

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА**

На правах рукописи



Чудосай Юлия Викторовна

**Разработка бифункциональной платформы на основе наночастиц магнетит-
золото для тераностики онкологических заболеваний**

1.5.6. Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Москва – 2025

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научные руководители:

Клячко Наталья Львовна

доктор химических наук, профессор

Абакумов Максим Артемович

кандидат химических наук, доцент

Официальные оппоненты:

Гудилин Евгений Алексеевич

доктор химических наук, профессор, член-корреспондент РАН, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет наук о материалах, кафедра наноматериалов, заведующий кафедрой

Горин Дмитрий Александрович

доктор химических наук, профессор, Сколковский институт науки и технологии, центр фотоники и фотонных технологий, профессор

Кусков Андрей Николаевич

доктор химических наук, доцент, Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева, факультет химико-фармацевтических технологий и биомедицинских препаратов, кафедра технологии химико-фармацевтических и косметических средств, профессор

Защита диссертации состоится « 17 » июня 2025 года в 15 часов на кафедре химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 1, стр. 11Б, 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 портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3454>

Автореферат разослан « » мая 2025 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат химических наук



И.К. Сакодынская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Проблема терапии онкологических заболеваний остро стоит перед учеными и врачами в мире. Ежегодное количество диагностированных случаев онкологических заболеваний составляет около 10 миллионов в год и постоянно увеличивается. Такое количество обуславливается, как увеличением влияния канцерогенных веществ, в связи с индустриализацией производства, так и совершенствованием методов диагностики. При этом проблема терапии онкологических до конца не решена, на смотря отдельные успехи в этом направлении. Основными препятствиями на пути к успешной терапии онкологических заболеваний являются: 1) низкая специфичность методов терапии широкого спектра, таких как химиотерапия и лучевая терапия; 2) высокие риски побочных эффектов при использовании существующих методов терапии; 3) наличие химиорезистентности у ряда опухолевых заболеваний, зачастую индивидуальных у каждого конкретного пациента 4) высокое сродство опухолевых клеток (тканей) со здоровыми.

Одним из инновационных методов терапии рака является ФДТ. ФДТ — это стратегия лечения, при которой используется соединение, называемое фотосенсибилизатор, в комбинации со световым излучением. Когда фотосенсибилизаторы подвергаются воздействию света определенной длины волны, они производят АФК, которые токсичны для клеток. ФДТ была признана безопасным методом абляции опухоли при многочисленных показаниях к терапии онкологических заболеваний¹. К преимуществам ФДТ можно отнести достаточно высокую специфичность метода, так как за счет локального воздействия света образование АФК происходит только в зоне опухолевого очага, не затрагивая здоровые органы и ткани. Кроме того, используемые в ФДТ молекулы фотосенсибилизатора подобраны так, чтобы обладать низкой токсичностью в отсутствие света (так называемой «темновой» токсичностью) для минимизации возможных побочных эффектов, связанных с введением фотосенсибилизатора. Важно подчеркнуть и возможность сочетания с другими методами лечения рака, например, химиотерапией². Как и у всех методов терапии у ФДТ имеются недостатки: для успешной ФДТ необходимо, чтобы облучение светом было проведено при максимальном накоплении фотосенсибилизатора в опухоли, что требует отслеживания накопления фотосенсибилизатора в опухоли для выбора оптимального «временного окна» для облучения светом. На сегодняшний день эта проблема решается благодаря наличию собственной флуоресценции у молекул фотосенсибилизатора, что позволяет использовать одну и ту же молекулу и как терапевтический, и как диагностический агент. Однако данная стратегия имеет ряд ограничений: 1) при возбуждении светом возникают два взаимоисключающих варианта «использования» энергии кванта света фотосенсибилизатора - возможность флуоресцировать или продуцировать АФК, что ограничивает внедрение новых классов фотосенсибилизаторов, обладающих высокими квантовыми выходами синглетного кислорода, но крайне слабой флуоресценцией, из-за невозможности оценить их максимальное накопления в опухоли для точечного воздействия; 2) низкие значения Стоксовского сдвига у ряда фотосенсибилизаторов ограничивают возможность детекции их флуоресценции в опухоли.

Решить проблему низкой интенсивности флуоресценции фотосенсибилизаторов, обладающих высоким квантовым выходом синглетного кислорода, можно совместив в одной платформе фотосенсибилизатор и флуоресцентную метку — флуорофор для

1. Li X. et al. Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer // Nat Rev Clin Oncol. 2020. Vol. 17, № 11. P. 657–674.

2. Ito A.M. et al. Nanotherapeutic Intervention in Photodynamic Therapy for Cancer // ACS Omega. 2022. Vol. 7, № 50. P. 45882–45909.

одновременного использования ФДТ и ФД. Однако, при комбинации фотосенсибилизатора и флуорофора в одной структуре возникает проблема с безызлучательным переносом энергии – проблема Фёрстеровского безызлучательного переноса энергии (FRET). В случае переноса энергии с флуорофора на фотосенсибилизатор будет уменьшаться интенсивность флуоресценции, что приведет к невозможности детекции накопления препарата в опухоли, а в случае переноса энергии с фотосенсибилизатора на флуорофор будет падать способность к образованию АФК, что уменьшит терапевтический эффект. Оба варианта являются крайне нежелательными и не позволяют решить вышеперечисленные проблемы ФДТ.

Существует два варианта решения данной проблемы, а именно, осуществить подбор пары фотосенсибилизатора и флуорофора минуя механизм FRET или путем разнесения в пространстве пары хромофоров (фотосенсибилизатор и флуорофор). В научной литературе известно множество молекул, используемых в качестве фотосенсибилизаторов и флуорофоров, но изучив спектры поглощения и флуоресценции хромофоров, можно сделать вывод о невозможности подбора такой пары флуорофора и фотосенсибилизатора без механизма FRET, так как спектры хромофоров расположены в диапазоне видимого излучения (от ~300 нм до ~800 нм) и имеют зоны перекрывания. Таким образом, решение «проблемы FRET» может быть более успешно осуществлено путем стереометрического разнесения двух хромофоров (флуорофор и фотосенсибилизатор) в пространстве во избежание эффекта FRET, например путем закрепления их на разных концах одной «жесткой конструкции», в качестве которой могут выступать гибридные наноструктуры.

Одним из наиболее интересных объектов с точки зрения применения в биомедицине являются гибридные структуры на основе магнитных НЧ и НЧ благородных металлов, позволяющие одновременно вводить на поверхность НЧ два типа молекул для их дальнейшего использования. При введении комбинации двух хромофоров (флуорофор и фотосенсибилизатор) в составе одной НЧ они будут доставлены в опухоль благодаря эффекту повышенной проницаемости и удержания, свойственному наночастицам определенного размера и химической структуры. Стоит отметить, что на сегодняшний момент комбинация пары фотосенсибилизатора и флуорофора в одной системе, обеспечивающая проведение диагностики (ФД) и терапии (ФДТ) практически не представляется возможным, так как за счет стерически близкого расположения в пространстве при возбуждении одного из хромофорных агентов наблюдается безызлучательный перенос энергии (FRET), что влечет за собой или снижение детекции платформы или невозможность проведения ФДТ. Наличие двух поверхностей дает возможность расположения фотосенсибилизатора и флуорофора на оптимальном расстоянии, заведомо большем чем типичные значения Ферстеровского радиуса, что позволит избежать эффекта FRET. Две химически различные поверхности позволят осуществить поэтапную модификацию поверхностей НЧ различными лигандами, что позволит решить проблему FRET при одновременной иммобилизации фотосенсибилизатора и флуорофора на одну НЧ. Наличие магнитной компоненты придает данным НЧ магнитно-резонансные контрастные (МР-контрастные) свойства и позволяет проводить их неинвазивную визуализацию методом магнитно-резонансной томографии (МРТ), а флуоресцентная метка позволит отследить время максимального накопления препарата в опухолевых тканях для проведения эффективной терапии³⁻⁶.

3. Zhao Q. et al. Spinel: Controlled Preparation, Oxygen Reduction/Evolution Reaction Application, and Beyond // Chem Rev. 2017. Vol. 117, № 15. P. 10121–10211.

4. Salih S.J., Mahmood W.M. Review on magnetic spinel ferrite (MFe₂O₄) nanoparticles: From synthesis to application // Heliyon. 2023. Vol. 9, № 6. P. e16601.

5. Yousuf M.A. et al. The impact of yttrium cations (Y³⁺) on structural, spectral and dielectric properties of spinel manganese ferrite nanoparticles // Ceram Int. 2019. Vol. 45, № 8. P. 10936–10942.

6. Mmesle O.K. et al. Cobalt ferrite nanoparticles and nanocomposites: Photocatalytic, antimicrobial activity and toxicity in

Степень разработанности темы. В настоящее время в научных литературных данных представлено большое количество работ, посвященных иммобилизации ФС различной природы на поверхность наночастиц для создания тераностиков⁷. Однако метод оценки накопления иммобилизованных фотосенсибилизаторов на органном уровне при использовании ФД ранее не был описан.

За последние два десятилетия большое количество природных и синтетических хромофоров были испытаны *in vitro* и *in vivo* в качестве фотосенсибилизаторов в экспериментах с ФДТ⁸. Фотосенсибилизаторы, которые находятся на финальных стадиях клинических испытаний или были одобрены для противоракового ФДТ, включают хлорины, бактериохлорины, бензопорфирины, фталоцианины, профилактические вещества и гиперичины. Различные фотосенсибилизаторы вводятся внутривенно, перорально или местно и накапливаются дольше в опухолях по сравнению с нормальными клетками, что требует задержки между введением и облучением светом. Оптимальная временная задержка определяется максимальной концентрацией фотосенсибилизатора в ткани, и она варьируется среди фотосенсибилизаторов.

Метод ФД отличается высокой чувствительностью, позволяет выявлять скрытые опухолевые очаги, новообразования малых размеров (до 1 мм), не дает тяжелых системных или местных осложнений, обследование может проводиться амбулаторно, применяется также интраоперационно для уточнения истинных границ злокачественных образований и контроля полноты удаления опухоли. Использование ФД позволяет нивелировать недостатки ФДТ и увеличить уровень АФК, что ведет к большему эффекту апоптоза раковых клеток.

Совмещение и комбинирование методов ФДТ и ФД, а также анализ эффективности совместного использования был выполнен и описан впервые.

Данные, представленные в настоящей работе, вносят важный вклад в реализацию инновационного подхода в тераностике онкологии.

Цель и задачи работы. Химический дизайн димерных наночастиц магнетит-золото для использования в качестве бифункциональной платформы для совместной фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики опухолей.

Для успешного осуществления поставленной цели необходимо решить следующие **задачи**:

- 1) Получение и физико-химическая характеристика стабильных водных коллоидных суспензий магнитных димерных наночастиц магнетит-золото несущих молекулы ФС и ФФ иммобилизованных на магнитную и золотую поверхности димерных НЧ соответственно;
- 2) Исследование флуоресцентных свойств ФС и ФФ в случае их селективной иммобилизации на различные поверхности;
- 3) Исследование темновой и световой токсичности, а также внутриклеточного распределения димерных НЧ, несущих ФС и ФФ, и их смесь в экспериментах *in vitro*;
- 4) Исследование фармакокинетики и определение максимального времени накопления образцов НЧ/ФФ, НЧ/ФС, НЧ/ФС/ФФ и НЧ/ФС+НЧ/ФФ в опухолях с использованием метода флуоресцентной диагностики на опухолевых моделях *in vivo*;
- 5) Исследование эффективности терапии методом ФДТ с использованием димерных НЧ, несущих ФС и ФФ на опухолевых моделях *in vivo* для НЧ/ФС/ФФ и

water treatment // Mater Sci Semicond Process. 2021. Vol. 123. P. 105523.

7. Lucky S.S., Soo K.C., Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy. // Chem Rev. 2015. Vol. 115, № 4. P. 1990–2042.

8. Kwiatkowski S. et al. Photodynamic therapy–mechanisms, photosensitizers and combinations // Biomedicine & pharmacotherapy. – 2018. – Т. 106. – С. 1098-1107.

НЧ/ФС+НЧ/ФФ.

