

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Крот Алексей Романович

**Исследования оптических свойств наноразмерных
форм тетрапирольных фотосенсибилизаторов
при различных факторах**

Специальность:

1.3.6. Оптика

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2025

Работа выполнена на кафедре молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества физического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Научный
руководитель: **Сергеева Ирина Александровна,**
кандидат физико-математических наук, доцент

Официальные
оппоненты: **Генина Элина Алексеевна,**
доктор физико-математических наук, доцент,
Саратовский национальный исследовательский
государственный университет имени Н.Г. Чернышевского,
Институт физики, кафедра оптики и биофотоники, профессор

Дубровин Евгений Владимирович,
доктор физико-математических наук,
Московский государственный университет имени
М.В. Ломоносова, физический факультет, кафедра физики
полимеров и кристаллов, ведущий научный сотрудник

Короленко Павел Васильевич,
доктор физико-математических наук, профессор,
Московский государственный университет имени
М.В. Ломоносова, физический факультет, кафедра оптики,
спектроскопии и физики наносистем, профессор

Защита диссертации состоится «25» декабря 2025 года в 14:00 на заседании диссертационного совета МГУ.013.6 на физическом факультете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 2, аудитория 4-28.

E-mail: kosareva@physics.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций Научной библиотеки Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (119192, г. Москва, Ломоносовский проспект, д. 27) и в сети Интернет: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3540>

Автореферат разослан «___» _____ 2025 года.

Учёный секретарь
диссертационного совета МГУ.013.6
доктор физико-математических наук, доцент



О.Г. Косарева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы данного исследования обусловлена высокой важностью поиска доступных методов терапии злокачественных новообразований (ЗНО). Среди множества концепций лечения ЗНО традиционно выделяют фотодинамическую терапию (ФДТ) – популярный метод лечения, основанный на фотохимической реакции кислорода с биологическим субстратом. Под воздействием лазерного излучения, поглощаемого молекулами фотосенсибилизатора (ФС), образуется синглетный кислород, инициирующий апоптоз опухолевых тканей. Эффективность ФДТ во многом определяется физико-химическими и оптическими свойствами ФС. В данной работе представлен комплексный анализ перспективных отечественных наночастиц ФС третьего поколения на основе ряда тетрапиррольных макроциклов – аннелированных порфиразинов, в том числе, фталоцианинов, а также метилфеофорбида *a*.

В случае реализации концепции пассивного таргетинга ключевым параметром, определяющим эффективное накопление наночастиц ФС в опухоли, является их средний размер. Исследование гидродинамических радиусов ФС в данной работе проводилось методом динамического рассеяния света (ДРС). ДРС имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами определения размера наночастиц, позволяя определять эффективный гидродинамический радиус частиц в жидких средах, в условиях, близких к физиологическим, при этом, не оказывая влияния на строение самого ФС.

Однако, при наличии взаимодействия наночастиц ФС с сывороточным альбумином, различить размеры многокомпонентной дисперсной системы может быть практически невозможным. Использование оптических методов спектрофотометрии и спектрофлуориметрии позволяет анализировать изменения спектральных свойств в процессе взаимодействия частиц ФС с белком. Такой анализ позволяет определить характерные времена взаимодействия при заданных концентрациях, установить химическую кинетику протекания реакции. Анализ разгорания или тушения флуоресценции мономеров в водных растворах позволяет количественно оценить концентрации мономерных и ассоциированных форм наночастиц ФС в зависимости от их строения и, как следствие, кинетику процесса взаимодействия.

При глубоких расположениях опухолей в организме особое внимание уделяется селективности накопления в них ФС, чтобы минимизировать поражение здоровых тканей. Одним из перспективных направлений в этой области является создание наноразмерных контейнеров, содержащих активные препараты. Данный подход продолжает свое активное развитие, однако, существуют сложности в проведении клинических испытаний, связанных в первую очередь с

необходимостью использования относительно высоких концентраций поверхностно-активных веществ (ПАВ) в качестве стабилизирующей оболочки. Липосомальные наноконтейнеры представляют собой наночастицы на основе гидрофобных ФС и амфифильного ПАВ, например, такого как: поливинилпирролидон (ПВП), полиэтиленгликоль (ПЭГ), плуроник и др. Такие ПАВ формируют с тетрапиррольными соединениями стабильные ассоциаты в водных растворах, однако их использование может приводить к невозможности корректного определения летальной дозы самих терапевтических препаратов.

Другим распространённым подходом является создание амфифильных ФС, способных к самосборке. ФС на основе тетрапиррольных соединений с гидрофильными заместителями могут самостоятельно растворяться в воде, формируя при этом стабильные наноразмерные мицеллярные структуры и, тем самым, обеспечивая пассивный таргетинг. Порфиразины и их производные являются эффективными ФС благодаря интенсивному оптическому поглощению от видимого до ближнего инфракрасного спектра и высокому квантовому выходу синглетного кислорода. Их структурная гибкость, широкие возможности для введения функциональных групп и способность образовывать устойчивые комплексы с различными металлами позволяют использовать эти соединения не только как амфифильные ФС для целевой доставки, но и в качестве молекулярных ФС, флуоресцентных маркеров для диагностики опухолевых тканей, а также радиосенсибилизаторов при использовании тяжёлых металлов, что потенциально расширяет область их применения до ФДТ, активируемой рентгеновским излучением. Кроме того, свойства порфиразинов делают возможным их использование в качестве агентов для фототермальной терапии и в мультимодальных подходах, сочетающих диагностику и лечение (тераностика).

В настоящем исследовании представлен комплексный анализ уникальных отечественных наночастиц ФС двух типов: способные к самосборке амфифильные ФС и наночастицы на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера.

Цель и задачи работы

Цель работы заключается в разработке методики исследования оптических свойств отечественных наноразмерных ФС третьего поколения и выявлении их возможного взаимодействия с основным белком сыворотки крови – альбумином *in vitro*.

