

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М.В. ЛОМОНОСОВА
ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Чудосай Юлия Викторовна

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

1.5.6. Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научные руководители:

д.х.н., профессор Клячко Н.Л.,

к.х.н., доцент Абакумов М.А.

Москва 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
<i>I</i> ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	15
1.1 Проблемы терапии онкологических заболеваний.....	15
1.1.1 Сходства между здоровыми и опухолевыми клетками (тканями)	16
1.1.2 Ключевые молекулярно-генетические причины низкой эффективности противоопухолевой терапии	19
1.1.2.1 Выключение проапоптотических путей в опухолевых клетках	19
1.1.2.2 Иммуносупрессивное окружение опухоли.....	21
1.1.2.3 Множественная лекарственная устойчивость	23
1.2 Подходы и проблемы в противоопухолевой терапии.....	28
1.2.1 Химиотерапия.....	29
1.2.2 Лучевая терапия.....	31
1.2.3 Радиочастотная абляция	32
1.2.4 Иммуноterapia	34
1.2.5 Фотодинамическая терапия.....	38
1.2.5.1 Поколения фотосенсибилизаторов	44
1.2.5.2 Направления в совершенствовании фотодинамической терапии	49
1.2.5.3 Критерии подбора FRET-пары.....	57
1.3 Химический дизайн димерных наночастиц	60
1.3.1 Структура типа «ядро-оболочка»	61
1.3.2 Структура типа «гантель» (наночастицы Януса).....	66
1.3.2.1 Полимерные наночастицы Януса	67
1.3.2.2 Неорганические наночастицы Януса	69

1.3.2.3	Полимерно-неорганические наночастицы Януса	71
1.4	Преимущества димерных наночастиц для доставки лекарств. 74	
1.4.1	Пассивная доставка лекарств на основе димерных наночастиц	76
1.4.1.1	Использование преимущества двух поверхностей димерных систем для доставки лекарств	76
1.4.1.2	EPR эффект	81
2	ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	84
2.1	Материалы.....	84
2.2	Методы исследования	85
2.2.1	Синтез и функционализация наночастиц.....	85
2.2.1.1	Синтез гибридных НЧ Fe_3O_4 -Au гантелевидной формы	85
2.2.1.2	Стабилизация магнитной поверхности НЧ Fe_3O_4 -Au ДФУК (НЧ/ДФУК)	86
2.2.1.3	Модификация ПЭГ (НЧ/ДФУК/ПЭГ)	87
2.2.1.4	Ковалентная конъюгация фотосенсибилизатора (НЧ/ФС)	88
2.2.1.5	Ковалентная конъюгация флуорофора (НЧ/ФФ)	90
2.2.1.6	Синтез системы НЧ/ФС/ФФ.....	91
2.2.1.7	Синтез смеси конъюгатов НЧ/ФС + НЧ/ФФ	92
2.2.2	Характеристика физических и химических свойств наночастиц	92
2.2.3	Характеристика FRET пары хромофоров	95
3	ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	105
3.1	Характеристика НЧ, НЧ/ДФУК, НЧ/ДФУК/ПЭГ	105
3.2	Иммобилизация хромофоров на поверхности наночастиц	114

3.3	Исследование цитотоксичности, фототоксичности и интернализации систем клеточной линией СТ26.....	124
3.4	Флуоресцентная диагностика, исследование биораспределения систем	128
3.5	Исследование фотоиндуцированной противоопухолевой эффективности <i>in vivo</i>	140
4	ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.....	146
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	148

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ФДТ – фотодинамическая терапия

АФК – активные формы кислорода

ФД – флуоресцентная диагностика

НЧ – наночастицы

FRET – Фёрстеровский безызлучательный перенос энергии

EPR эффект – эффект повышенной проницаемости и удержания

КТ – компьютерная томография

РЭС – ретикулоэндотелиальная система

ЛТ – лучевая терапия

ПАВ – поверхностно активные вещества

ДФУК – 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

АЭС – атомно-эмиссионная спектроскопия

РФА – рентгенофазовый анализ

ДРС – динамическое рассеяние света

МРТ – магнитно-резонансная томография

ДМСО – диметилсульфоксид

ФС – ^{13}C аминоксиды бактериохлорина e_6

ФФ – сульфо - Су5

МАО – макрофаги, ассоциированные с опухолью

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. 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 заболеваний [1]. 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, химиотерапией [2]. 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 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 терапии [3–6].

Степень разработанности темы

В настоящее время в научных литературных данных представлено большое количество работ, посвященных иммобилизации фотосенсибилизаторов различной природы на поверхность наночастиц для создания тераностиков [7]. 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 ФДТ [8]. Фотосенсибилизаторы, которые находятся на финальных стадиях клинических испытаний или были одобрены для противоракового ФДТ, включают хлорины, бактериохлорины, бензопорфирины, фталоцианины, профилактические вещества и гиперидины. 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 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 НЧ/ФС+НЧ/ФФ.

Объект исследования. Объектами исследования служили димерные наночастицы магнетит-золото вида «гантель», стабилизированныеДФУК 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 Fe₃O₄-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, спектрофлуорометрия, магнитометрия, ДРС, 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 (более 30%) 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.

1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Проблемы терапии онкологических заболеваний

В современном мире одним из ключевых заболеваний, ведущих к летальному исходу и влияющих на рост смертности населения, является онкология. Эта проблема требует новых стратегий, которые позволят обеспечить более раннее обнаружение (диагностика) и лучшую стратификацию опухолей для подбора эффективной терапии. Эффективность лечения (терапии) напрямую зависит от раннего выявления (диагностики) злокачественных опухолей, поскольку это позволяет обнаружить болезнь на ранних стадиях, выбрать адекватное лечение и повысить вероятность выздоровления. В связи с этим, перспективным направлением становится разработка и внедрение инновационных методов ранней диагностики рака. Также существует ряд проблем, связанных и с терапевтическими методами, формирующих потребность в разработке инновационных подходов терапии. Низкая специфичность и высокая токсичность лекарств (химиотерапия), формирование лекарственной толерантности, высокая инвазивность методов (хирургические вмешательства) и устойчивость к излучению (при радиотерапии) – все это сильно уменьшает эффективность лечения. Более того, во многом физиология опухолевых клеток (тканей) имеет схожесть, что также усложняет задачу при подборе или разработке новых подходов терапии рака.

За последние десять лет в медицине, особенно в биомедицинских исследованиях, появилось новое понятие – тераностика. Это дисциплина, сочетающая в себе диагностику и персонализированное лечение с целью повышения эффективности и безопасности терапии [9]. Тераностика основана на интеграции научных достижений в таких областях, как изучение молекулярных механизмов заболеваний, совершенствование методов

визуализации и диагностики биологических объектов, а также технологии разработки новых наноматериалов.

При разработке новых лекарств тераностического подхода необходимо учитывать множество факторов, а также поведенческих механизмов опухолевых клеток (тканей). Чтобы достичь большей эффективности с помощью современных методов лечения, исследователи пытаются использовать различия между нормальными и злокачественными клетками на клеточном и молекулярном уровне.

1.1.1 Сходства между здоровыми и опухолевыми клетками (тканями)

За последние десятилетия уровень выживаемости при раке увеличился благодаря персонализированной терапии, открытию целевых терапевтических средств и новых биологических агентов, а также применению паллиативных методов лечения. Несмотря на эти достижения, устойчивость опухоли к химиотерапии и облучению и быстрое прогрессирование метастатического заболевания все еще наблюдаются у пациентов. Это обуславливается тем, что раковые стволовые клетки (CSC), имеют много общих характеристик со здоровыми соматическими стволовыми клетками (SSC). Наиболее важными свойствами CSC является их способность к самообновлению и к дифференциации в гетерогенные популяции раковых клеток. Хотя CSC составляют лишь небольшой процент от общей массы опухоли, эти клетки могут самостоятельно повторно вырастить опухолевую массу.

CSC также называются клетками, иницирующими опухоль, поскольку они обладают несколькими важными свойствами SSC: самообновлением, неограниченным потенциалом пролиферации, медленной репликацией, устойчивостью к лекарствам и способностью дифференцироваться, давая начало дочерним клеткам, которые составляют основную массу опухоли. Первоначально идентифицированные при лейкемии, CSC впоследствии были

обнаружены при раке молочной железы, толстой кишки, поджелудочной железы и мозга. Общие генетические и фенотипические особенности были обнаружены как в SSC, так и в CSC.

Одной из основных проблем в неудачах лечения рака является наличие раковых стволовых клеток (CSC) — они считаются ответственными за устойчивость к лекарственной терапии и, как полагают, участвуют в инициации рака и метастазировании. Успешная терапия должна иметь минимальные побочные эффекты на нормальные соматические стволовые клетки (SSC). Понимание различий в происхождении, механизме самообновления и сигнальных путях CSC и SSC позволит лучше подходить к выбору этих конкретных популяций с целью защиты здоровых клеток и минимизации побочных эффектов.

Рак развивается путем накопления мутаций в генах, приводящих к дерегуляции сигнальных путей, которые иницируют приобретение самодостаточных сигналов роста, приводящих к нечувствительности к антиростовым сигналам, уклонению от апоптоза, неограниченному репликативному потенциалу, устойчивому ангиогенезу и способности проникать в окружающие ткани [10]. Метастатическая колонизация в основном осуществляется субпопуляцией раковых клеток, которые попадают в кровь, позволяя достигать отдаленных участков [11]

Хотя конкретное происхождение CSC все еще обсуждается, данные свидетельствуют о том, что они происходят из стволовых клеток, которые не смогли контролировать пролиферацию при аномальных обстоятельствах [12]. Еще одна из версий основана на возникновении CSC в результате слияния раковых клеток со взрослыми стволовыми клетками, за счет переноса генов между соматическими и раковыми клетками или мутаций в стволовых клетках [13] Кроме того, трансформация может происходить во время процесса регенерации ткани в ответ на воспаление, инфекцию, воздействие токсинов и/или метаболические процессы, которые могут вызывать мутации [14].

Когда клетки, инициирующие рак, получают первую мутацию, вызывающую рак, предполагается, что они отличаются от SSC; однако они демонстрируют несколько сходств, таких как низкие скорости пролиферации, высокая самообновление и устойчивость к химиотерапии и облучению [15]. В настоящее время не ясно, происходят ли CSC из клеток, инициирующих рак, или оба типа клеток имеют одинаковое происхождение. Однако, обе клетки поддерживают инициацию и распространение опухоли.

Например, внеклеточная везикулярная коммуникация между опухолевыми клетками и иммунными клетками может привести к снижению иммунного ответа на опухолевые клетки [16]. Также было доказано, что стволовые клетки соединительных тканей и CSC обладают одинаковыми иммунорегуляторными свойствами. Разница в том, что первые используют эти свойства при регенерации поврежденных тканей и иммуномодуляции, тогда как CSC используют это свойство, чтобы выжить в опухоли и избежать иммунного ответа [17].

Кажется интуитивно понятным, что как исходная клетка, так и характер приобретенных мутаций определяют судьбу опухоли и фенотип. Тесная связь между клеточной линией и фенотипом рака предполагает, что ограниченные линией механизмы, которые обычно действуют во время развития, могут способствовать возникновению опухолей. Исходная клетка часто может соответствовать нормальной стволовой клетке ткани, используя ее внутреннюю способность к самообновлению. Это может особенно относиться к тканям с очень высоким оборотом, таким как кишечник, поскольку клетки-предшественники могут не жить достаточно долго, чтобы приобрести полный набор мутаций, необходимых для злокачественности. Стволовая клетка или ранняя клетка-предшественник также проявились как вероятная клетка-источник при некоторых лейкомиях, глиобластомах и раке простаты.

1.1.2 Ключевые молекулярно-генетические причины низкой эффективности противоопухолевой терапии

1.1.2.1 Выключение проапоптотических путей в опухолевых клетках

Апоптоз — это физиологический процесс, жизненно важный для эмбрионального развития и поддержания гомеостаза в многоклеточных организмах, но он также участвует в широком спектре патологических процессов, включая рак. Апоптоз следует отличать от некроза, который также является формой клеточной смерти, но не является генетически запрограммированной функцией. Некроз клеток влияет на группы соседних клеток и вызывает воспалительную реакцию. Смерть клетки в результате некроза приводит к высвобождению молекул «сигнала тревоги», которые стимулируют несколько рецепторов для распознавания макрофагами, дендритными клетками и клетками-киллерами. Наличие некротических клеток в ткани часто интерпретируется иммунной системой как опасное и, следовательно, действует как сигнал для запуска иммунного ответа [18].

Апоптоз в клетках разделяется на два основных пути: внешний путь, активируемый сигналами проапоптотических рецепторов на клеточной поверхности, и внутренний путь, который включает нарушение целостности митохондриальной мембраны. Апоптоз, контролируемый и энергозависимый процесс, является наиболее описанной формой запрограммированной клеточной смерти. Его дерегуляция может привести к раку, аутоиммунным и дегенеративным заболеваниям, что объясняет растущий интерес к выяснению путей апоптоза для этиологии заболеваний и терапевтической модуляции. Наиболее важными характерными чертами апоптоза являются: фрагментация ДНК; расщепление белков в определенных местах; повышенная проницаемость митохондриальной мембраны, приводящая к высвобождению проапоптотических белков и последующему образованию апоптотических тел

и фагоцитоз апоптотических тел соседними клетками или макрофагами; блеббинг цитоплазматической мембраны (нерегулярная выпуклость в плазматической мембране клетки).

Внешний путь действует через рецепторы смерти на поверхности клетки, а внутренний путь, зависящий от митохондрий, активируется при потере сигналов факторов роста или в ответ на летальные стимулы изнутри клетки. Оба пути взаимосвязаны с другими сигнальными белками, такими как NK-кВ и p53-MDM2, и сходятся на уровне эффекторных протеолитических ферментов, называемых каспазами. Каспазы подразделяются, в зависимости от их активности, на провоспалительные (каспазы 1, 4, 5, 11, 12, 13 и 14) и проапоптотические каспазы. Последние группируются как инициаторные каспазы (2, 8, 9, 10) и эффекторные каспазы (3, 6, 7). Каспазы модулируются несколькими эндогенными клеточными факторами, включая белки-ингибиторы апоптоза (IAP).

Внешний путь инициируется стимуляцией трансмембранных рецепторов смерти специфическими лигандами, высвобождаемыми другими клетками. Рецепторы смерти могут принадлежать к семейству факторов некроза опухоли (TNF), которое состоит из многих членов. Члены семейства рецепторов TNF имеют богатый цистеином внеклеточный субдомен, который позволяет им специфически распознавать свои лиганды, и цитоплазматический домен из примерно 80 аминокислот, называемый «доменом смерти» (DD), который играет решающую роль в передаче сигнала смерти с поверхности клетки на межклеточные пути.

Внутренний путь, включающий митохондрии, обычно активируется при потере сигналов факторов роста или в ответ на летальные стимулы изнутри клетки, такие как повреждение ДНК, окислительный стресс, гипоксия или химиотерапевтические препараты.

Ген p53 — это известный ген-супрессор опухолей, который кодирует ядерный белок, играющий решающую роль в регуляции клеточной смерти. В ответ на различные клеточные стрессы p53 останавливает прогрессирование

клеточного цикла посредством экспрессии своего целевого гена p21. Когда клетка не может восстановить клеточные повреждения, p53 способствует апоптозу. Известно, что p53 использует несколько путей для индукции клеточной смерти [19]. Хорошо известно, что p53 трансативирует различные факторы апоптоза, а также может транслоцироваться в митохондрии, где он связывается с антиапоптотическими белками. Кроме того, p53 может стимулировать выработку активных форм кислорода для перераспределения на поверхность клетки. Поэтому, когда p53 ингибируется, пролиферация клеток ускоряется. Отмечается, что функция p53 нарушена при большинстве видов рака у человека.

1.1.2.2 Иммуносупрессивное окружение опухоли

Взаимодействие между раковыми клетками и иммунными клетками хозяина в опухолевой микросреде создает иммуносупрессивную сеть, которая способствует росту опухоли, защищает опухоль от иммунной атаки и ослабляет эффективность иммунотерапевтических подходов. Развитие иммунной толерантности становится преобладающим в иммунной системе пациентов с опухолями. Было описано несколько механизмов, с помощью которых опухоли могут подавлять иммунную систему, включая секрецию цитокинов, изменения в антигенпрезентирующих клеточных субпопуляциях, изменения костимулирующих и коингибиторных молекул и измененные соотношения Тreg клеток к эффекторным Т-клеткам. Показано, что эти механизмы иммуносупрессии могут ухудшать иммунные реакции, специфичные для опухоли. Однако не установлено, может ли эта иммуносупрессивная среда влиять на иммунные реакции на неопухолевые антигены, особенно в отношении развития памяти [20].

Одним из важнейших преимуществ такого микроокружения для опухолевых клеток является иммуносупрессивная среда, имеющая высокое содержание регуляторных клеток и Т-клеток, которые играют центральную

роль в установлении и поддержании иммунологической аутоотолерантности и гомеостаза. Молекула CTLA-4, экспрессируемая регуляторными Т-клетками, предотвращает созревание антигенпрезентирующих клеток, что приводит к подавлению активации Т-клеток. Ингибирующие цитокины и аденозин, продуцируемые регуляторными Т-клетками, также отвечают за их подавляющие функции. Действительно, высокая инфильтрация регуляторных Т-клеток наблюдается во многих опухолевых тканях и связана с плохими клиническими исходами. Регуляторные Т-клетки привлекаются в опухоли через хемокины, секретируемые опухолевыми клетками и иммунными клетками, и далее размножаются в микросреде опухоли. Недавно было показано, что метаболизм опухолевых клеток и инфильтрированных иммунных клеток в опухолевой микросреде также является важным компонентом иммуносупрессивной среды опухоли. Эффекторные Т-клетки используют гликолиз для своей пролиферации и эффекторной функции, тогда как регуляторные Т-клетки в основном используют окислительное фосфорилирование для подавляющей функции. В опухолевой микросреде опухолевые клетки поглощают и используют большое количество глюкозы и глутамина, а концентрация этих питательных веществ намного ниже, чем в нормальных тканях или периферической крови. В условиях низкого уровня глюкозы эффекторные Т-клетки не могут управлять гликолизом для своего выживания и эффекторной функции. Хотя дефицит глутамина вызывает ингибирование пролиферации Т-клеток и продукции цитокинов, это благоприятно для регуляторных Т-клеток. Высокое потребление глюкозы посредством гликолиза опухолевыми клетками приводит к накоплению лактата в микросреде опухоли, что приводит к подавлению пролиферации и функции эффекторных Т-клеток. Кроме того, известно, что аденозин, вырабатываемый опухолевыми клетками и регуляторными Т-клетками, нарушает функцию эффекторных Т-клеток. В совокупности различные факторы микросреды опухоли, включая метаболизм опухолевых клеток и инфильтрированных иммунных клеток, позволяют регуляторным Т-клеткам

инфильтрировать, пролиферировать и проявлять сильную подавляющую функцию, что приводит к дисфункции эффекторных Т-клеток [21].

Другими словами, создается дисбаланс в микросреде опухоли, включающий в себя изменения в подгруппах антигенпрезентирующих клеток, изменения костимулирующих и коингибиторных молекул, а также измененные соотношения эффекторных Т-клеток и регуляторных Т-клеток [22].

В итоге, микроокружение опухоли, которое состоит из иммунных клеток, опухолевых клеток, стволовых клеток и внеклеточного матрикса, является главной «мишенью» во время неопластического процесса, способствуя пролиферации, выживанию и миграции опухолевых клеток. Опухоли не только могут выживать и распространяться, за счёт созданного иммуносупрессивного окружения, но, что более важно, они могут имитировать некоторые сигнальные пути иммунной системы для распространения условий, которые способствуют иммунной толерантности опухоли, ослабляя иммунотерапевтическую эффективность.

1.1.2.3 Множественная лекарственная устойчивость

Множественная лекарственная устойчивость рака описывает явление, при котором устойчивость к одному противораковому препарату сопровождается устойчивостью к препаратам, структуры и механизмы действия которых могут быть совершенно разными. Понимание поведения стволовых клеток опухоли будет определять общий ответ на терапию. По аналогии со стволовыми клетками нормальных тканей существует множество механизмов, включающих как внутренние клеточные свойства, так и факторы микроокружения, которые позволяют опухолевым стволовым клеткам противостоять потенциально генотоксичным агентам [23].

Существует две основные методологические проблемы в исследовании резистентности: раковые стволовые клетки в популяции опухоли не могут

быть легко идентифицированы напрямую, а также не могут быть адекватно изучены, когда они отделены от микроокружения среды клеток. Известны и изучены механизмы, с помощью которых опухолевые стволовые клетки проявляют множественную лекарственную устойчивость.

Механизмы множественной лекарственной устойчивости, препятствующие достижению лекарствами клеток-мишеней

Независимо от того, вводятся ли лекарства перорально, внутривенно, внутриартериально или другими путями, противораковые препараты должны диффундировать из кровотока в отдельные опухолевые стволовые клетки. Плотность сосудов опухоли, которая определяет среднее расстояние диффузии от кровоснабжения до отдельной опухолевой клетки, будет иметь большое влияние на время диффузии для некоторых препаратов и может способствовать множественной лекарственной устойчивости. Как и в случае с нормальным костным мозгом, имеются данные о том, что опухолевые стволовые клетки могут существовать в состоянии низкого содержания кислорода, что предполагает наличие перфузионного барьера, который может ограничивать скорость проникновения противораковых препаратов [24]. Гипоксия опухоли также может быть либо внутренней (связанной с сосудистой геометрией), либо прерывистой (связанной с временными изменениями в кровотоке опухоли), и оба эти состояния могут способствовать доступу и эффективности препарата. Диффузия препарата зависит не только от структуры и динамики опухоли, но и от свойств препарата, таких как молекулярная масса и степень связывания с белками. Альбумин — это распространенный связывающий белок, который отвечает за низкую свободную фракцию многих лекарств, а α -кислый гликопротеин, белок острой фазы, уровень которого обычно повышается у онкологических больных, также может оказывать существенное влияние на концентрацию свободных лекарств [25]. Свободная фракция лекарств может быть довольно низкой (<5%) для некоторых противораковых препаратов, особенно сложных органических молекул, и это повлияет на скорость внеклеточной диффузии [26].

Механизмы множественной лекарственной устойчивости, препятствующие достижению лекарственных препаратов целевых внутриклеточных концентраций

Лекарства перемещаются через раковую ткань не только путем внеклеточной диффузии, но и путем клеточного поглощения, причем быстрая трансклеточная диффузия повышает их способность достигать своей цели. Последний процесс контролируется несколькими процессами, такими как скорость прохождения между внеклеточной жидкостью и цитоплазмой, степенью связывания с макромолекулами внутри клетки, скоростью секвестрации во внутриклеточные везикулы и скоростью клеточного оттока. Некоторым противораковым препаратам требуются транспортеры для поглощения/оттока, и активность этого транспортера может, следовательно, регулировать эффективность доставки лекарств; примером является транспортер меди АТР7В в случае цисплатина, карбоплатина и оксалиплатина [27]. Транспортеры оттока лекарств семейства ABC, которые обычно находятся как на плазматической мембране, так и на мембранах клеточных везикул, обычно действуют, чтобы минимизировать цитоплазматические концентрации лекарств, способствуя оттоку из клетки или секвестрации в везикулы, тем самым снижая эффективность трансклеточной диффузии лекарств. Примером последнего процесса является секвестрация цисплатина в меланосомах клеток меланомы [28]. Внутриклеточное связывание белков и связывание ДНК также будут влиять на скорость трансклеточной диффузии, снижая цитоплазматическую свободную концентрацию лекарств.

Исследования с линиями опухолевых клеток выявили транспортные белки, действующие либо для содействия оттоку препарата из клетки, либо для его секвестрации в клеточных везикулах, которые позже устраняются экзоцитозом, как основной механизм множественной лекарственной устойчивости. Первым таким транспортным белком, который был идентифицирован, был Р-гликопротеин, мембранно-ассоциированный белок, обычно находящийся на плазматической мембране и способный, как и

альбумин, связываться с широким спектром малых молекул, особенно тех, которые содержат гидрофобные домены и положительно заряженные области [29]. Однако, в отличие от альбумина, Р-гликопротеин способен осуществлять АТФ-зависимое конформационное изменение, которое перемещает субстрат наружу клетки, где он высвобождается. Известно не менее 48 структурно связанных транспортеров, известных под общим названием семейство ABC, некоторые из них связаны с транспортом лекарств: имеют в составе Р-гликопротеин, транспортеры белков, ассоциированных с множественной лекарственной устойчивостью и мембранные белки (АТФ-связывающие кассетные транспортёры). Некоторые из этих транспортеров действуют непосредственно на лекарство, в то время как другие действуют на конъюгаты совместно с клеточными конъюгирующими ферментами, которые сначала связывают лекарство с глутатионом, глюкуронидом или сульфатом. Экспрессия мембранных белков была зарегистрирована в популяциях линий опухолевых клеток с некоторыми характеристиками стволовых клеток, что согласуется с гипотезой о том, что опухолевые стволовые клетки обычно экспрессируют эти белки оттока лекарств [30,31].

Механизмы множественной лекарственной устойчивости, включающие пути гибели клеток

Считается, что основным механизмом множественной лекарственной устойчивости раковых стволовых клеток является подавление путей, которые приводят к апоптозу или другим формам гибели клеток. Противораковые препараты обычно индуцируют стрессовые пути, такие как киназа p38 [32], или подавляют пути «выживания», такие как те, которые координируются PI3K (фосфатидил-3-фосфаткиназа) и ERK1 (внеклеточная регулируемая киназа-1) [33]. Модуляция этих путей влияет на баланс активности семейства белков bcl-2, которые, в свою очередь, контролируют стабильность внешней митохондриальной мембраны. Изменение баланса семейства Bcl-2 приводит к так называемому переходу проницаемости [34], при котором внешняя митохондриальная мембрана нарушается, и белки, которые обычно хранятся в

пространстве между внутренней и внешней митохондриальными мембранами, высвобождаются в цитоплазму. Эти белки включают в себя, в зависимости от клетки: цитохром С, эндонуклеазу G и апоптоз-индуцирующий фактор (AIF); и могут действовать различными способами, вызывая гибель клетки. Цитохром С хорошо известен своей способностью индуцировать каскад ферментов каспазы, которые превращают клетку в небольшие фрагменты, которые могут быть распознаны и поглощены близлежащими фагоцитами.