Объект исследования. Объектами исследования служили димерные наночастицы магнетит-золото вида «гантель», стабилизированные ДФУК и ПЭГ-СООН, несущие ФС на магнитной поверхности и ФФ на золотой поверхности, и их смесь.

Научная новизна. Основная новизна исследований может быть разделена на две составляющие:

1) Впервые созданы биосовместимые НЧ магнетит-золото, имеющие две различные поверхности, предотвращающие явления FRET при иммобилизации молекул флуорофора и фотосенсибилизатора, а также обеспечивающие наличие диагностической компоненты (за счет магнитных свойств магнетита), позволяющей осуществлять неинвазивный мониторинг распределения наночастиц методом МРТ;

2) Показаны, проанализированы и сравнены возможности одновременной и попарной загрузки фотосенсибилизатора и флуорофора на магнитную и золотую поверхности наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ соответственно, что позволило избежать явления FRET, сохранив как терапевтические свойства фотосенсибилизатора, так и диагностические свойства флуорофора, что позволяет проводить ФДТ и ФД.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в разработке теоретической модели, которая имеет экспериментальное подтверждение возможности снижения FRET при использовании фотосенсибилизатора и флуорофора, иммобилизованных на различных поверхностях димерных НЧ магнетит-золото (Патент РФ №2798612, 2022). Практическая значимость работы заключается в возможности эффективной совместной ФД и ФДТ опухолей при использовании димерных магнитных НЧ магнетит-золото, несущих фотосенсибилизатор на поверхности магнетита, а флуорофор на поверхности золота. Разработанный подход позволяет детектировать нанокострукцию в опухолевых клетках с возможностью последующего использования терапевтического метода ФДТ.

Положения, выносимые на защиту.

1) Модификация магнитной поверхности наночастиц путем последовательной ковалентной конъюгации ДФУК и ПЭГ-СООН позволяет получать стабильные коллоидные растворы НЧ с гидродинамическим диаметром от 15 нм до 30 нм с возможностью дальнейшей иммобилизации хромофорных агентов (ФС и ФФ) с различной химической природой на магнитную и золотую поверхности НЧ соответственно.

2) Разработанные методики иммобилизации ФС и ФФ обеспечивают селективную загрузку ФС на поверхность магнетита, а ФФ – на поверхность золота.

3) Флуоресцентные свойства синтезируемых наноконструкций подтвердили уменьшение FRET-эффекта между ФС и ФФ. Наличие остаточного FRET-эффекта объясняется близким расположением хромофоров на стыке двух поверхностей НЧ и не влияет на терапевтический эффект системы.

4) Колокализация флуоресцентного сигнала от ФФ и ФС, иммобилизованных на золотой и магнитной поверхностях НЧ соответственно, свидетельствует о сохранении структуры НЧ после интернализации клетками при исследовании внутриклеточного распределения в экспериментах *in vitro*.

5) Димерные НЧ, несущие ФС или ФФ в комбинации с ФФ, или физическая смесь (НЧ/ФС+НЧ/ФФ) показали наличие фотоиндуцированной токсичности по отношению к клеточной культуре карциномы толстой кишки мыши СТ26 в экспериментах *in vitro*.

6) Введение ФС и ФФ в состав НЧ не оказывает влияния на характер их биораспределения после внутривенного введения, при этом для НЧ/ФС/ФФ и НЧ/ФС+НЧ/ФФ также не наблюдается различий в биораспределении после внутривенного введения на опухолевых моделях *in vivo*.

7) Димерные НЧ, несущие ФС и ФФ на магнитной и золотой поверхностях

соответственно (НЧ/ФС/ФФ), и физическая смесь димерных НЧ, несущих ФС или ФФ (НЧ/ФС+НЧ/ФФ), обеспечивают ФД и терапию опухолей методом ФДТ на модели опухоли СТ26 *in vivo* и не уступают димерным НЧ, несущим либо ФС, либо ФФ.

Методология и методы исследования. Методологическая основа диссертации представлена анализом современной научной литературы по изучаемой проблеме и общепринятыми методами проведения лабораторных исследований (экспериментов). В работе использованы следующие основные методы и подходы исследования: методы синтеза наноматериалов (соосаждение, высокотемпературное разложение в инертной атмосфере), ПЭМ, АЭС, РФА, спектрофотометрия, спектрофлуориметрия, магнитометрия, ДСР, ИК-спектроскопия, МРТ, конфокальная микроскопия, система для прижизненной детекции флуоресценции IVIS.

Личный вклад автора. Представленные в работе данные получены лично автором или при его непосредственном участии на всех этапах исследований под руководством профессора, д.х.н. Н.Л. Клячко и к.х.н. М.А. Абакумова. Автор самостоятельно изучил современные литературные данные по теме исследования и подготовил обзор литературы. Автором самостоятельно или при непосредственном его участии были выполнены все эксперименты, произведен сбор, обработка и анализ полученных данных. Автором проведена значительная работа над текстом статей и их представлением. Автор участвовал в переписке с редакторами и рецензентами. В работах, опубликованных в соавторстве, значительный вклад принадлежит автору. На защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении которых роль соискателя была определяющей.

Степень достоверности и апробации работы. Степень достоверности представленных количественных данных определяется инструментальной погрешностью использованного аналитического оборудования и статистической обработкой полученных результатов. Результаты работы были представлены и обсуждены на:

XXVIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Секция "Биология", Россия, 12-23 апреля 2021 г., 13-ой Международной конференции «Биоматериалы и нанобиматериалы: Последние достижения безопасности, токсикологии и экологии», Крит, Греция, 12 мая 2022 г., 14-ой Международной конференции «Биоматериалы и нанобиоматериалы: последние достижения безопасности, токсикологии и экологии», онлайн, Греция, 11 мая 2023 г., XXX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Секция "Химия", Россия, 12-23 апреля 2021 г., Международной конференции «Наука будущего», Орел, 20-23 сентября 2023 г., 15-ой Международной конференции «Биоматериалы и нанобиоматериалы: последние достижения безопасности, токсикологии и экологии», онлайн, Греция, 17 мая 2024 г.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 2 статьи в рецензируемых научных журналах, индексируемых базами Web of Science и Scopus, и зарегистрирован 1 патент (Патент РФ №2798612, 2022). А также опубликовано 2 статьи в сборниках.

Связь работы с государственными программами. Результаты работы были получены в рамках грантов Министерства образования и науки РФ № 121041500039-8; Фонда содействия инновациям по программе «УМНИК» №15269ГУ/2020.

Структура и объем работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, экспериментальной части, описывающей материалы методики синтеза НЧ, модификации и функционализации их поверхности, и методы их исследования *in vitro* и *in vivo*, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 169 страницах машинописного текста, содержит 5 таблиц и 46 рисунков. Список литературы включает 219 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационного исследования, изложена новизна, теоретическая и практическая значимость работы, сформулированы цели и задачи исследования.

В первой главе изложен обзор литературы, в котором рассмотрены проблемы в терапии онкологических заболеваний, а также различные подходы в противоопухолевой терапии; химические дизайны димерных наночастиц, их особенности; а также преимущества димерных наночастиц для доставки лекарств.

Во второй главе описаны материалы, методы синтеза димерных НЧ «магнетит-золото» вида гантель и полученных систем, включающих димерные НЧ, ФС и ФФ, физико-химические и биологические методы их исследования.

В третьей главе, состоящей из пяти частей, представлены результаты диссертационного исследования и их обсуждение.

3.1 Характеристика НЧ, НЧ/ДФУК, НЧ/ДФУК/ПЭГ

Гантелеобразные НЧ были синтезированы путем разложения пентакарбонила железа на поверхности наночастиц Au в присутствии олеиновой кислоты и олеиламина, как описано ранее. Синтезированные НЧ состоят из НЧ магнетита и золота с размерами 11.2 ± 1.5 нм и 4.4 ± 1.0 нм для магнетита и золота соответственно, измеренными методом ПЭМ (Рисунок 1а). На представленных микрофотографиях (ПЭМ) (Рисунок 1а) видны попарно соединенные НЧ золота (темные) и НЧ магнетита (светлые). Кроме того, можно отметить, что полученный образец не содержит агрегатов наночастиц, а также свободных наночастиц магнетита или золота. Такие размеры предполагают минимизацию FRET-эффекта между ФС и ФФ, поскольку расчетный параметр — радиус Фёрстера для выбранной пары хромофоров составил $15 \text{ \AA}$ ⁹. Расчет эффективности переноса энергии для данной пары хромофоров составил 0.0064, что подтверждает практически полное подавление переноса энергии в случае иммобилизации на поверхности НЧ. Также имеется хорошее соответствие среднего размера кристаллитов по данным РФА и среднего диаметра НЧ по данным ПЭМ (Таблица 1). Можно также утверждать, что синтезированные НЧ являются монодисперсными (Рисунок 1 в,г). Кроме того, по данным рентгенограмм (Рисунок 1 б) наблюдается 100% соответствие спектров магнетита (ИКДД PDF-2 № 00-019-0629) и золота (ИКДД PDF-2 № 03-065-8601) компоненты всех образцов НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$, где определен тип структуры кубической шпинели Fd-3m (структура типа магнетита).

Результаты магнитометрии, где удельная намагниченность насыщения равна 55.2 (σ_s , $\text{A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{kg}^{-1}$), остаточная намагниченность насыщения равна 1.3 (σ_r , $\text{A}\cdot\text{m}^2\cdot\text{kg}^{-1}$), коэрцитивная сила равна 3.3 (H_c , $\text{kA}\cdot\text{m}^{-1}$) при комнатной температуре свидетельствуют о суперпарамагнитной природе образцов НЧ ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$) (с размерами менее 20 нм), что характерно для наноядер магнетита таких размеров и хорошо согласуется с литературными данными^{10–11}.

В качестве основной стратегией модификацией НЧ молекулами ПЭГ нами был выбран двухстадийный синтез, в котором на первой стадии молекулы ДФУК прочно связывается с поверхностью магнетита за счет вицинальных ОН-групп, сопровождающееся частичной

9. Panchenko P.A. et al. Effect of linker length on the spectroscopic properties of bacteriochlorin – 1,8-naphthalimide conjugates for fluorescence-guided photodynamic therapy // J Photochem Photobiol A Chem. 2020. Vol. 390. P. 112338.

10. Nguyen M.D. et al. Fe_3O_4 Nanoparticles: Structures, Synthesis, Magnetic Properties, Surface Functionalization, and Emerging Applications // Applied Sciences. 2021. Vol. 11, № 23. P. 11301.

11. Wei Y. et al. Synthesis of Fe_3O_4 Nanoparticles and their Magnetic Properties // Procedia Eng. 2012. Vol. 27. P.632–637.

полимеризацией отдельных молекул.

Таблица 1. Данные НЧ, полученные методами ПЭМ и порошковой рентгеновской дифракции

ПЭМ		Порошковая рентгеновская дифракция (РФА)					
d, нм		объемная доля, %		размер кристаллитов, нм		период решетки, нм	
Fe ₃ O ₄	Au	Fe ₃ O ₄	Au	Fe ₃ O ₄	Au	Fe ₃ O ₄	Au
11.2±1.5	4.4±1.0	94.0±2.0	6.0±2.0	12.0±2.0	5.1±1.0	0.8387±0.0004	0.4064±0.0004

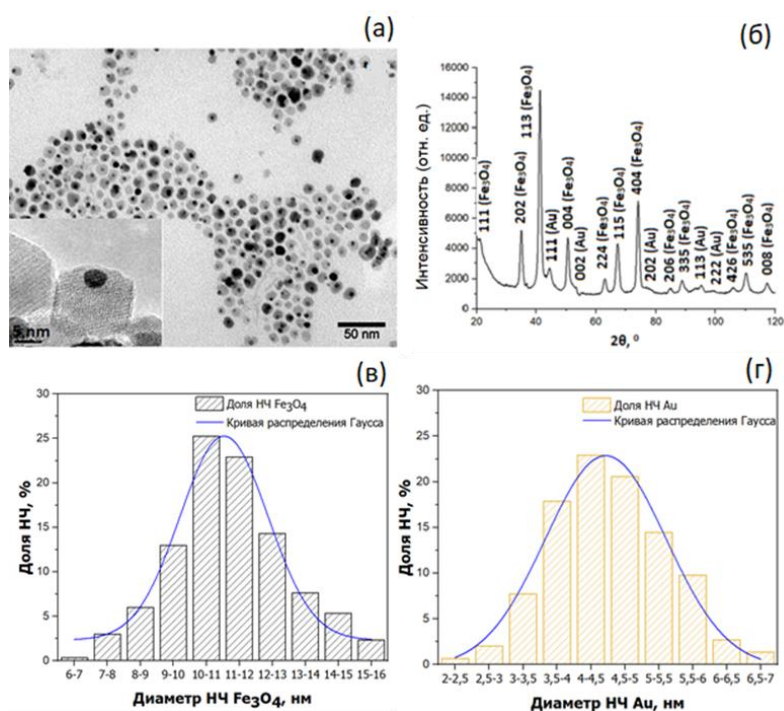


Рисунок 1. ПЭМ-изображения НЧ Fe₃O₄ – Au вида «гантель» (а); Рентгенофазовый анализ НЧ (б) и распределение наночастиц оксида железа и золота по размерам (в, г).