Для достижения поставленной цели в работе сформулированы ряд следующих практических **задач**:

1. Определить характерные гидродинамические радиусы двух типов наноразмерных ФС: способные к самосборке амфифильные ФС (S_27_Na и PT_reg) и наночастицы на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера (VP-6, PT-1, PT-5 и IB-25);

2. Исследовать изменение оптических параметров наночастиц с течением времени, от длительности светового воздействия и различного уровня pH;
3. Изучить возможное влияние концентрации ПВП на средний гидродинамический радиус наночастиц на основе гидрофобных ФС с амфифильным полимером;
4. Исследовать возможное взаимодействие ФС с основным транспортным белком сыворотки крови – альбумином и определить кинетику данного процесса.

Объект и предмет исследования

Объектом исследования являются следующие типы наноразмерных ФС: наночастицы гидрофобных ФС на основе диад фталоцианинов и метилфеофорбида а (IB-25, VP-6), диазепинопорфиразинов магния (РТ-1, РТ-5) и амфифильного полимера ПВП, а также способные к самосборке амфифильные гетероциклические монодиазепинаннелированные аналоги фталоцианина магния (S_27_Na и РТ_reg). В качестве белка для исследования использовался основной транспортный белок крови — сывороточный альбумин человека. Предметом исследования являлись гидродинамические характеристики, фотостабильность и оптические свойства наночастиц ФС, их поведение в присутствии поливинилпирролидона, а также механизмы взаимодействия амфифильных ФС с сывороточным альбумином.

Методология и методы исследования

В рамках работы использовались современные оптические методы для исследования наночастиц ФС и их взаимодействия с биомолекулами. Экспериментальная работа включала комплекс приборов, таких как спектрофотометр HITACHI U-2900 для анализа спектров поглощения и спектрофлуориметр Cary Eclipse для оценки флуоресцентных свойств ФС. Для измерения гидродинамического радиуса наночастиц и их стабильности применялся метод динамического рассеяния света с использованием установки Photocor «Complex».

Также были задействованы специализированные программы для обработки данных, такие как DynaLS, позволяющие проводить автоматизированную обработку результатов и получать параметры гидродинамических радиусов и коэффициентов диффузии наночастиц.

В работе использовались методы спектрофотометрии и спектрофлуориметрии для определения кинетики взаимодействий наночастиц с сывороточным альбумином, включая оценку констант связывания и анализа мономерных состояний ФС при различных условиях.

Дополнительно была разработана и применена методика статистической обработки данных на языке Python для анализа средних гидродинамических радиусов полидисперсных систем, позволяющая минимизировать влияние внешних факторов и обеспечивающая высокую точность измерений в рамках изучения взаимодействий наночастиц с белками сыворотки крови.

Научная новизна

Научная новизна данной работы обусловлена разработкой методики, основанной на подборе оптических методов исследования и анализе полученных данных, представляющей собой необходимый и достаточный инструментарий для анализа взаимодействия наночастиц с основным транспортным белком сыворотки крови — альбумином, с акцентом на свойствах стабильности и кинетики процесса. А также рядом результатов, полученных впервые:

- С помощью метода динамического рассеяния света были получены гидродинамические радиусы для двух типов уникальных ФС: наночастицы на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера (VP-6, PT-1, PT-5, IB-25) и способные к самосборке амфифильные ФС (S_27_Na, PT_peg).
- Определены характерные времена стабильности наночастиц на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера (VP-6, PT-1, PT-5, IB-25) и способных к самосборке амфифильных ФС (S_27_Na, PT_peg) от светового воздействия, что актуально при использовании наночастиц ФС в терапевтической практике.
- Установлена корреляция, и получены точные значения увеличения среднего гидродинамического радиуса наночастиц на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера (VP-6, PT-1) от концентрации полимера ПВП.
- Методами спектрофотометрии и спектрофлуориметрии установлены константы связывания и времена кинетики процесса взаимодействия для отдельных наночастиц на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера.
- Разработан подход обработки данных ДРС, включающий методику подбора оптимальных концентраций для полидисперсных систем и статистический анализ корреляционных функций, исключающий субъективное влияние корректировок погрешности аппроксимации.

Научно-практическая значимость исследования

Практическая ценность предлагаемой работы заключается в совершенствовании методики исследования ФС третьего поколения отечественного производства, основанной на использовании оптических методов.

Данная методика, включающая ДРС, спектрофотометрию и спектрофлуориметрию, представляет собой мощный инструментарий для точного определения гидродинамических радиусов наночастиц и их стабильности, а также анали-

за взаимодействия ФС с основным транспортным белком сыворотки крови – альбумином.

Такой подход позволяет не только исследовать физико-химические свойства наночастиц в условиях, близких к физиологическим, но и выявить параметры, критически важные для их клинической эффективности в терапии ЗНО.

Результаты данной работы обладают значительным потенциалом для практического применения в медицине, поскольку они открывают возможности для создания новых фармакоформ на основе ФС третьего поколения. Разработанная методика позволяет оптимизировать процессы создания наночастиц с заданными свойствами, необходимыми для пассивного таргетинга и эффективного взаимодействия с биологическими системами. Это важный шаг в развитии современных методов ФДТ, ориентированных на лечение онкологических заболеваний.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Средние гидродинамические радиусы наночастиц на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера лежат в диапазоне [46; 124] нм, а размеры способных к самосборке амфифильных ФС в диапазоне [31; 237] нм для РТрег и [39; 198] нм для S₂₇Na соответственно.
2. Срок сохранения фотофизических характеристик ФС составляет не менее 3 месяцев для наночастиц на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера и более 6 месяцев для способных к самосборке амфифильных ФС.
3. Воздействие лазерного излучения ($\lambda = 647$ нм) не приводит к значимым структурным изменениям наночастиц в течение времени до 4,5 часов.
4. Увеличение мольного соотношения ФС/ПВП в диапазоне от 1:1 до 1:5 приводит к контролируемому изменению гидродинамического радиуса частиц в среднем до 2 раз.
5. Для способных к самосборке амфифильных ФС с сывороточным альбумином константы связывания составляют от 10^2 до 10^8 М⁻¹ в зависимости от условий и времени взаимодействия не менее 60 минут.