Существует множество примеров изменений в опухолевых клетках, которые снижают способность противораковых препаратов индуцировать пути клеточной смерти. Многие опухолевые клетки имеют либо мутировавший ген фосфоинозитид 3-киназы (PI3K), либо утратили ген PTEN, фосфатазы, которая регулирует активность антиапоптотических PI3K. Результирующая потеря регуляции PI3K, в свою очередь, приводит к повышению активности сигнальных путей АКТ и фосфорилированию Bad, члена семейства Bcl-2. Потеря нефосфорилированного Bad защищает митохондрии от перехода проницаемости и, таким образом, повышает устойчивость к клеточной смерти. Аналогично, активирующие мутации в генах RAS или RAF приводят к активации фермента ERK1, инактивации фосфорилированием Bid (семейство Bcl-2, предотвращает выход цитохрома С из митохондрий в цитоплазму и активацию каспазы 3), и защите митохондрий от перехода проницаемости. Фосфорилирование Bcl-2 может привести к резистентности опухолевых клеток [35]. Индуцированная сверхэкспрессия самого Bcl-2 также может обеспечить механизм резистентности [36].

Роль гетерогенности опухоли

Гетерогенность является важной особенностью, которая отличает популяции стволовых клеток опухоли от стволовых клеток в нормальной ткани. Если эта гетерогенность распространяется на экспрессию механизмов множественной лекарственной устойчивости, преодоление одной формы клеточно-опосредованной множественной лекарственной устойчивости может повлиять только на часть общей популяции стволовых клеток, оставляя

оставшуюся часть для повторного заселения микроокружения клеток. Существует ряд механизмов для возникновения такой гетерогенности; опухолевые клетки содержат ряд мутаций или эпигенетических изменений, которые приводят к дефектам как в их способности дифференцироваться, так и в их контроле пролиферации. Такие изменения влияют не только на вход в клеточный цикл, но и на репликацию centrosомы [37], а дефекты centrosомы приводят во время митоза к нестабильности хромосом, тетраплоидии и анеуплоидии. Другие механизмы, такие как нестабильность микросателлитов и дефектная репарация ДНК, также могут способствовать так называемому фенотипу мутатора, при котором опухолевые клетки могут развивать большое количество генетических изменений [38].

Таким образом, в то время как нормальные стволовые клетки диплоидны, гомогенны и обычно находятся в состоянии покоя, опухолевые стволовые клетки обычно анеуплоидны, гетерогенны и имеют значительную скорость пролиферации.

Механизмы множественной лекарственной устойчивости являются сложными, и разработка стратегий борьбы множественной лекарственной устойчивостью требует значительных дальнейших исследований и большего понимания.

1.2 Подходы и проблемы в противоопухолевой терапии

Рак — это неконтролируемый рост и развитие клеток в организме, и это одна из основных причин смерти во всем мире. Существует более ста различных типов рака, которые классифицируются на основе пораженной ткани или органа человеческого тела. Рак, многофакторное заболевание, включает в себя разнообразные изменения в геноме из-за взаимодействия с окружающей средой человека. Отличительными чертами рака являются неконтролируемая репликация, неспособность реагировать на сигналы роста,

что приводит к остановке деления клеток, непрерывный ангиогенез, устойчивость к апоптозу и способность проникать в другие ткани.

В настоящее время существует множество методов и подходов противоопухолевой терапии как традиционных: хирургия, лучевая терапия, химиотерапия, радиотерапия; так и относительно новых, прогрессивных: фотодинамическая терапия, гормональная терапия, иммунотерапия, клеточная (CAR-T) и другие. Выбор наилучшего подхода противоопухолевой терапии зависит от различных факторов, таких как тип злокачественных новообразований, стадии роста, возраст, частота лечения, дозировка лекарств и состояние здоровья пациентов. Так как у каждого из методов существуют ограничения, а также минусы и плюсы.

1.2.1 Химиотерапия

Химиотерапия рака относится к введению цитотоксических агентов с целью, в некоторых случаях, редуцировать опухоль или, по крайней мере, уменьшить опухолевую нагрузку и, таким образом, уменьшить симптомы, связанные с опухолью, и, возможно, продлить жизнь. Химиотерапия в первую очередь работает, предотвращая дальнейший рост и деление раковых клеток. Раковые клетки обычно делятся и растут гораздо быстрее, чем нормальные клетки, и физиологически обладают очень высоким эндогенным стрессом. Поэтому препараты могут уничтожать их быстро и более эффективно по сравнению с другими окружающими клетками. Цитотоксические препараты в основном вводятся внутривенным путем. Однако пероральное введение является альтернативным для некоторых препаратов. В случае опухолей, ограниченных анатомической областью, цитотоксические препараты иногда вводятся только в область опухоли, например, в брюшную полость, спинномозговую жидкость или через кровеносные сосуды в конечность. Таким образом, используемая доза может быть выше, тем самым увеличивается шанс на достижение лучшего противоопухолевого эффекта.

Цитотоксические препараты в основном назначаются в определенных комбинациях из двух или более препаратов с целью повышения возможности преодоления резистентности опухолевых клеток, обеспечения активности против различных «клонов» опухолевых клеток и избегания выраженной токсичности со стороны нормальных тканей [39].

При химиотерапии злокачественных опухолей часто наблюдается отсутствие значительного противоопухолевого эффекта. Некоторые опухоли, например рак легких, почек и ЖКТ, изначально устойчивы к цитотоксическим препаратам. Другие, как рак груди или яичников, могут на время реагировать, но позднее проявляют устойчивость. Лекарственная устойчивость может быть связана с механизмами на клеточном уровне, повышенным метаболизмом препаратов, плохой васкуляризацией опухолей или клеточной кинетической резистентностью. Главным фактором неудачи лечения является отсутствие чувствительности опухолевых клеток к препарату. Различные механизмы в раковых клетках становятся устойчивыми к одному или нескольким химиотерапевтическим препаратам, известны как множественная лекарственная устойчивость (МЛУ), которая препятствует эффективности химиотерапии. Потенциальные факторы МЛУ включают усиленную детоксикацию лекарств, сниженное поглощение лекарств, повышенные уровни внутриклеточных нуклеофилов, усиленное восстановление вызванных лекарствами повреждений ДНК, повышенную экспрессию переносчика лекарств, такого как Р-гликопротеин, белки, ассоциированные с множественной лекарственной устойчивостью (MRP1, MRP2).

В настоящее время наноструктуры, такие как полимерные/твердые липидные/неорганические/металлические НЧ, квантовые точки, дендримеры, липосомы, мицеллы, стали инновационными, эффективными и многообещающими платформами для лечения раковых клеток, устойчивых к лекарствам.

Наноносители обладают потенциалом для улучшения терапевтического индекса препарата: способности к многофункциональности; сведению к

минимуму высокой токсичности, опосредованной лекарствами, на другие соседние ткани и органы (селективное нацеливание на опухолевые клетки, раковые стволовые клетки, клетки, инициирующие опухоль, или микроокружение рака).

Селективное нацеливание наноносителей на опухоль преодолевает побочные эффекты, ограничивающие дозу, отсутствие селективности, токсичность тканей, ограниченный доступ препарата к опухолевым тканям, высокие дозы препарата и возникновение МЛУ при обычной или комбинированной химиотерапии.

1.2.2 Лучевая терапия

Лучевая терапия является основным методом лечения рака более ста лет. Также называемая радиотерапией, эта методика использует излучение для повреждения клеток опухоли, что приводит к их прекращению в росте и делении. Примерно две трети всех больных раком получают ЛТ как основное лечение или в составе комплексной терапии. Революция в ЛТ началась в 1970-х годах с появлением трехмерных технологий, таких как компьютерная томография (КТ). Одним из значительных преимуществ ионных пучков является их высокая управляемость, что делает их идеальным инструментом для лечения рака и сложных доброкачественных заболеваний.

Основой лучевой терапии является эффект гибели клеток под воздействием радиации. Взаимодействие радиации с клетками приводит к двум уровням повреждений — молекулярному и клеточному. Молекулярное повреждение радиацией проявляется в виде разрывов двух цепей ДНК в ядре клетки [40]. К клеточному повреждению относятся такие явления, как ингибирование деления клеток, хромосомные aberrации, генетические мутации и смерть клеток. Нормальные клетки обладают лучшими механизмами восстановления после радиационного воздействия, чем опухолевые клетки. Гибель клеток, вызванная радиацией, объясняется через

концепцию доли выживания, которая представляет собой логарифмическую кривую зависимости выживаемости клеток от дозы облучения.

ЛТ строится на пяти принципах радиобиологии, известных как 5 R: восстановление, перераспределение, репопуляция, реоксигенация и радиочувствительность. ЛТ значительно изменяет иммунный ландшафт у пациентов с онкологическими заболеваниями, влияя на иммунную активацию и иммуносупрессивные механизмы. Доза и количество фракций лучевой терапии оказывают заметное влияние на эту иммунную регуляцию. В связи с этим активация иммунного ответа после облучения может стать основанием для добавления 6-го принципа радиобиологии — «реактивации противоопухолевого иммунного ответа» [41].

Изначально лучевая терапия использовала гамма- и рентгеновское излучение, но с развитием технологий предпочтение отдается корпускулярному излучению, включая электроны, протоны, карбоионы и нейтроны, поскольку они имеют уникальные преимущества. Современные конформные методы излучения обеспечивают меньшую токсичность по сравнению с предыдущими методами, при этом лечение становится более эффективным и безопасным. Визуально контролируемая лучевая терапия (IGRT) значительно повысила точность и эффективность современных методов лечения.

1.2.3 Радиочастотная абляция

Метод радиочастотной абляции (РЧА) все чаще используются для минимально инвазивного лечения местных неоперабельных опухолей. РЧА является безопасной для абляции мягких тканей, неоперабельных опухолей печени и болезненных литических метастазов костей. РЧА успешно применялась для лечения злокачественных новообразований почек, печени, груди, костей и легких.

В этом подходе используют переменный радиочастотный ток (460-480 кГц) для генерации фрикционного тепла и индукции коагуляционного некроза внутри и вокруг твердых опухолей. Эта форма гибели клеток сопровождается высвобождением воспалительных цитокинов и «сигналов опасности», которые могут запустить и/или усилить уже существующий противоопухолевый иммунитет [42].

Доклинические и клинические данные свидетельствуют о том, что некроз, вызванный РЧА, является источником опухолевых антигенов, которые могут использоваться иммунной системой хозяина для выработки противоопухолевого иммунитета. Однако иммунные реакции, вызванные только РЧА, недостаточны для морфологически видимых ответов или системного контроля опухоли. Более того, давно продемонстрировано, что чувствительность к радиационному повреждению клеток и тканей зависит от присутствия кислорода во время облучения [43]. Гистологические исследования аденокарциномы легких человека выявили механизм, с помощью которого клетки могут быть гипоксическими в опухолях. Из-за своего неограниченного роста опухолевые клетки будут вытесняться из сосудов за пределы эффективного расстояния диффузии кислорода в ткани, тем самым становясь гипоксическими и в конечном итоге некротическими [44]. Таким образом, гипоксия опухоли является важным фактором, приводящим к резистентности к радиотерапии и к химиотерапии (из-за более низкой пролиферации и более низких концентраций лекарств в гипоксических клетках).

Также к общим недостаткам относятся неполная абляция [45], рецидив заболевания и ограниченность применения метода РЧА: если аблированная опухоль находится вблизи крупных кровеносных сосудов, при множественных опухолях и наличии большого количества метастазов.

1.2.4 Иммуноterapia

В отличие от традиционных методов лечения рака, таких как радиотерапия и химиотерапия, иммуноterapia является инновационным методом лечения, который динамически модулирует иммунную систему для атаки раковых клеток в нескольких целях и направлениях, продлевая выживаемость без прогрессирования и общую выживаемость [46]. Иммуноterapia в основном используется для укрепления иммунной системы путем регулирования иммунного микроокружения, чтобы иммунные клетки могли атаковать и уничтожать опухолевые клетки в нескольких важных узлах [47]. В сочетании с традиционной противоопухолевой терапией или множественными ингибиторами иммунных контрольных точек большинство эффектов будут значительно усилены. Существует несколько подходов, используемых в иммунотерапии.

Вакцины на основе антигенпрезентирующих дендритных клеток

Дендритные клетки (ДК) были первоначально идентифицированы как антигенпрезентирующие клетки, полученные из костного мозга, являющиеся единственными клетками иммунной системы, способными активировать Т-клетки [48]. Последующие исследования показали, что ДК прямо влияют на качество ответа Т-клеток, вызывая поляризацию, или в некоторых случаях вызывая анергию Т-клеток или образование регуляторных Т-клеток. В отличие от других антигенпрезентирующих клеток, таких как макрофаги или В-клетки, ДК демонстрируют лучшую способность к стимулированию ответов Т-клеток как в антигенспецифических системах, так и в поликлональных экспериментах, таких как реакция смешанных лимфоцитов [49,50]. Известно, что в периферических тканях (вне лимфатических узлов) ДК захватывают антигены посредством нескольких дополнительных механизмов, включая фагоцитоз и рецептор-опосредованный эндоцитоз. Известно, что незрелые ДК обладают высокой степенью фагоцитарной активности и низким уровнем антигенпрезентирующей активности. Известен передовой препарат на основе

ДК - Provenge (sipuleucel-T), который одобрен FDA для лечения резистентного к андрогенам рака предстательной железы [50,51].

Адоптивная иммунотерапия

1. Использование лимфокин-активированных клеток-киллеров

Первоначальные исследования концепции аутологичной иммунотерапии были инициированы работой 1980-х годов, в которой изначально определили с помощью мышиных и *ex vivo* человеческих систем. Активируя лимфоциты IL-2 *in vitro* происходит проявление цитотоксических свойств обусловленных лимфокин-активированными клетками-киллерами, за счет которых можно добиться разрушения опухолевых клеток (лизис опухолевых клеток-мишеней), не затронув здоровые и без необходимости предварительной иммунизации [52]. Однако, при этом были зафиксированы побочные шокоподобные симптомы, задержка жидкости, что исчезало после прекращения введения IL-2 [53].

2. Использование инфильтрирующих опухоль лимфоцитов

В стремлении оптимизировать процесс *ex vivo* активации иммунных клеток, были исследованы культивированные *in vitro* опухолевые инфильтрирующие лимфоциты от животных с различными моделями опухолей. Было показано, что опухолевые инфильтрирующие лимфоциты, размноженные в IL-2 у мышей, имеющих микрометастазы из различных типов опухолей, в 50-100 раз более эффективны в своей терапевтической активности, чем лимфокин-активированные клетки-киллеры [54]. Концептуально это может быть связано с различными клеточными механизмами между терапиями. Потому что инфильтрирующие лимфоциты в первую очередь являются антигенспецифическими лимфоцитами, которые в основном состоят из расширенных клонов Т-клеток. Напротив, лимфокин-активированные клетки-киллеры являются клетками, обладающими спонтанной цитотоксичностью и, по-видимому, в основном имеют фенотип естественных клеток-киллеров. Так как последние обладают ограниченной экспансивной активностью, тогда как Т-клетки могут мощно экспансивно расширяться,

различия между двумя подходами объясняется тем, что один подход действует через адаптивную иммунную систему, тогда как другой действует через врожденную иммунную систему.

3. Инфузия донорских лимфоцитов

При лечении пациентов с рецидивом трансплантации костного мозга было сообщено, что использование инфузии донорских лимфоцитов вызывает эффективную регрессию лейкемии [55].

4. Клеточная иммунотерапия с использованием химерных антигенных рецепторов Т-клетки (CAR-T)

CAR-T относится к химерной антигенной рецепторной Т-клеточной иммунотерапии, которая является эффективной адаптивной клеточной терапией. Принцип метода основан на извлечении Т-клеток из организма пациента с помощью процедуры снижения лейкоцитов и трансформации в поверхностные CAR-T с помощью генной инженерии, с последующим переносом в опухоль пациентов для достижения специфического уничтожения опухоли [56]. Проблема с этим подходом заключается в том, что рецепторы Т-клетки ограничены человеческими лейкоцитарными антигенами, поэтому специфические рецепторы Т-клетки должны быть созданы для специфических гаплотипов пациентов, и, кроме того, во многих ситуациях опухолевые клетки не имеют или снижают экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов [57,58]. Решением является использование химерных антигенных рецепторов (CAR) Т-клеток. Этот подход был первоначально изобретен в 1980-х годах путем слияния антигенсвязывающего домена антител с сигнальным доменом рецептора Т-клетки [59]. Благодаря этому процессу активация Т-клеток больше не зависит от экспрессии антигена опухолью. Кроме того, он позволяет осуществлять опосредованное Т-клетками нацеливание на эпитопы В-клеток, это важно, поскольку многие опухолевые антигены находятся на поверхности и не вызывают человеческих лейкоцитарных антигенов, таких как углеводы [60], ганглиозиды [61], протеогликаны [62] и сильно гликозилированные белки [63].

Структура CAR включает эктодомен с областью связывания лиганда, спейсер, за которым следует трансмембранная область, соединенная с эндодоменом, ответственным за внутриклеточную сигнализацию. В отличие от физиологических рецепторов Т-клетки, CAR способны распознавать и связывать необработанные антигены независимо от экспрессии с главным комплексом гистосовместимости. Опухолевые клетки способны подавлять экспрессию человеческих лейкоцитарных антигенов и протеасомную обработку антигенов как механизм иммунного уклонения. Таким образом, CAR-T клетки могут эффективно преодолевать такие опухолевые механизмы для ухода от иммунитета хозяина [64].

Одно из первых клинических применений CAR-T-клеток было сообщено в 2011 году [65]. Одним из способов повышения практичности CAR-T была концепция использования аллогенного CAR-T. Были созданы вирусспецифический донорский CAR-T (VST) для лечения пациентов с хроническим лимфолейкозом, у которых произошел рецидив после трансплантации костного мозга [66].

Иммунотерапия рака является инновационным методом лечения опухолей на сегодняшний день. В ходе различных экспериментов и клинических исследований было обнаружено, что иммунотерапия имеет несравненные преимущества, за счет использования специфичности и способности памяти Т-клеток, разрабатываются новые средства селективного уничтожения опухолей и опухолевых стволовых клеток без побочных эффектов традиционных подходов. Однако иммунотерапия имеет очевидную сложность и неопределенность, так как может вызывать серьезные побочные реакции из-за сверхактивации иммунной системы. Более эффективные и менее побочные реакции иммунологических подходов все еще находятся в стадии дальнейшего изучения.

1.2.5 Фотодинамическая терапия

ФДТ — это стратегия лечения, при котором используется лекарство, называемое фотосенсибилизатором или фотосенсибилизирующим агентом, и световое излучение. Когда фотосенсибилизаторы подвергаются воздействию определенной длины волны света, они производят АФК, которые убивают близлежащие клетки. Каждый фотосенсибилизатор активируется светом определенной длины волны. Эта длина волны определяет, как далеко свет может проникать в тело. Таким образом, ученые используют специальные фотосенсибилизаторы и длины волн света для лечения различных областей тела с помощью ФДТ.

На первом этапе ФДТ для лечения рака в кровоток вводят фотосенсибилизирующий агент. Агент поглощается клетками по всему телу, но остается в раковых клетках дольше, чем в нормальных клетках. Приблизительно через 24-72 часа после инъекции, когда большая часть агента покинула нормальные клетки, но остается в раковых клетках, опухоль подвергается воздействию света. Фотосенсибилизатор в опухоли поглощает свет и вырабатывает активную форму кислорода, которая разрушает близлежащие раковые клетки посредством индукции апоптоза или некроза $^1\text{O}_2$, реже аутофагии. (Рис. 1).

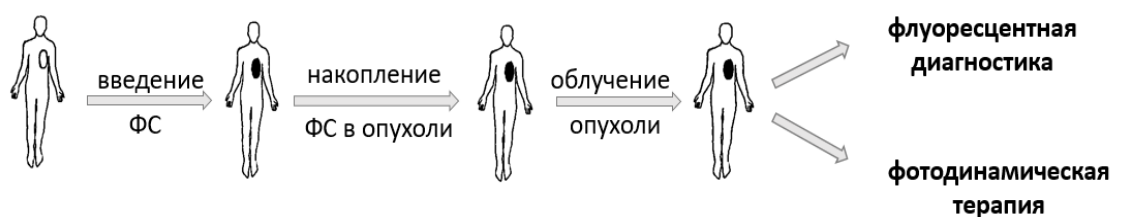


Рис. 1. Схема фотодинамической терапии (ФДТ)

В то время как традиционные методы лечения рака, такие как радиотерапия и химиотерапия, в основном вызывают иммунную супрессию, ФДТ способна вызывать воспаление, привлекая лейкоциты в целевую область, а также способствуя активации противоопухолевых Т-лимфоцитов. ФДТ

также уменьшает микрососудистую сеть опухоли; таким образом, приводя к лишению кислорода и питательных веществ в опухолевой ткани [67]. Все перечисленные механизмы, скорее всего, взаимосвязаны. Все или некоторые из этих механизмов оказываются важными в различных клинических условиях в зависимости от типа опухоли и фотосенсибилизатора. Опухолевые ткани содержат не только раковые клетки (паренхиму), но и строму [68]. Микроокружение опухоли состоит из различных образований, таких как иммунные клетки, фибробласты, сосудистые структуры, а также внеклеточный матрикс (были описаны в разделе 1.1.3). Большинство стромальных элементов функционируют для облегчения роста опухоли. ФДТ может влиять на большинство элементов опухолевой среды.

Воздействие на иммунную систему

Было показано, что ФДТ влияет на иммунные реакции [69]. Такие эффекты могут приводить к иммуностимуляции или иммуносупрессии. Традиционные методы лечения, такие как химиотерапия и радиотерапия, обычно вызывают иммуносупрессию. Опухолевая ткань, после воздействия ФДТ, может обеспечивать хемотаксис для иммунных клеток.

ФДТ может оказывать воздействие как на моноциты/макрофаги, так и на лимфоциты [70,71].

ФДТ способна вызывать острое воспаление в целевой ткани [72]. Такой воспалительный ответ можно считать важным для активации противоопухолевого иммунитета. В результате ФДТ наблюдалась экспрессия воспалительных цитокинов (например, интерлейкина ИЛ-6), хемокинов и молекул адгезии (например, Е-селектина и внутриклеточной молекулы адгезии ICAM-1), а также инфильтрация лейкоцитов (например, нейтрофилов) в целевую опухолевую ткань [73]. Фактически, было предложено, что подавление роста опухоли после ФДТ связано с наличием нейтрофилов. Кроме того, было высказано предположение, что нейтрофилы играют ключевую роль в успешной ФДТ *in vivo*.

Подводя итог, можно сказать, что активация воспаления имеет решающее значение с точки зрения индукции мощных иммунных ответов. Вклад иммунной системы в регрессию опухоли после ФДТ исследовался несколькими группами. Было показано, что Т-клетки необходимы для предотвращения повторного роста опухоли после ФДТ. Естественные клетки-киллеры также были вовлечены в этот ответ. ФДТ была способна вызывать защитный противоопухолевый иммунитет [74]. Исследование изучало эффекты фотоактивированных фталоцианинов на противоопухолевые иммунные ответы у иммуносупрессированных и нормальных мышей BALB/c с фибросаркомой. Результаты показали, что вызванный ФДТ специфический противоопухолевый иммунитет был важен [75].

В другом исследовании было продемонстрировано, что цитотоксические Т-клетки были основными иммунными эффекторными клетками, ответственными за лечебный результат ФДТ, в то время как хелперные Т-клетки играли вспомогательную роль. Они также сообщили об активации естественных клеток-киллеров в саркомах после ФДТ [76]. Такие исследования сильно подчеркивают важность иммунной системы с точки зрения эффективного клинического применения ФДТ.

Уничтожение опухолевых клеток

ФДТ способна устранять опухолевые клетки напрямую в некоторой степени, и такое устранение не достигается посредством единого механизма. ФДТ способна уменьшать количество клоногенных опухолевых клеток. Сообщалось, что до приблизительно 72% сокращения количества клоногенных клеток может быть достигнуто сразу после завершения светового облучения опухолей, обработанных фотосенсибилизатором. Кроме того, уничтожение опухолевых клеток, по-видимому, является кинетическим процессом, поскольку количество клоногенных клеток дополнительно уменьшалось в зависимости от времени после ФДТ. ФДТ напрямую вызывает смесь апоптоза и некроза на целевых опухолевых клетках [77,78].

Кроме того, также сообщалось, что ФДТ способна вызывать гибель раковых клеток путем аутофагии, которая является важным консервативным механизмом клеточной рециркуляции [78,79].

Давно известно, что несколько методов лечения рака, включая ФДТ, нацелены на апоптотические пути. ФДТ способна индуцировать различные пути апоптоза. Как внешние (опосредованные рецепторами смерти), так и внутренние (опосредованные митохондриями) пути связаны с апоптозом, опосредованным ФДТ. Типы фотосенсибилизаторов и раковых клеток влияют на тип апоптотического пути. ФДТ в основном запускает внутренний путь и активирует каспазу-3 или каспазу-7. Митохондрии играют ключевую роль во внутреннем пути, что приводит к апоптозу, зависимому от каспазы и независимому от нее при ФДТ. Следует также отметить, что ФДТ в первую очередь запускает зависимые от каспазы апоптотические пути [78]. Внутриклеточная локализация фотосенсибилизатора также влияет на эффективность индукции апоптоза при ФДТ. В соответствии с этим, фотосенсибилизаторы, локализующиеся в митохондриях, являются очень мощными индукторами апоптоза [77].