На данной стадии происходит формирование полимерной оболочки, прочно связанной с магнетитом, а кроме того обеспечивается наличие COOH групп, которые на второй стадии используются для конъюгации молекул ПЭГ. Такое покрытие обеспечивает как стерическое отталкивание НЧ за счет плотной полимерной оболочки, так и электростатическое отталкивание за счет наличия большого количества одноименно заряженных карбоксильных групп. Как видно из таблицы 2, размеры всех НЧ составляют менее 30 нм с отрицательным поверхностным зарядом менее -20 мВ, измеренным методом ДРС. Это позволит добиться длительной циркуляции в крови, тем самым повысится эффективность пассивного нацеливания. Стоит отметить дополнительную модификацию поверхности НЧ ДФУК и ПЭГ ($M_w \sim 1100 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$), которая способствует снижению гидрофобности системы, а также может увеличить время циркуляции в крови¹², уменьшить захват макрофагами¹³ и защитить от опсонизации путем отталкивания белков плазмы.

12. Yoo J.-W., Chambers E., Mitragotri S. Factors that Control the Circulation Time of Nanoparticles in Blood: Challenges, Solutions and Future Prospects // Curr Pharm Des. 2010. Vol. 16, № 21. P. 2298–2307.

13. Moghimi S.M., Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties // Prog Lipid Res. 2003. Vol. 42, № 6. P. 463–478.

Таблица 2. Данные распределение размеров и ζ -потенциал систем.

	<i>НЧ/ДФУК</i>	<i>НЧ/ДФУК/ПЭГ</i>	<i>НЧ/ФС</i>	<i>НЧ/ФФ</i>	<i>НЧ/ФС/ФФ</i>	<i>смесь НЧ/ФС+НЧ/ФФ</i>
Гидродинамический размер, нм	17.1±1.5	18.3±1.4	20.5±2.0	21.5±2.0	25.9±2.1	22.1±2.0
PDI	0.381	0.345	0.377	0.275	0.299	0.301
ζ -потенциал, мВ	-24.0±2.0	-26.3±2.0	-20.4±2.0	-36.6±3.0	-25.5±2.0	-27.7±2.5

На каждом этапе модификации методом ДРС измерялись гидродинамические диаметры НЧ. Гидродинамический диаметр наночастиц увеличивался после каждого этапа модификации, что свидетельствует об образовании дополнительных органических слоев ДФУК, ПЭГ, ФС и ФФ соответственно.

Подтверждение и анализ FRET-эффекта

Перенос энергии резонанса Фёрстера (FRET) представляет собой фотофизический процесс, посредством которого изначально электронно-возбужденный флуорофор, называемый донором (D), передает свою энергию возбуждения (и, таким образом, гасится) другому хромофору, называемому акцептором (A), электронный спектр поглощения которого перекрывает спектр испускания D. Последний, изначально находящийся в основном электронном состоянии, возбуждается при переносе и может (или не может) флуоресцировать.

Так как при подборе пары хромофоров нельзя полностью избежать этого эффекта, его можно минимизировать. Однако первым этапом, после выбора пары хромофоров следует рассчитать значение радиуса Ферстера. При помощи теоретических расчетов этого значения для пары хромофоров ФФ/ФС (сульфо - Су5 / 13^1 аминобутиламид бактериохлорина e_6) было получено значение R_0 равное 15 Å или 1.5 нм. С учетом практических данных их литературы, разумно использовать димерные НЧ размером более $2R_0$ для максимальной минимизации FRET-эффекта. Синтезированные димерные НЧ (Fe_3O_4 -Au), имеющие размер около 15 нм являются максимально подходящими. Такое многократное увеличение радиуса ($10R_0$) обуславливается еще и стерическим расположением ФФ и ФС на золотой и магнитной поверхностях синтезируемых НЧ. Так как планируемая степень загрузки хромофоров высока (~20-40%), то расположение конъюгированных молекул будет не только экваториальным, тем самым расстояние между парой хромофоров будет уменьшаться.

Карбодиимидным методом был получен конъюгат, напрямую ковалентно соединённых хромофоров (ФС + ФФ) (Рисунок 2) в ДМСО для подтверждения FRET эффекта между ними. Для подтверждения или опровержения безызлучательного переноса энергии между парой хромофоров были сняты спектры поглощения и флуоресценции (два канала возбуждения: ФС и ФФ) (Рисунок 3).

На рисунке 3а видны характерные пики поглощения для обоих хромофоров (ФС – 350 нм, 520 нм, 750 нм и ФФ – 660 нм). При этом возбуждение светом с длиной волны 520 нм приводит к флуоресценции, как ФФ (680 нм), так и ФС (770 нм), а возбуждение светом длины волны 660 нм также приводит к флуоресценции обоих хромофоров (ФФ – 680 нм и ФС – 770 нм). Представленные данные свидетельствуют о наличии FRET эффекта между хромофорами, что является нежелательным для получения эффективного тераностического препарата.

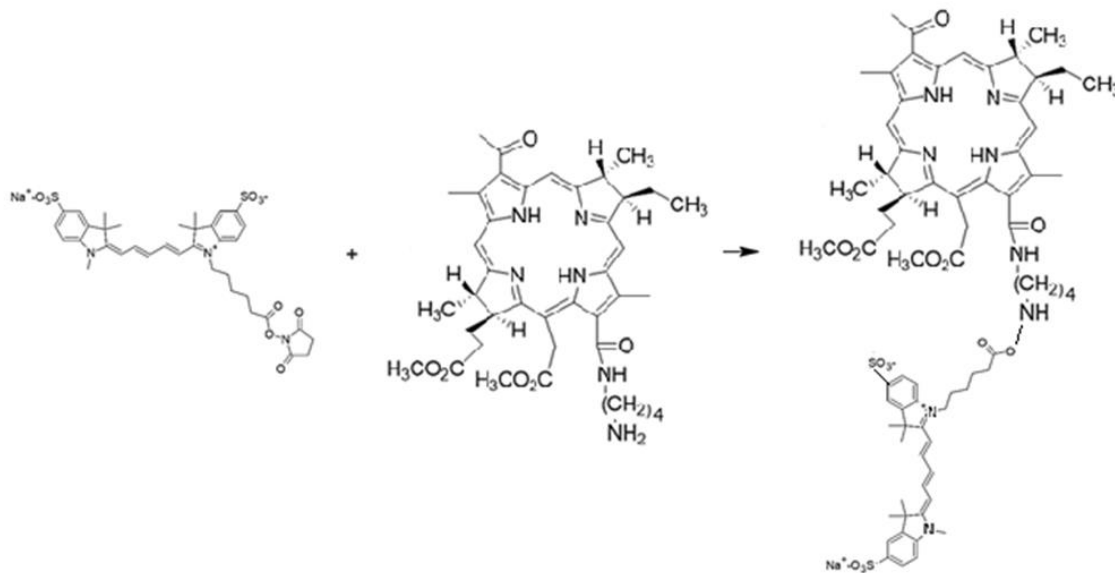


Рисунок 2. Схема ковалентной сшивки пары хромофоров

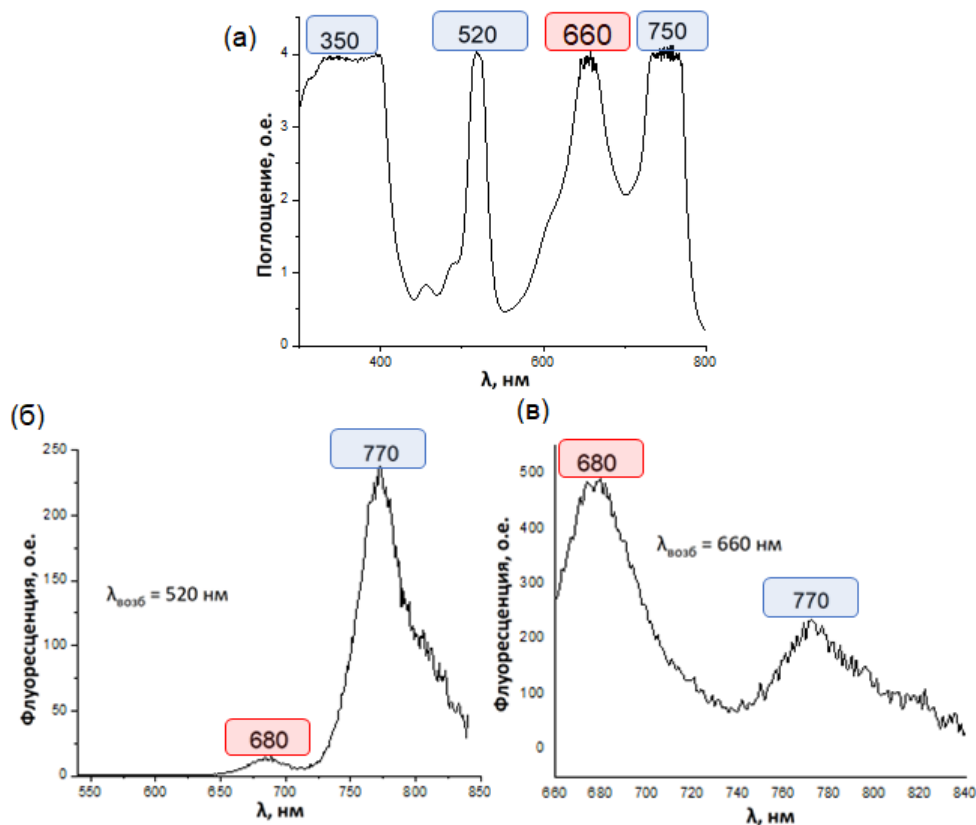


Рисунок 3. (а) спектр поглощения ФФ+ФС; (б) спектр флуоресценции ФФ+ФС (длина волны возбуждения = 520 нм); (в) спектр флуоресценции ФФ+ФС (длина волны возбуждения = 660 нм)

3.2 Иммобилизация хромофоров на поверхности наночастиц

После получения стабильных водных растворов НЧ, покрытых ДФУК-ПЭГ, необходимо было решить еще одну проблему — селективную иммобилизацию ФС на поверхности магнетита, покрытого ДФУК-ПЭГ. Основная проблема возникает из-за плохой растворимости ФС в воде, что не только препятствует его конъюгации с НЧ/ДФУК/ПЭГ, но и в воде наблюдается «стекинг» молекулы ФС, что приводит к потере продукции АФК и флуоресценции (Рисунок 4) ¹⁴. С другой стороны, большое количество органического растворителя приводит к потере коллоидной стабильности НЧ/ДФУК/ПЭГ.

Поэтому была изучена динамика стабильности НЧ/ДФУК/ПЭГ и флуоресценции ФС в зависимости от соотношения растворителей ДМСО/Н₂О. Были приготовлены образцы НЧ/ДФУК/ПЭГ с ФС с разным соотношением растворителей ДМСО/Н₂О: 10/90, 20/80, 30/70, 50/50, 70/30 соответственно и сняты спектры флуоресценции (Рисунок 4).