Достоверность результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается значительным объемом приведенных в работе экспериментальных данных и высокой степенью повторяемости при одинаковых условиях проведения экспериментов.

Апробация работы

Основные результаты научно-квалификационной работы были представлены соискателем лично на следующих 14 научных конференциях и семи-

нарах: Международные конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов-2016, 2017, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023» (Москва, 2016, 2017, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023), Научная конференция «Ломоносовские чтения – 2024, 2025» (Москва, 2024, 2025), Международный симпозиум Saratov Fall Meeting Optics and Biophotonics «SFM'15, 21, 23» (Саратов, 2015, 2021, 2023), XIV Международная конференция «Синтез и применение порфиринов и их аналогов» (ICPC-14) (Иваново, 2022), The International Conference on Coherent and Nonlinear Optics (ICONO 2016) (Минск, 2016).

Публикации

Основные результаты диссертационной работы изложены в 5 печатных работах, в том числе 4 статьях в рецензируемых научных журналах, удовлетворяющих Положению о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова, и 1 прочей публикации. Список работ автора приведён в конце автореферата.

Личный вклад

Все экспериментальные данные и результаты, приведенные в диссертации, получены автором лично либо при его определяющем участии.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, пяти глав, и заключения. Полный объем диссертации составляет 159 страниц, включая 55 рисунка и 15 таблиц. Список литературы содержит 102 наименования.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснована актуальность темы исследования, сформулирована цель данной работы, описаны решенные задачи, определяется объект исследования, даны основные положения, которые выносятся на защиту, аргументирована их научная новизна, научная и практическая значимость, описаны методология и методы исследования, апробация основных результатов и их достоверность, приведено краткое содержание работы.

Первая глава посвящена анализу научных публикаций, касающихся применения ФС в медицине и современных оптических методов для изучения взаимодействия наночастиц с биомолекулами, такими как молекулы сывороточного альбумина и глобулина. Рассмотрены основные подходы к созданию ФС третьего поколения и их соответствующие преимущества: низкая темновая токсичность, высокая химическая стабильность и способность к избирательному накоплению в опухолевых тканях.

В литературном обзоре акцентируется внимание на необходимости разработки эффективных ФС, обладающих улучшенными терапевтическими и диагностическими свойствами для применения в ФДТ. Проанализированы современные тенденции в синтезе наночастиц ФС, на основе тетрапиррольных соединений порфиразинового ряда, и их модификации с целью повышения квантового выхода и уменьшения побочных эффектов. Рассмотрены перспективы использования наночастиц с амфифильными покрытиями и их взаимодействие с альбумином, что имеет важное значение для разработки фармакоформ, ориентированных на целевой транспорт и накопление в опухолевых тканях.

Основное внимание в обзоре уделено методам ДРС, спектрофотометрии и спектрофлуориметрии, которые являются ключевыми для оценки гидродинамического радиуса наночастиц, их стабильности и кинетики взаимодействий с биомолекулами. Показано, что метод ДРС, обладая высокой чувствительностью и точностью, позволяет изучать гидродинамические радиусы наночастиц в жидких средах, приближенных к физиологическим условиям. Описаны преимущества ДРС в сравнении с другими методами определения размеров наночастиц, такими как электронная микроскопия, и обоснована необходимость точного подбора параметров эксперимента для измерения полидисперсных систем.

Также в главе анализируются современные подходы к изучению взаимодействий наночастиц с биомолекулами, с акцентом на оптические методы, такие как спектрофотометрия поглощения и спектрофлуориметрия. Подчеркнута важность изучения констант связывания и кинетики взаимодействий наночастиц ФС с сывороточным альбумином, что является важным шагом для понимания их поведения в организме и оптимизации условий их применения. Приведены примеры успешного применения оптических методов для исследования взаимодействий наночастиц с белками, включая возможность регистрации мономерных состояний ФС при добавлении белков.

Обзор завершает анализ актуальных проблем и задач в области создания ФС третьего поколения и определения перспективных направлений дальнейших исследований. Отмечается, что комплексный подход к использованию оптических методов для анализа взаимодействий наночастиц с биомолекулами открывает новые возможности для разработки эффективных и безопасных фармакоформ для ФДТ и других медицинских применений.

Вторая глава посвящена описанию объектов исследования, включающих различные типы наночастиц ФС, используемых в ФДТ, а также анализу их свойств и взаимодействия с биомолекулами. В работе представлены два основных типа ФС: наночастицы на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера и способные к самосборке амфифильные ФС, что позволяет всесторонне оценить их поведение и эффективность в условиях, близких к физиологическим.

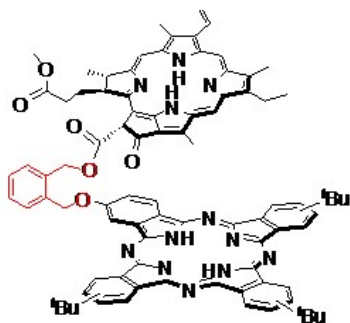


Рис. 1а — Строение IB-25

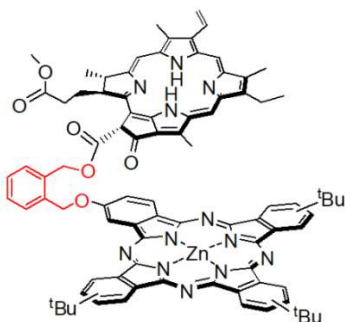


Рис. 1в — Строение VP-6.