Одним из ранних событий, наблюдаемых при апоптозе, опосредованном ФДТ, является нарушение митохондриального трансмембранного потенциала за счет воздействия фотосенсибилизатора на внутреннюю проницаемость мембраны для протонов [80]. Несколько исследований предположили, что фотосенсибилизаторы, которые нацелены на митохондрии, могут вызывать эффективный апоптоз при ФДТ. Сообщалось, что механизмы, включая высвобождение цитохрома с, а также активацию каспаз, таких как каспаза-9 и каспаза-3, связаны с ФДТ [81]. В соответствии с такими выводами, роль каспазы-3 в апоптозе, опосредованном ФДТ, была изучена во многих исследованиях с различными фотосенсибилизаторами [82,83].

Подводя итог, очевидно, что ФДТ очень эффективна в запуске апоптоза. Тем не менее, ФДТ в настоящее время не полностью эффективна при терапии опухолей в клинических условиях. Было высказано предположение, что

эффективность ФДТ-опосредованного убийства опухолевых клеток снижается с увеличением расстояния клеток от сосудистого питания, а неоднородное распределение фотосенсибилизатора в опухолевой ткани может привести к критическим последствиям [84].

Повреждение сосудов

ФДТ может повредить сосудистые структуры опухолевой ткани. Было продемонстрировано, что лечение опухолей *in vivo* с помощью ФДТ уменьшило количество клоногенных опухолевых клеток за счет повреждения кровообращения в опухоли [85]. Снижение клоногенности опухоли через 4 ч после ФДТ очень напоминало таковое у опухоли, лишенной кислорода в течение того же периода времени, предполагая, что одним из важных факторов, способствующих разрушению опухоли, может быть повреждение сосудистой сети опухоли и последствия вызванных лечением изменений в физиологии опухоли. Опухолевые клетки в значительной степени зависят от питательных веществ и кислорода, поставляемых сосудистой сетью. Поэтому многие опухолевые клетки секретируют проангиогенные факторы, такие как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) [86].

Изменения клеточных сигнальных механизмов

Биологическая активность фотосенсибилизатора в клетке может варьироваться в зависимости от его типа, локализации в клетке, дозы, а также пути введения. Такие различия могут привести к изменениям в регуляции клеточных сигнальных механизмов. Следовательно, клетка может реагировать на ФДТ несколькими биологическими реакциями, такими как апоптоз, некроз или аутофагия. Соотношение Bax/Bcl-2 определяет судьбу клеток с точки зрения опосредованного ФДТ апоптоза. Когда проапоптотические белки, такие как Bax, активируются, а антиапоптотические белки, такие как Bcl-2, подавляются, каспазы, которые регулируют апоптоз в клетке активируются [75]. ФДТ может повышать уровни АФК в клетках, а также может изменять концентрацию Ca^{2+} . Известно, что незначительные изменения в концентрации Ca^{2+} способны регулировать и запускать апоптоз [87].

Некроз может характеризоваться отеком цитоплазмы, разрушением органелл, а также разрушением плазматической мембраны. Эти изменения могут вызывать высвобождение внутриклеточного содержимого и воспаление. Можно предположить, что высокая доза ФДТ (например, высокая концентрация фотосенсибилизатора и/или высокая плотность светового потока) может привести к гибели клеток путем некроза. Напротив, более низкие дозы ФДТ могут иметь предрасположенность к апоптотической гибели клеток [87]. ФДТ, вызвавшая менее 70% цитотоксичности, привела в основном к апоптозу; тогда как большинство клеток оказались некротическими при дозах, вызвавших 99% цитотоксичности [88].

Аутофагия (самопоедание) является важным клеточным механизмом, который участвует в удалении ненужных или дисфункциональных компонентов. Аутофагия позволяет перерабатывать клеточные компоненты. В раковых клетках аутофагия может способствовать росту клеток. Также было показано, что фотоповреждение может вызывать аутофагию. Поскольку ФДТ увеличивает уровни АФК, клеточный стресс увеличивается, и белок Beclin-1 индуцирует аутофагический механизм. Сообщалось, что ФДТ способна индуцировать аутофагию [89].

Несколько исследований показали, что аутофагия может демонстрировать подавляющие или стимулирующие эффекты опухоли в зависимости от типа фотосенсибилизатора, используемого при применении ФДТ, а также от типа клеток и света. Недавнее исследование с линиями клеток колоректальной карциномы HCT116 и SW480 предположило, что ФДТ с метатетрагидроксибензилхлорином (m-THPC) и вертепорфином (VP) активирует сигнальный путь АФК/JNK в клетках. Кроме того, вызванная ФДТ аутофагия опосредовала гибель клеток посредством активации сигнального пути АФК/JNK [90].

Существует достаточное количество причин использовать ФДТ вместо традиционных подходов терапии рака, эти причины включают низкий уровень системной токсичности при сохранении высокой селективности к опухоли,

относительную малоинвазивность подхода, возможность повторных циклов лечения, меньшее количество побочных эффектов и возможность сочетать ФДТ с другими вариантами лечения, такими как хирургия, лучевая терапия или химиотерапия. Так как при ФДТ используется фотосенсибилизатор, стоит поподробнее разобрать различные поколения фотосенсибилизаторов их достоинства и недостатки.

1.2.5.1 Поколения фотосенсибилизаторов

Фотосенсибилизаторы — это агенты, которые поглощают свет определенной длины волны и используют его энергию. Для синтеза АФК в фотодинамической терапии сочетание фотосенсибилизатора со светом и молекулярным кислородом вызывает гибель клеток, генерируя цитотоксические молекулы. За последние два десятилетия большое количество природных и синтетических красителей были испытаны *in vitro* и *in vivo* в качестве фотосенсибилизаторов в экспериментах с ФДТ [91–94]. Различные фотосенсибилизаторы вводятся внутривенно, перорально или местно и сохраняются 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.

Разработка фотосенсибилизатора с высокой эффективностью против рака позволила повысить эффективность ФДТ. Например, производное гематопорфирина Фотофрин - фотосенсибилизатор первого поколения, одобренный для лечения рака мочевого пузыря, молочной железы, легкого, пищевода, желудка, шейки матки и яичников [95,96]. Хотя фотофрин является наиболее широко используемым фотосенсибилизатором в клинической практике ФДТ, у него есть несколько недостатков [97,98]. Во-первых, он может удерживаться кожной тканью в течение 4–10 недель после приема, что

приводит к длительной светочувствительности кожи, которая требует от пациентов избегать света в течение значительного периода времени. Во-вторых, фотофрин активируется при длине волны, которая ниже оптимальной для эффективного проникновения в ткани. Кроме того, химический состав фотофрина плохо определен. Эти недостатки стимулировали поиск фотосенсибилизаторов нового поколения с превосходными характеристиками [99].

Идеальным фотосенсибилизатором был бы химически чистый препарат со специфическим поглощением тканями-мишенями, минимальной токсичностью в темноте (то есть активируется только при облучении), высокой фотоактивностью (высокий квантовый выход), быстрым клиренсом во избежание фототоксических побочных эффектов и сильным поглощением на относительно больших длинах волн (630–800 нм) [96,97,99]. На основе этих свойств был разработан ряд синтетических или природных фотосенсибилизаторов. Фотосенсибилизаторы, которые находятся на продвинутых стадиях клинических испытаний или были одобрены для противоракового ФДТ, включают хлорины, бактериохлорины, бензопорфирины, фталоцианины, профилактические вещества и гиперичины. Например, мета-тетра (гидроксифенил) хлорин (m-THPC) демонстрирует такие преимущества, как низкая светочувствительность кожи, высокий квантовый выход для синглетного кислорода и сильное поглощение при 652 нм. Он используется во многих странах для лечения рака легких, простаты, поджелудочной железы, кожи, головы и шеи. Свойства моно-1-аспартилхлорина е6 (NPe6) включают растворимость в воде, быстрый вывод из кровообращения, кратковременную фототоксичность для кожи и значительное поглощение при 664 нм. Это соединение тестируется в клинических испытаниях для лечения гепатоцеллюлярной карциномы [100,101]. Недавно был разработан еще один фотосенсибилизатор на основе хлорина, ДН-II-24 [102]. ДН-II-24 демонстрирует сильное поглощение при 666 нм, положительные цитотоксические эффекты, минимальную токсичность в

темноте и более короткий период полураспада в организме, но еще не в клинических испытаниях. Монокислотное кольцо производного бензопорфирина А (вертепорфин) быстро накапливается в опухоли, обладает низкой светочувствительностью кожи и демонстрирует значительное поглощение при 690 нм. Он успешно применяется для лечения неоваскуляризации роговицы [97,103]. Фталоцианиновый фотосенсибилизатор Рс4, который структурно связан с порфиринами, демонстрирует сильное поглощение при 675 нм, быстрый клиренс и высокий выход синглетного кислорода после ФДТ [104]. Фотосенсибилизатор Рс4 показал положительные эффекты в клиническом испытании I фазы для кожных новообразований. Гиперицин фотосенсибилизатор на основе порфирина представляет собой природный пигмент, полученный из растений зверобоя, обладающий способностью избирательно воздействовать на опухоли и минимальной токсичностью в темноте; однако до настоящего времени клинические испытания были безуспешными [105,106].

Непрерывная разработка новых фотосенсибилизаторов необходима для улучшения сайт-специфической доставки раковых клеток и терапевтической эффективности ФДТ, что, следовательно, расширяет спектр клинических применений. Недавно были разработаны целевые стратегии доставки для повышения селективности фотосенсибилизаторов к опухолям. В случае успеха эти усилия обеспечат ФДТ при раке с минимальным риском для здоровых тканей.

Если разобраться более глубоко в механизме работы ФДТ, то фотосенсибилизатор – это молекула, которая ответственна за преобразование энергии света в химическую энергию, взаимодействуя с другими молекулами, находясь в электрохимически активном состоянии. Возможны два типа реакции:

Тип I: возбужденный фотосенсибилизатор реагирует непосредственно с другими субстратами с образованием свободных радикалов;

Тип II: возбужденный фотосенсибилизатор передает энергию молекулярному кислороду, превращая его в синглетный кислород, который затем вызывает окисление клеточных макромолекул.

В реакциях типа I или типа II общий эффект представляет собой повреждение свободными радикалами, приводящее к гибели клеток. Реакции типа II считаются наиболее клинически значимыми. Хотя разрушение опухолевых клеток происходит непосредственно внутри опухоли, большая часть повреждения вызвана сосудистой сетью опухоли, что приводит к ишемии и гибели клеток. Провоспалительные клетки также привлекаются к опухоли и помогают в разрушении опухоли (Рис. 2).

Фотосенсибилизаторы активируются с использованием источника света, обычно лазера, который генерирует одну длину волны и поэтому будет работать только с одним фотосенсибилизатором. Лазерный свет можно доставлять через оптические волокна небольшого диаметра (~ 400 нм), что делает его пригодным для лечения висцеральных опухолей с помощью эндоскопии. Эти небольшие волокна также могут быть помещены непосредственно в опухоли для интерстициальной ФДТ (например, карциномы предстательной железы).

Кроме того, количество света, используемого для ФДТ, значительно меньше, чем у хирургических лазеров, а это означает, что ткани не подвергаются локальному нагреву и индукции белков теплового стресса. Понимание сложных перекрестных связей между этими путями может повысить эффективность ФДТ. Более того серьезным преимуществом метода является возможность проводить лечение амбулаторно, сохраняя трудоспособность работающих больных.

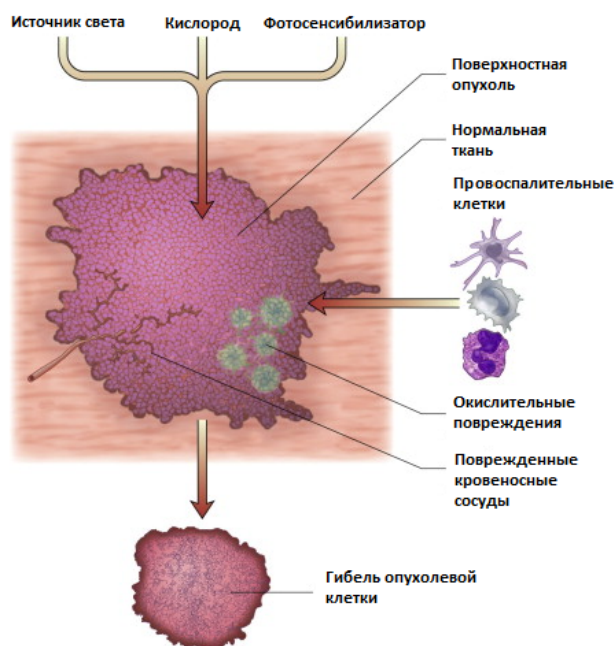


Рис. 2. Механизм уничтожения опухолевых клеток фотодинамической терапией

Однако, существуют и недостатки, характерные для почти всех фотосенсибилизаторов. Фотосенсибилизаторы обычно демонстрируют низкую растворимость и агрегацию в воде, что может привести к их фотодинамической неактивности в водных растворах. Эта проблема может препятствовать использованию фотосенсибилизаторов *in vivo* [107,108]. Большинство исследований сосредоточены на абсорбционных и эмиссионных свойствах фотосенсибилизаторов в растворах ДМСО [109]. Оптимальный фотосенсибилизатор должен демонстрировать высокий квантовый выход синглетного кислорода в водном растворе. Проблему нерастворимости фотосенсибилизаторов можно решить за счёт включения их в липосомы, НЧ или эмульсии, чтобы иметь возможность использовать их в водных растворах [110,111].

1.2.5.2 Направления в совершенствовании фотодинамической терапии

Хотя ФДТ может стать самостоятельным методом лечения и управления раком на разных стадиях, в настоящее время она используется только для лечения поверхностных и плоских поражений, поражений, доступных через эндоскопы, или в качестве хирургического вспомогательного средства и профилактического лечения дисплазий и первичных поражений. Поэтому одной из основных проблем является неспособность ФДТ лечить солидные, объемные опухоли или глубоко расположенные опухоли. Решением могут послужить разработка систем таргетной доставки в солидные опухоли (пассивная или активная). Еще одна из важных проблем — это отсутствие возможности отслеживания накопления фотосенсибилизатора в опухолевых тканях (время после введения фотосенсибилизатора для воздействия лазером в момент максимального накопления), что влечет за собой понижение эффективности ФДТ.

Использование носителей, например, таких как, НЧ, может решить не только перечисленные проблемы, но также и вопросы контроля экстравазации фотосенсибилизатора после введения. Так как было показано, что размер коллоидных носителей лекарственных средств определяет их переход из внутрисосудистого пространства во внесосудистое, а именно экстравазацию [112]. Таким образом, экстравазация фотосенсибилизатора может контролироваться размером НЧ, в которые включен фотосенсибилизатор. Эта стратегия может быть полезна для достижения пассивного нацеливания фотосенсибилизатора на раковые ткани. Экстравазация НЧ необходима для обогащения опухолевых тканей фотосенсибилизатором, тем самым увеличивая терапевтическую эффективность ФДТ. Опухолевые ткани характеризуются феноменом, известным как EPR эффект (описанный в главе 1.4.1.2). НЧ малого размера, способные пересекать фенестрации опухолевых капилляров, но достаточно большие, чтобы удерживаться в интерстициальном

пространстве, являются перспективной наноплатформой для пассивной доставки для ФДТ. Стратегия заключается в объединении противоопухолевых препаратов с коллоидными НЧ с целью преодоления неклеточных и клеточных механизмов резистентности и повышения селективности препаратов по отношению к раковым клеткам при одновременном снижении их токсичности по отношению к нормальным тканям. В дополнении, помимо доставки в солидные опухоли, НЧ также позволят решить вопрос отслеживания фармакокинетики фотосенсибилизатора для понимания времени максимального накопления для воздействия светом. Так как при использовании димерных НЧ (за счет наличия двух поверхностей) появляется возможность использования диагностического флуоресцентного агента для диагностических целей.

Способность светочувствительных молекул флуоресцировать применяется в методе ФД. Для фотосенсибилизатора способность генерировать синглетный кислород и флуоресцировать являются взаимоисключающими процессами, в связи с чем возникает необходимость использования второй светочувствительной молекулы – флуорофора, для флуоресцентной детекции. Известно, что сочетание фотосенсибилизатора и флуорофора в одной системе приводит к такому явлению как FRET, аббревиатура от английского Fluorescence Resonance Energy Transfer (резонансный перенос энергии флуоресценции), – безызлучательному переносу энергии по донорно-акцепторному механизму, возникающему между двумя хромофорами при непосредственной близости расположения молекул. Поэтому поиск решений для минимизации переноса энергии между фотосенсибилизатором и флуорофором по механизму FRET является актуальной темой для исследований. Так как при совмещении фотосенсибилизатора и флуорофора в одной системе решается важная проблема повышения эффективности метода ФДТ.

Флуорофоры

Флуорофор – это природное или синтетическое соединение (краситель), которое после облучения светом начинает испускать (флуоресцировать) характерное свечение. Флуоресцентные соединения на основе синтетических малых молекул являются мощными инструментами для визуализации биологических событий в живых клетках и организмах. С момента открытия органических флуоресцентных соединений в конце девятнадцатого века предпринимались попытки «увидеть» поведение определенных биомолекул в живых системах, используя эти красители в качестве меток. Кроме того, после разработки флуоресцентных индикаторов Ca^{2+} в 1980-х годах было сообщено и применено в биологических исследованиях множество флуоресцентных зондов или биосенсоров, которые определяются как молекулы, показывающие изменение свойств флуоресценции в присутствии их целевой молекулы. Сегодня доступно множество зондов, которые нацелены на ионы металлов, pH, активность ферментов и сигнальные молекулы. По химическому строению флуорофор представляют собой обычно ароматические и гетероциклические соединения с электронодонорными и/или электроноакцепторными заместителями [113].

Физическую природу флуоресценции удобно проиллюстрировать, пользуясь диаграммой Яблонского (Рис. 3). При поглощении фотонов света (10^{-15} с) в молекуле флуорофора наблюдается переход электронов из основного состояния S_0 на один из подуровней возбуждённого S_1 . В возбуждённом состоянии происходит быстрый процесс безызлучательной релаксации, так называемой колебательной релаксации (10^{-12} с), когда молекула теряет часть своей энергии и опускается до самого низкого подуровня возбуждённого состояния. Процесс флуоресценции происходит при возвращении молекулы с самого нижнего колебательного уровня S_1 в основное состояние S_0 спустя 10^{-8} - 10^{-6} с, при этом возникает излучение с большей длиной волны, чем возбуждающее излучение.



Рис. 3. Диаграмма Яблонского

К числу процессов, конкурирующих с флуоресценцией, относятся внутренняя конверсия, интеркомбинационная конверсия, а также фотохимические реакции, в которые может вступать молекула, находясь в синглетном возбужденном состоянии. В результате интеркомбинационной конверсии молекула переходит в триплетное состояние за 10^{-8} – 10^{-3} с. Внутренняя конверсия (10^{-12} – 10^{-9} с) представляет собой процесс, в ходе которого молекула переходит с низшего колебательного подуровня одного из более высоких электронно-возбужденных состояний на один из высоких колебательных подуровней основного состояния.

Фотофизические свойства

Одной из самых важных характеристик флуорофоров является квантовый выход флуоресценции (Φ_F), который представляет собой отношение числа испущенных и поглощенных фотонов или отношение константы скорости процесса флуоресценции к сумме констант скоростей всех процессов релаксации возбужденного состояния [114]:

$$\varphi_F = \frac{k_F}{k_F + k_{IC} + k_{ISC}},$$

где k_F – константа скорости флуоресценции; k_{IC} – константа скорости внутренней конверсии; k_{ISC} – константа скорости интеркомбинационной конверсии.

Поскольку процесс безызлучательной релаксации возбужденного состояния происходит одновременно с флуоресценцией, значение φ_F всегда будет меньше 1. Кроме того, возможны химические изменения флуоресцентного вещества, такие как фотообесцвечивание, что также приводит к снижению квантового выхода. Высокий квантовый выход означает более эффективное преобразование возбуждающего света в флуоресцентное излучение. Квантовый выход флуоресценции зависит от длины волны возбуждающего света, характеристик растворимого флуоресцентного вещества и растворителя, концентрации раствора, температуры и наличия примесей. Тем не менее, согласно закону С.И. Вавилова, квантовый выход остается постоянным и не зависит от длины волны возбуждающего света λ_{abc} , если она меньше длины волны флуоресценции λ_{fl} . При $\lambda_{abc} > \lambda_{fl}$ квантовый выход резко снижается [115].

Расстояние между длинами волн максимумов спектров поглощения и флуоресценции называется стоксовым смещением или Стоксовым сдвигом (Рис. 4). Этот сдвиг важен для понимания фотофизических свойств флуоресцентных веществ: небольшой Стоксов сдвиг указывает на схожесть электронной плотности в возбужденном и основном состояниях, в то время как большой сдвиг свидетельствует о значительной реорганизации и стабилизации хромофоров в возбужденном состоянии под воздействием внешних или внутренних факторов. Размер смещения может варьироваться от нескольких нанометров до сотен. Например, Стоксов сдвиг для флуоресцеина составляет около 20 нм, для хинина — 110 нм, а для порфиринов — более 200 нм [114].

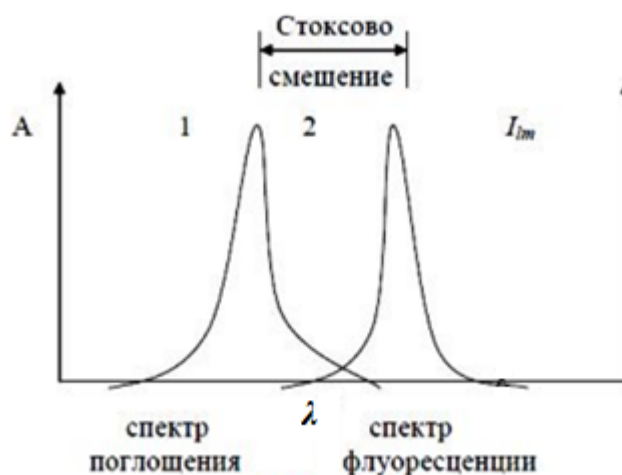


Рис. 4. Спектр поглощения (1) и спектр флуоресценции (2); A – светопоглощение, I_{lm} – интенсивность люминесценции, λ – длина волны

Интенсивность флуоресценции — это параметр, пропорциональный количеству фотонов, достигающих детектора за единицу времени. Она измеряется в фотонах в секунду (c_{ps} , counts per second) или в относительных единицах (A.U., произвольные единицы). Этот параметр зависит как от исследуемого образца, так и от используемого оборудования [115]. Наибольшую флуоресценцию можно получить, облучая вещество светом, длина волны которого близка к максимуму поглощения. Спектр флуоресценции, который показывает зависимость интенсивности от длины волны детекции при фиксированной длине волны возбуждения, демонстрирует, каким цветом флуоресцирует вещество.

Время, за которое флуоресцентное вещество теряет 50 % своей яркости, называется фотостабильностью. «Идеальное» флуоресцентное вещество должно обладать высоким квантовым выходом и хорошей фотостабильностью. Эффективность поглощения света описывается молярным коэффициентом экстинкции, который определяется как оптическая плотность одномолярного раствора при толщине светопоглощающего слоя в 1 см. Этот коэффициент зависит от природы вещества и длины волны проходящего света. Данный параметр определяется законом Бугера-Ламберта-Бера:

$$A = \varepsilon(\lambda)lc,$$

где A – поглощение как функция молярного коэффициента экстинкции $\varepsilon(\lambda)$;

l – длина кюветы в см;

c – концентрация хромофора в моль/л.

Еще одним важным параметром является время жизни возбужденного состояния или время затухания флуоресценции. Оно зависит от констант скоростей излучательной и безызлучательной релаксации возбужденного состояния.

$$\tau = 1 / (k_F + k_{IC} + k_{ISC})$$

Тушение флуоресценции обозначает процессы, которые приводят к снижению интенсивности флуоресценции вещества. Это может происходить по множеству причин, включая химические реакции в возбужденном состоянии, перенос энергии, образование комплексов и столкновения с молекулами [116].

Общая эффективность флуорофора может быть представлена в виде яркости β флуоресцентного вещества в $\text{см}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{л}$, которая зависит от способности как поглощать, так и излучать фотоны:

$$\beta = \varepsilon(\lambda) \times \varphi_F.$$

Яркость флуоресцентного вещества активно используется в биологии для сравнения различных хромофоров. Ее можно настроить, увеличивая молярное поглощение молекулы $\varepsilon(\lambda)$ и/или квантовый выход флуоресценции φ_F [116].

На сегодняшний день одобрено четыре флуорофора для клинического использования, два из которых имеют историческое одобрение, индоцианин зеленый (ICG) и метиленовый синий (MB), в дополнение к 5-аминолевулиновой кислоте (ALA), которая является биосинтетическим предшественником пропотопорфирина IX (PrIX) и пафолацианина (OTL38)

[117]. Среди одобренных флуорофоров наиболее экономически эффективными и широкодоступными во всем мире являются ICG и метиленовый синий.

С 1960-х годов флуоресцеин применяется для диагностики множества офтальмологических заболеваний. Визуализация сосудов с помощью ICG зарекомендовала себя как экономически эффективный метод для оценки перфузии кожных лоскутов после мастэктомии. Флуорофоры также применялись для обнаружения раковых заболеваний, однако только ограниченное количество типов опухолей можно выявить с помощью клинически одобренных нецелевых флуорофоров.

ICG — это флуорофор гептаметинцианина, первый и единственный клинически одобренный флуорофор, который излучает флуоресценцию в ближнем инфракрасном диапазоне. ICG обладает гидрофобными свойствами, что позволяет ему связываться с белками в плазме и ограничивает его нахождение в внутрисосудистом пространстве, делая его особенно подходящим для ангиографических исследований[118]. ICG также используется для интраоперационной идентификации метастазов печени и гепатоцеллюлярных карцином из-за его гидрофобности и естественного клиренса через гепатобилиарную систему [119]. Благодаря сильному связыванию с белками плазмы, ICG может пассивно проникать в опухолевые ткани, которые обычно имеют рыхлую сосудистую сеть и нарушенный лимфодренаж.