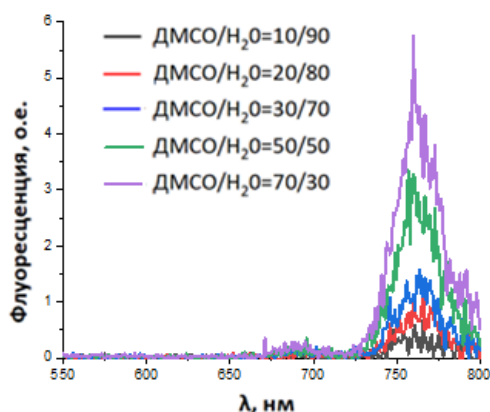


Рисунок 4. Спектры флуоресценции ФС в растворах с различными соотношениями ДМСО/Н₂О (длина волны возбуждения 530 нм)

На основании оценки интенсивности флуоресценции ФС в различных соотношениях ДМСО/Н₂О, иммобилизацию ФС проводили в смеси ДМСО/Н₂О в соотношении 30/70 по объему. При таком объемном соотношении ДМСО/Н₂О ФС все еще сохраняет свою фотоактивность, а НЧ/ДФУК/ПЭГ не агрегируют. Иммобилизацию проводили для создания систем НЧ/ФС и НЧ/ФС/ФФ с предварительной активацией карбоксильной группы ПЭГ карбодиимидным методом. Количество ФС, загруженного на магнитную поверхность НЧ, варьируется в пределах 20-25% от максимально возможного (емкость загрузки ФС достигает 0.5 мг на 1 мг Fe). Для конъюгации ФФ с золотой поверхностью НЧ/ДФУК/ПЭГ было использовано синтезированное производное - дисульфидная форма сульфо цианинового красителя Су5. Количество ФФ, загруженного на поверхность НЧ золота, варьировалась в пределах 38–40% от максимально возможного (емкость загрузки ФФ достигает 0.065 мг на 1 мг Fe).

После загрузки ФС на магнитную поверхность НЧ (НЧ/ФС) (Рисунок 6) были обнаружены пики поглощения ФС при 530 и 760 нм (Рисунок 5а), а также пик эмиссии 760 нм (возбуждение 530 нм) системы НЧ/ФС (Рисунок 5б), что подтверждает наличие ФС на поверхности НЧ. Пик поглощения при 650 нм (Рисунок 5в) и пик эмиссии при 680 нм (возбуждение 650 нм) подтверждают эффективное сопряжение ФФ с золотой поверхностью НЧ в НЧ/ФФ (Рисунок 5г) и НЧ/ФС/ФФ (Рисунок 5в). Также можно видеть широкий пик поглощения при 350 нм, особенно в области ниже 350 нм, что характерно для ядер НЧ магнетита. На рисунке 6, наблюдаются все четыре пика поглощения системы НЧ/ФС/ФФ, соответствующие пикам поглощения ФС и ФФ, что свидетельствует об эффективной иммобилизации как ФС, так и ФФ. При этом при возбуждении системы НЧ/ФС/ФФ длиной

14. Xu X. et al. Secondary Structure in Overcoming Photosensitizers' Aggregation: α -Helical Polypeptides for Enhanced Photodynamic Therapy // Adv Healthc Mater. 2023. Vol. 12, № 21.

волны 530 нм (возбуждение ФС) (Рисунок 6б) мы наблюдаем только флуоресценцию ФС, однако при воздействии 650 нм (возбуждение ФС) (Рисунок 6в), видна дополнительная эмиссия ФС в области 770 нм, связанная с переносом энергии по механизму FRET от акцептора энергии (ФФ) к донору (ФС) ¹⁵. Ожидалось, что передача энергии будет иметь относительно низкую интенсивность, что подтвердилось на практике, поскольку димерные НЧ имеют форму «гантели», на стыке двух сферических поверхностей (магнетита и золота) всегда будут стерически близко расположены молекулы ФС и ФФ.

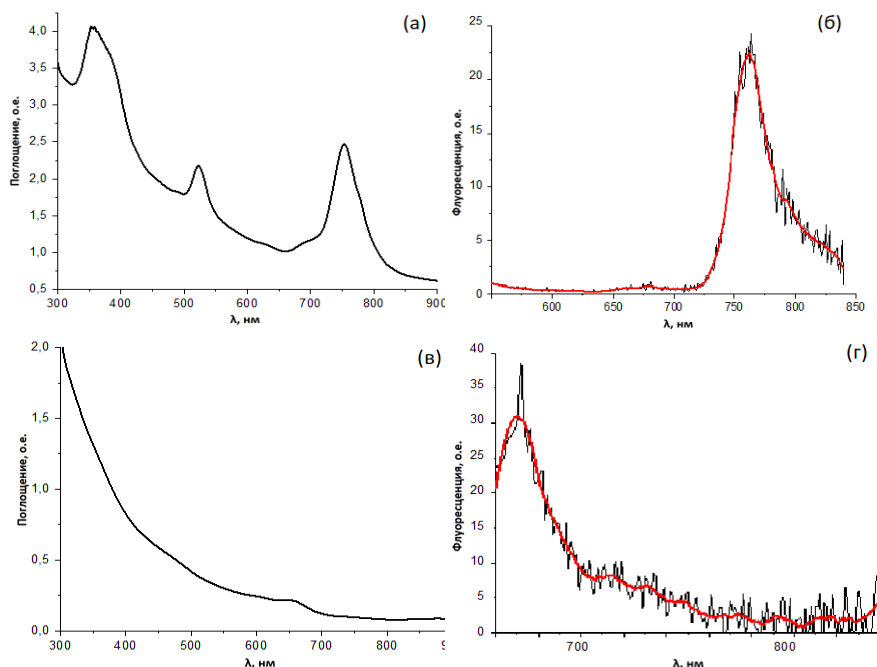


Рисунок 5. (а) спектр поглощения НЧ/ФС; (б) спектр флуоресценции НЧ/ФС (длина волны возбуждения = 520 нм); (в) спектр поглощения НЧ/ФФ; (г) спектры флуоресценции НЧ/ФФ (длина волны возбуждения = 650 нм).

Говоря об оптических свойствах смеси НЧ/ФС + НЧ/ФФ, изученных после синтеза, нужно обратить внимание на характерную визуализацию пиков как поглощения, так и флуоресценции для ФС и ФФ (Рисунок 7). Наблюдается bathochromic shift пика поглощения ФФ с 650 нм на 680 нм (Рисунок 7а), который вероятно связан с образованием структур «голова к хвосту» на поверхности НЧ ¹⁶. При возбуждении смеси (НЧ/ФС + НЧ/ФФ) длиной волны 520 нм наблюдалась флуоресценция ФС с пиком в области 770 нм. Как и для системы НЧ/ФС/ФФ для смеси конъюгатов был обнаружен перенос энергии: при возбуждении ФФ длиной волны 650 нм была дополнительная эмиссия ФС в области 770 нм, что обуславливается близким межмолекулярным расстоянием в коллоидной смеси.

Таким образом, можно сделать вывод, что наличие пиков поглощения, соответствующее функциональным группам используемых органических лигандовДФУК, ПЭГ, ФС и ФФ, говорит об их успешной ковалентной конъюгации между собой и с золотой и магнитной поверхностями НЧ.

15. Langhals H. et al. Förster Resonant Energy Transfer in Orthogonally Arranged Chromophores // J Am Chem Soc. 2010. Vol. 132, № 47. P. 16777–16782.

16. Behera G.B., Behera P.K., Mishra B.K. Cyanine dyes: self-aggregation and behaviour in surfactants. A review // Journal of Surface Science and Technology. 2007. Vol. 23, № 1–2. P. 1–31.

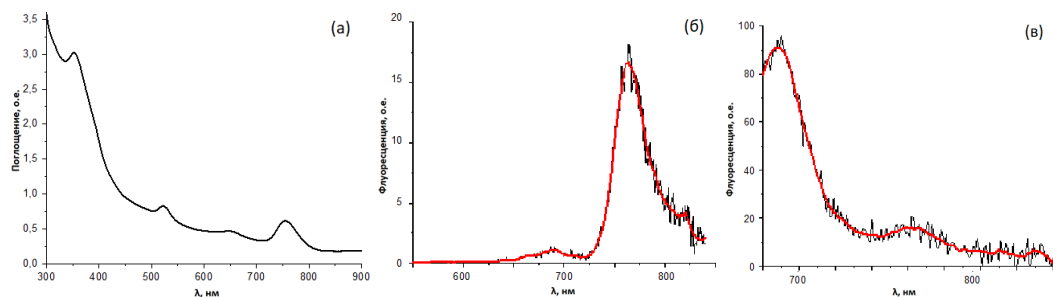


Рисунок 6. (а) спектр поглощения НЧ/ФС/ФФ; (б) спектр флуоресценции НЧ/ФС/ФФ (длина волны возбуждения = 520 нм); (в) спектр флуоресценции НЧ/ФС/ФФ (длина волны возбуждения = 650 нм).

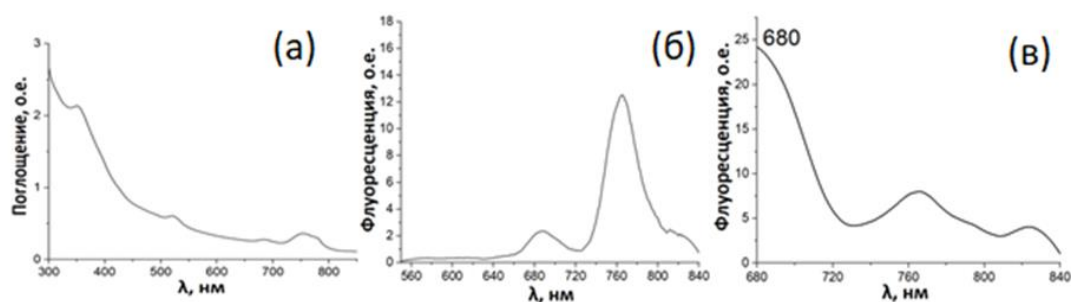


Рисунок 7. (а) спектр поглощения смеси конъюгатов НЧ/ФС + НЧ/ФФ; (б) спектр флуоресценции смеси конъюгатов НЧ/ФС + НЧ/ФФ (длина волны возбуждения = 520 нм); (в) спектр флуоресценции смеси конъюгатов НЧ/ФС + НЧ/ФФ (длина волны возбуждения = 650 нм).

3.3 Исследование цитотоксичности, фототоксичности и интернализации систем клеточной линией СТ26

Цитотоксичность и фототоксичность систем

Токсичность является одним из наиболее важных элементов биологического применения наноматериалов. Токсичность всех трех типов НЧ оценивали с помощью МТТ-теста на культуре клеток СТ26 в изучаемом диапазоне концентраций (C_{Fe} от 3.125 до 100 мкг/мл) (Рисунок 8). Исходя из полученных данных, можно сделать вывод об отсутствии каких-либо значимых цитотоксических эффектов от всех четырех типов НЧ, за исключением НЧ/ФС/ФФ, при концентрации 100 мкг/мл наблюдалось небольшое снижение (около 20%) жизнеспособности.

Фотоиндуцированную токсичность (активность) систем НЧ/ФС, НЧ/ФФ, НЧ/ФС/ФФ и смеси конъюгатов НЧ/ФС+НЧ/ФФ (Таблица 3) изучали также на линии опухолевых клеток СТ26 при концентрации Fe во всех системах равной 1.5 – 1.6 мг/мл, что соответствует концентрации ФС в системах, равной 0.75 мг/мл. Как и ожидалось, система НЧ/ФФ без ФС не проявляет выраженной фототоксичности, $ИК_{50} > 4000$ нг/мл за 4 часа инкубации.