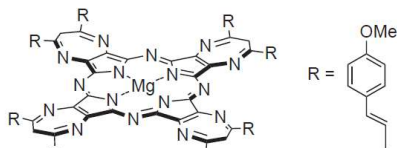


Рис. 1д — Строение PT-1.

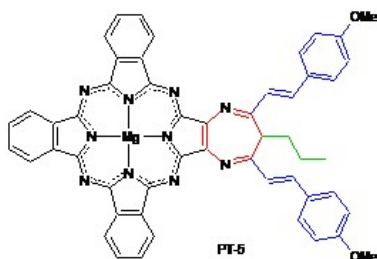


Рис. 1ж — Строение PT-5.

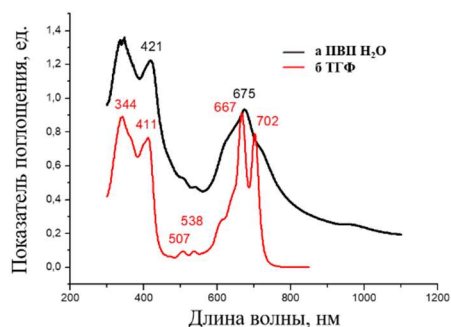


Рис. 1б — ЭСП мицелл на основе IB-25 и ПВП в воде (H_2O) и соединения IB-25 в тетрагидрофуране (ТГФ).

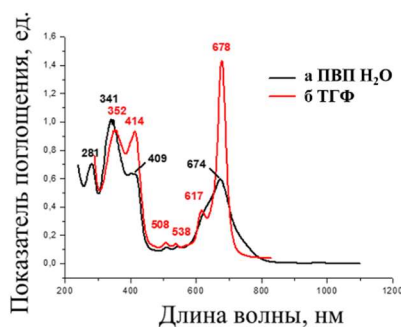


Рис. 1г — ЭСП наночастиц на основе VP-6 и ПВП в воде (H_2O) и соединения VP-6 в тетрагидрофуране (ТГФ).

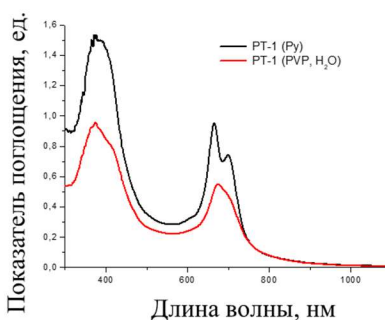


Рис. 1е — ЭСП соединения PT-1 в пиридине (Py) и формы PT-1-ПВП в воде (H_2O).

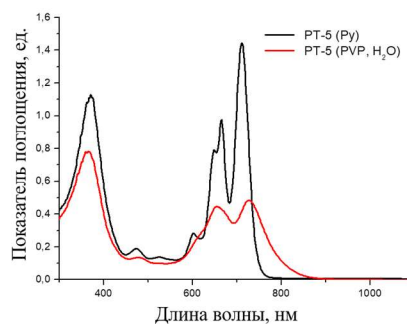


Рис. 1з — ЭСП соединения PT-5 в пиридине (Py) и мицелл на основе PT-5 и ПВП в воде (H_2O).

В разделе 2.1 описаны наночастицы гидрофобных ФС на основе диад фталоцианинов и метилфеофорбида *a* (IB-25, VP-6), diaзепинопорфиразинов магния (PT-1, PT-5) и амфифильного полимера ПВП (рис. 1).

Представленные наночастицы имеют гидрофобное ядро, окруженное амфифильным полимером ПВП, который обеспечивает их стабильность и улучшает растворимость в водных средах. Подробно рассмотрены их особенности строения, включая функциональные группы, которые оказывают существенное влияние на квантовый выход активных форм кислорода. Особое внимание уделено свойствам полимера ПВП, который играет ключевую роль в стабилизации наночастиц и контроле их размеров, что критически важно для эффективного таргетинга в опухолевых тканях.

Раздел 2.2 главы посвящен способным к самосборке амфифильным гетероциклическим монодiazепинаннелированными аналогам фталоцианина магния (S_27_Na и PT_reg). Эти ФС обладают уникальной способностью к самосборке в стабильные мицеллярные наночастицы в водных растворах, что обеспечивает их пассивный таргетинг и повышенную устойчивость в биологических средах. Использование полиэтиленгликолиевых фрагментов в PT_reg обеспечивает более эффективное экранирование гидрофобного ядра и снижает взаимодействие с сывороточными белками и улучшает фармакокинетические свойства PT_reg относительно S_27_Na.

В разделе 2.3 рассматриваются особенности взаимодействия всех исследуемых наночастиц с сывороточным альбумином — основным транспортным белком крови. Описаны различия в поведении наночастиц на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера ПВП и способных к самосборке амфифильных ФС при взаимодействии с белками, включая образование крупных агрегатов и изменение гидродинамических радиусов. Представлены данные о кинетике взаимодействий и отмечены особенности связывания альбумина с ФС, которые являются ключевыми для понимания поведения наночастиц в организме.

Таким образом, вторая глава представляет всесторонний обзор объектов исследования, особенностей строения и свойств, которые влияют на их стабильность, эффективность и взаимодействие с молекулами белка крови человека. Анализ является основой для последующего экспериментального исследования в рамках разработки эффективных отечественных нанофармакоформ для применения в ФДТ.

Третья глава посвящена описанию оптических методов исследования, применяемых для анализа свойств наночастиц ФС и их взаимодействия с биомолекулами. В работе использован комплекс оптических методов, такие как ДРС, спектрофотометрия и спектрофлуориметрия, которые позволяют получить всесторонние данные о гидродинамическом радиусе, стабильности и кинетике взаимодействий наночастиц в условиях, приближенных к физиологическим.