МВ - хорошо известный катионный и первичный тиазиновый краситель, также является умеренно сильным флуорофором, излучающим в диапазоне от 650 до 750 нм даже при низких дозах. Однако, высокая доза МВ не только окрашивает операционное поле, но и несет значительный риск серьезных побочных эффектов, включая токсическую метаболическую энцефалопатию и оказание нейротоксического воздействия на центральную нервную систему [120].

Резюмируя, стоит посветить и тот факт, что клинически одобренные флуорофоры являются не единственными для применения в ФД, так как существует широкий спектр красителей более стабильных в физиологических средах, а также имеющих более высокую интенсивность флуоресценции, которая позволяет использовать меньшие дозы для визуализации солидных опухолей.

1.2.5.3 Критерии подбора FRET-пары

Резонансный перенос энергии Фёрстера (или флуоресценции, FRET) — это процесс безызлучательной передачи энергии возбуждения от возбужденного донорного флуоресцентного красителя к акцепторному красителю, находящемуся на близком расстоянии [121]. Основной особенностью этого явления является угасание флуоресценции донора и появление флуоресценции акцептора на более длинных волнах.

Механизм переноса энергии основывается на диполь-дипольном взаимодействии между переходными дипольными моментами донора и акцептора. Процесс FRET происходит следующим образом: донорная молекула поглощает энергию и переходит в возбужденное состояние S_1 . В этом состоянии молекула может переходить на различные колебательные уровни, которые обычно быстро дезактивируются до основного состояния через быструю безызлучательную колебательную релаксацию (Рис. 5).

Когда молекула-акцептор находится близко, она может "ощущать" электрическое поле переходного диполя и забирать его энергию, если существует резонанс — т.е. если энергия донора совпадает с энергией электронного перехода в акцепторе [122]. В результате донор безызлучательным образом передает энергию акцептору на малых расстояниях, который в последствие флуоресцирует.

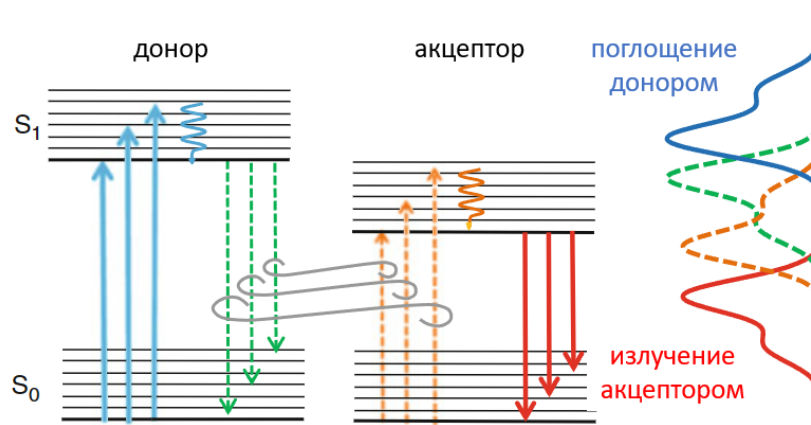


Рис. 5. Принцип процесса FRET

Процессы FRET обусловлены диполь-дипольными взаимодействиями и зависят от степени перекрытия спектров флуоресценции донора и поглощения акцептора, а также от расстояния между донором и акцептором, которое влияет на скорость передачи энергии по закону шестой степени. Скорость безызлучательной передачи энергии описывается следующим уравнением [123]:

$$k_{FRET} = \frac{1}{\tau} \cdot \left(\frac{R_0}{r} \right)^6,$$

где τ – время жизни флуоресценции донора в отсутствие акцептора, с;

r – расстояние между донором и акцептором, нм;

R_0 – критический радиус Ферстера, нм.

Значение R_0 рассчитывается в соответствии с уравнением [124]:

$$R_0^6 = \frac{900 \ln 10 k^2 \phi_{D,0}^{fl}}{128 \pi^2 N_A n^4} \int_0^\infty J(\lambda),$$

где k^2 – параметр, который зависит от взаимной ориентации донорного и акцепторного диполей (принимается как 2/3);

$\phi_{D,0}^{fl}$ – квантовый выход флуоресценции донора в отсутствие акцептора;

n – показатель преломления растворителя;

N_A – постоянная Авогадро;

$J(\lambda)$ – интеграл соответствует степени перекрытия между нормированным спектром излучения донора со спектром поглощения акцептора, л·нм⁴/(моль·см).

Интеграл спектрального перекрытия $J(\lambda)$ представляет собой количественную меру донорно-акцепторного спектрального перекрытия по всем длинам волн λ . Величина $J(\lambda)$ может быть вычислена по формуле:

$$J(\lambda) = \frac{\int_0^{\infty} I_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^{\infty} I_D(\lambda) d\lambda},$$

где $I_D(\lambda)$ – спектр флуоресценции донора;

$\varepsilon_A(\lambda)$ – спектр поглощения акцептора, л·моль⁻¹·см⁻¹;

λ – длина волны, нм.

Эффективность FRET сильно зависит от расстояния R между донором и акцептором [125]:

$$Q_{FRET} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6},$$

где r – реальный радиус между донором и акцептором, нм.

Перенос энергии возможен для любых пар хромофоров. Однако, он может проявляться в меньшей или большей мере в зависимости от степени перекрывания спектров поглощения хромофоров в выбранной паре. Поэтому при выборе FRET-пары следует учитывать следующие ключевые критерии [126]:

1. Условие резонанса: спектральное перекрытие полосы фотолюминесценции донора с полосой поглощения акцептора. Процесс передачи энергии должен происходить быстрее, чем излучательный переход донора из возбужденного состояния в основное;

2. Близость донора и акцептора: эффективность переноса энергии обратно пропорциональна шестой степени расстояния между молекулами донора и акцептора. Для оценки этого расстояния вычисляется Ферстеровский

радиус — максимальное расстояние, при котором происходит передача энергии по механизму FRET на уровне 50% от максимума.

Поэтому очень важно осуществить подбор FRET-пары при разработке тераностических препаратов на основе ФДТ и ФД с учетом всего вышесказанного, а именно учесть потерю энергии при Стоксовом сдвиге, квантовый выход флуоресценции, а также минимальный радиус Ферстера (для обеспечения оптимального стерического расстояния между флуорофором и фотосенсибилизатором).

1.3 Химический дизайн димерных наночастиц

Важное место в медицине занимает химический дизайн материалов. От структуры и элементного состава, очевидно, зависят свойства материала. Поэтому ведутся интенсивные исследования, направленные на поиск и синтез НЧ с определенными составом и структурой. Основными характеристиками, которыми должны обладать потенциально терапевтически эффективные НЧ, являются высокая биодоступность, низкая токсичность, биоинертность, биосовместимость [127]. Тераностика на основе димерных НЧ рассматривается как многообещающая будущее в наномедицине, поскольку наличие димерности (наличие двух различных поверхностей) и наноразмерности открывает возможность использования таких систем для нацеливания в опухоли, визуализации (диагностики) и терапевтического потенциала в рамках одной наноплатформы. В отличие от малых молекул с одной поверхностью, тераностические димерные наноструктуры имеют больший спектр физико-химических свойств (оптические, электрические, магнитные, биологические и др.), и могут быть модифицированы множеством функциональных агентов (контрастные вещества, антитела, лекарственные молекулы и др.).

Существует множество различных форм и видов димерных НЧ. Димерные НЧ можно разделить на два вида: структуры типа «ядро-оболочка»

и «гантель» (НЧ Януса). В свою очередь димерные НЧ вида «гантель» (Янус) можно классифицировать на: полимерные Янус, неорганические Янус и полимерно-неорганические Янус.

1.3.1 Структура типа «ядро-оболочка»

НЧ данного класса в целом можно описать следующим образом: материал состоит из внешней оболочки и внутреннего ядра. Природа обоих компонентов может быть, как органической, так и неорганической природы. На Рис. 6 представлены некоторые классы рассматриваемых материалов [128].

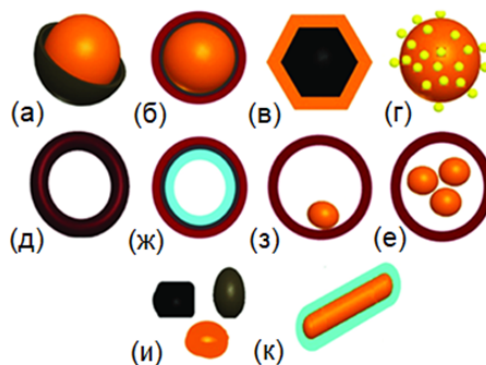


Рис. 6. Схематичные изображения наночастиц со структурой «ЯО»

Как можно заметить, присутствуют как структуры с двумя компонентами, так и с тремя. Каждый из этих классов имеет свои уникальные свойства. На Рис. 6а представлены типичные сферические частицы «ядро-оболочка»; для частиц на Рис. 6б характерно мультикомпонентная оболочка; Рис. 6в показывает частицы, у которых и ядро, и оболочка имеет гексагональную форму; на Рис. 6г морфология ядра является пористой; частицы на Рис. 6д характеризуются полым ядром; частицы на Рис. 6ж аналогичны предыдущим, только оболочка состоит из двух и более компонентов; возможны ситуации, когда внутреннее ядро представляет из себя частицу, способную перемещаться в полый области внутри внешней оболочки, что продемонстрировано на Рис. 6з; внутренняя сфера частиц на

Рис. 6е характеризуются наличием в ней нескольких ядер; на Рис. 6и представлены НЧ с необычной, нерегулярной формой; на Рис. 6к частицы имеют форму стрелы.

Разработка таких структур связана со следующими причинами. НЧ могут быть использованы в качестве материалов для лечения рака: адресной доставки лекарств и магнитной гипертермии. Однако магнитные НЧ, к примеру, магнетит (Fe_3O_4) в чистом виде проявляет токсичность, склонен к агрегации и окислению, а также сложно поддается функционализации поверхности. Решением этой проблемы может стать покрытие его ядра золотой оболочкой. В отличие от других материалов, используемых для оболочек, таких как полимеры, биомакромолекулы, органические лиганды или неорганические вещества (например, углерод или оксид кремния), золото обладает низкой химической активностью и легко позволяет модифицировать поверхность с помощью серосодержащих лигандов. Размер ядра и толщину оболочки можно варьировать в зависимости от метода синтеза. Из-за значительных различий в свойствах магнетита и золота процесс создания структуры ядро-оболочка является довольно сложным. Необходимо предварительно активировать поверхность магнетита для того, чтобы обеспечить его взаимодействие с золотом. Адсорбция золота на поверхности магнетита может происходить через ковалентные или нековалентные взаимодействия. В научном исследовании [129] используется метод, основанный на восстановлении ацетилацетоната железа (III) в среде 1,2-гександиола, олеиламина и олеиновой кислоты в инертной атмосфере. Покрытие проводится восстановлением ацетата золота в присутствии магнетита и последующей физической адсорбции золота на поверхности ядра (Рис. 7). Недостатком данного метода является использование исходной реакционной смеси магнетита без его очистки и выделения, а также бимодальное распределение частиц по размерам. В другом методе (Рис. 8) магнетит получали по золь-гель технологии с последующим покрытием силаном и активацией поверхности серосодержащими группами. В данном

методе НЧ золота не связаны между собой, но ковалентно связаны с активированным ядром.

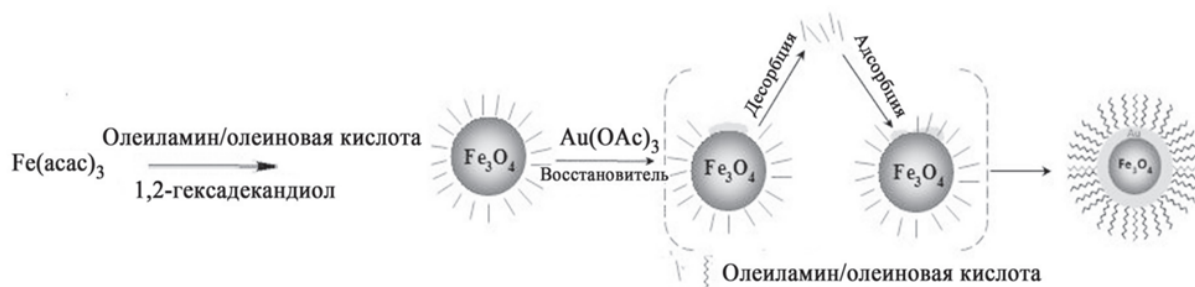


Рис. 7. Схема синтеза наночастиц магнетит-золото в системе олеиламин-олеиновая кислота [129]

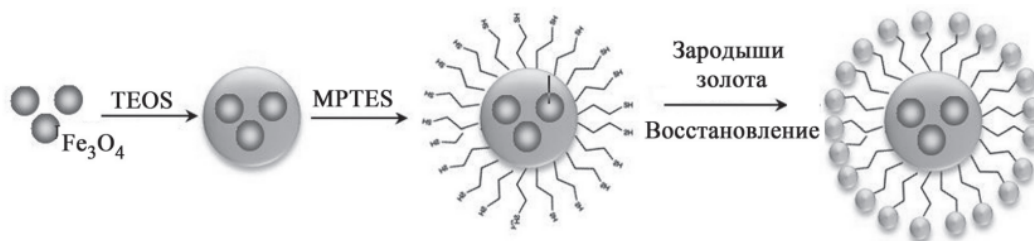


Рис. 8. Схема синтеза наночастиц магнетит-золото с использованием силанов; TEOS – тетраэтоксисилан, MPTES – 3-(меркаптопропил)триметоксисилан [129]

В работе [130] для создания сенсора, способного определять концентрацию глюкозы до 20 мМ, использовался биоконъюгат глюкозооксидаза-магнетит ($\text{GO}_x\text{-Fe}_3\text{O}_4$). Наночастицы магнетита были функционализированы аминогруппами (Рис. 9), что сделало возможным их ковалентное связывание с коллоидным золотом. Образование золотой оболочки на поверхности магнетита в процессе синтеза позволило в последующих экспериментах зафиксировать значительное увеличение количества и активности иммобилизованного фермента глюкозооксидазы, в зависимости от соотношения масс Fe_3O_4 к Au.

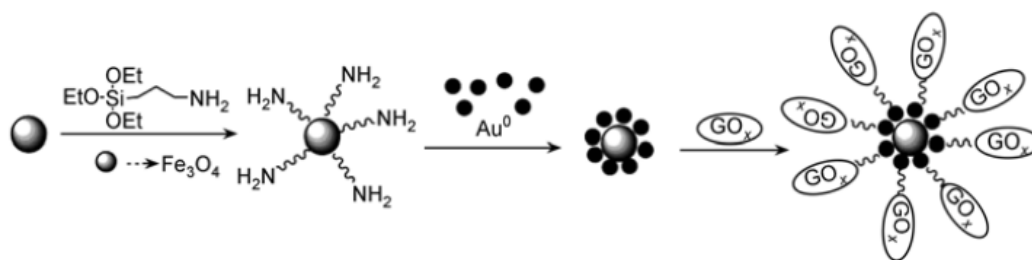


Рис. 9. Схематичное изображение синтеза наночастиц магнетит-золото «ядро-оболочка» и функционализации поверхности

На базе наночастиц магнетита с золотой оболочкой можно осуществлять целевую доставку противоопухолевых препаратов. В частности, в работе [131] была рассмотрена конъюгация глутатиона (GSH, γ -глутамил-цистеинил-глицин) с оболочкой наночастиц $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ благодаря прочной ковалентной связи между $-\text{SH}$ группой и глутатионом. Это позволило использовать данную структуру для высвобождения доксорубина (DOX) в целях противоопухолевой терапии (Рис. 10). Стоит отметить, что присутствие конъюгированного глутатиона на оболочке снижает побочные эффекты DOX, а контролируемое высвобождение препарата повышает его противоопухолевую эффективность.

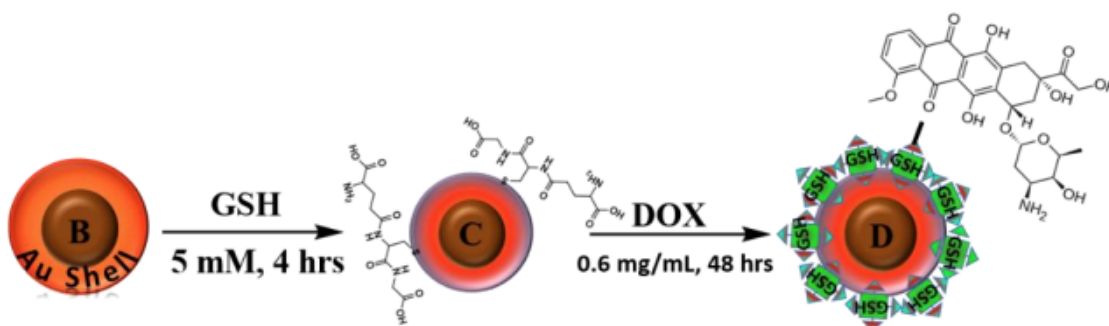


Рис. 10. Схематическое изображение функционализации GSH на поверхности Au для стабилизации наночастиц и обеспечения конъюгации DOX

НЧ $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-Au}$ типа «ядро-оболочка» также используются и востребованы. Процесс получения НЧ данного состава состоит двух этапов: непосредственный синтез CoFe_2O_4 НЧ и дальнейшая функционализация

поверхности частицами золота. Рассмотрим метод получения данной системы, описанный в работе [132]. Данная система интересна тем, что за счет появления в структуре шпинели ионов Co^{2+} наблюдается улучшенные магнитные свойства, за счет чего этот материал становится перспективным кандидатом для применения для магнитной гипертермии, МРТ, магнитной сепарации, биосенсоров и доставки лекарственных веществ [133–135].

Также существуют работы по синтезу НЧ, в составе которых содержится диоксид кремния и золото. Данный наноккомпозит состоит из золотого ядра и оболочки из диоксида кремния. Система золото-кремнезем интересна тем, что обладает свойствами как оптическими свойствами золота, так и свойствами диоксида кремния [136,137]. Рассмотрим метод синтеза данной системы (Рис. 11), представленный в [138].

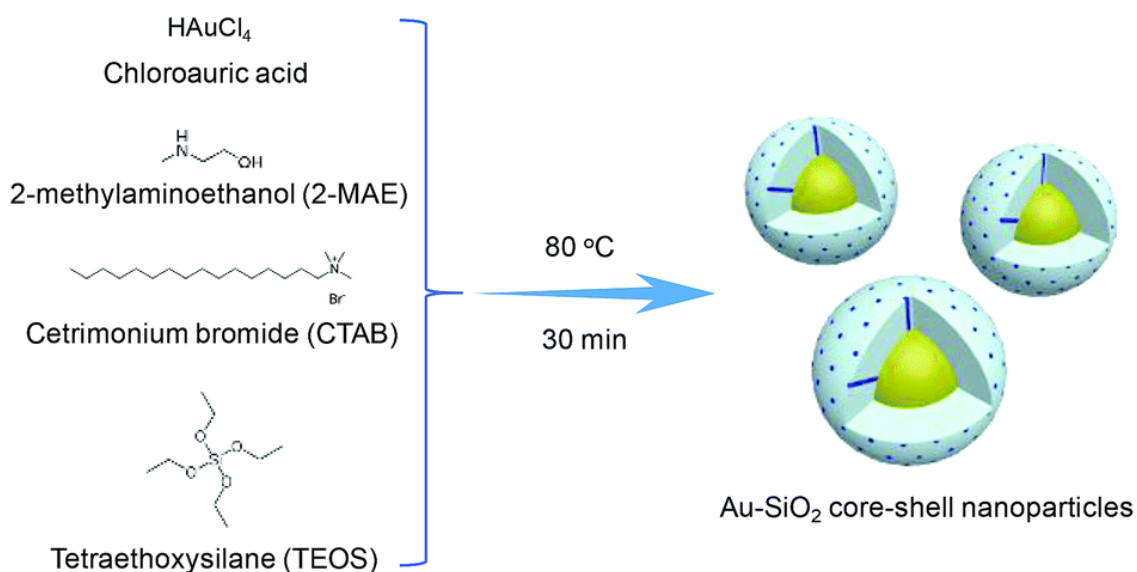


Рис. 11. Схематичное изображение синтеза наночастиц Au-SiO₂

Данный метод синтеза Au-SiO₂ является одностадийным и заключается в создании раствора, включающего деионизированную воду, этанол, цетилтриметиламмония бромид (СТАВ), 2-(N-метиламино)этанол, ЗХВК и чистый TEOS. Реактивы смешивали при помощи ультразвуковой обработки. Затем раствор нагревали до 80° с постоянным перемешиванием и выдерживали в течение 30 минут, после чего охлаждали до комнатной

температуры. Полученную смесь дважды подвергли центрифугированию при 11000 оборотов в минуту на протяжении 30 минут, а затем растворили в воде.

В начале данной главы указывалось, что НЧ со структурой «ядро-оболочка» являются димерными, т.е. обладают двумя поверхностями с совершенно разными свойствами. Отчасти, это правда. Но следует сделать важное замечание, что, по сути, со средой, в которой данные НЧ должны находиться для какой-либо терапевтической цели, взаимодействует лишь внешняя оболочка, в то время как внутреннее ядро никак не воздействует на нее и не подвергается ее воздействию в ответ. С одной стороны, это является плюсом данных структур, поскольку внутреннее ядро может быть токсичным, в связи с чем применение данных НЧ может быть ограничено. С другой стороны, использование обеих поверхностей для функционализации невозможно, поэтому использование таких структур в тераностических целях не рационально. Так как только внешняя оболочка (поверхность) взаимодействуют с физиологической средой или с определенными тканями/клетками.

1.3.2 Структура типа «гантель» (наночастицы Януса)

Особый интерес представляет структура типа «гантель» в силу своих структурных особенностей, а именно димерное строение, т.е. наличие двух поверхностей с совершенно различными физико-химическими свойствами. Иными словами, их называют НЧ Януса, которые классифицируются по составу входящих в них наноструктур. Благодаря различной структуре прекурсоров, условиям и методам синтеза можно варьировать характеристики веществ со «гантель».

1.3.2.1 Полимерные наночастицы Януса

Дендримеры представляют собой полимерные молекулы с древовидной структурой (Рис. 12), состоящие из повторяющихся звеньев, что предоставляет обширную поверхность для функционализации различными активными агентами. Впервые о таких полимерах сообщили в 1980-х годах доктор Дональд Томалия и его коллеги [139], синтезировавшие трехмерные полиаминоаминовые дендримеры, включающие третичные амины и амидные связи. Структура дендримера предусматривает три основных участка для инкапсуляции лекарств через различные механизмы: пустоты для молекулярного захвата, точки разветвления через водородные связи, и внешние поверхностные группы благодаря электростатическим взаимодействиям [9]. Уникальные свойства дендримеров позволяют использовать их как платформы для «двойной» доставки лекарств, отличающихся по гидрофильности.

В одном из исследований [140] успешно продемонстрировали совместную инкапсуляцию в полипропилениминовом дендримере 5-го поколения метотрексата (гидрофобного химиотерапевтического средства) и полностью трансретиноевой кислоты (гидрофильного соединения с умеренной противоопухолевой активностью). В другом исследовании [141] авторы синтезировали полиаминоаминовый дендример 5-го поколения с этилендиаминовым ядром, к которому были ковалентно присоединены фолиевая кислота, флуоресцеин и противоопухолевый препарат метотрексат. Этот комплекс способен одновременно осуществлять нацеливание, визуализацию и внутриклеточную доставку лекарств благодаря функциональным компонентам. Однако использование дендримеров также связано с рядом недостатков и сложностей, которые могут возникнуть при разработке таких систем. Более того значительные различия в химической структуре препаратов могут не только изменять их фармакокинетику при внутривенном введении, но и влиять на их взаимодействие с наноструктурами,

через которые происходит инкапсуляция. Это может привести к проблемам при одновременной загрузке двух препаратов в одну систему, что усложняет процесс синтеза. Такие системы часто характеризуются недостаточной стабильностью в условиях организма и ограниченной способностью проникать в опухолевые клетки, что требует дополнительной оптимизации. Все эти факторы снижают их доступность и увеличивают стоимость разработки.

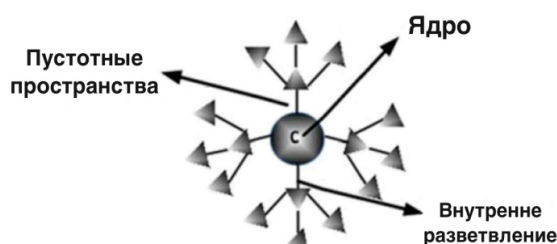


Рис. 12. Схема изображения дендримера

Пример использования полимеров, как связующего звена, для объединения двух хромофоров за счет двух гибких олиго(этиленгликолевых) линкеров разной длины для тераностики онкологических заболеваний [122]. Конъюгация 4-пиразолинил-1,8-нафталимида и пропаргил-15,17-диметокси-13-амида и бактериохлорина привело к созданию двухфункциональной системы включающую фотосенсибилизатор и агент для визуализации флуоресценции. Используемый тип флуоресцентных красителей демонстрировал высокие сдвиги Стокса, хорошую фотостабильность и способность к визуализации *in vitro*. Однако, в вышеуказанной системе существуют недостатки, такие как демонстрация системой более высокой интенсивности эмиссии, исходящей от нафталимидной единицы, что объясняется повышением эффективности резонансного переноса энергии между хромофорами. Флуоресценция нафталимида в исследуемых конъюгатах сильно возросла из-за резонансного переноса энергии на акцепторный фрагмент (флуорофор). Более того, визуализация была возможна только после

облучения высокой мощности, которое вызывает фотодеструкцию хромофора бактериохлорина.