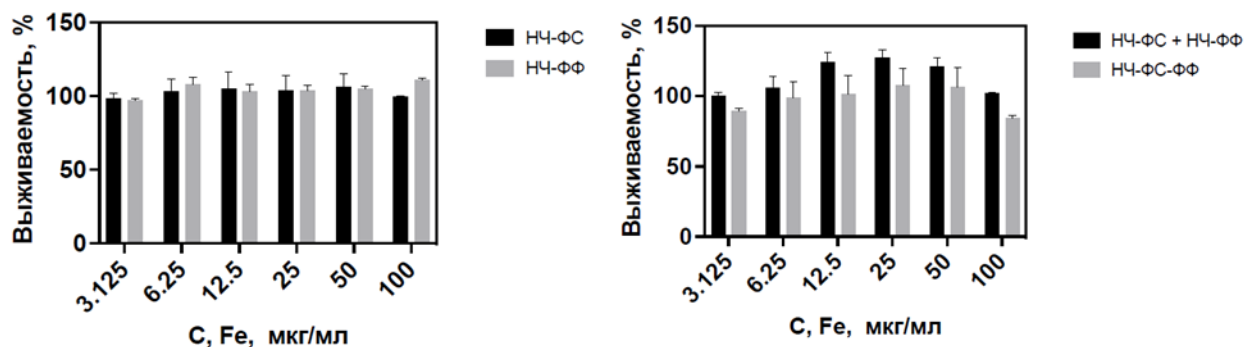


Рисунок 8. Данные цитотоксичности, полученные спустя 48 ч инкубации НЧ с клетками СТ26.

Таблица 3. Фотоиндуцированная активность субстанций (культура клеток СТ26).

ИК₅₀, нг/мл

Субстанции	Время инкубации, ч		
	0,5	2	4
НЧ/ФС	> 4000	3320±19	1799±14
НЧ/ФФ	> 4000	> 4000	> 4000
НЧ/ФС/ФФ	2318±16	1172±13	483±7
смесь (НЧ/ФС+НЧ/ФФ)	> 4000	2434±22	1763±15

Для НЧ/ФС и НЧ/ФС/ФФ наблюдалась фотоиндуцированная цитотоксичность. Фотоиндуцированный цитотоксический эффект увеличивался с увеличением продолжительности инкубации от 30 мин до 4 ч, что объясняется более высокой эффективностью поглощения НЧ клетками. Интересно, что наблюдается значительное увеличение фотоиндуцированной цитотоксичности НЧ/ФС/ФФ по сравнению с системой НЧ/ФФ несмотря на то, что концентрации ФФ были равны. Объяснение этому факту мы находим в спектрах флуоресценции обеих систем. Как было ранее показано на рисунке 7г и рисунке 8в, для НЧ/ФС/ФФ дополнительный пик флуоресценции ФС наблюдается в диапазоне 750-770 нм, что указывает на то, что существует небольшая доля ФС и ФФ рядом друг с другом, позволяющая возникать FRET-эффекту и передавать энергию от ФФ к ФС, тем самым увеличивая флуоресценцию и продукцию АФК. Для фотоиндуцированной цитотоксичности, мы использовали фильтр с $\lambda > 620$ нм, что означает, что ФФ также будет поглощать свет этой длины волны, позволяя ФФ возбуждаться и передавать энергию молекулам ФС, тем самым увеличивая общую фотоиндуцированную цитотоксичность. Полученные данные по смеси конъюгатов НЧ/ФС+НЧ/ФФ коррелируют с данными НЧ/ФС, что можно интерпретировать тем, что вероятнее всего происходит возбуждение ФС (как и в образце НЧ/ФС), но не наблюдается FRET-эффекта, за счет большего межмолекулярного расстояния, обусловленного разделением в смеси конъюгатов НЧ/ФФ и НЧ/ФС.

Интернализация систем

Для оценки этого эффекта клеточное распределение трех типов НЧ оценивали с помощью конфокальной микроскопии. Для всех трех типов наночастиц мы наблюдали их поглощение клетками СТ26, однако закономерности их интернализации были разными. В случае НЧ/ФС и НЧ/ФС/ФФ типы интернализации были схожими, и, что более важно, для НЧ/ФС/ФФ наблюдались области колокализации в обоих флуоресцентных каналах для ФС и для ФФ, что указывает на то, что даже через 2 часа после интернализации оба ФС и ФФ соединены с поверхностью НЧ. В случае НЧ/ФС и НЧ/ФС/ФФ ядерной локализации не наблюдалось. Цитоплазматическая или перинуклеарная локализация, по-видимому, не была распределена равномерно, и можно было идентифицировать некоторые более интенсивно флуоресцентные пятна (Рисунок 9). Для системы НЧ/ФФ наблюдалось менее равномерное распределение, и большая часть сигнала была обнаружена в виде небольших пятен, вероятно, соответствующих лизосомам. Полагаю, что этот результат обусловлен присутствием молекул ФС на поверхности НЧ/ФС и НЧ/ФС/ФФ, что приводит к изменению их внутриклеточного распределения по сравнению с НЧ/ФФ. Кроме того, присутствие ФС на поверхности НЧ, по-видимому, является более важным фактором, влияющим на интернализацию НЧ, поскольку наблюдается, что в НЧ/ФС/ФФ локализация флуоресцентного сигнала от ФФ хорошо коррелирует с локализацией флуоресцентного сигнала от ФС (Рисунок 9в) и сигнала ФФ в клетках, инкубированных с НЧ/ФС/ФФ, не демонстрируя ту же картину, что наблюдается для НЧ/ФФ (Рисунок 9б).

Таким образом, все системы демонстрируют внутриклеточную флуоресценцию в соответствующем диапазоне длин волн и способны интернализироваться в цитоплазме раковых клеток (Рисунок 9а-з). На рисунке 9в показана частичная колокализация сигналов ФС и ФФ, что указывает на наличие в цитоплазме наночастиц, имеющих на своей поверхности ковалентно конъюгированные ФС и ФФ (НЧ/ФС/ФФ). В случае смеси конъюгатов (Рисунок 9г) сигнал от НЧ/ФС был распределен диффузно по цитоплазме, тогда как для НЧ/ФФ локализация наблюдалась в виде более ярких точечных сигналов. При анализе изображений клеток, инкубированных со смесью НЧ/ФС+НЧ/ФФ не удастся идентифицировать области, в которых полностью совпадает флуоресцентный сигнал от ФС и ФФ, хотя для обоих типов наночастиц наблюдается цитоплазматическая локализация. Исходя из этого можно сделать вывод об схожем времени необходимом для захвата НЧ/ФС и НЧ/ФФ клеткой, однако дальнейшее их внутриклеточное распределение скорее всего различается. Стоит отметить, что для успешной ФДТ нет необходимости проникновения ФС через клеточную мембрану, так как формирующиеся во внеклеточном матриксе АФК будут все равно оказывать токсическое действие на окружающие ткани. В результате можно предположить, что, если при внутривенном введении НЧ будут доставляться к опухоли это обеспечит успешную терапию опухоли методом ФДТ.

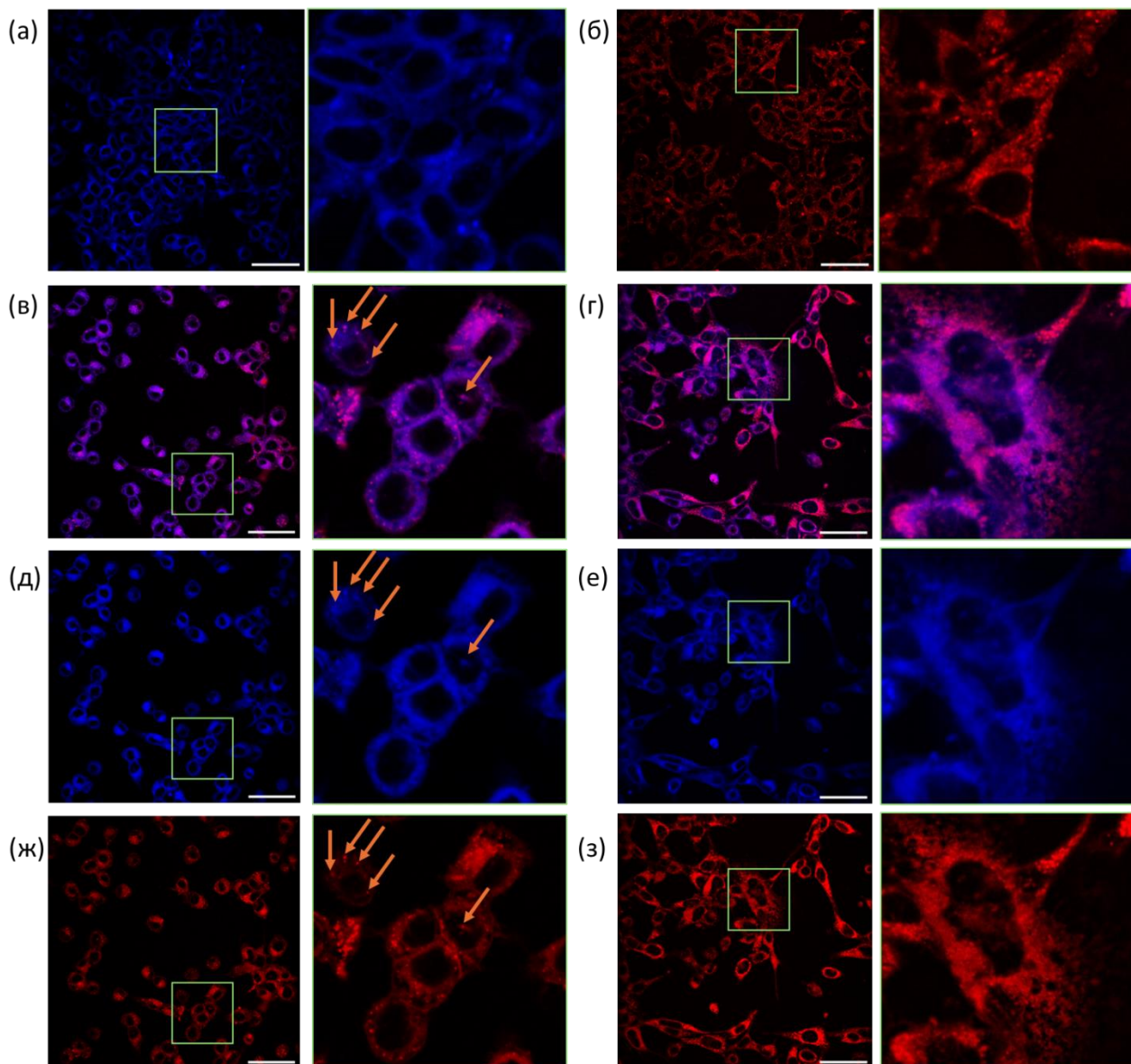


Рисунок 9. Конфокальная визуализация клеток СТ26, инкубированных в течение 2 часов с системами: (а) НЧ/ФС; (б) НЧ/ФФ; (в) НЧ/ФС/ФФ (слияние); (г) НЧ/ФС+НЧ/ФФ (слияние); (д) НЧ/ФС/ФФ (длина волны возбуждения = 405 нм); (е) НЧ/ФС+НЧ/ФФ (длина волны возбуждения = 405 нм)

3.4 Флуоресцентная диагностика, исследование биораспределения систем

Для подтверждения возможности использования в целях ФД, а также для исследования биораспределения и времени максимального накопления в опухоли, системы НЧ/ФФ, НЧ/ФС, НЧ/ФС/ФФ и смесь НЧ/ФФ + НЧ/ФС были внутривенно введены в ткани мышей линии Balb/c с имплантированной подкожно опухолью карциномы толстого кишечника СТ26. После внутривенного введения, был задетектирован флуоресцентный сигнал в легких, печени, селезенке, сердце, опухолях и почках с помощью системы для прижизненной детекции флуоресценции IVIS. Флуоресценцию ФФ детектировали при длине волны возбуждения 640 нм и длине волны испускания 700 нм (Рисунок 10). Флуоресценцию ФС детектировали при длине возбуждения 745 нм и длине волны испускания 800 нм (Рисунок 11).

Стоит отметить, что численные значения флуоресценции систем с ФФ в опухоли превосходят таковые для систем с ФС чуть более чем на порядок (Рисунок 12). Из чего можно сделать вывод, что наличие в системе ФФ может обеспечивать более чувствительную ФД, не влияя на эффективность терапевтической составляющей (ФДТ).

Исследование времени накопления ФС и ФФ в составе НЧ в опухолях после внутривенного введения показало, что пик накопления ФФ и ФС находится во временном диапазоне 1-2 часов после внутривенного введения (Рисунок 12).