В разделе 3.1 подробно описана установка для измерений методом динамического рассеяния света на приборе Photocor «Complex». Установка оборудована диодным лазером с длиной волны 647 нм и мощностью 25 мВт, обеспечивающим высокую точность и стабильность лазерного излучения. Прибор включает в себя оптическую систему с гониометром, фокусирующими линзами и кюветным держателем, что позволяет точно позиционировать образцы для анализа рассеянного света. Установка использует многоканальный коррелятор с прямым подключением к персональному компьютеру, обеспечивая автоматическую обработку сигналов и получение параметров гидродинамических радиусов наночастиц.

Отдельно рассмотрены комплексные подходы к обработке данных, полученных оптическим методом динамического светорассеяния. Использование программного обеспечения DynaLS позволяет автоматизировать анализ данных ДРС и точно определять параметры диффузии и гидродинамический радиус наночастиц. В разделе главы описаны методы статистической обработки данных для полидисперсных систем, что позволяет минимизировать влияние шумов и улучшить точность измерений, особенно при работе с многокомпонентными системами, включающими белки и наночастицы.

В разделе 3.2 рассмотрены методы спектрофотометрии, использующиеся для изучения изменений спектров поглощения наночастиц ФС при их взаимодействии с белками. Спектрофотометр Hitachi U-2900, работающий в диапазоне 190 – 1100 нм, позволяет точно регистрировать электронные спектры поглощения (ЭСП), что является важным для анализа состояния наночастиц, в том числе их перехода в мономерные состояния при добавлении сывороточного альбумина. Сравнительные данные ЭСП наночастиц ФС являются важным этапом в изучении строения комплексных соединений.

Раздел 3.3 посвящен применению спектрофлуориметрии для исследования флуоресцентных свойств наночастиц. Спектрофлуориметр Cary Eclipse (Agilent Technologies) позволяет получать спектры флуоресценции с высокой чувствительностью, и проводить анализ процессов тушения, разгорания флуоресценции, а также определять кинетические параметры взаимодействия наночастиц с белками. Применение спектрофлуориметрии позволяет не только оценивать интенсивность флуоресценции, но и анализировать временные параметры, связанные с переходами молекул ФС в различные состояния.

В завершении данной главы представлена разработанная методика исследования *in vitro*, основанная на последовательном применении оптических методов — динамического рассеяния света, спектрофотометрии и спектрофлуориметрии (рис. 2). Предложенная методика является универсальным подходом, обеспечивающим необходимый и достаточный инструментарий для системного

исследования наночастиц ФС, их стабильности и взаимодействий с молекулами сыворотки белка крови. Подход создает исследовательскую основу для реализации процесса поиска успешного ФС третьего поколения.

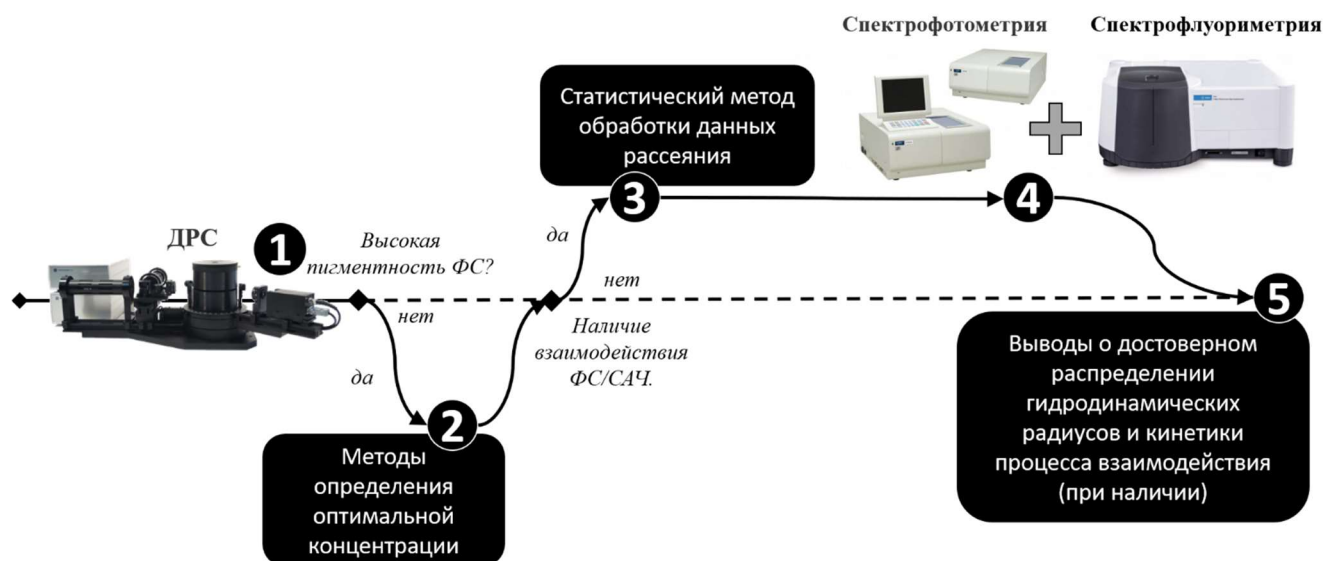


Рис. 2 — Схема последовательного применения оптических методов исследования для определения основных параметров фоточувствительных нанообъектов.

Четвёртая глава посвящена экспериментальному исследованию наночастиц на основе гидрофобных ФС, стабилизированных амфифильным полимером, и их взаимодействия с сывороточным альбумином. Рассмотрены особенности поведения наночастиц различных ФС, таких как IB-25, PT-5, PT-1 и VP-6, в водных растворах и их взаимодействие с биомолекулами. Исследования проводились с целью определения их стабильности, гидродинамического радиуса и возможности формирования комплексов с сывороточным альбумином крови, что является ключевым для разработки эффективных ФС третьего поколения.