1.3.2.2 Неорганические наночастицы Януса

Гетерогенные димерные НЧ, похожие визуально на гантели, представляют собой важный тип композитного наноматериала, вызывающий растущий интерес. Это объясняется наличием двух поверхностей с разной химической и физической природой, то есть двумя НЧ из разных материалов, контактирующими друг с другом. Такую наноструктуру можно рассматривать как особое промежуточное звено между отдельными сферическими наночастицами и наноструктурой «ядро-оболочка». В состав таких наноструктур входит две различные по составу неорганические фазы, чаще, эпитаксиально сросшиеся, создавая форму «гантель» и называемые неорганическими НЧ Януса. Поэтому синтез гантелеобразных НЧ сложнее, чем других структур. Управляемость процесса синтеза, размер НЧ и дисперсность, а также морфология конечных продуктов зависят от многих факторов: размер затравки и соотношение размеров могут использоваться для влияния на управляемость эпитаксиального роста. Размеры компонентов и распределение размеров можно изменять, тщательно контролируя температуру реакции и время реакции. Морфология димерных наночастиц вида «гантель» тесно связана с полярностью растворителя, соотношением прекурсоров, несоответствием решеток между двумя компонентами и концентрацией поверхностно-активного вещества. Гантелеобразные НЧ обычно синтезируются путем эпитаксиального роста одной компонентной НЧ на другой компонентной наночастице, которая называется затравочной наночастицей. Это напоминает процесс синтеза наночастиц типа «ядро-оболочка», однако зародышеобразование должно быть строго контролируемым, чтобы обеспечить анизотропное развитие, сосредоточенное на одной конкретной кристаллической плоскости вокруг затравочных НЧ, что

отличается от равномерного распределения, характерного для структур типа «ядро-оболочка». Поэтому для успешного синтеза НЧ вида «гантель» необходимо способствовать гетерогенному зародышеобразованию и подавлять гомогенное зародышеобразование.

Этот вид димерных гибридных НЧ представляет интерес из-за их уникальных электронных, магнитных, оптических и каталитических свойств, которые отсутствуют в отдельных компонентах НЧ. Эти свойства обусловлены электронной связью, возникающей между двумя компонентами. В отличие от других структур, таких как НЧ типа «ядро-оболочка», где ядро и его «интерфейс» окружены оболочкой, НЧ вида «гантель» имеют организацию, где две функциональные поверхности двух компонентов и их активный «интерфейс» полностью открыты; это усиливает их каталитическую активность и их полезность в качестве многофункциональных зондов для диагностических и терапевтических применений [142,143]. Поскольку относительные положения каждого компонента в НЧ вида «гантель» могут быть зафиксированы, возможно скоординированное распределение между двумя компонентами при каталитическом сжигании СО [144] и других газов, и, таким образом, спекание может быть сведено к минимуму. Например, НЧ Au обычно химически инертны и не катализируют реакцию окисления СО, но показывают высокую каталитическую активность после их осаждения на металл-оксидный носитель. Считается, что это усиление каталитической активности является результатом переноса электронов между оксидным носителем и соседними наночастицами Au. В гантелеобразной структуре каталитические НЧ могут не только иметь лучший эффект соединения, поскольку они находятся в тесном контакте внутри каждой пары, но они также стабильны при более высоких температурах из-за их скоординированного распределения и фиксированных положений [145].

Одним из преимуществ этой особой структуры и сильных поверхностных взаимодействий является то, что оба компонента в структуре могут быть модифицированы путем переноса электронов через границу

раздела поверхностей, что делает гантелеобразные НЧ Януса высокоактивными при относительно низких температурах. К сожалению, из-за особенностей структуры и строгих требований к надлежащему зародышеобразованию, описанных выше, на сегодняшний день удалось успешно синтезировать только несколько НЧ вида «гантель», включая Au (Ag, Pt, Pd) – Fe_3O_4 (Co_3O_4) [142,145], Au – PbS (PbSe), FePt–CdS и Cu–Ag [146]; большинство из них содержат НЧ благородных металлов и магнитные НЧ, имеющими между собой внутреннюю эпитаксиальную связь.

Резюмируя, НЧ вида «гантель», очевидно, выделяются на фоне других НЧ, за счет наличия двух химических поверхностей их можно модифицировать разными молекулами в заданных соотношениях для различных целей. НЧ Fe_3O_4 -Au вида «гантель» можно выделить как наиболее предпочтительные для изготовления гибридных наноконструкций [147]. Поверхность золота (Au) имеет превосходные оптические свойства, каталитическую активность и поверхностную функциональность [148]. Использование магнитной составляющей (Fe_3O_4) дает возможности использования различных целевых методов визуализации, таких как КТ, МРТ, фотоакустическая визуализация, ультразвуковая визуализация лечения рака [149]. Например, при разработке платформы для тераностики онкологических заболеваний, состоящей из двух хромофоров для одновременного использования ФДТ и ФД, использование таких НЧ способно нивелировать FRET-эффект, за счет разнесения в пространстве флуорофора и фотосенсибилизатора.

1.3.2.3 Полимерно-неорганические наночастицы Януса

Наноматериалы Януса, состоящие из двух поверхностей с разным составом и/или функциональностью, привлекли значительный интерес за последние несколько десятилетий благодаря их разнообразным наноструктурам и интригующим свойствам, вытекающим из двух

компонентов и микроструктур. Полимерно-неорганические НЧ Януса представляют собой класс уникальных материалов, которые обеспечивают синергические характеристики полимеров и неорганических веществ, обеспечивая привлекательные свойства и перспективные приложения. Неорганические НЧ Януса демонстрируют уникальные физические свойства (например, оптические, электронные, магнитные и каталитические свойства) и высоконастраиваемые характеристики внешнего вида (например, размер, форма, морфология и поверхность). Однако органические полимеры, как правило, обладают хорошей биосовместимостью, стабильностью и технологичностью, а также высокоадаптируемой разлагаемостью и восприимчивостью к внешним стимулам (например, свету, теплу, pH, акустическим волнам и биологическим сигналам). Наноразмерные сборки, полученные из полимеров и неорганических НЧ, объединяют взаимодополняющие сильные стороны обеих сторон, чтобы получить синергически улучшенные свойства. Эти свойства сделали возможными новые применения сборок полимерно-неорганических НЧ Януса в биологии и медицине, особенно в визуализации и терапии рака.

Крайне важно доставить достаточное количество НЧ в нужное место в нужное время для достижения их оптимальной биологической эффективности. Как и в случае с другими наноматериалами, эффективность применения полимерно-неорганических НЧ Януса *in vitro* и *in vivo* регулируется их физико-химически значимыми структурными параметрами, такими как размер, форма, заряд и поверхностное ПЭГилирование.

Размер НЧ влияет на их распределение *in vivo*. Оптимальный размер для применения в организме — 5–200 нм. Так как мелкие частицы (< 5 нм) могут легко секретироваться из опухолевых тканей даже после того, как они накапливаются вокруг опухолей, в то время как частицам размером более 200 нм становится трудно проникать через протекающие сосуды и попадать в опухолевые ткани из-за захватывания клетками Купфера в РЭС [150]. Так как

сосудистая сеть опухолей более проницаема, это позволяет накапливать НЧ (эффект EPR) – осуществлять их пассивную доставку [151].

Форма играет важную роль в судьбе НЧ *in vitro* и *in vivo*. Считается, что форма частиц влияет на клеточное поглощение и субклеточное расположение НЧ. Когда размер НЧ превышает 100 нм, было обнаружено, что стержни показывают наибольшее клеточное поглощение, за ними следуют сферы и кубы [152]. Но в исследованиях с НЧ размером менее 100 нм сферы демонстрируют более высокую клеточную интернализацию по сравнению со стержнями.

Поверхностный заряд НЧ имеет решающее значение для их клеточного поглощения, биораспределения и взаимодействия с другими биологическими средами. Как правило, положительно заряженные НЧ могут легче интернализироваться в клетки, чем нейтрально и отрицательно заряженные НЧ, из-за отрицательно заряженной природы клеточной мембраны [153].

ПЭГилирование НЧ широко использовалось для продления времени их циркуляции *in vivo* с помощью «эффекта скрытности» [154]. ПЭГилирование создает гидрофильный защитный слой вокруг НЧ для предотвращения абсорбции опсониновых белков с помощью стерических сил отталкивания, тем самым защищая НЧ от фагоцитоза и продлевая период циркуляции наноконструкций *in vivo* [155]. Однако ПЭГилирование может также блокировать функционирование активных групп (например, лигандов или терапевтических фрагментов) на поверхности НЧ, что ставит под угрозу эффективность гибридных НЧ в биомедицинских приложениях [156].

Суммируя, разработка полимерно-неорганических НЧ Януса позволяет достичь возможность использования важного функционала в терапии и диагностики опухолей. Во-первых, предоставление пространственной и временной информации об ангиогенезе опухоли и микроокружении опухоли как в первичной опухоли, так и в метастатических участках путем простого введения функциональных полимеров, которые могут реагировать на эндогенные или экзогенные стимулы в опухолевых тканях [157]. Эта

информация имеет решающее значение для ранней диагностики опухоли и/или для выбора и оптимизации терапевтических стратегий. Во-вторых, характеристика биораспределения НЧ и количественное определение дозы и максимального накопления НЧ в целевые участки, либо посредством собственной способности визуализации НЧ (МРТ), либо путем конъюгации полимеров с различными визуализирующими агентами (ФД) [158]. В-третьих, контроль динамики доставки терапевтических агентов и прогнозирование возможных результатов терапии. В результате терапия может быть потенциально оптимизирована и персонализирована для достижения максимальной эффективности. Более того, за счет иммобилизации на НЧ Януса двух различных по функционалу агентов, достигается менее инвазивный подход при тераностике онкологических заболеваний [159].

1.4 Преимущества димерных наночастиц для доставки лекарств

Значительный исследовательский интерес проявляется в области систем доставки лекарств с использованием НЧ.

Наноструктурированные биоматериалы обладают уникальными физико-химическими свойствами, такими как сверхмалый и контролируемый размер, большое отношение площади поверхности к массе, высокая реакционная способность и функционализируемая структура. Они изменяют и улучшают фармакокинетические и фармакодинамические свойства различных типов молекул лекарственных средств, которые способны к целенаправленной доставке как агентов визуализации, так и противораковых препаратов, а также к раннему выявлению раковых поражений, определению молекулярных сигнатур опухоли с помощью неинвазивной визуализации и, что наиболее важно, к молекулярно-таргетной терапии рака. Эти свойства могут быть применены к лекарственным средствам для преодоления некоторых ограничений в традиционных терапевтических методах [160–162]. Более того, использование димерных НЧ (Януса) открывает возможности использования

дополнительного функционала (совмещение с диагностикой или синергические эффекты для терапии).

Преимущества использования НЧ в качестве системы доставки лекарств включают:

1. Контролируемое и устойчивое высвобождение препарата во время транспортировки и в месте локализации опухоли, распределение препарата по органам и последующий клиренс препарата для достижения повышения терапевтической эффективности препарата и снижения побочных эффектов.
2. Препарат может быть включен в систему без какой-либо химической реакции; это важный фактор для сохранения эффективности терапии.
3. Контролируемое высвобождение и деградация препарата могут быть модифицированы.
4. Нет потерь препарата и, таким образом, повышается биодоступность в определенном месте в необходимой дозе в течение длительного периода времени.
5. Улучшение растворимости плохо растворимых в воде лекарств, продление периода полувыведения препарата из системного кровообращения за счет сниженной иммуногенности, контроль высвобождения лекарства и снижение частоты введения.
6. Улучшение терапевтической эффективности препарата, за счет возможности таргетной доставки (пассивной – EPR эффект или активной) по сравнению с традиционными методами.

При использовании НЧ Януса возникает важное преимущество – возможность совмещения диагностики и терапии (тераностика) и комбинированной терапии, что влечет за собой очевидные преимущества. За счет химически двух различных поверхностей появляется возможности для различных модификаций (Рис. 913), позволяющих использовать одновременно несколько методов терапии (в том числе совмещая диагностику).

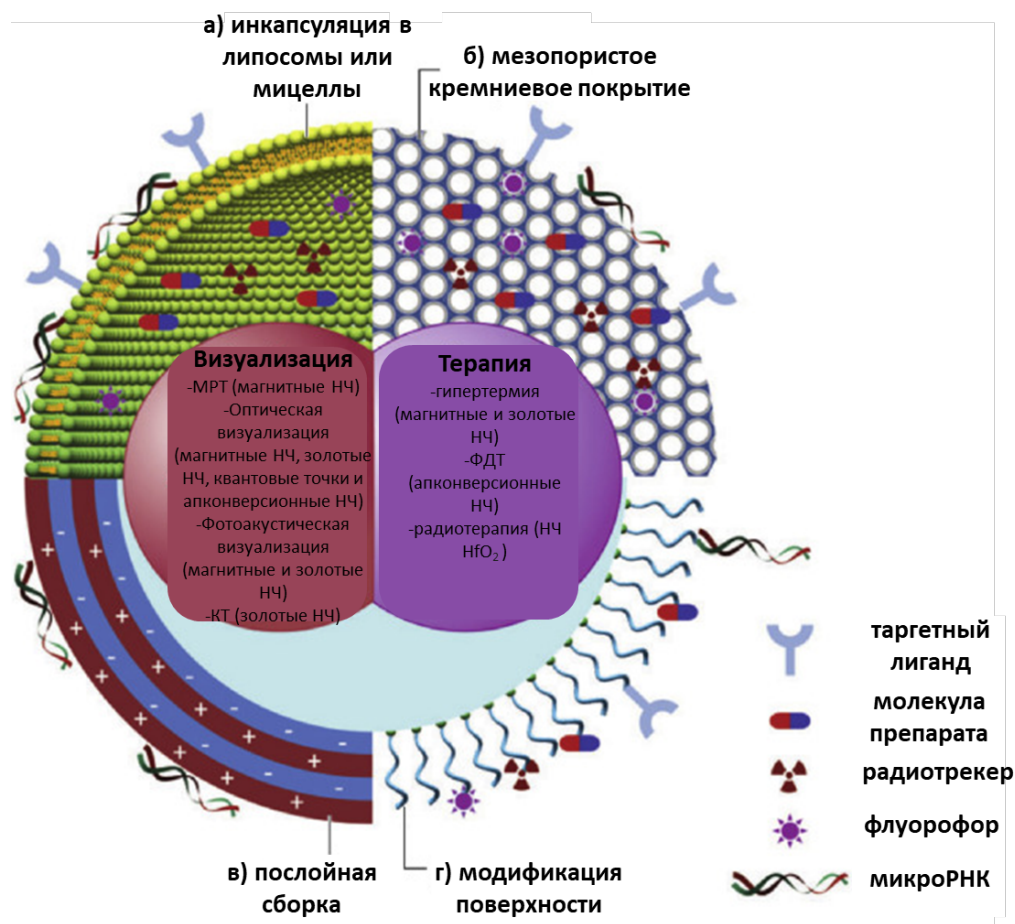


Рис. 13. Схема возможностей разработки и функционализации димерных НЧ

1.4.1 Пассивная доставка лекарств на основе димерных наночастиц

1.4.1.1 Использование преимущества двух поверхностей димерных систем для доставки лекарств

Димерные НЧ магнетит-золото также находят применение в биомедицине для доставки активных молекул. Одна из первых работ, посвященных противоопухолевой таргетной терапии с использованием таких НЧ, была представлена в 2009 году [163]. В ней описан яркий пример специфичной функционализации поверхностей НЧ вида «гантель»: поверхность золота была функционализирована комплексными соединениями

платины (такими как цисплатин и оксоплатин), а поверхность магнетита — моноклональными антителами против Her2-белка.

Успех применения нанокомпозитов на основе магнетит-золота сильно зависит от их наноструктуры, состава, стабильности и дисперсности в различных условиях. Эти НЧ известны уже около 20 лет, и существует ряд доклинических исследований об их использовании в биомедицине в качестве контрастных агентов для МРТ-визуализации и платформ для доставки противоопухолевых лекарств [164]. Основным принципом формирования гетероструктур любого состава является подавление гомогенной нуклеации и создание условий для гетерогенной нуклеации, то есть обеспечение таких параметров, при которых возможно вырастание одной НЧ на поверхности другой. Возможность существования димерных структур на основе магнетита и золота обусловлена параметрами их кристаллической решетки: для Fe_3O_4 он составляет 0.8397 нм, а для Au — 0.4078 нм. Обе решетки имеют кубическую сингонию, а их параметры отличаются почти в два раза, что позволяет осуществлять эпитаксиальный рост одной НЧ на поверхности другой [165].

Димерные НЧ получают путем термического разложения различных прекурсоров оксида железа и золота в присутствии ПАВ в органических высококипящих растворителях. Существует множество способов получения НЧ различных составов, однако именно процессы нагрева прекурсоров лучше подходят для синтеза сложных НЧ, таких как НЧ «ядра-оболочки» и «гантели», поскольку для формирования таких композитных структур обычно требуется гетерогенное зародышеобразование и рост второго компонента на предварительно сформированных монодисперсных НЧ первого компонента [166].

Связывание различных по своей природе молекул на две различные поверхности Fe_3O_4 -Au было уже не раз продемонстрировано ранее, однако, на данный момент нет работ, где на каждую из поверхностей наночастиц Fe_3O_4 -Au загружено одно из лекарств, комбинация из которых проявляет синергетический эффект. Иными словами, система “2в1” ранее не была

получена для данного типа частиц. Отдельно стоит отметить, что почти нет работ, сравнивающих эффект от комбинированной химиотерапии, использующей два противоопухолевых препарата, загруженные на две одинаковые НЧ, то есть нет работ, сравнивающие эффективность от терапии для систем “2в1” и “2в2”. Тем не менее, в одной из недавних работ была использована физическая смесь из комбинации НЧ и сополимера молочной и гликолевой кислоты (PLGA), каждая из которых содержала один препарат (доксорубицин или паклитаксел) - система “2в2” [167]. Авторы предполагали, что из-за минимальных различий в фармакокинетике, обе частицы, загруженные каждая своим препаратом, могут доставляться в опухолевые ткани примерно в одно и то же время, что позволяет обеспечить максимальный эффект от терапии комбинацией противоопухолевых веществ. Согласно их результатам, средняя выживаемость при терапии модели глиобластомы была увеличена с 48 дней после имплантации опухоли для комбинации лекарств (доксорубицин с цисплатином) до более чем 80 дней для комбинации частиц, несущих два препарата.

Наиболее исследованными магнитными НЧ для использования в качестве терапевтических агентов при магнитной гипертермии являются суперпарамагнитные НЧ оксида железа в силу их биосовместимости и способности к биodeградации. Однако их недостаточная эффективность термической конверсии, связанная с низкой магнитной восприимчивостью, рассматривается как критическая проблема. Для решения данной проблемы проводятся исследования, связанные с улучшением магнитной восприимчивости для достижения значительно улучшенных свойств индукционного нагрева и направленные на изучение влияния размеров таких частиц, их состава, морфологии и модификации поверхности на данный параметр. В частности, большое внимание уделено композитным бифункциональным наноматериалам на основе ферритных шпинелей.

Подводя итог, можно отметить, что использование наноматериалов в качестве базовой платформы в тераностике онкологических заболеваний

является максимально актуальным и востребованным. Более того, стоит заметить, что максимально эффективными являются димерные НЧ, что обуславливается возможностью использования «химии двух поверхностей» для достижения синергических эффектов или же совмещении использования терапии и диагностики одновременно.

Инкапсуляция комбинации различных препаратов в одну наночастицу позволяет решить проблему различий фармакокинетики препаратов, так как при инкапсуляции фармакокинетика начинает определяться в большей степени не химической природой препаратов, а параметрами самой НЧ, такими как размер, форма, заряд и т.п. Таким образом, использование наночастиц обеспечивающих содоставку комбинаций лекарственных препаратов должно было бы решить проблемы фармакокинетических различий лекарственных веществ и привести к качественному рывку в терапии онкологических заболеваний, тем не менее при создании таких систем ученые неизбежно сталкиваются с рядом неочевидных трудностей. Во-первых, в случае серьезных различий в химической структуре отличается не только фармакокинетика препаратов при внутривенном введении, но их взаимодействие с материалом НЧ, за счет которого происходит инкапсуляция. Это приводит к ситуации, в которой загрузка двух препаратов в одну наночастицу либо невозможна, например, в случае, когда одно лекарство гидрофобно, а другое гидрофильно, либо, если лекарства связываются за счет одного и того же механизма, возникает конкуренция за сайты связывания на наночастице, что приводит к невозможности соблюдения задаваемого соотношения лекарств. Во-вторых, гетерогенность опухолей от пациента к пациенту приводит к ситуации, когда синергетический эффект оказывается индивидуален, так как опухоль чувствительна только к определенным препаратам и в определенном соотношении, и создание наночастиц с заданным соотношением препаратов будет эффективно только для относительно небольшой группы пациентов, что делает данный подход принципиально неотличимым от использования таргетных препаратов и не

решает проблему терапии широкого спектра онкологических заболеваний различного генеза [168]. В-третьих, ранее неоднократно было показано, что эффективность терапии с использованием наночастиц напрямую зависит от их способности проникать в опухолевый очаг, за счет EPR эффекта. Использование терапевтических наночастиц не решает проблемы оценки эффективности доставки наночастиц в опухоли после внутривенного введения. На сегодняшний день единственным методом, позволяющим оценить этот параметр является использование диагностических наночастиц, мимикрирующих терапевтические по своей форме и размеру, либо комбинация диагностической и терапевтической компоненты в одной наночастице. Оба подхода позволяют проводить прижизненную визуализацию эффективности доставки НЧ неинвазивными методами, такими как МРТ, КТ, позитронная эмиссионная томография (ПЭТ) и другие.

Таким образом, несмотря на большое количество работ, посвященных созданию наночастиц с комбинацией препаратов, обеспечивающих синергетический эффект, и/или комбинацией флуорофора и фотосенсибилизатора [122], в лучшем случае на выходе будет получен еще один препарат, показывающий свою эффективность для довольно небольшой когорты пациентов.

Резюмируя, можно перечислить ряд требований предъявляемым к НЧ, позволяющим перейти на качественно иной уровень терапии онкологических заболеваний:

- 1) НЧ должны обладать двумя различными поверхностями для возможности их селективной функционализации комбинацией флуорофора и фотосенсибилизатора;
- 2) В случае системы, содержащей флуорофор и фотосенсибилизатор, НЧ должны иметь жесткую структуру для невозможности передачи энергии с флуорофора на фотосенсибилизатор и наоборот (флуорофор и фотосенсибилизатор должны находиться друг от друга на расстоянии больше Ферстеровского радиуса);

- 3) НЧ должны быть биосовместимыми;
- 4) НЧ должны нести диагностическую компоненту (флуорофор), для возможности оценки эффективности их доставки в опухолевый очаг (ФД) и возможности использования ФДТ и в момент их максимального накопления.

1.4.1.2 EPR эффект

НЧ считаются перспективным инструментом как в диагностике, так и в терапии. Тераностические димерные НЧ обладают объединенными свойствами целевой визуализации и доставки лекарств в рамках одного целого. Фармакокинетика тераностических наноконструкций в значительной степени зависит от физико-химических свойств НЧ Януса, входящих в их состав, а также от путей введения. Следовательно, измененная фармакокинетика изменяет фармакодинамическую эффективность и токсичность наноконструкций. Хотя тераностические НЧ Януса имеют большие перспективы в наномедицине и биомедицинских приложениях, сохраняется отсутствие понимания механизмов биораспределения и побочных эффектов. Идеальная модель тераностических НЧ Януса должна обладать несколькими важными свойствами. Для доставки НЧ должны воздействовать на целевые ткани и демонстрировать соответствующую кинетику высвобождения препарата в оптимальных концентрациях в месте действия, иллюстрируя их эффективную терапевтическую эффективность. Поскольку они также обладают диагностическими возможностями, они должны помогать определять точное местоположение и характеристики заболевания. Наряду с этими свойствами, очень важно, чтобы НЧ были нетоксичными и легко выводились или удалялись из организма [169]. Признавая, что биодоступность и эффективность НЧ *in vivo* в основном определяются их фармакокинетикой и потенциальной токсичностью, обсудим вариативность подходов нацеливания в опухоль тераностических агентов в составе НЧ.

Существует два основных подхода к эффективному нацеливанию в опухоль: при пассивном нацеливании НЧ достигают места опухоли через «пористый» эндотелий, окружающий опухолевые ткани (EPR эффект). Напротив, активное нацеливание основано на нацеливании лигандов, таких как антитела, аптамеры и пептиды, на поверхности НЧ, которые позволяют НЧ связываться с рецепторами, сверхэкспрессированными на раковых клетках.

Пассивное нацеливание НЧ основано на уникальной фармакокинетике НЧ, включая минимальный почечный клиренс и EPR эффект в опухоли. Ангиогенез и васкуляризация хорошо охарактеризованы для опухолей. В опухолях стенки кровеносных сосудов становятся проницаемыми из-за дефектной сосудистой архитектуры, включая плохо выровненные эндотелиальные клетки с широкими фенестрациями и отсутствие гладкомышечного слоя. Эти свойства являются результатом быстрого ангиогенеза или васкуляризации, потому что опухолевые клетки развиваются очень быстро и требуют большого количества питательных веществ и кислорода. Сосудистая проницаемость опухолевых тканей также может быть усилена действием секретируемых факторов, таких как кинин и фактор роста эндотелия сосудов. Кроме того, опухолевые ткани обычно не имеют эффективного лимфатического дренажа. Поэтому макромолекулы или лейкоциты могут дренироваться через проницаемые кровеносные сосуды и удерживаться. Это явление было определено как EPR эффект.

Наноконструкции с размером частиц выше порогов нормальной проницаемости капилляров крови (6–12 нм) и почечной фильтрации (5–6 нм), но ниже порогов проницаемости сосудистой сети опухоли (600–800 нм) имеют высокую вероятность максимального накопления в опухоли и минимальные риски высокого накопления в других органах. Однако, при этом основным ограничением эффекта EPR является его гетерогенность. Изменения в типе опухоли и стадии могут привести к развитию интерстиция опухоли с отличным составом внеклеточного матрикса (например, коллаген,

фибронектин, гиалуронан, фибрин и протеогликаны), опухолевой паренхимы и стромальных клеток в различных опухолях. Кроме того, гетерогенность сосудистой проницаемости и стромального содержимого в различных типах опухолей также может влиять на накопление, проникновение и терапевтическую эффективность наноконструкций. Исследование визуализации показало, что первичная опухоль имеет более высокое содержание стромы, что делает этот тип опухоли более подходящей целью для доставки наноконструкций на основе EPR эффекта [170]. Опухолевые модели гепатоцеллюлярной карциномы, почечноклеточной карциномы, карциномы толстой кишки, саркомы Капоши, опухолей головы и шеи считаются опухолевыми моделями с высоким EPR эффектом, тогда как рак простаты считается опухолью с низким EPR эффектом из-за изменчивости состава внеклеточного матрикса и сосудистой плотности опухолей.