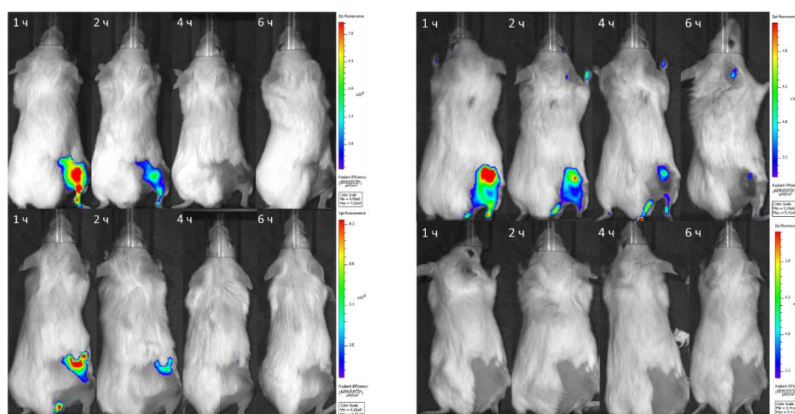


Рисунок 10. Справа: интенсивность флуоресценции, при внутривенном введении НЧ/ФФ/ФС (сверху), НЧ/ФС+НЧ/ФФ (снизу); слева: интенсивность флуоресценции, при внутривенном введении НЧ/ФФ (сверху), НЧ/ФС (снизу). Длина волны возбуждения 640 нм, длина волны испускания 700 нм

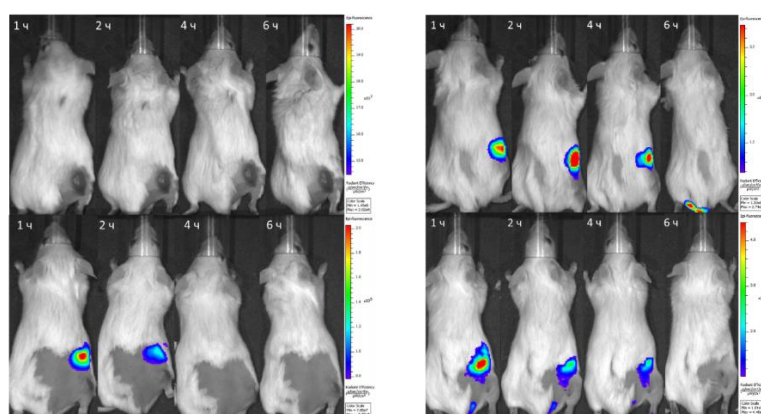


Рисунок 11. Справа: Интенсивность флуоресценции, при внутривенном введении НЧ/ФФ (сверху), НЧ/ФС (снизу); слева: интенсивность флуоресценции, при внутривенном введении НЧ/ФФ/ФС (сверху), НЧ/ФС+НЧ/ФФ (снизу). Длина волны возбуждения 745 нм, длина волны испускания 800 нм

Отдельно стоит отметить, что как для сигнала от ФС, так и для сигнала от ФФ максимум интенсивности наблюдается в один и тот же временной промежуток (1-2) часа для всех исследуемых групп НЧ (НЧ/ФФ, НЧ/ФС, НЧ/ФС/ФФ и НЧ/ФС+НЧ/ФФ), что косвенно подтверждает гипотезу о том, что именно НЧ определяют фармакокинетические параметры, а загрузка препаратов в концентрациях, необходимых для достижения тераностического эффекта, не оказывает существенного влияния на распределение в организме.

Дополнительно к полученным данным о накоплении ФС и ФФ в опухолях через 6 часов животных выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации, и исследовали интенсивность флуоресценции в каналах соответствующих ФС и ФФ от отдельных органов. В канале флуоресценции, соответствующем флуоресценции ФФ для НЧ/ФФ, НЧ/ФС/ФФ и НЧ/ФС+НЧ/ФФ не наблюдается статистически значимых отличий в интенсивностях флуоресценции от органов мышей, получавших внутривенную инъекцию НЧ/ФФ, НЧ/ФС/ФФ и НЧ/ФС+НЧ/ФФ за исключением сигнала от селезенки в мышах, получавших инъекцию НЧ/ФС+НЧ/ФФ, где наблюдалось достоверное увеличение сигнала по сравнению с остальными группами в селезенке ($P \geq 0.05$) (Рисунок 13).

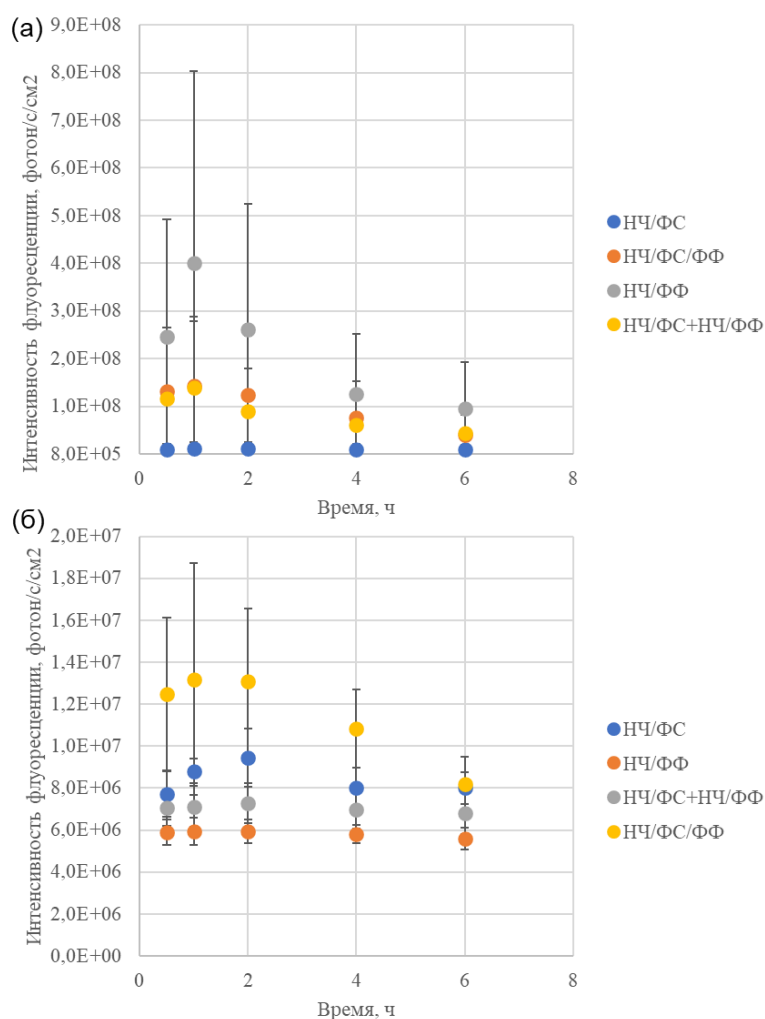


Рисунок 12. Накопление систем НЧ/ФФ, НЧ/ФС, НЧ/ФС/ФФ и НЧ/ФС+НЧ/ФФ в опухоли после инъекции: (а) при длине волны возбуждения 640 нм и длине волны испускания 700 нм; (б) при длине волны возбуждения 745 нм и длине волны испускания 800 нм

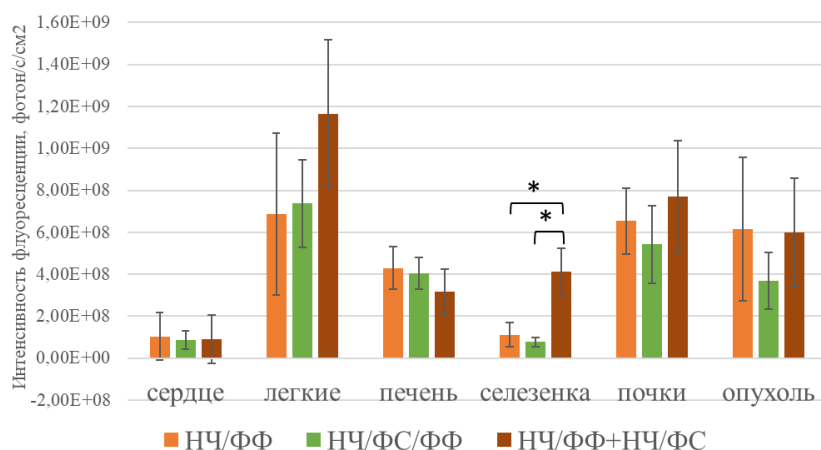


Рисунок 13. Биораспределение систем в органах и опухоли спустя 6 ч. после инъекции при длине волны возбуждения 640 нм и длине волны испускания 700 нм. Результаты представлены как среднее $\pm$ SD; * $p \leq 0.05$ (ANOVA)

Предполагается, что иммунные клетки, связанные с опухолью, перемещаются между селезенкой и опухолью ¹⁷. Одна из многих возможных гипотез заключается в том, что опухолевые клетки увеличивают секвестрацию НЧ как через макрофаги селезенки, так и через макрофаги, ассоциированные с опухолью (МАО). Таким образом, НЧ будут проникать и накапливаться больше в опухолевой ткани, что подтверждается данными (Рисунок 13), где видно относительно высокое накопление препарата в опухоли, что вероятнее всего ещё связано с высокой гидрофильностью поверхности НЧ за счет модификации ПЭГ, а значит

17. Zelepukin I. V. et al. Fast processes of nanoparticle blood clearance: Comprehensive study // Journal of Controlled Release. 2020. Vol. 326. P. 181–191.

уменьшение опсонизации. Системы таким образом не поглощались в большом количестве печенью и селезенкой. Более того, улучшенная циркуляция в крови и эффект EPR наноструктур НЧ/ФФ, НЧ/ФС/ФФ и НЧ/ФФ+НЧ/ФС малых размеров (≤ 50 нм) также повлияли на относительно высокое накопление в опухоли, сравнимое с сигналами от печени и селезенки. Снижение секвестрации НЧ печенью и селезенкой может увеличить их биодоступность и накопление в опухоли, что также обуславливает высокое накопление систем в опухоли (Рисунок 13). Также отмечался относительно высокий флуоресцентный сигнал в легких, что вероятнее всего обуславливается фагоцитарным поглощением альвеолярными мышиными макрофагами. Стоит отметить, что наиболее предпочтительный путь выведения НЧ из организма — через почки, с учетом данных биораспределения спустя 6 часов, можно предположить, что высокий сигнал флуоресценции в почках, сравнимый с сигналами опухоли и легких обусловлен именно этим (Рисунок 13).

В канале флуоресценции, соответствующем флуоресценции ФС (при длине волны возбуждения 745 нм и длине волны испускания 800 нм) для НЧ/ФС, НЧ/ФС/ФФ и НЧ/ФС+НЧ/ФФ наблюдается статистически незначимые отличия в интенсивностях флуоресценции от органов мышей, получавших внутривенную инъекцию НЧ/ФС, НЧ/ФС/ФФ и НЧ/ФС+НЧ/ФФ (Рисунок 14), кроме сигнала в печени, где видна более высокая интенсивность флуоресценции для НЧ/ФС/ФФ и НЧ/ФС+НЧ/ФФ.

Кроме того, стоит отметить, что в целом при сравнении изображений соответствующих флуоресценции ФС и флуоресценции ФФ наблюдается иная картина распределения НЧ по органам. Наиболее заметным является наличие максимума флуоресценции в ткани печени в канале флуоресценции ФС. В печени наблюдается некоторое содержание порфиринов и их производных, которые являются прекурсорами гема, только лишенными железа и имеющими схожие каналы поглощения (500-700 нм) и флуоресценции (длинноволновая часть видимого спектра 600 нм и 800 нм), которые использовались при детекции ФС.