В разделе 4.1 приведено подробное описание экспериментальных установок, используемых в настоящей работе, а именно: многоугловой анализатор размеров частиц Photocor «Complex», спектрофлуориметр Cary Eclipse и спектрофотометр HITACHI U-2900. Описание включает технические параметры, конструктивные особенности и принципиальные схемы каждого прибора.

В разделе 4.2 представлены результаты изучения специфики взаимодействия полимера ПВП с сывороточным альбумином. Экспериментально показано, что при значительном увеличении концентрации ПВП относительно альбумина происходит образование интрамолекулярных комплексов (Рис. 3). Определение средних гидродинамических радиусов интрамолекулярных комплексов позволяет делать выводы о наличии взаимодействия белка с ФС, содержащими в своем составе полимер ПВП.

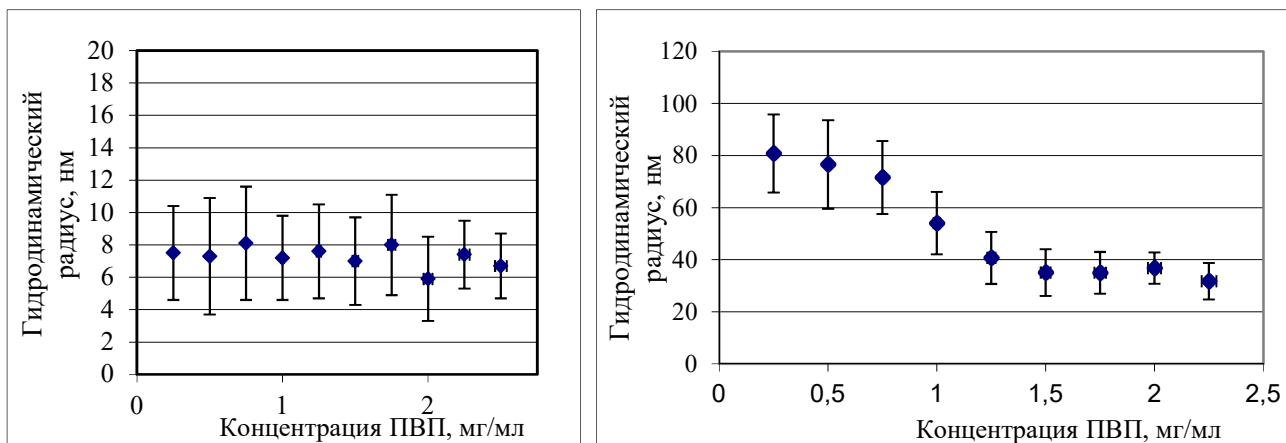


Рис. 3 — Гидродинамический радиус ПВП в зависимости от его концентрации в водном растворе (а) и в присутствии САЧ с концентрацией белка 0,6 мг/мл (б). рН раствора в конце измерений $\sim 6,9$.

В разделе 4.3 проведено исследование взаимодействия сывороточного альбумина с комплексом наночастиц IB-25. Установлено, что IB-25 формирует стабильные наночастицы с ПВП, которые сохраняют свои средние гидродинамические радиусы и не вступают в значимое взаимодействие с альбумином. Полученные данные подтверждают перспективность использования IB-25 для ФДТ с минимальными побочными эффектами.

Раздел 4.4 посвящен анализу влияния сывороточного альбумина на водный раствор наночастиц РТ-5. В результате экспериментов выявлено, что взаимодействие с альбумином приводит к изменению среднего гидродинамического радиуса наночастиц РТ-5, что может свидетельствовать о возможности образования агрегатов. Эти данные важны для оценки стабильности и безопасности РТ-5 в биологических средах.

В разделе 4.5 рассматривается контроль гидродинамических радиусов наночастиц на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера. Экспериментальные данные показали, что гидродинамический радиус наночастиц VP-6 коррелирует с мольным соотношением ФС к полимеру ПВП (Рис. 4). Были получены следующие соответствующие значения радиусов: при соотношении 1:1 — $37,2 \pm 4,7$ нм, при 1:2 — $43,6 \pm 6,5$ нм, и при 1:5 — $59,3 \pm 15,2$ нм. Это указывает на способность управлять размерами наночастиц через изменение мольного соотношения исходных веществ.

Контроль размеров наночастиц играет ключевую роль в реализации пассивного таргетинга: оптимальные размеры позволяют наночастицам эффективно накапливаться в опухолевых тканях за счёт эффекта повышенной проницаемости и задержки (EPR-эффект). В частности, размеры в диапазоне 30–60 нм считаются наиболее подходящими для пассивного таргетинга, так как обеспечивают длительное время циркуляции в кровотоке и способствуют предотвращению быстрого выведения ФС.