Поэтому в исследованиях *in vitro* и *in vivo* мы будем использовать клеточную линию CT26 карциномы толстой кишки, в которой, согласно литературным данным, имеется большее содержание стромы в первичной опухоли с доказанно высоким EPR эффектом. Кроме того, ранее в работах коллег по доставке фотосенсибилизатора с использованием магнитных НЧ было показано, что данная опухолевая модель способна эффективно накапливать НЧ при внутривенном введении [171].

2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Материалы

Олеиновая кислота (90%, Sigma-Aldrich, США), олеиламин (70%, Sigma-Aldrich, США), 1-октадецен (90 %, Sigma Aldrich. США), пентакарбонил железа ($\text{Fe}(\text{CO})_5$, 99,9%, Sigma Aldrich, США), тригидрат золотохлористоводородной кислоты (III) ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 99,9%, Sigma Aldrich, США), ацетон ($\geq 98\%$, СигмаТек, Россия), этанол ($\geq 98\%$, СигмаТек, Россия), н-гексан ($\geq 98\%$, Сигматек, Россия), изопропанол ($\geq 98\%$, Сигматек, Россия), соляная кислота (HCl , $\geq 99\%$, СигмаТек, Россия), феррозин ($\geq 97\%$, Sigma Aldrich, США), ацетат аммония ($\geq 98\%$, Sigma Aldrich, США), аскорбиновая кислота ($\geq 99\%$, Sigma Aldrich, США), стандарт ICP по железу (Sigma Aldrich, США), 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота (ДФУК, 98%, Sigma-Aldrich, США), гидроксид натрия (NaOH , 95%, АО Реахим, Россия), метиловый спирт (CH_3OH , 95%, АО Реахим, Россия), N-гидроксисукцинимид (NHS, 98%, Sigma-Aldrich, США), 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид гидрохлорид (EDC, 98%, Sigma-Aldrich, США), полиэтиленгликоль 2-аминоэтиловый эфир уксусной кислоты (NH_2 -ПЭГ- COOH , $M_w \sim 1100 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$, Sigma Aldrich, США), диметилсульфоксид (ДМСО, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich, США), метиловый эфир 131-(4-аминобутилкарбамоил)бактериохлорина (синтезирован в МИРЭА), сульфоцианин-5 NHS-эфир (Cy5, Lumiprobe, Россия), цистамин дигидрохлорид (96%, Sigma-Aldrich, США), таблетки для приготовления натрий-фосфатного буферного раствора (1xPBS, Sigma-Aldrich, США), деионизованная дистиллированная (DI) вода была получена с помощью системы очистки Millipore Milli-Q Academic System, центрифужные фильтры Amicon Ultra 10 и 30 кДа (Millipore, США), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолиум (MTS) был приобретен в компании Promega (США). Для приготовления всех растворов в

процессах синтеза и анализа использовалась деионизованная дистиллированная (DI) вода, приготовленная в системе Milli-Q-RO4 (Millipore).

Статистический анализ. Построение графика и расчет значений стандартного отклонения и стандартной ошибки среднего производились с использованием программного обеспечения Origin 8.0 и Prism 6 – GraphPad. Данные анализировались с использованием теста дфуфакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Во всех случаях была принята альтернативная гипотеза (значения мат. ожиданий отличаются), т.к. $p < 0.05$, а $F_{\text{крит.}} < F$. Значения $p < 0.05$ считались значимыми.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Синтез и функционализация наночастиц

2.2.1.1 Синтез гибридных НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ гантелевидной формы

Синтез димерных НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ в гантелевидной форме проводился методом совместного термического разложения $\text{Fe}(\text{CO})_5$ и HAuCl_4 [165] с некоторыми модификациями. В трехгорлой круглодонной колбе объемом 250 мл с термометром и трубкой для подачи газа (аргон/азот) смешивали 20 мл 1-октадецена, 2 мл олеиламина и 1.9 мл олеиновой кислоты. Полученную смесь нагревали до 120° в интенсивном потоке инертного газа при перемешивании в течение 30 минут. Затем устанавливали систему с обратным холодильником, уменьшали расход газа и вводили шприцем 1.9 мл $\text{Fe}(\text{CO})_5$. Через 3 минуты добавляли смесь, содержащую 40 мг $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (прекурсор наночастиц Au), 0.5 мл олеиламина и 5 мл 1-октадецена, предварительно выдержанную в атмосфере инертного газа в течение 7-10 минут. Реакционную смесь нагревали со скоростью $3^\circ/\text{мин}$ до температуры кипения ($300\text{--}320^\circ$) и выдерживали при этой температуре 45 минут. После этого раствор в колбе охлаждали при

перемешивании до комнатной температуры и окисляли кислородом воздуха в течение часа.



Рис. 14. Схема получения НЧ Fe_3O_4 -Au со структурой «гантель»

Для очистки НЧ от избытка 1-октадецена, олеиновой кислоты и олеиламина полученный раствор распределяли по 2 мл в каждую пробирку, ресуспендируя в 13 мл изопропанола. Затем центрифугировали со скоростью 6000 об/мин в течение 20 минут, после чего осадок отделяли с помощью магнита. Этот процесс повторяли 4-6 раз, до получения прозрачного супернатанта. Очищенные димерные НЧ ресуспендировали в 5 мл гексана.

2.2.1.2 Стабилизация магнитной поверхности НЧ Fe_3O_4 -Au ДФУК (НЧ/ДФУК)

Для получения стабильных водных коллоидных растворов НЧ магнетита-золота использовали метод покрытия их 3,4-дигидроксифенилуксусной кислотой (ДФУК) (Рис. 15). Сначала приготовили смесь из 51 мг ДФУК, 24 мг гидроксида натрия и 10 мл метанола, перемешивая раствор в течение 10 минут. Затем в полученный раствор добавили смесь из 7 мл гексана и 3 мл наночастиц ($C_{\text{Fe}} = 1 \text{ мг/мл}$) и перемешивали на водяной бане при 50° в течение 6–8 часов. После этого смесь охлаждали при непрерывном перемешивании в течении 8-12 часов до комнатной температуры.

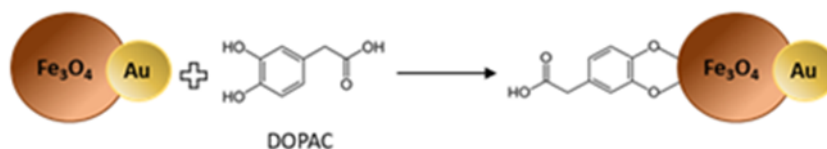


Рис. 15. Схема покрытия ДФУК магнитной части НЧ Fe_3O_4 -Au

После этого НЧ/ДФУК переносили в фальконы для центрифугирования и осаждали при 6000 об/мин в течение 20 минут. Осадок удаляли с помощью магнита, затем НЧ диспергировали в дистиллированной воде и очищали повторным центрифугированием в фальконах с центрифужными фильтрами (30 кДа) при 6000 об/мин в течение 7 минут до обесцвечивания надосадочной жидкости.

2.2.1.3 Модификация ПЭГ (НЧ/ДФУК/ПЭГ)

Поскольку НЧ/ДФУК достаточно нестабильны и склонны к агрегации, необходима их дополнительная стабилизация молекулами NH_2 -ПЭГ- COOH ($M_w \sim 1100$ г·моль⁻¹). Для осуществления ковалентной конъюгации карбоксильные группы ДФУК на поверхности магнетита были предварительно активированы карбодиимидным методом (EDC/NHS) (Рис. 16). С расчетом на 1 мл Fe_3O_4 -Au/ДФУК ($C_{\text{Fe}} = 1$ мг/мл) добавляли свежие водные растворы NHS (10 мг/мл) и EDC (10 мг/мл) поочередно в количестве 8 и 14 мкл соответственно. Для завершения реакции активации смесь перемешивали на шейкере в течение 20 мин.



Рис. 16. Схема реакции активации карбоксильной группы на НЧ/ДФУК карбодиимидным методом

Далее к полученному раствору с расчетом на 1 мл Fe_3O_4 -Au/ДФУК ($C_{\text{Fe}} = 1$ мг/мл) добавляли 5 мг водного раствора NH_2 -ПЭГ- COOH ($M_w \sim 1100$ г·моль⁻¹) с концентрацией 100 мг/мл и перемешивали на шейкере в течение ночи. Модифицированные НЧ/ДФУК/ПЭГ (Рис. 17) очищали от избытка непрореагировавших веществ путем многократного центрифугирования с

добавлением дистиллированной H_2O со скоростью 3000 об/мин (RCF 1710g) на центрифужных фильтрах (Millipore Amicon Ultra-4, 30 кДа) до прозрачности супернатанта.

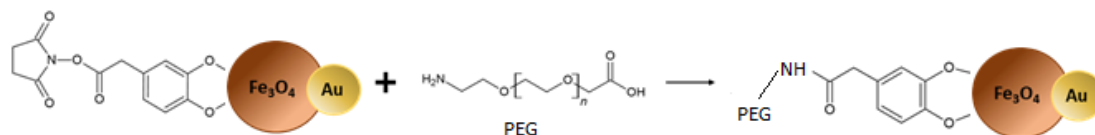


Рис. 17. Схема покрытия НЧ/ДФУК ПЭГ (НЧ/ДФУК/ПЭГ)

2.2.1.4 Ковалентная конъюгация фотосенсибилизатора (НЧ/ФС)

Флуоресцентный краситель бактериофеофорбидного ряда (ФС) был синтезирован в МИРЭА в лаборатории химии и технологии биологически активных соединений под руководством к.х.н. Островерхова П.В. А именно по методике [172] к раствору метилового эфира бактериофеофорбида в пиридине добавляли 1,4-диаминобутан и кипятили в атмосфере аргона в течение 6 часов (Рис. 18). После реакции органический слой выделяли с помощью хлороформа и сушили на ротаторном испарителе. Продукт очищали методом препаративной тонкослойной хроматографии (хлороформ/метанол).

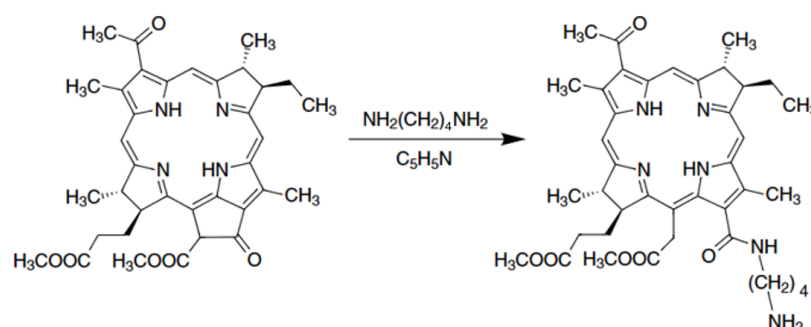


Рис. 18. Схема синтеза ФС бактериофеофорбидного ряда

Далее раствор НЧ/ДФУК/ПЭГ (с активированной карбоксильной группой NH_2 -ПЭГ- COOH карбодиимидным методом описанным ранее) по каплям добавляли к раствору ФС в ДМСО, приготовленному из расчета 0,5 мг ФС на

1 мл водного раствора НЧ/ДФУК/ПЭГ ($C_{\text{Fe}} = 1$ мг/мл), принимая в расчёт соотношение растворителей ДМСО/ $\text{H}_2\text{O} = 30/70$ (Рис. 28). Реакция ковалентной конъюгации ФС на магнитную поверхность НЧ/ДФУК/ПЭГ шла 8-12 часов при перемешивании на шейкере. Избыток гидрофобного несвязанного ФС удаляли повторным центрифугированием со скоростью 3000 об/мин (RCF 1710g) с использованием фальконов с центрифужными фильтрами (Millipore Amicon Ultra-4, 30 кДа) 8-10 раз до прозрачности надосадочной жидкости. При каждой итерации очистки супернатант ресуспендировали смесью ДМСО/ $\text{H}_2\text{O} = 30/70$. После достижения прозрачности надосадочной жидкости центрифугировали 2-3 раза с ресуспендированием супернатанта только дистиллированной H_2O для полного удаления ДМСО.

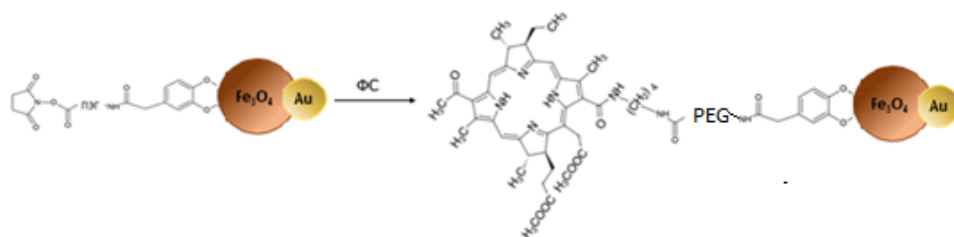


Рис. 19. Схема ковалентной конъюгации НЧ/ДФУК/ПЭГ с ФС (НЧ/ФС)

Для подтверждения полного удаления несвязавшегося ФС, были сняты спектры поглощения с алиquotы супернатанта и надосадочной жидкости (очищенных НЧ/ФС). После производили расчеты процента загрузки ФС на магнитную поверхность НЧ. Количество ФС, загруженного на магнитную поверхность НЧ, варьировалась в пределах 20–25% от максимально возможного в зависимости от партии (емкость загрузки ФС достигает 0.5 мг на 1 мг Fe).

2.2.1.5 Ковалентная конъюгация флуорофора (НЧ/ФФ)

Для конъюгации ФФ с золотой поверхностью НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ необходима тиольная или дисульфидная группа, чтобы обеспечить прочную ковалентную связь Au-S (энергия связи 40 ккал/моль). Дисульфидная форма красителя была синтезирована по методике [173] из Су5 (Рис. 20). В пробирку Эппендорфа добавили 0.1 мг сульфозефира NHS Су5 в 100 мкл деионизированной воды, затем 0.02 мг дигидрохлорида цистамина в 900 мкл 1хPBS (pH 8.3-8.5). Смесь перемешивалась на встряхивании и инкубировалась на шейкере при комнатной температуре в течение 4 часов.

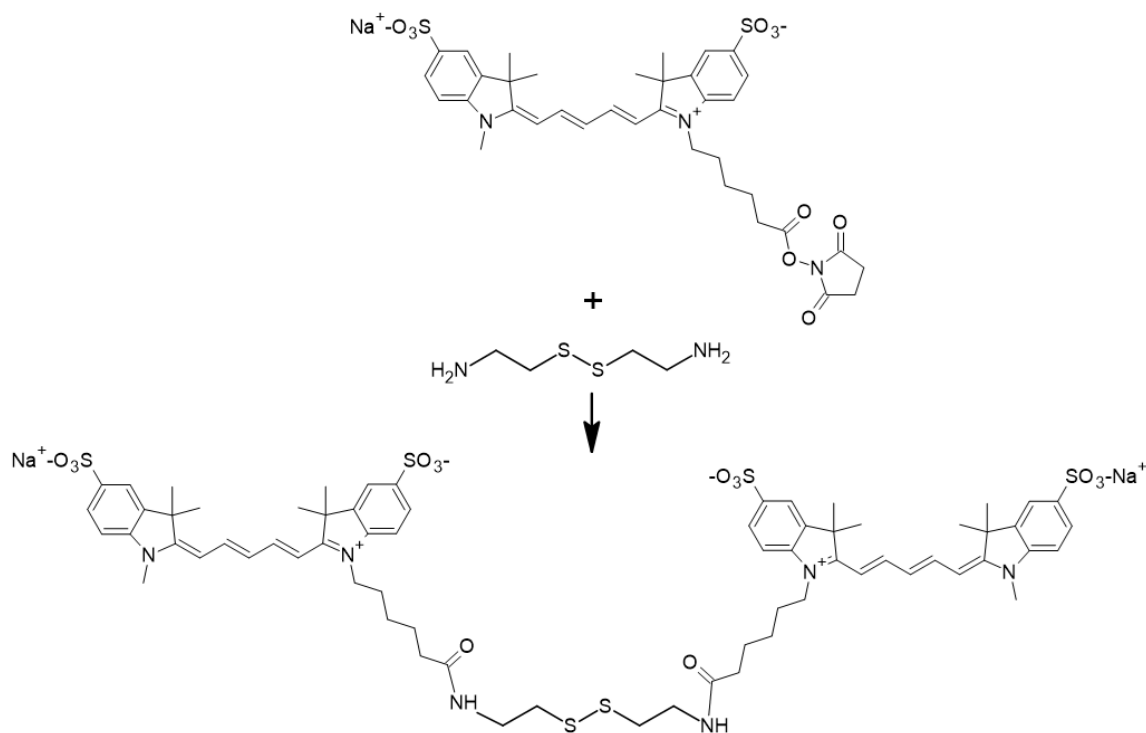


Рис. 20. Схема синтеза цианинового производного ФФ - дисульфид сульфо - Су5

Полученное дисульфидное производное сульфо - Су5 смешивали с 1 мл раствора НЧ/ДФУК/ПЭГ ($C_{\text{Fe}} = 1$ мг/мл) на шейкере в 8-12 часов при комнатной температуре. От избытка непрореагировавшего красителя избавлялись методом многократного центрифугирования с добавлением дистиллированной H_2O со скоростью 3000 об/мин (RCF 1710g) с

использованием центрифужных фильтров (Millipore Amicon Ultra-4, 30 кДа) до прозрачности надосадочной жидкости. Для подтверждения полного удаления несвязавшегося красителя, были сняты спектры поглощения с аликвоты супернатанта и надосадочной жидкости (очищенных НЧ/ФФ). После производили расчеты процента загрузки ФФ на золотую поверхность НЧ (Рис. 21). Количество ФФ, загруженного на поверхность НЧ золота, варьировалась в пределах 38–40% от максимально возможного в зависимости от партии (емкость загрузки ФФ достигает 0.065 мг на 1 мг Fe).

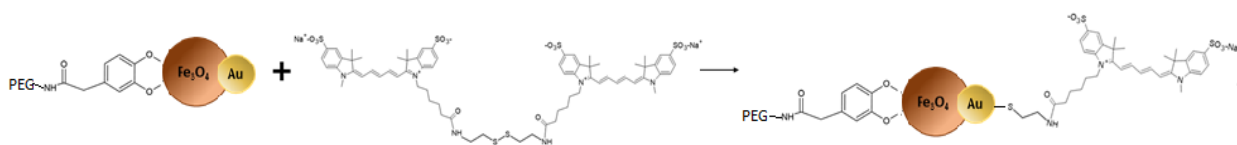


Рис. 21. Схема ковалентной конъюгации НЧ/ДФУК/ПЭГ с ФФ (НЧ/ФФ)

2.2.1.6 Синтез системы НЧ/ФС/ФФ

Синтез наноконструкции НЧ/ФС/ФФ осуществлялся методом ковалентной конъюгации ФФ с системой НЧ/ФС по методике раздела «Ковалентная конъюгация флуорофора (НЧ/ФФ)» (Рис. 22). Методика очистки от избытка непрореагировавшего ФФ также аналогична.

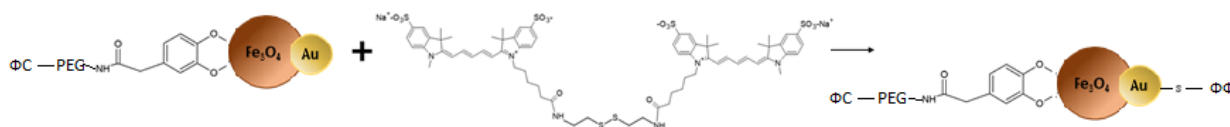


Рис. 22. Схема ковалентной конъюгации НЧ/ФС с ФФ (НЧ/ФС/ФФ)

Расчеты процентов загрузок ФС и ФФ на магнитную и золотую поверхности соответственно проводили по методикам, описанным в пунктах 2.2.1.4 и 2.2.1.5.

2.2.1.7 Синтез смеси конъюгатов НЧ/ФС + НЧ/ФФ

Смесь конъюгатов (НЧ/ФС + НЧ/ФФ) получали смешением растворов НЧ/ФС и НЧ/ФФ, приготовленных по методикам описанных выше (см. пункты 2.2.1.4 и 2.2.1.5), в соотношении по концентрации магнетита 1:1.

2.2.2 Характеристика физических и химических свойств

наночастиц

Кристаллическая структура образцов была исследована с помощью метода РФА на рентгеновском порошковом дифрактометре Rigaku Ultima IV с использованием Co K_α излучения. Данные собирались при углах дифракции $2\theta = 30 - 120^\circ$ с шагом 0.1° и временем экспозиции 3 секунды на точку. Обработка результатов проводилась с использованием программных пакетов OUTSET и PHAN для качественного фазового анализа, а также SPECTRUM и PHAN% для количественного анализа. В процессе подгонки спектров оптимизировались параметры решетки, количество каждой фазы и размер кристаллитов.

Размер, морфология и структура НЧ в образцах изучались методом ПЭМ на электронном микроскопе JEOL JEM-1400 при ускоряющем напряжении 120 кВ. Обзорные изображения были получены в обычном режиме ТЕМ в светлом поле, а для изображений с высоким разрешением использовались как светлое, так и темное поле с высокоугловым кольцевым детектором (HAADF-STEM). Образцы подготавливались путем нанесения и испарения капли суспензии НЧ в воде или изопропанолe на медную сетку с полимерным или углеродным покрытием (300 mesh). Средний диаметр НЧ рассчитывался на основе анализа около 1000 частиц для каждого образца с использованием программного обеспечения ImageJ. Энергодисперсионную рентгеновскую спектроскопию (EDX) и рентгеноспектральный микроанализ (РСМА) проводили с детектором Oxford X-max.

Статические магнитные свойства НЧ (гистерезисные петли, температурная зависимость намагниченности) исследовались на вибромагнетометре в системе Quantum Design PPMS DynaCool в синтетических капсулах, содержащих порошок НЧ или их раствор ($1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ в DI H_2O /1xPBS).

Элементный состав образцов (железо и золото) определялся методом атомноэмиссионной спектроскопии (АЭС) с микроволновой плазмой на приборе Agilent 4200 MP-AES. Для измерений готовились серии из пяти калибровочных стандартов в диапазоне концентраций $0.1 - 1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ (Au) и $0.5 - 2 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ (Fe) путем разбавления коммерческих стандартных растворов в деионизированной воде. Образцы растворялись в смеси HCl и HNO_3 в соотношении 3:1 (царская водка), разбавленной DI водой.

Для *ex vivo* исследований через 24 часа после внутривенных инъекций НЧ/ФС, НЧ/ФФ, НЧ/ФС/ФФ ($5 \text{ мг} \cdot \text{кг}$ по ФС), для группы получавшей смесь НЧ/ФФ+НЧ/ФС дозировка по ФС составляла 2.5 мг/кг . Для НЧ/ФФ дозу подбирали так, чтобы доза ФФ была равна дозе ФФ в группе НЧ/ФС/ФФ. Количество мышей в группах ($n = 5$) анестезировали внутрибрюшинной инъекцией 200 мг/кг кетамина (Московский эндокринный завод, Россия) и 10 мг/кг ксилазина (Нита-Фарм, Россия). После завершения исследования эффективности ФДТ извлекали и взвешивали печень, селезенку, почки, легкие, сердце и опухоль, растворяя их в царской водке в течение 1 недели. Количественное определение концентраций железа и золота осуществляли с помощью атомно-эмиссионной спектроскопии (АЭС), как описано ранее. В качестве контроля ($n = 5$) использовали органы животных, которым не вводили НЧ, для измерения эндогенного уровня Fe и Au. Полученные значения вычитались из соответствующих уровней накопления Fe и Au в опытной группе, что позволяло получить концентрацию Fe и Au, связанную с введением наночастиц (мкг/г ткани). Расчеты эффективности доставки НЧ основывались на концентрации Fe и Au в опухолевых тканях, массе опухоли и вводимой дозе ($\pm \Delta \text{Fe}$ рассчитывалось по ГОСТ Р 57165-2016).

Для характеристики коллоидных растворов определялись гидродинамический размер и ζ потенциал образцов методом ДРС с использованием анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments), а также при анализе траектории наночастиц (NTA) на приборе NanoSight NS500. Разбавленные водные коллоидные растворы образцов (концентрация Fe в диапазоне 0.1 – 0.3 мг/мл) измерялись в режиме обратного рассеяния при 173° и температуре 25°. Средний гидродинамический диаметр НЧ, поверхностный заряд и стандартные отклонения получались в результате трех экспериментов, каждый из которых состоял из 13 измерений для каждого образца. Оптические спектры НЧ в видимом диапазоне (400-800 нм) записывались с использованием прибора Thermo Scientific Multiscan GO, а спектры флуоресценции регистрировались на SpectraMax M5.

Количественное определение железа в образцах НЧ проводилось колориметрическим методом с использованием теста Феррозин и стандартной калибровочной кривой, а также методом АЭС.