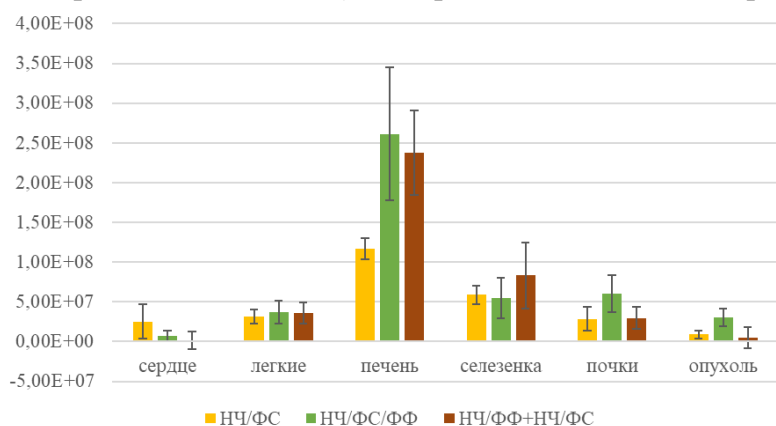


Рисунок 14. Биораспределение систем в органах и опухоли спустя 6 ч. после инъекции при длине волны возбуждения 745 нм и длине волны испускания 800 нм. Результаты представлены как среднее $\pm$ SD

Удельное поглощение света тканями сильно зависит от длины волны, при этом при смещении в коротковолновую область прозрачность тканей для света резко падает. Печень содержит большое количество производных гема, поглощающих свет в канале флуоресценции ФФ, что объясняет высокий сигнал флуоресценции замеченный при исследовании биораспределения НЧ/ФС, НЧ/ФС/ФФ и НЧ/ФС+НЧ/ФФ (Рисунок 14) при длине волны возбуждения 745 нм и длине волны испускания 800 нм.

В дополнении количественно оценивалось биораспределение НЧ (всех образцов) у мышей BALB/c *ex vivo*, путем измерения концентрации Fe с помощью метода АЭС. По данным, рассчитанным по АЭС (*ex vivo*) после внутривенной инъекции 0.5-1 % от введенной дозы НЧ (в зависимости от системы) достигают опухоли. Рассчитанный интервал коррелирует с данными среднего показателя эффективности для пассивной доставки НЧ (~ 0.7 %) ¹⁸.

18. Wilhelm S. et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours // Nat Rev Mater. 2016. Vol. 1, № 5. P. 16014.

Суммируя полученные данные можно утверждать, что как в части накопления в опухоли, так и в части распределения исследуемых препаратов в органах подтверждается выдвинутая гипотеза о превалирующем влиянии НЧ на биораспределение в органах, что позволяет предполагать возможность перехода от более сложных в получении и характеристике димерных наночастиц, несущих и ФФ и ФС в составе одной наночастицы к более простой в реализации схемы с использованием физической смеси двух типов НЧ, несущих каждая свой тип молекул (ФС и ФФ соответственно). Стоит отметить, что данный вывод будет корректироваться после изучения терапевтического эффекта по средствам ФДТ на тех же моделях *in vivo*.

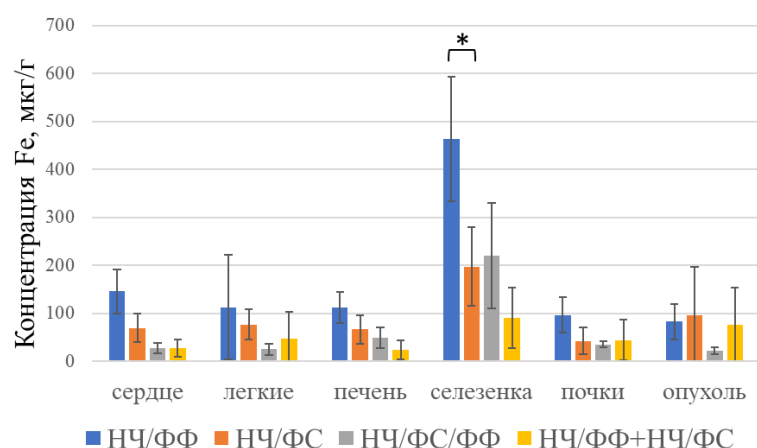


Рисунок 15. Биораспределение систем в органах и опухоли *ex vivo* после в/в инъекции методом АЭС. Результаты представлены как среднее $\pm$ SD; * $p \leq 0.001$ (ANOVA)

3.5 Исследование фотоиндуцированной противоопухолевой эффективности *in vivo*

В течение первой недели после лечения у животных, которым проводилась ФДТ с инъекциями систем НЧ/ФС/ФФ и НЧ/ФС+НЧ/ФФ (Рисунок 18б,в), наблюдалась задержка роста опухоли по сравнению с контрольной группой (Рисунок 18г). Все три используемые системы (НЧ/ФС, НЧ/ФС/ФФ и НЧ/ФС+НЧ/ФФ) для лечения привели к значительному контролю роста опухоли по сравнению с группой контроля (PBS) ($P \leq 0.05$). Хотя ни одна из опухолей не была полностью излечена, скорость роста в группе «НЧ/ФС+НЧ/ФФ» (Рисунок 18в) стала медленнее по сравнению с группой «контроль» (без лечения), что привело к значительным различиям в размерах опухолей к 21 дню. Это процесс замедления роста обуславливается апоптозом раковых клеток при использовании ФДТ.

Реакция опухоли представлена на кривых Каплана-Майера (Рисунок 16), где процент мышей с объемом опухоли менее 2000 мм^3 , увеличивших средний диаметр по сравнению с размером до лечения, нанесен на график в зависимости от дней после лечения. Горизонтальная линия на 60-й день на графике кривой представляют процент вылеченных животных, который составил 0%. В данном исследовании был поставлен акцент на сравнение терапевтической эффективности двух систем: НЧ/ФС/ФФ и смеси НЧ/ФС+НЧ/ФФ. Важной задачей было соотнесение параметров эффективности и понимание в необходимости синтеза более сложной наноконструкции НЧ/ФС/ФФ.

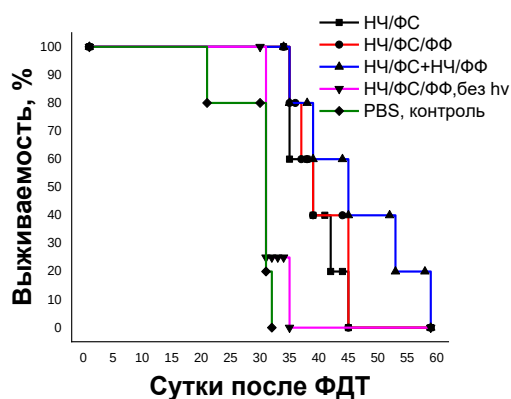


Рисунок 16. Выживаемость мышей с карциномой толстой кишки СТ26 после сеанса ФДТ (Каплан-Майер). Двухфакторный дисперсионный анализ $p \leq 0.05$ (ANOVA)

НЧ/ФС
НЧ/ФС/ФФ
НЧ/ФС+НЧ/ФФ
контроль

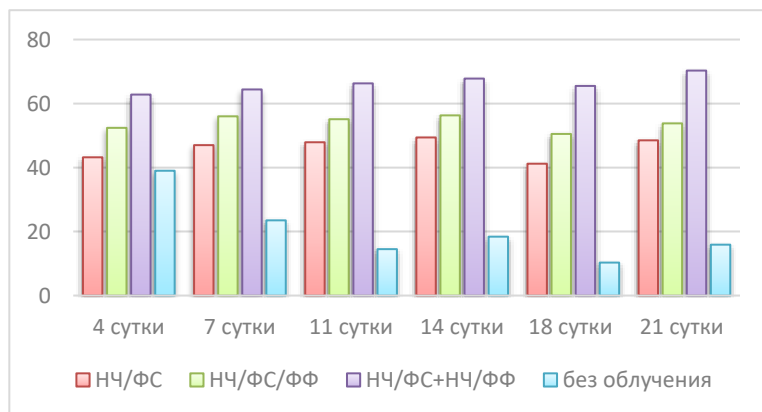
$$\left. \begin{array}{l} \text{НЧ/ФС} \\ \text{НЧ/ФС/ФФ} \\ \text{НЧ/ФС+НЧ/ФФ} \\ \text{контроль} \end{array} \right\} p = 2.18e^{-8} \left\} p = 3.18e^{-4} \left\} p = 1.47e^{-4} \right\} p = 6.08e^{-5} \left\} p = 6.05e^{-4} \right\} p = 1.25e^{-2}$$


Рисунок 17. Торможение роста опухоли после лечения ФДТ

Нами было рассчитано, что размеры опухоли в день ФДТ (0 день) не имели статистически значимых различий в объеме опухоли. Однако, на рисунке 17 показан процент торможения опухоли в течении 21 дня после ФДТ, где фиксируется максимальный регресс роста для системы НЧ/ФС+НЧ/ФФ, что говорит о ее относительной эффективности в сравнении с остальными. Из этого можно сделать вывод, об отсутствии (максимальной минимизации) FRET эффекта между ФФ и ФС на межмолекулярном уровне в физической смеси НЧ/ФС+НЧ/ФФ относительно системы НЧ/ФС/ФФ. Системы, несущие ФС успешно индуцировали противоопухолевый ответ против подкожно растущей карциномы толстой кишки СТ26.

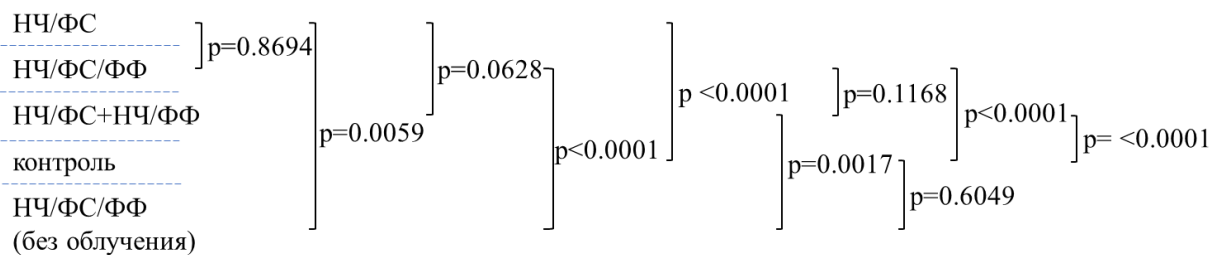
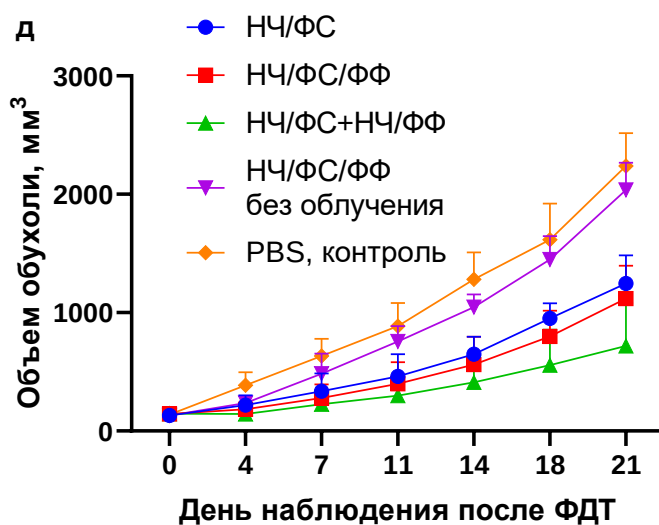
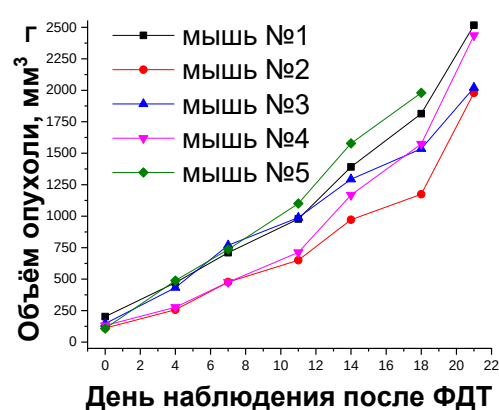
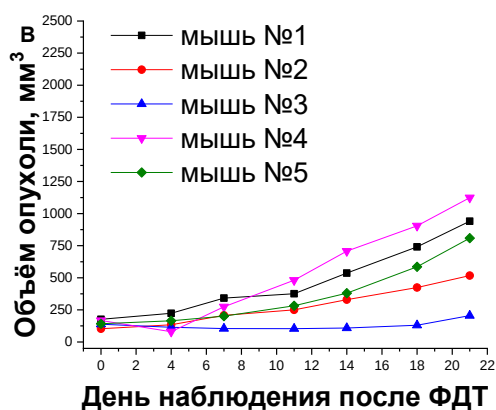
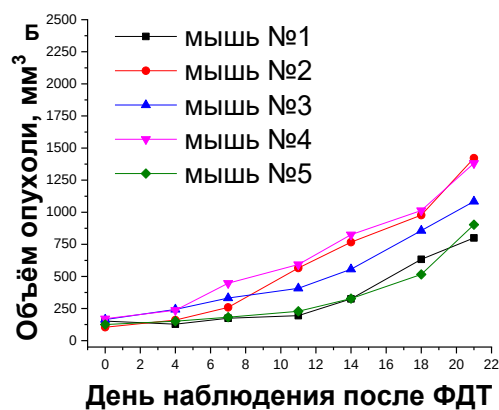
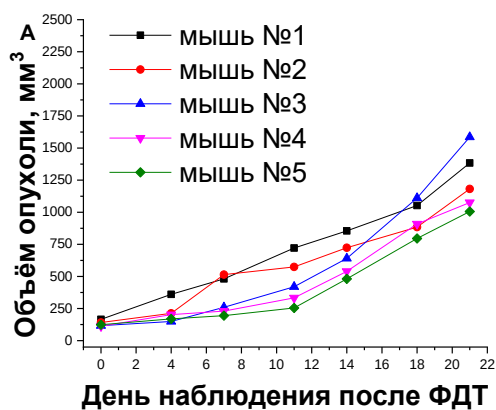