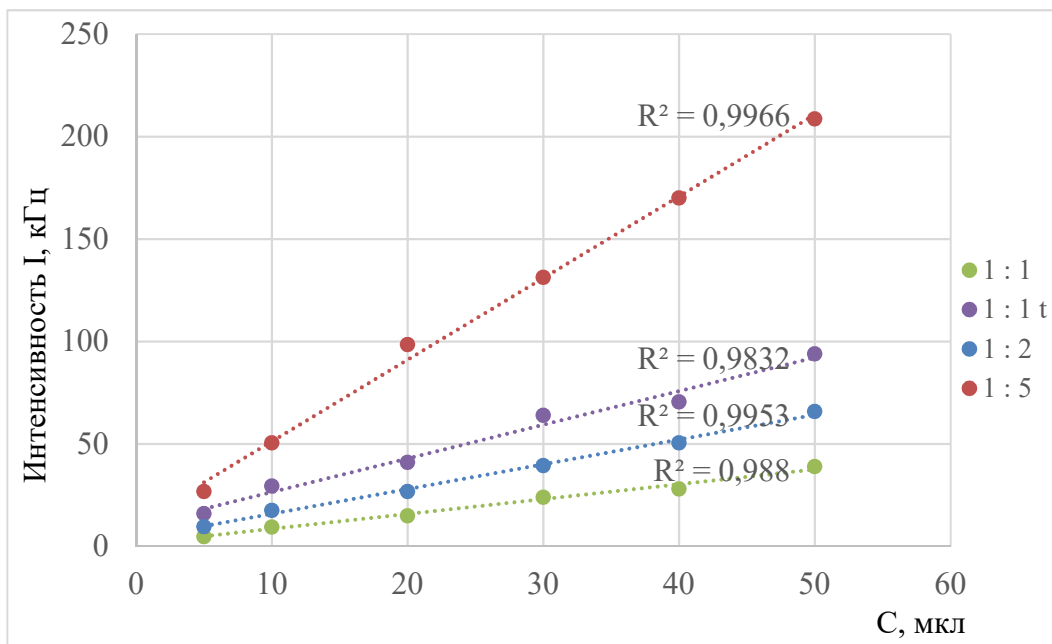


Рис. 4 — График зависимости интенсивности рассеянного света в растворе наночастиц VP-6-ПВП для мольных соотношений 1:1, 1:2 и 1:5 соответственно от концентрации в водном растворе, где образец 1:1 t — образец 1:1, измеренный после длительного хранения, R^2 — величина достоверной линейной аппроксимации. Погрешность величины интенсивности для каждого из значений не превышает 5%.

Управление размером наночастиц VP-6 через варьирование концентрации ПВП не только способствует оптимизации их накопления в целевых тканях, но и позволяет снизить побочные эффекты за счёт минимизации взаимодействий с здоровыми клетками. Это делает VP-6 перспективными кандидатами для ФДТ, где важна высокая селективность и минимизация повреждения здоровых тканей.

В разделе 4.6 рассматривается контроль гидродинамических радиусов ФС, на основе тетрапиррольного комплекса магния (РТ-1). Согласно полученным данным, зависимость интенсивности рассеянного света от концентрации частиц в растворе носит линейный характер, за исключением области высоких концентраций, где наблюдается отклонение, обусловленное затемнением раствора. Средний гидродинамический радиус наночастиц также демонстрирует зависимость от мольного соотношения. Наблюдается увеличение радиуса при возрастании относительной концентрации ПВП: при соотношении 1:1 — 112 ± 28 нм, при 1:10 — 135 ± 20 нм, и при 1:100 — 265 ± 39 нм.

Таким образом, управление мольным соотношением РТ-1 и ПВП позволяет контролировать средний гидродинамический радиус наночастиц, что важно для оптимизации их физических свойств и потенциального использования в ФДТ.

Пятая глава посвящена экспериментальному исследованию способных к самосборке амфифильных ФС, таких как, S_27_Na и PT_reg, а также их взаимодействию с сывороточным альбумином. Основной акцент сделан на анализе их стабильности, гидродинамических радиусов и кинетики взаимодействий, что важно для оценки их применимости в качестве фармакоформ для ФДТ.

В разделе 5.1 представлен статистический метод усреднения данных рассеяния света, который был разработан для анализа полидисперсных систем с множеством пиков интенсивности. Данный подход позволяет определить гидродинамические радиусы наночастиц и распределение их радиусов в растворе, обеспечивая высокую точность результатов, что имеет важное значение для понимания стабильности наночастиц и их взаимодействий с белками, особенно в сложных биологических системах.

В разделе 5.2 рассмотрены модификации гетероциклического аналога фталоцианина магния (PT_reg) и их взаимодействие с сывороточным альбумином. В ходе исследований было показано, что основные гидродинамические радиусы PT_reg без ПВП составляют 45 ± 14 нм и 112 ± 37 нм, что свидетельствует о формировании стабильных наночастиц. Однако при добавлении ПВП как пассивной нагрузки наблюдается появление нового пика около 400 нм, указывающего на взаимодействие свободного ПВП с альбумином. Это демонстрирует важность контроля концентрации полимера для минимизации нежелательных взаимодействий, что необходимо учитывать при разработке ФС для клинического применения.

Раздел 5.3 посвящен исследованию взаимодействий сывороточного альбумина с карбоксилзамещенным монодиазепинаннелированным аналогом фталоцианина магния S_27_Na. Показано, что S_27_Na проявляет значительное взаимодействие с альбумином, как в отсутствие ПВП, так и при его наличии. Средние гидродинамические радиусы наночастиц S_27_Na составили 92 ± 38 нм без ПВП и 62 ± 23 нм и 162 ± 36 нм с ПВП. Наличие множественных новых пиков при добавлении белка в раствор с S_27_Na указывает на сложное взаимодействие, что влияет на их стабильность и поведение в биологических средах.

В результате исследований показано, что наночастицы S_27_Na и PT_reg могут быть использованы в качестве перспективных фармакоформ, однако их стабильность и взаимодействия с белками зависят от условий подготовки и состава, что требует дальнейшей оптимизации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В заключении сформулированы основные результаты диссертации, которые заключаются в следующем:

1. Впервые определены характерные гидродинамические радиусы исследуемых типов наночастиц ФС:
 - наночастицы на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера:
IB-25 $R_h = 88 \pm 15$ нм;
PT-5 $R_h \in [50; 80]$ нм;
VP-6 $R_h = 96 \pm 28$ нм;
PT-1 $R_h = 64 \pm 18$ нм;
 - способные к самосборке амфифильные ФС:
S_27_Na без ПВП: $R_h = 92 \pm 38$ нм;
S_27_Na с ПВП: $R_h = 62 \pm 23$ нм и $R_h = 162 \pm 36$ нм;
PT_reg без ПВП: $R_h = 45 \pm 14$ нм и $R_h = 112 \pm 37$ нм;
PT_reg с ПВП: $R_h = 90 \pm 28$ нм и $R_h = 197 \pm 40$ нм.
2. Исследована стабильность наночастиц в зависимости от временного фактора (общая стабильность), а также светового воздействия: для всех исследованных ФС было показано, что наночастицы сохраняют стабильность на протяжении нескольких месяцев (более 3 месяцев для VP-6 и более 6 месяцев для PT-1). Также установлено, что световое воздействие ($\lambda = 647$ нм) не оказывает значительного влияния на строение наночастиц в течение до 4,5 часов эксперимента;
3. Исследовано возможное влияние концентрации ПВП на средний гидродинамический радиус наночастиц на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера: для VP-6 с мольным соотношением ПВП 1:1, 1:2 и 1:5 были получены следующие значения гидродинамических радиусов: $R_h = 37,2 \pm 4,7$ нм, $R_h = 43,6 \pm 6,5$ нм и $R_h = 59,3 \pm 15,2$ нм соответственно.
Для PT-1 в тех же условиях значения радиусов варьировались от $R_h = 112 \pm 28$ нм до $R_h = 265 \pm 39$ нм;
4. Исследовано взаимодействие наночастиц ФС с основным транспортным белком крови — сывороточным альбумином:
 - наночастицы на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера:
Для IB-25, VP-6 и PT-1 показано отсутствие значимого взаимодействия с сывороточным альбумином, что свидетельствует о сохранении их стабильности в белковой среде.

- способные к самосборке амфифильные ФС:
Для S_27_Na и PT_reg без ПВП выявлены новые пики ~ 200 нм (взаимодействие с альбумином). При добавлении ПВП наблюдаются дополнительные пики (~ 400 нм), что обусловлено не только связыванием свободного ПВП с белком, но и ослаблением взаимодействия между наночастицами S_27_Na вследствие экранирования π - π стекинг-взаимодействий, приводящего к формированию менее устойчивых комплексов ФС.
 - Константа связывания для свежеприготовленного образца S_27_Na составила $3,16 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, с кинетикой процесса, продолжающейся не менее 60 минут. Сайт связывания $n = 1,7$. Константа связывания для образца S_27_Na составила $1,02 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$, с кинетикой процесса, продолжающейся не менее 60 минут. Сайт связывания $n = 0,5$.
 - Константа связывания для S_27_Na ПВП составила $2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, с кинетикой процесса, продолжающейся не менее 60 минут. Сайт связывания $n = 1,4$.
5. Разработан процесс обработки данных ДРС, включающий методику подбора оптимальных концентраций для полидисперсных систем и статистический подход к анализу корреляционных функций, исключая субъективное влияние корректировок погрешности аппроксимации.

Публикации автора по теме диссертации

Публикации в рецензируемых научных журналах, удовлетворяющих Положению о присуждении учёных степеней в МГУ имени М.В. Ломоносова:

- A1. **Krot A.R.**, Ladynin A.I., Sergeeva I.A. *Self-assembled porphyrin nanoparticles interaction analysis with albumin by dynamic light scattering* // Journal of Biomedical Photonics and Engineering, 2024, Vol. 10, No. 2, P. 020305. Импакт-фактор 0,21 (SJR). DOI: 10.18287/JBPE24.10.020305. Общий объём статьи = 0,688 п.л., личный вклад = 0,564 п.л.
- A2. Tarakanov P.A., Neganova M.E., Mishchenko D.V., Bondarenko S.D., Sergeeva I.A., **Krot A.R.**, Goryachev N.S., Simakov A.O., Kukharsky M.S., Pukhov S.A., Pushkarev V.E. *Low-symmetry A₃B-type 6H-1,4-diazepinoporphyrazines with anti-Kasha effect as promising photosensitizers* // Photochemistry and Photobiology, 2024, Vol. 100, No. 5, P. 1277–1289. Импакт-фактор 2,5 (JIF). EDN: NLMCWQ. Общий объём статьи = 1,438 п.л., личный вклад = 0,244 п.л.
- A3. Balashova I.O., Tolbin A.Yu., Tarakanov P.A., **Krot A.R.**, Fedorova K.V., Sergeeva I.A., Trashin S.A., De Wael K., Pushkarev V.E., Koifman M.O., Ponomarev G.V. *A covalently linked dyad based on zinc phthalocyanine and methylpheophorbide a: synthetic and physicochemical study* // Macromolecules, 2021, Vol. 14, No. 1, P. 40–50. Импакт-фактор 1,2 (JIF). EDN: ZSHQDZ. Общий объём статьи = 1,063 п.л., личный вклад = 0,213 п.л.
- A4. Сергеева И.А., Хитрина К.А., **Крот А.Р.**, Сукнева А.В., Петрова Г.П. *Исследование взаимодействия и динамики молекул в растворах коллагена и коллагеназы методом динамического рассеяния света* // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика, 2017, Т. 17, № 3, С. 171–178. Импакт-фактор 0,444 (РИНЦ). EDN: ZTHZEJ. Общий объём статьи = 0,875 п.л., личный вклад = 0,149 п.л.

Прочие публикации по теме диссертации:

- A5. **Крот А.Р.**, Строганова Ю.Д., Сергеева И.А., Федорова К.В., Коростей Ю.С., Балашова И.О., Пушкарев В.Е., Тараканов П.А. *Исследование устойчивости фотосенсибилизаторов на основе тетрапиррольных комплексов алюминия, магния и цинка при различных факторах* // Учёные записки физического факультета Московского Университета, 2018, № 3, С. 1830702. Импакт-фактор 0,125 (РИНЦ). EDN: VPHYFNG. Общий объём статьи = 0,938 п.л., личный вклад = 0,704 п.л.