Приготовление феррозинового теста. На каждом этапе последующих экспериментов необходимо оценивать концентрацию Fe в растворе НЧ. Для этого был приготовлен феррозиновый тест: 385.4 мг ацетата аммония, 352.2 мг L-аскорбиновой кислоты и 32.13 мг феррозина растворяли в 10 мл DI H₂O. Полученный раствор использовали для спектрофотометрического измерения концентрации Fe. В 10 мл деионизированной воды растворили 3.584 г ацетата аммония, 32.13 мг феррозина и 3.522 г аскорбиновой кислоты. Из раствора феррозина готовили серию растворов с концентрациями по Fe: 0.063; 0.125; 0.25; 0.5; 1 мг/мл. 20 мкл раствора НЧ растворяли в 80 мкл концентрированной HCl и разбавляли в 10 раз DI H₂O. К 400 мкл полученного раствора НЧ добавляли 200 мкл DI H₂O и 40 мкл феррозинового теста. Далее по 300 мкл приготовленного раствора добавляли в 2 лунки 96-луночного планшета. Феррозин образует с ионами Fe устойчивый фиолетовый железо-феррозиновый комплекс, интенсивность окраски которого прямо пропорциональна концентрации Fe в растворе. Интенсивность

поглощения света измеряли при длине волны 560 нм на спектрофотометре Thermo Scientific Multiskan GO.

Магнитно-резонансную томографию (МРТ) измеряли в пробирках на 500 мкл при 18 ° в томографе ClinScan 7 Тл (Bruker BioSpin). Релаксивность R_2 протонов водорода в присутствии $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ НЧ, модифицированных ДФУК–ПЭГ– COOH , ФФ и/или ФС, определяли путем линейной подгонки различных концентраций Fe от 0.01 до 0.5 мМ в воде. Получение изображений выполнялось в режиме Spin Echo со следующими параметрами: время повторения (TR) 10 с, время эхо (TE) 16, 24, ..., 256 мс, угол переворота 180° , разрешение 640×448 пикселей, поле зрения $120 \times 82,5$ мм². Интенсивности сигналов определяли с помощью программного обеспечения ImageJ, а время релаксации T_2 рассчитывали путем экспоненциальной аппроксимации как функции времени эхо (TE). Значения R_2 -релаксивности были рассчитаны путем линейной подгонки времен T_2 -релаксации как функции концентрации Fe.

2.2.3 Характеристика FRET пары хромофоров

Расчет эффективности переноса энергии необходим для оценки подобранной FRET-пары. Минимальное полученное значение эффективности переноса, говорит о максимально используемой энергии для образования синглетного кислорода. Для расчета константы скорости FRET-процесса используется соотношение [121]: $k_{FRET} = \frac{1}{\tau} \cdot \left(\frac{R_0}{r} \right)^6$, где t – время жизни флуоресценции донора в отсутствие акцептора, с; r – расстояние между донором и акцептором, нм; R_0 – критический радиус Ферстера, нм.

Значение R_0 рассчитывается в соответствии с уравнением [122]:

$$R_0^6 = \frac{900 \ln 10 \kappa^2 \phi_{D,0}^f}{128 \pi^2 N_A n^4} \int_0^\infty J(\lambda), \text{ где } \kappa^2 - \text{фактор ориентации, который зависит от}$$

взаимного расположения дипольных моментов переходов донора и акцептора

(принимаемый как $2/3$); $\varphi_{D,0}^{\text{fl}}$ – квантовый выход флуоресценции донора в отсутствие акцептора ($\varphi^{\text{fl}} = 0,2$ взятого ФФ); n – показатель преломления растворителя; N_A – постоянная Авогадро; $J(\lambda)$ – интеграл соответствует степени перекрытия между нормированным спектром излучения донора со спектром поглощения акцептора, л·нм⁴/(моль·см). Величина $J(\lambda)$ может быть

вычислена по формуле: $J(\lambda) = \frac{\int_0^\infty I_D(\lambda) \varepsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty I_D(\lambda) d\lambda}$, где $I_D(\lambda)$ – спектр

флуоресценции донора (ФФ); $\varepsilon_A(\lambda)$ – спектр поглощения акцептора (ФС), л·моль⁻¹·см⁻¹; λ – длина волны, нм.

Эффективность FRET сильно зависит от расстояния R между донором и акцептором [123]: $Q_{\text{FRET}} = \frac{R_0^6}{R_0^6 + r^6}$, где r – реальный радиус между донором и акцептором, нм.

Определение количества ФС и ФФ на НЧ Fe₃O₄-Au проводили методом спектрофотометрии. Во всех случаях использовался линейный калибровочный график, построенных для свободных хромофоров (Су5, ФС) известной концентрации. В случае Су5 (ФФ) поглощение регистрировали на длине волны 650 нм, ФС – 350 нм, 520 нм и 750 нм (3 пика). В качестве фона использовали растворы НЧ/ДФУК/ПЭГ без добавления хромофоров. При синтезе НЧ/ФС, НЧ/ФФ и НЧ/ФС/ФФ осуществлялась очистка от свободных хромофоров в растворе после реакции конъюгации путем центрифугирования. Для каждом из полученных систем измеряли поглощение надосадочной жидкости на длине волны 650 нм и 520 нм (пики поглощения ФФ и ФС соответственно). В качестве отрицательного контроля (0% свободного ФС и/или ФФ в растворе) использовался образец НЧ/ДФУК/ПЭГ идентичной концентрации после аналогичной процедуры центрифугирования/декантации. Положительный контроль (100% свободного ФС и/или ФФ в растворе) был получен путем приготовления растворов ФС и ФФ аналогичных

концентраций, используемых при конъюгациях. После вычитания фона (НЧ/ДФУК/ПЭГ), поглощение синтезируемых систем (НЧ/ФС, НЧ/ФФ и НЧ/ФС/ФФ) делили на поглощение растворов ФС, ФФ и ФС/ФФ соответственно и выражали в %.

Спектры поглощения и флуоресценции получали на многофункциональном анализаторе Thermo Scientific Varioskan LUX Multimode Microplate Reader (США). Спектры записывали при комнатной температуре в кварцевых кюветах (0.4×1.0 см) с длиной оптического пути 1 см (спектральная ширина щели 1 нм). Спектры поглощения ПС и ФП (растворитель ДМСО) записывали в диапазоне 300-900 нм. Спектры флуоресценции ФС регистрировали в диапазоне 550-900 нм (длина волны возбуждения 530 нм) и ФФ в диапазоне 670-900 нм (длина волны возбуждения 650 нм). Спектры поглощения НЧ/ФС, НЧ/ФФ, НЧ/ФС/ФФ и смеси конъюгатов НЧ/ФС + НЧ/ФФ в диапазоне длин волн 300-900 нм.

НПВО ИК-спектроскопия с Фурье преобразованием использовалась для подтверждения эффективной конъюгации ФС на магнитную поверхность, ФФ на золотую поверхность НЧ (наличия пептидной и S-Au связей в образцах НЧ/ФФ, НЧ/ФС и НЧ/ФС/ФФ). НПВО ИК-спектры были записаны с использованием спектрометра Bruker Tensor 27, оснащенного детектором на основе кадмия ртути теллурида (МСТ), охлаждаемым жидким азотом. Образцы размещались в термостатированной ячейке BioATR-II с ATR-элементом из ZnSe (Bruker, Германия). Спектрометр ATR-FTIR очищался постоянным потоком сухого воздуха. Спектры ATR-FTIR регистрировались в диапазоне от 900 до 3000 см^{-1} с разрешением 1 см^{-1} . Для каждого спектра аккумулировалось 100 сканирований с частотой 20 кГц, после чего данные усреднялись. Все спектры регистрировались в водном буферном растворе при температуре 22 °, концентрация НЧ в образцах составляла 1–2 мг/мл по Fe.

Для изучения спектральных характеристик образцов в качестве контроля использовался раствор НЧ/ДФУК/ПЭГ соответствующей концентрации. Спектральные данные обрабатывались с помощью

программного обеспечения Bruker Opus 7.5 (Bruker, Германия), которое включает линейное вычитание контроля, коррекцию базовой линии и компенсацию атмосферы. При необходимости применялось семи- или девятиточечное сглаживание Савицкого-Голея для удаления белого шума. Пики идентифицировались с помощью стандартной процедуры определения пиков Bruker.

Биологические исследования

Интернализацию клеточной линии CT26 исследовали с помощью конфокальной визуализации. Клетки CT26 высевали в чашку Петри с 1.5 мл ростовой среды (200×10^3 клеток на лунку) и инкубировали в течение 24 часов. Затем питательную среду удаляли и заменяли на PBS. Клетки инкубировались в течение разных временных промежутков (15, 30, 60 и 120 минут) и дважды промывались HBSS с ионами кальция и магния. Визуализацию проводили на микроскопе Nikon Eclipse Ti2 (Nikon, Токио, Япония), оснащенном лазерным сканирующим устройством (ThorLabs, Нью-Джерси, США) и водоиммерсионными линзами Apo 25 $\times$ /1.1. Сканирование выполнялось с использованием программного обеспечения ThorImageLS (версия 2.4) (Thorlabs, Нью-Джерси, США), а обработка изображений проводилась в Fiji.

Для оценки фотоиндуцированной и темновой активности использовалась линия клеток CT26 аденокарциномы толстой кишки мышей (коллекция Института вирусологии им. Д.И. Ивановского). Клетки культивировали в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 2 mM L-глутамина и 10% сыворотки фетальной бычьей крови (FBS) («Corning», США) в культуральных флаконах площадью 25 см² («Corning», США) при температуре 37° в атмосфере с 5% углекислого газа. Для пассирования клеток с субстрата использовался раствор Версена («ПанЭко», Россия). Для исследований *in vitro* использовались клетки третьего и четвертого пассажей с оптимальной концентрацией затравки 10×10^4 клеток/мл. Все полученные объемы веществ фильтровали через мембранный фильтр Millipore с размером пор 0.45 мкм. Далее полученные образцы разводили в 24-луночных планшетах

(Corning, США) в среде культуры клеток. Конечная концентрация веществ варьировала от 4000 нг/мл до 20 нг/мл.

Конфокальная микроскопия, исследования цитотоксичности и фототоксичности. Для экспериментов опухолевые клетки СТ26 высевали в 96-луночные планшеты, по 10×10^3 клеток на лунку в объеме 100 мкл. Клетки были в экспоненциальной фазе роста через 24 часа после посева. Растворы соединений добавляли в полную культуральную среду в конечной концентрации от 20 нг/мл до 4000 нг/мл, в тройных образцах. Инкубация клеток с соединениями перед облучением проводилась в течение 0,5, 2 и 4 часов. Культуральная среда использовалась в качестве контроля. Световое воздействие осуществлялось с помощью галогенной лампы через широкополосный фильтр КС-10 ($\lambda > 620$ нм) с дозой 10 Дж/см². После светового воздействия планшеты помещали в СО₂-инкубатор на 24 часа. Для оценки цитотоксичности клетки инкубировались с веществами в течение 24 часов в затемненных условиях в СО₂-инкубаторе.

Выживаемость клеток оценивалась с помощью колориметрического МТТ-теста (через 24 часа после облучения). Этот тест основан на способности дегидрогеназ живых клеток превращать желтый водорастворимый 3-(4,5-диметил-тетразолил-2)-2,5-дифенилтетразолия бромид в синие кристаллы формазана, количество которых измерялось спектрофотометрически. Перед началом теста клетки отмывали от цитотоксических агентов, затем добавляли 0,5% раствор МТТ и инкубировали в стандартных условиях в течение 3 часов. После инкубации среду с реагентом удаляли, а кристаллы формазана растворяли в диметилсульфоксиде в течение 10 минут. Оптическую плотность измеряли на многоканальном планшетном фотометре Multiscan FC (Thermo Scientific) при длине волны 550 нм. Уровень задержки роста клеток (ИР) рассчитывался по формуле: $\text{ИР (\%)} = [(OD_k - OD_o) / OD_k] * 100\%$, где OD_o – оптическая плотность формазана в экспериментальных лунках, OD_k – оптическая плотность формазана в контрольных лунках. Биологически

значимым эффектом считалось ингибирование роста клеток более чем на 50% (ИК₅₀, нг/мл).

Животные и опухолевые модели.

Исследование биораспределения проводили на мышах линии Balb/c с имплантированной подкожно опухолью карциномы толстого кишечника СТ26 на 12 сутки после имплантации. Раствор НЧ/ФФ, НЧ/ФС, НЧ/ФС/ФФ и смесь НЧ/ФС+НЧ/ФФ вводили внутривенно мышам в объеме 100-200 мкл. Для образцов НЧ/ФС и НЧ/ФС/ФФ дозировка по ФС составляла 5 мг/кг, тогда как для группы получавшей смесь НЧ/ФФ+НЧ/ФС дозировка по ФС составляла 2,5 мг/кг. Для НЧ/ФФ дозу подбирали так, чтобы доза ФФ была равна дозе ФФ в группе НЧ/ФС/ФФ. Спустя 6 часов после введения животных выводили из эксперимента путем цервикальной дислокации, забирали сердце, легкие, печень, селезенку, почки и опухоль и детектировали флуоресценцию *ex vivo* с помощью системы для прижизненной детекции флуоресценции IVIS Spectrum-CT (Perkin-Elmer, США). Флуоресценцию ФФ детектировали при длине волны возбуждения 640 нм и длине волны испускания 700 нм. Флуоресценцию ФС детектировали при длине возбуждения 745 нм и длине волны испускания 800 нм. Анализ изображений проводили с помощью программы Living Image 4.7.4 (Perkin-Elmer, США). Выбор животных и опухолевых моделей был сделан, руководствуясь обзорами научных исследований данных моделей, их восприимчивости к фотодинамической терапии [122,174].

Изучение фотоиндуцированной противоопухолевой эффективности in vivo.

Лабораторные животные

Исследования проведены на мышах линии Balb/CJLac, самках, полученные из питомника «Андреевка» ФГБУН "НЦБМТ" ФМБА России НПП. В исследовании использовали половозрелых мышей (масса тела – 20 – 22 г; возраст – 9 – 13 недель). Все животные имели ветеринарный паспорт и сертификат качества.

Животные в течение всего срока исследования содержались в контролируемых условиях окружающей среды (температура – плюс 26 – 28°C и относительная влажность – 30 – 70 %).

Эксперименты на животных проведены в соответствии с руководством по уходу за лабораторными животными и их использованию Национального медицинского исследовательского радиологического центра Министерства здравоохранения Российской Федерации и в соответствии с правилами и требованиями Европейской конвенции ETS/STE N 123 и международного стандарта GLP (OECD Руководство 1: 1998). Протоколы экспериментов на животных были одобрены Этическим комитетом.

Опухолевая модель

Исследования проводили у животных с аденокарциномой толстой кишки мыши СТ26. Для экспериментов мышам клетки СТ256 прививали по 1 млн. подкожно, на внешнюю сторону бедра. Клетки наращивали в стандартных условиях на среде RPMI1640 с добавлением 2 мМ-L-глутамина (ПанЭко, Россия) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки добавлением (Biowest, Южная Америка). Для прививки животным использовали клетки 3 пассажа.

Методика проведения фотодинамической терапии (ФДТ) у животных карциномой толстой кишки СТ

ФДТ у мышей проводили на 9-й день роста опухоли, средний размер опухолевых образований составлял 135.0 ± 15.0 мм³.

Субстанции вводили однократно внутривенно в дозе 5.0 мг/кг. Облучение проводили светодиодным источником с длиной волны 754 ± 28 нм (Россия), состоящий, собственно, из источника света, оптического гомогенизатора в виде прямоугольной восьмигранной призмы, регулятора мощности светового излучения (от 30 до 150 мВт/см²) и стрелочного индикатора тока световода. Контролем служила группа животных, которым вводили PBS (ООО «ЭКО-Сервис», Россия), без светового воздействия.

Облучение проводили в монопозиционном режиме (одно поле облучения) при плотности мощности $150,0 \text{ мВт/см}^2$, световая доза составила 150 Дж/см^2 , время экспозиции - 60 минут.

Опытные и контрольная группы состояли из 5 животных. Дизайн исследования представлен в Таблица 1.

Таблица 1. Дизайн исследования

№ группы	Количество животных	ФС	Параметры фотодинамического воздействия		
			Доза ФС, мг/кг	Интервал между введением ФС и облучением	Режимы ФДТ
Опытные группы					
1	5	НЧ/ФС	5.0	60 минут	Ps = 150.0 мВт/см ² E = 150.0 Дж/см ²
2	5	НЧ/ФС/ФФ	5.0		
3	5	НЧ/ФС+НЧ/ФФ	5.0		
4	5	НЧ/ФС/ФФ	5.0	Без облучения	
Контрольная группа					
5	5	PBS	0.2 мл	Без облучения	

За 15 минут до начала светового воздействия мышей седировали введением 2.5% раствора дроперидола (ФГУП «Московский эндокринный завод», Россия) внутривенно по 0.10 мл/мышь.

Клинические наблюдения и регистрируемые параметры

После сеанса облучения регистрировали общее состояние животных, образование отека и повреждение кожного покрова в зоне облучения. Клинический осмотр животных проводили через 2 часа после проведенного лечения и затем каждые 3 – 4 дня до гуманной конечной точки, которая характеризовалась в проводимых исследованиях следующими признаками: объём опухоли превышал 2000 мм^3 , опухоли, доступные визуальному осмотру, были изъязвлены и/или некротизированы, снижение двигательной активности, вялость и др.

В ходе осмотра наблюдали за общим состоянием животных, наличием (или отсутствие) побочных эффектов, регистрировали размеры подкожной опухоли в 3-х взаимно перпендикулярных проекциях, массу тела мышей с использованием весов AND HT-500 04757 (Япония), продолжительность жизни.

Критерии оценки эффективности

Размер подкожной опухоли определяли путем измерения опухолевых образований при помощи электронного цифрового штангенциркуля STORM™ 3C301 (Central Tools, Inc, США) в трех взаимно перпендикулярных проекциях.

Объем опухоли рассчитывали по формуле (1):

$$V = a \times b \times c \times 0.52 \quad (1)$$

где a, b, c – три взаимно перпендикулярных диаметра опухоли.

Критериями оценки эффективности являлись: торможение роста опухоли (ТРО), степень торможения роста опухоли (Т/С), увеличение продолжительности жизни (УПЖ), и излеченность.

ТРО – торможение роста опухоли рассчитывали по формуле (2):

$$\text{ТРО} = \frac{V_k - V_o}{V_k} \times 100\% \quad (2)$$

где V_o и V_k – средний объем опухоли в опытной и контрольной группах, соответственно.

Показатель степень торможения роста опухоли рассчитывали по формуле (3):

$$\text{Т/С} = \left[\frac{V_o}{V_k} \right] * 100\% \quad (3)$$

где V_k и V_o – средний объем опухоли на 21 сутки после окончания лечения в контрольной и опытной группах (мм^3), соответственно.

УПЖ – увеличение продолжительности жизни рассчитывали по формуле (4):

$$\text{УПЖ} = \frac{\text{СПЖ}_o - \text{СПЖ}_k}{\text{СПЖ}_k} \times 100\% \quad (4)$$

где $СПЖ_0$ и $СПЖ_k$ – средняя продолжительность жизни в опытной и контрольной группах, соответственно.

Медиану выживаемости рассчитывали по кривой, построенной по методу Каплан-Мейера.

3 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

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 (Рис. 23а). На представленных микрофотографиях (ПЭМ) (Рис. 23а) 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 $15 \text{ \AA}$ [122]. Стоит отметить, что использование для расчета эффективности переноса энергии данного значения будет соответствовать только случаю, когда ФФ и ФС закреплены на диаметрально противоположных частях НЧ. Поэтому за значение реального радиуса между донором (ФФ) и акцептором (ФС) было решено принять значение равное 7.5 нм. Таким образом, расчет эффективности переноса энергии для данной пары хромофоров составил 0.0064, что подтверждает практически полное подавление переноса энергии в случае иммобилизации на поверхности НЧ.

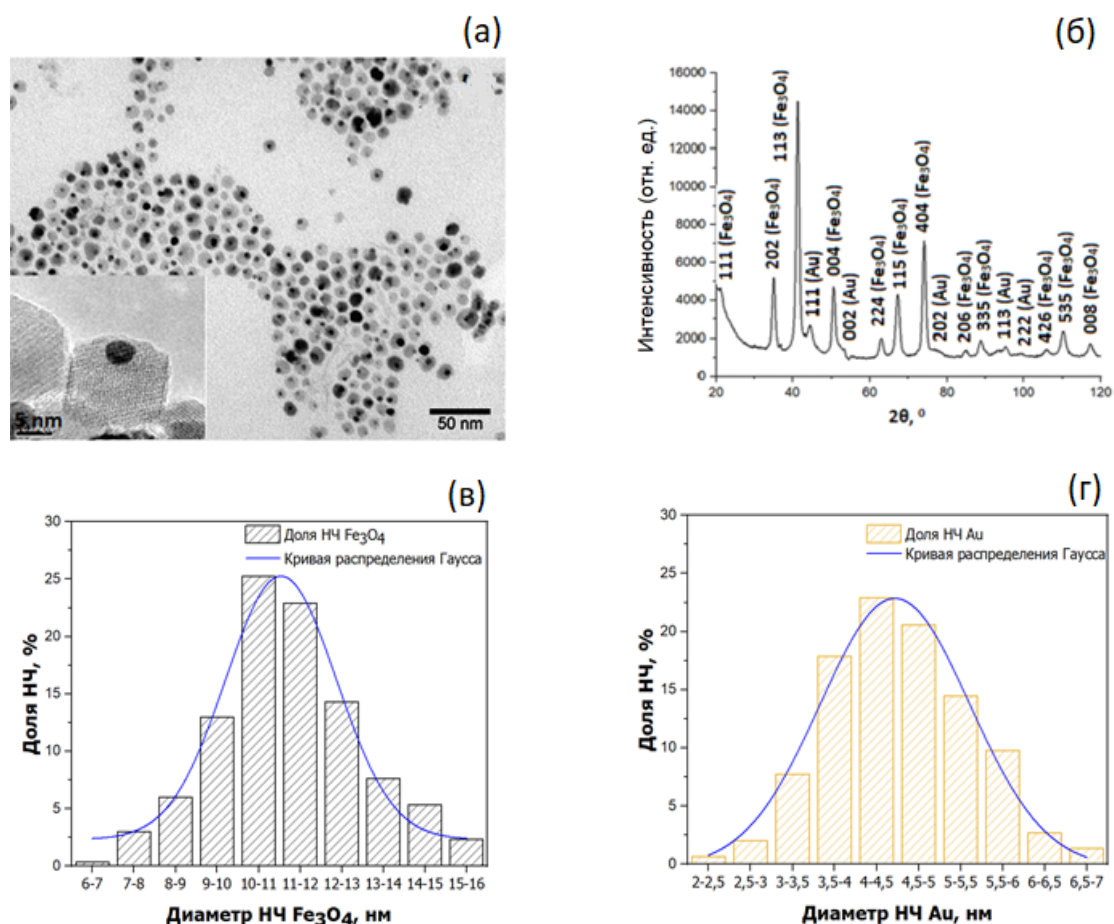


Рис. 23. ПЭМ-изображения НЧ Fe₃O₄ – Au вида «гантель» (а); Рентгенофазовый анализ НЧ (б) и распределение наночастиц оксида железа и золота по размерам (в, г)

Также имеется хорошее соответствие среднего размера кристаллитов по данным РФА и среднего диаметра НЧ по данным ПЭМ (Таблица 2). Можно также утверждать, что синтезированные НЧ являются монодисперсными (Рис. 23в, Рис. 23г). Кроме того, по данным рентгенограмм (Рис. 23б) наблюдается 100% соответствие спектров магнетита (ИКДД PDF-2 № 00-019-0629) и золота (ИКДД PDF-2 № 03-065-8601) компоненты всех образцов НЧ Fe₃O₄-Au, где определен тип структуры кубической шпинели Fd-3m (структура типа магнетита). Результаты магнитометрии (Рис. 24), где удельная намагниченность насыщения равна 55.2 (σ_s , А·м²·кг⁻¹), остаточная намагниченность насыщения равна 1.3 (σ_r , А·м²·кг⁻¹), коэрцитивная сила равна 3.3 (H_c , кА·м⁻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 [175,176]. Значения всех полученных параметров (σ_s , σ_r , H_c) коррелируют с данными, описанными в литературе [177,178].

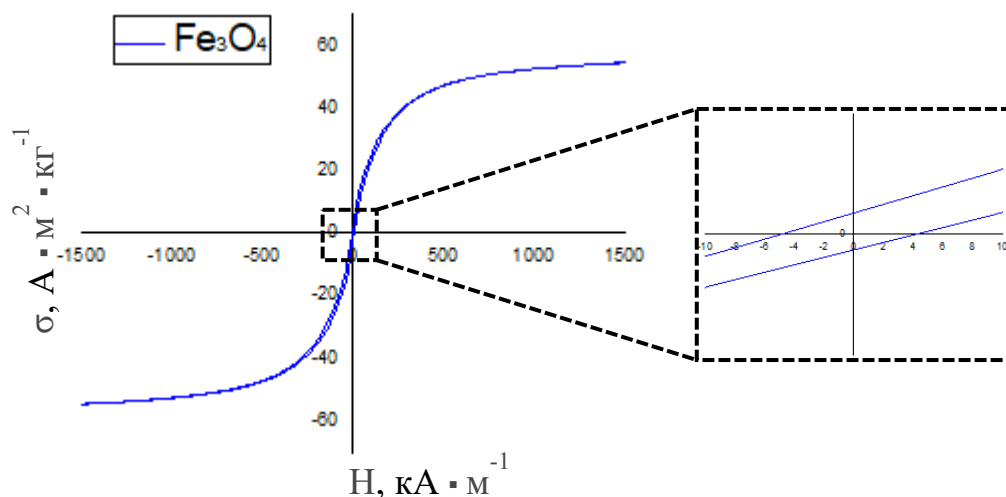


Рис. 24. Кривая намагниченности НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ вида «гантель»

Таблица 2. 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_3O_4	Au	Fe_3O_4	Au	Fe_3O_4	Au	Fe_3O_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

Для эффективной доставки к целевой опухолевой ткани НЧ должны обладать коллоидной стабильностью в водных растворах с рН и ионной силой, имитирующими условия физиологических жидкостей, таких как кровь. Помимо коллоидной стабильности, для достижения эффективной доставки наночастиц к опухоли необходима их длительная циркуляция в кровотоке. Обычные поверхностные немодифицированные НЧ обычно захватываются

РЭС, такой как печень и селезенка [179]. Предлагаемый механизм выведения наночастиц из кровотока включает взаимодействие с резидентными макрофагами органов РЭС. Двумя основными факторами, регулирующими взаимодействие наночастиц с макрофагами, являются размер и покрытие поверхности [180]. Было показано, что увеличение размера коррелирует с увеличением захвата наночастиц макрофагами, что приводит к уменьшению времени циркуляции [181]. Критический размер наночастиц составлял около 100 нм [182]. Для наночастиц размером выше этого значения обычно наблюдается значительное уменьшение продолжительности кровообращения, особенно для магнитных наночастиц. Для наночастиц размером менее 100 нм таких резких изменений не наблюдается, однако все же наблюдается тенденция увеличения времени кровообращения при уменьшении размера наночастиц до десятков нанометров [183]. Второй фактор – химическая структура поверхности наночастиц. Немодифицированные НЧ гидрофобны и легко могут взаимодействовать с белками плазмы в процессе, называемом процессом опсонизации [184]. Появление белков плазмы на поверхности наночастиц значительно увеличивает их поглощение макрофагами, тем самым сокращая время циркуляции [185]. Одним из наиболее популярных подходов к снижению опсонизации наночастиц является модификация поверхности наночастиц полиэтиленгликолем. Молекулы ПЭГ создают незаряженный гидрофильный слой, который предотвращает взаимодействие белков плазмы с поверхностью наночастиц, тем самым предотвращая опсонизацию [186]. 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 полимеризацией отдельных молекул. 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 3, 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 НЧДФУК и ПЭГ ($M_w \sim 1100 \text{ г} \cdot \text{моль}^{-1}$), которая способствует снижению гидрофобности системы, а также может увеличить время циркуляции в крови [182], уменьшить захват макрофагами [187] и защитить от опсонизации путем отталкивания белков плазмы.