Рисунок 18. Динамика роста опухоли СТ26 у мышей после ФДТ (количество животных в группе n=5): (А) НЧ/ФС; (Б) НЧ/ФС/ФФ; (В) НЧ/ФС+НЧ/ФФ; (Г) контроль; (Д) объединенные данные. Двухфакторный дисперсионный анализ $p \leq 0.05$ (ANOVA), результаты представлены как среднее $\pm$ SD

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного исследования в данной диссертационной работе был разработан химический дизайн и способ получения наноконструкции, при помощи которой можно осуществлять ФДТ и ФД. Было предложено два подхода в создании наноконструкций, включающих в себя димерные НЧ Fe_3O_4 -Au, стабилизированные ковалентноДФУК и ПЭГ карбодиимидным методом. При первом подходе НЧ/ФС/ФФ магнитная поверхность НЧ была модифицирована ФС бактериофеофорбидного ряда, золотая поверхность – ФФ цианинового ряда, второй подход НЧ/ФС+НЧ/ФФ включает физическую смесь, состоящую из димерных НЧ с иммобилизованным ФС на магнитную поверхность с димерными НЧ с ФФ на золотой поверхности, в соотношении 1:1 по концентрации Fe. Предложенные модели решают важную проблему FRET-эффекта, возникающего при совмещении в одной системе ФФ и ФС, что делает возможным использование ФДТ и ФД в одном препарате. Более того, сравнение двух подходов не выявило существенно значимых различий в терапевтической эффективности при ФДТ, что сильно упрощает синтез таких наноконструкций.

ВЫВОДЫ

- 1) Метод термического разложения пентакарбонила железа в октадецене с использованием в качестве ПАВ олеиновой кислоты и олеиламина с последующим добавлением тетрахлораурата водорода позволяет получать димерные наночастицы магнетит-золото с размерами магнитного и золотого ядра 11.2 ± 1.5 нм и 4.4 ± 1.0 нм соответственно.
- 2) Разработанная методика модификации поверхности наночастиц магнетит-золото с использованием ДФУК и ПЭГ позволяет получать стабильные водные коллоидные растворы димерных наночастиц с размером 18.3 ± 1.4 нм и поверхностным зарядом -26.3 ± 2.0 мВ;
- 3) Ковалентная конъюгация ФС на магнитную поверхность димерных наночастиц с использованием в качестве растворителя смеси ДМСО/вода в соотношении 30/70 позволяет избежать агрегации молекул ФС и сохранить его фототоксические свойства, а емкость загрузки достигает 0.5 мг на 1 мг Fe. Использование дисульфидного производного ФФ позволяет проводить ковалентное связывание ФФ с поверхностью золота за счет образования связи Au-S, а емкость загрузки достигает 0.065 мг на 1 мг Fe.
- 4) Методом конфокальной микроскопии показана колокализация флуоресцентных сигналов ФФ и ФС в клеточной культуре карциномы толстой кишки мыши СТ26 как для НЧ/ФС/ФФ, так и для смеси НЧ/ФС+НЧ/ФФ.
- 5) Как НЧ/ФС/ФФ, так и смесь НЧ/ФС+НЧ/ФФ показали фотоиндуцированную токсичность по отношению к клеточной культуре карциномы толстой кишки мыши СТ26, при этом максимальный фототоксический эффект наблюдался спустя 4 часа после инкубации с клеточной культурой, а значение ИК_{50} составило 483 ± 7 нг/мл и 1763 ± 15 нг/мл для НЧ/ФС/ФФ и смеси НЧ/ФС+НЧ/ФФ соответственно.
- 6) Методом прижизненной оптической визуализации показано, что максимальное накопление в опухоли НЧ/ФС/ФФ и смеси НЧ/ФС+НЧ/ФФ наблюдается в диапазоне 1-2 часа после внутривенного введения мышам с имплантированной опухолью карциномы толстой кишки СТ26, методом АЭС (*ex vivo*) продемонстрировано эффективное накопление в опухоли систем (0.5-1% от введенной дозы), что коррелирует с медианным (по литературным данным) значением для пассивной доставки.
- 7) Исследование *in vivo* на мышах линии Balb/CJLac с привитой аденокарциномой толстой кишки мыши СТ26 с использованием НЧ/ФС/ФФ и НЧ/ФС + НЧ/ФФ показало возможность визуализации опухолевого очага методом ФД и эффективную терапию опухолей методом ФДТ, что делает их перспективными тераностическими препаратами.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах, индексируемых базами Web of Science и Scopus.

1. Веселов М.М. и др. Управление биокатализом пары α -химотрипсин - ингибитор баумана-бирка, иммобилизованных на гибридных наночастицах магнетит-золото, с помощью негреющего низкочастотного магнитного поля / Веселов М.М., Коломоец Н.И., Блинова А.Р., Ефремова М.В., **Чудосай Ю.В.**, Прусов А.Н., Жигачев А.О., Головин Ю.И., Клячко Н.Л. // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. – 2020. – Т. 61. – № 4, С. 287–295. (объем 0,5 п.л. авторский вклад 30%) [Импакт-фактор РИНЦ=0,764] (Veselov M.M. et al. Regulation of Biocatalysis with the α Chymotrypsin–Bowman–Birk Inhibitor Pair Immobilized on Magnetite-Gold Hybrid Nanoparticles Using a Non-Heating Low-Frequency Magnetic Field / Veselov M.M., Kolomoec N.I., Blinova A.R., Efremova M.V., **Chudosay Yu V.**, Prusov A.N., Zhigachev A.O., Golovin Yu I., Klyachko N.L. // Moscow University Chemistry Bulletin. – Vol. 75. – № 4. – P. 225-231. (объем 0,43 п.л., авторский вклад 30%) [Импакт-фактор Wos JIF=0,7]) doi: 10.3103/S0027131420040100.
2. Варфоломеев С.Д. и др. Биокатализ: современные проблемы и приложения / Варфоломеев С.Д., Шведас В.К., Ефременко Е.Н., Егоров А.М., Хренова М.Г., Тишков В.И., Атрошенко Д.Л., Пометун А.А., Савин С.С., Угарова Н.Н., Ломакина Г.Ю., Гачок И.В., Лягин И.В., Муронец В.И., Синицын А.П., Синицына О.А., Рожкова А.М., Махаева Г.Ф., Бачурин С.О., Лаврик О.И., Жарков Д.О., Юдкина А.В., Панасенко О.М., Байков А.А., Массон П., Паширова Т.Н., Шайхутдинова З.М., Попова Е.В., Тихомирова В.Е., Кост О.А., Кудряшова Е.В., Добрякова Н.В., Клячко Н.Л., Веселов М.М., Лопухов А.В., Ле-Дейген И.М., Усвалиев А.Д., **Чудосай Ю.В.**, Еремеев Н.Л., Зверева М.Э., Рубцова М.Ю., Уляшова М.М., Преснова Г.В., Сиголаева Л.В., Пергушов Д.В., Курочкин И.Н., Евтушенко Е.Г., Богинская И.А., Звягина Ю.Ю., Слипенченко Е.А., Крюкова О.В., Седова М.В., Рыжиков И.А., Шумянцева В.В., Королёва П.И., Булко Т.В., Агафонова Л.Е., Масамрех Р.А., Филиппова Т.А., Кузиков А.В., Савицкий А.П., Шлеева М.О., Соловьев И.Д., Марынич Н.К. // Успехи химии. – 2024. – Т. 93. – № 12, С. 1–55. (объем 3,44 п.л., авторский вклад 18%) [Импакт-фактор РИНЦ=5,038] (Varfolomeev S.D. et al. Biocatalysis: modern challenges and applications / Varfolomeev S.D., Švedas V., Efremenko E.N., Egorov A.M., Khrenova M.G., Tishkov V.I., Atroshenko D.L., Pometun A.A., Savin S.S., Ugarova N.N., Lomakina G.Yu., Gachok I.V., Lyagin I.V., Muronetz V.I., Sinitsyn A.P., Sinitsyna O.A., Rojkhova A.M., Makhaeva G.F., Bachurin S.O., Lavrik O.I., Zharkov D.O., Yudkina A.V., Panasenko O.M., Baykov A.A.6, Masson P., Pashirova T.N., Shaihutdinova Z.M., Popova E.V., Tikhomirova V.E., Kost O.A., Kudryashova E.V., Dobryakova N.V., Klyachko N.L., Veselov M.M., Lopukhov A.V., Le-Deygen I.M., Usvaliev A.D., **Chudosai I.V.**, Eremeev N.L., Zvereva M.E., Rubtsova M.Yu., Ulyashova M.M., Presnova G.V., Sigolaeva L.V., Pergushov D.V., Kurochkin I.N., Evtushenko E.G., Boginskaya I.A., Zvyagina Yu.Yu., Slipchenko E.A., Kryukova O.V., Sedova M.V., Ryzhikov I.A., Shumyantseva V.V., Koroleva P.I., Bulko T.V., Agafonova L.E., Masamrekh R.A., Filippova T.A., Kuzikov A.V., Savitsky A.P., Shleevea M.O., Solovyev I.D., Marynich N.K. // RUSSIAN CHEMICAL REVIEWS. – 2024. – Т. 93. – № 12. (объем 3,21 п.л., авторский вклад 18%) [Импакт-фактор Wos JIF=7,46]) doi: 10.59761/RCR5144

Патент РФ

1. **Chudosai I.V.**, Abakumov M.A., Klychko N.L., Pavlova M.A., Panchenko P.A., Fedorova O.A. // Патент РФ №2798612, #623021000119-7, 20 июня 2022, Препарат для фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики и способ его получения (объем 2,55 п.л., авторский вклад 90%).

Прочие публикации

Chudosai I.V. et al. Synthesis and Characterization of a Bifunctional Platform Based on Magnetite–Gold Nanoparticles for Theranostics of Cancer / **Chudosai I.V.**, Sorokina M., Abakumov M., Klyachko N. // Materials Proceedings. – 2023. – Т. 14. – №. 1. – P. 72-80. (объем 0,6 п.л., авторский вклад 90%) doi: 10.3390/IOC2023-14498.

Chudosai I.V. et al. Synthesis and characterization of a bifunctional platform based on magnetite-gold nanoparticles for theranostics of cancer / **Chudosai I.V.**, Sorokina M., Abakumov M., Klyachko N. // Public Health and Toxicology – 2022. – Т. 2. – P. 11-12. (объем 0,1 п.л., авторский вклад 90%) doi: 10.18332/pht/150231.