell and Hepa-1C1C7 //J. Photochem. Photobiol. B Biol. – 2019. – V. 198. P. 111582.
17. Gozet T., Huynh L., Bohme D. K. Collision-induced dissociation of tetraphenyl iron and manganese porphyrin ions by electrospray ionization mass spectrometry //International Journal of Mass Spectrometry. – 2009. – V. 279. – №. 2-3. – P. 113-118.
18. Ali N. M. et al. Synthetic curcumin derivative DK1 possessed G2/M arrest and induced apoptosis through accumulation of intracellular ROS in MCF-7 breast cancer cells //Cancer Cell International. – 2017. – V. 17. – P. 1-12.
19. Crowley L. C. et al. Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry //Cold Spring Harbor Protocols. – 2016. – V. 2016. – №. 11. – P. pdb.prot087288.
20. Matassov D. et al. Measurement of apoptosis by DNA fragmentation //Apoptosis Methods and Protocols. – 2004. – P. 1-17.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus

1. **Mollaeva M.R. et al.** Optimization, Characterization and Pharmacokinetic Study of Meso-Tetraphenylporphyrin Metal Complex Loaded PLGA Nanoparticles / M.R. Mollaeva, N. Yabbarov, M. Sokol, M. Chirkina, M.D. Mollaev, A. Zabolotskii, I. Seregina, M. Bolshov, A. Kaplun, E. Nikolskaya // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22. – P. 12261. (объем 1,6 п.л., авторский вклад 60%) [Импакт-фактор Wos JIF=5.6] DOI: 10.3390/ijms222212261
2. **Faustova (Mollaeva) M. et. al.** Metalloporphyrins in medicine: from history to recent trends / M. Faustova (Mollaeva), E. Nikolskaya, M. Sokol, M. Fomicheva, R. Petrov, N. Yabbarov // ACS Applied Bio Materials. – 2020. – Vol. 3. – I. 12. – P. 8146–8171. (объем 2,9 п.л., авторский вклад 70%) [Импакт-фактор Wos JIF=4.7] DOI: 10.1021/acsbm.0c00941
3. **Фаустова (Моллаева) М.Р. и др.** Полимерные частицы, содержащие металлопорфирин на основе Fe, как высокоэффективный индуктор образования активных форм кислорода *in vitro* и *in vivo* / М. Р. Фаустова (Моллаева), Е.Д. Никольская, М.Д. Моллаев, М.Б. Сокол, А.И. Заболотский,

О.А. Жунина, М.В. Фомичева, В.И. Швец, А.В. Лобанов, Н.Г. Яббаров // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2019. – № 12. – С. 2216-2224. (объем 0,5 п.л.) **Faustova (Mollaeva) M.R. et. al.** Polymer particles containing Fe-based metalloporphyrin as a highly efficient stimulator of reactive oxygen species formation *in vitro* and *in vivo* / M.R. Faustova (Mollaeva), E.D. Nikolskaya, M.D. Mollaev, M.V. Sokol, A.I. Zabolotskiy, O.A. Zhunina, M.V. Fomicheva, V. I. Shvets, A.V. Lobanov, N.G. Yabbarov // Russian Chemical Bulletin. – 2019. – Vol. 68. – I. 12. – P. 2216-2224. (объем 0,5 п.л., авторский вклад 80%) [Импакт-фактор Wos JIF=1.7] DOI: 10.1007/s11172-019-2690-1

4. **Faustova (Mollaeva) M. et. al.** High-effective reactive oxygen species inducer based on Mn-tetraphenylporphyrin loaded PLGA nanoparticles in binary catalyst therapy / M. Faustova (Mollaeva), E. Nikolskaya, M. Sokol, A. Zabolotsky, M. Mollaev, O. Zhunina, M. Fomicheva, A. Lobanov, E. Severin, N. Yabbarov // Free Radical Biology and Medicine. – 2019. – Vol. 143. – P. 522-533. (объем 0,7 п.л., авторский вклад 60%) [Импакт-фактор Wos JIF=7.4] DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2019.09.008

5. **Фаустова (Моллаева) М.Р. и др.** Полимерные частицы, содержащие FeCl-тетрафенилпорфирин, для бинарной каталитической терапии новообразований / М.Р. Фаустова (Моллаева), Е.Д. Никольская, О.А. Жунина, М.Д. Моллаев, Н.Г. Яббаров, А.В. Лобанов, М.Я. Мельников, Е.С. Северин // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2018. – Т. 67. – № 2 – С. 359-365. (объем 0,4 п.л.) **Faustova (Mollaeva) M.R. et. al.** Polymer nanoparticles loaded with FeCl-tetraphenylporphyrin for binary catalytic therapy of neoplasms / M.R. Faustova (Mollaeva), E.D. Nikolskaya, O.A. Zhunina, M.D. Mollaev, N.G. Yabbarov, A.V. Lobanov, M.Ya. Melnikov, E.S. Severin // Russian Chemical Bulletin. – 2018. – Vol. 67. – I. 2. – P. 359-365. (объем 0,4 п.л., авторский вклад 70%) [Импакт-фактор Wos JIF=1.7] DOI: 10.1007/s11172-018-2081-z

Сокращения, принятые в тексте. АФК – активные формы кислорода, MeП – металлопорфирин, АК – аскорбиновая кислота, ПМГК – сополимер молочной и гликолевой кислот, НЧ – наночастицы, FeП – FeCl-тетрафенилпорфирин, MnП – MnCl-тетрафенилпорфирин, NiП – Ni-тетрафенилпорфирин, CoП – Co-тетрафенилпорфирин, ПВС – поливиниловый спирт, О/В – соотношение органической и водной фаз, ОС – общее содержание, РЧ – размер частиц, ИПД – индекс полидисперсности, СВ – степень включения вещества в частицы, MCF-7 – аденокарцинома молочной железы человека, HeLa – карцинома шейки матки человека, SK-OV-3 – аденокарцинома яичника человека, K562 – хронический миелогенный лейкоз человека, ДХФ – 2'-7'-дихлорфлуоресцеин, 4Т1 – аденокарцинома молочной железы мыши, УСПЖ – увеличение средней продолжительности жизни.