Таблица 3. 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 слоевДФУК, ПЭГ, ФС и ФФ соответственно. Также видно, что после гидрофилизации НЧ путем образования слояДФУК на магнитной поверхности НЧ за счет образования связей Fe-O с гидроксильными группамиДФУК, общий размер НЧ лишь незначительно увеличивается на 1-2 нм, что указывает на то, что такое покрытие обеспечивает не только эффективный фазовый перенос от

органических растворителей, но и предотвращает агрегацию НЧ в структуры, где более одной НЧ внедрены в оболочку ДФУК. Аспект монодисперсности наноконструкций является важным, поскольку при агрегации НЧ внутри ДФУК ориентация поверхностей Au и Fe_3O_4 становится непредсказуемой, что приводит к ситуации, когда эти поверхности будут ориентированы близко друг к другу, что позволяет ФС и ФФ сближаться на расстояния, достаточно близкие для возникновения FRET, что крайне нежелательно.

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.

FRET не включает ни испускание фотонов, ни молекулярный контакт между двумя видами, но сильно зависит от расстояния между ними. Для изолированной пары донор-акцептор коэффициент скорости (первого порядка) для взаимодействия FRET пропорционален обратной шестой степени этого расстояния [188]. Характерная длина для FRET — это радиус Фёрстера, R_0 , определяемый как расстояние донор/акцептор, для которого FRET в данной паре D/A эффективен на 50% (то есть так же вероятен, как и другие процессы распада возбуждения D). На практике диапазон расстояний, для которого FRET чувствителен, составляет от $0,5R_0$ до $2R_0$, поскольку эффективность FRET варьируется от 98,5 до 1,5% в этом интервале. Значение R_0 характерно для каждой пары D/A в данной среде, но обычно лежит в диапазоне от 1,5 до 6 нм. Это означает, что FRET в основном чувствителен к расстояниям в масштабе от 1 до 10 нм, что находится вне досягаемости обычных методов оптической микроскопии.

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 - Cy5 / 131 аминокбутиламид 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 ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$), 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 ($\sim 20\text{-}40\%$), то расположение конъюгированных молекул будет не только экваториальным, тем самым расстояние между парой хромофоров будет уменьшаться.

На первом этапе были сняты спектры поглощения и флуоресценции чистых растворов ФС и ФФ в ДМСО (Рис. 25) и зафиксированы пики возбуждения: для ФС – 350 нм, 520 нм и 750 нм, для ФФ – 660 нм; пики флуоресценции: для ФС – 770 нм, для ФФ – 680 нм.

Далее карбодиимидным методом был получен конъюгат, напрямую ковалентно соединённых хромофоров (ФС + ФФ) (Рис. 26) в ДМСО для подтверждения FRET эффекта между ними.

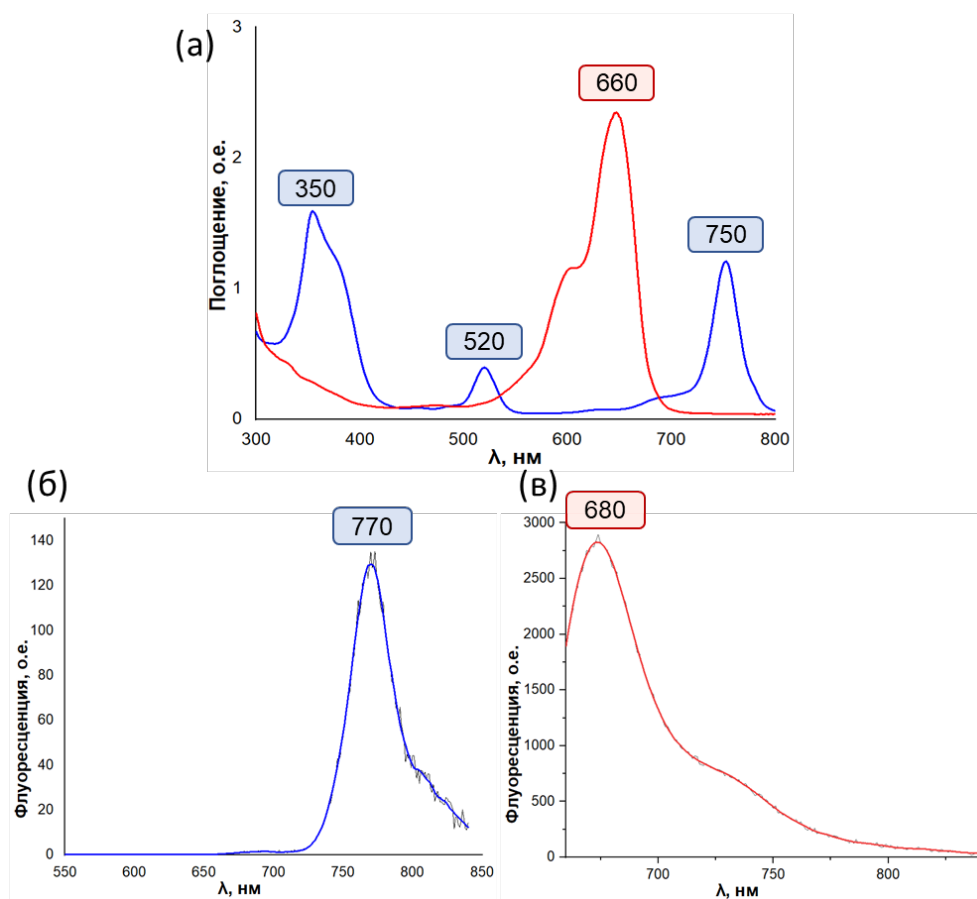


Рис. 25. (а) спектр поглощения ФФ (красный) и ФС (синий); (б) спектр флуоресценции ФС (длина волны возбуждения = 520 нм); (в) спектр флуоресценции ФФ (длина волны возбуждения = 660 нм)

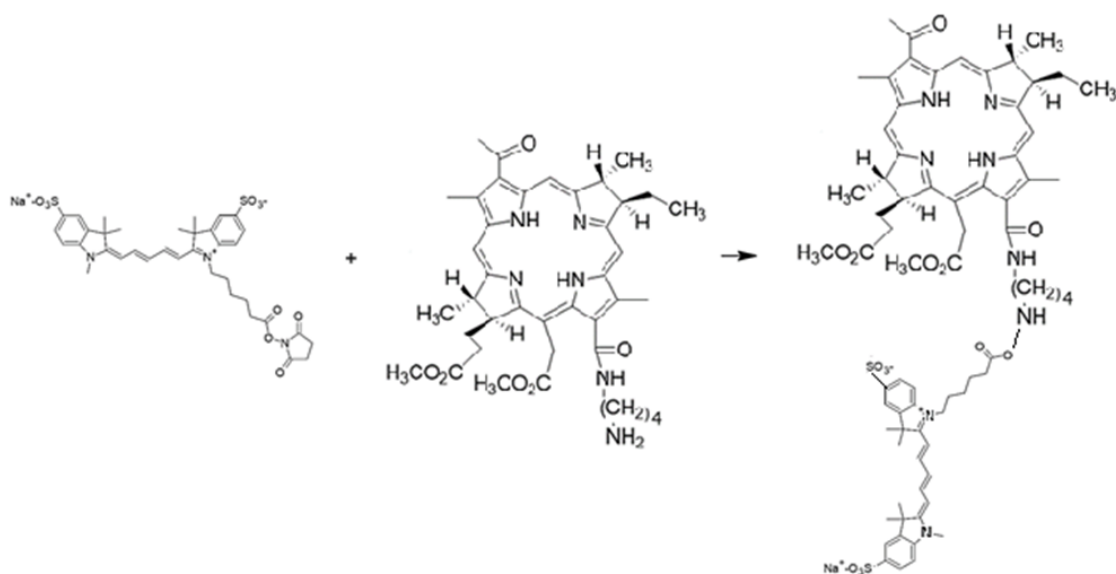


Рис. 26. Схема ковалентной сшивки пары хромофоров

Для подтверждения или опровержения безызлучательного переноса энергии между парой хромофоров были сняты спектры поглощения и флуоресценции (два канала возбуждения: ФС и ФФ) (Рис. 27).

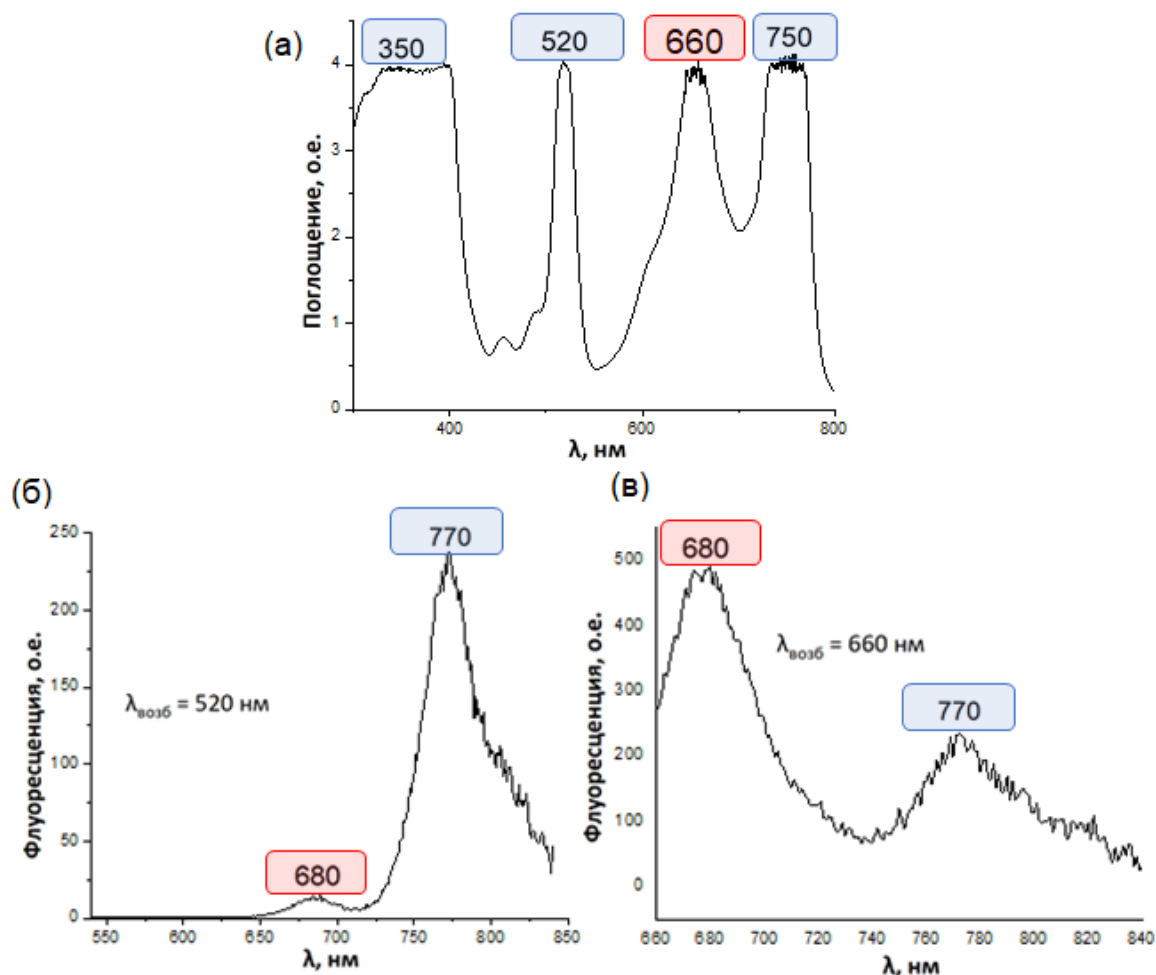


Рис. 27. (а) спектр поглощения ФФ+ФС; (б) спектр флуоресценции ФФ+ФС (длина волны возбуждения = 520 нм); (в) спектр флуоресценции ФФ+ФС (длина волны возбуждения = 660 нм)

На рис.26а 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.

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 (Рис. 28) [189]. С другой стороны, большое количество органического растворителя приводит к потере коллоидной стабильности НЧ/ДФУК/ПЭГ.

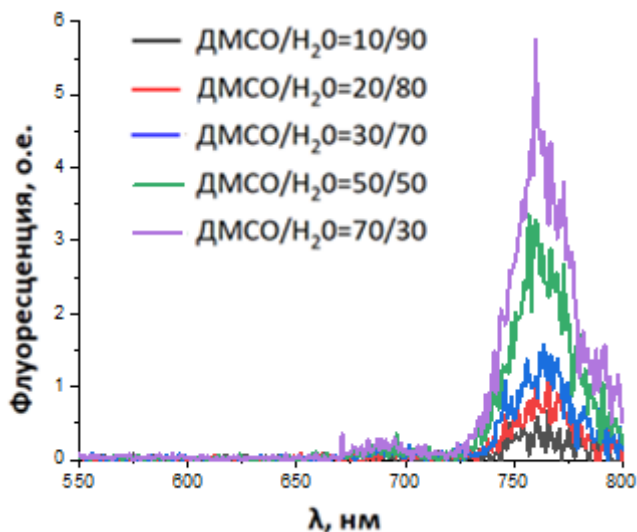


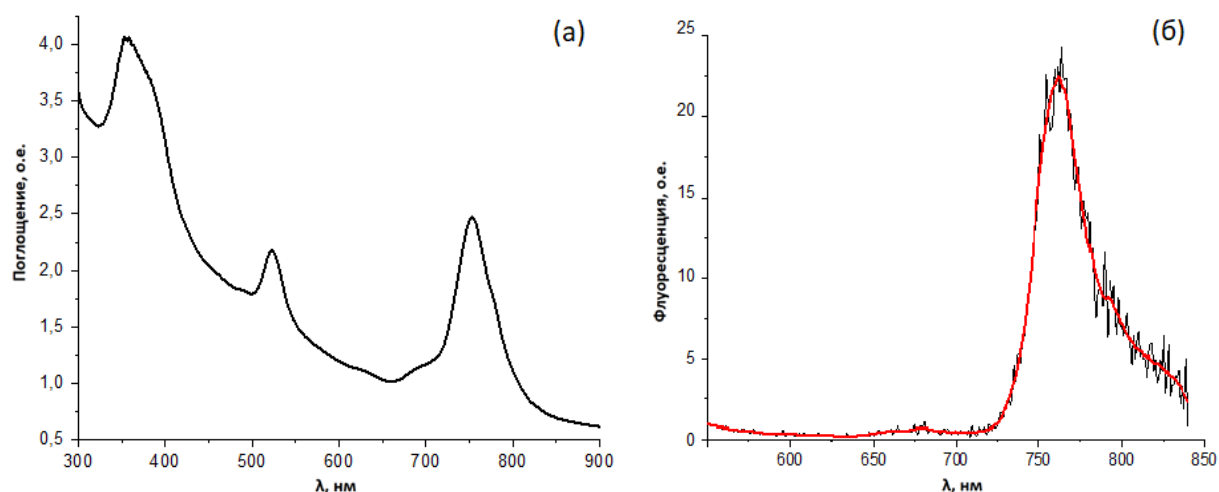
Рис. 28. Спектры флуоресценции ФС в растворах с различными соотношениями ДМСО/Н₂О (длина волны возбуждения 530 нм)

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 (Рис. 28). Как предполагалось ранее, с увеличением количества ДМСО интенсивность флуоресценции ФС увеличивается, при этом происходит уменьшение стабильности НЧ/ДФУК/ПЭГ. 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).

Было обнаружено общее увеличение размера НЧ после ковалентной загрузки для обоих типов хромофоров. Такое увеличение могло произойти за счет иммобилизации ФС и ФФ на поверхности НЧ, ведущее к повышению гидрофобности внешней оболочки, что может привести к увеличению размера покрытия (Таблица 3). Кроме того, после загрузки ФС на магнитную поверхность НЧ (НЧ/ФС) (Рис. 19) были обнаружены пики поглощения ФС при 530 и 760 нм (Рис. 29а), а также пик эмиссии 760 нм (возбуждение 530 нм) системы НЧ/ФС (Рис. 29б), что подтверждает наличие ФС на поверхности НЧ. Пик поглощения при 650 нм (Рис. 29в) и пик эмиссии при 680 нм (возбуждение 650 нм) подтверждают эффективное сопряжение ФФ с золотой поверхностью НЧ в НЧ/ФФ (Рис. 29г) и НЧ/ФС/ФФ (Рис. 30в). Также можно видеть широкий пик поглощения при 350 нм, особенно в области ниже 350 нм, что характерно

для ядер НЧ магнетита. На рис. 30, 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 волны 530 нм (возбуждение ФС) (Рис. 30б) мы наблюдаем только флуоресценцию ФС, однако при воздействии 650 нм (возбуждение ФФ) (Рис. 30в), видна дополнительная эмиссия ФС в области 770 нм, связанная с переносом энергии по механизму FRET от акцептора энергии (ФФ) к донору (ФС) [190]. 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. Важно понимать, что количество таких молекул с межмолекулярным расстоянием меньше радиуса Фёрстера крайне мало, что мы и наблюдаем в виде малоинтенсивного пика, который не влияет на терапевтическую эффективность платформы.



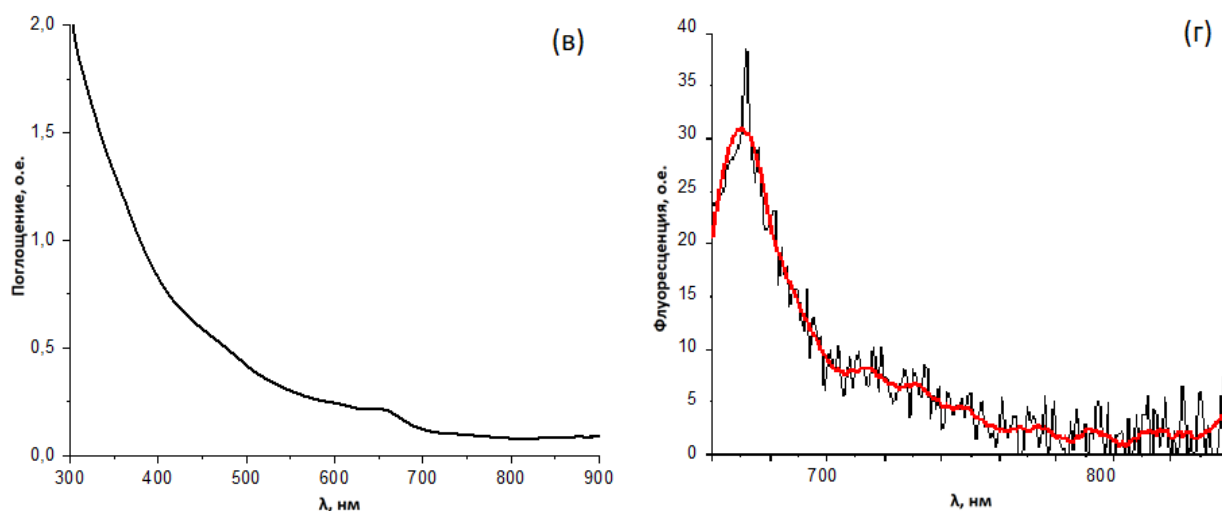


Рис. 29. (а) спектр поглощения НЧ/ФС; (б) спектр флуоресценции НЧ/ФС (длина волны возбуждения = 520 нм); (в) спектр поглощения НЧ/ФФ; (г) спектры флуоресценции НЧ/ФФ (длина волны возбуждения = 650 нм)

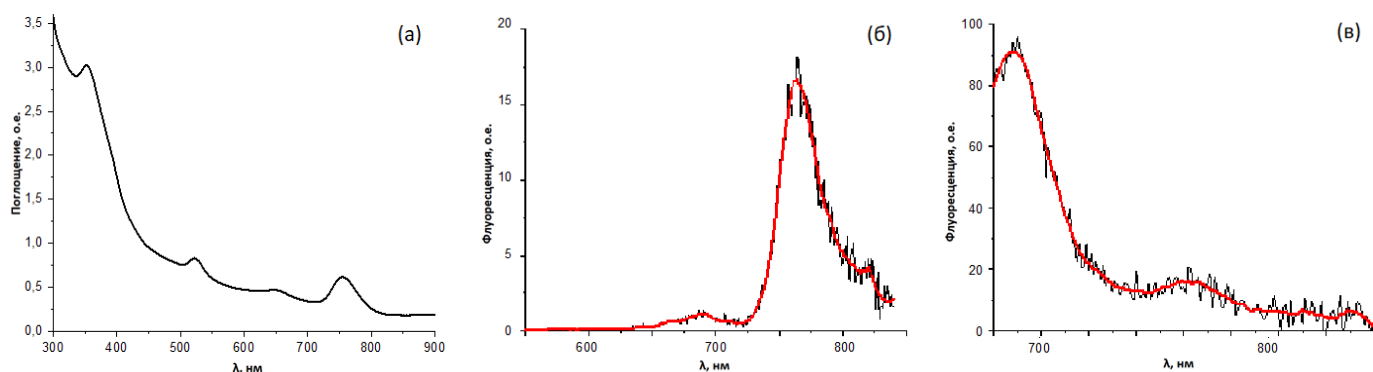


Рис. 30. (а) спектр поглощения НЧ/ФС/ФФ; (б) спектр флуоресценции НЧ/ФС/ФФ (длина волны возбуждения = 520 нм); (в) спектр флуоресценции НЧ/ФС/ФФ (длина волны возбуждения = 650 нм).

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 (Рис. 31). Наблюдается bathochromic shift пика поглощения ФФ с 650 нм на 680 нм (Рис. 31а), который вероятно связан с образованием структур «голова к хвосту» на поверхности НЧ [191]. 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.

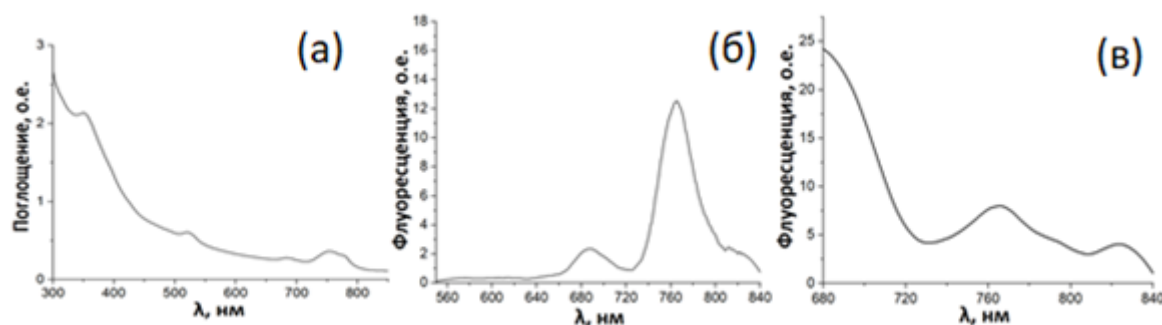


Рис. 31. (а) спектр поглощения смеси конъюгатов НЧ/ФС + НЧ/ФФ; (б) спектр флуоресценции смеси конъюгатов НЧ/ФС + НЧ/ФФ (длина волны возбуждения = 520 нм); (в) спектр флуоресценции смеси конъюгатов НЧ/ФС + НЧ/ФФ (длина волны возбуждения = 650 нм).

Стоит отметить, что хорошо виден пик поглощения ФС в ИК-области оптических спектров во всех системах, где был иммобилизован ФС. Этот факт важен, поскольку известно, что тело человека в основном прозрачно в ИК-области, что обеспечивает эффективное проникновение света в ткани в биологическом окне, что важно для терапии более глубоко расположенных опухолей [174,192]. Кроме того, облучение светом снижает риск перегрева тканей в ближней инфракрасной области [193,194].

Для доказательства успешной стабилизации ДФУК и ПЭГ с дальнейшей конъюгацией на магнитную - ФС, на золотую - ФФ поверхности НЧ были зарегистрированы НПВО ИК-спектры с Фурье преобразованием для каждого из полученных образцов: НЧ/ФС, НЧ/ФФ и НЧ/ФС/ФФ, растворитель - вода (для смеси НЧ/ФС+НЧ/ФФ ИК-спектроскопия не делалась, так как физическая смесь была приготовлена из образцов НЧ/ФС и НЧ/ФФ в заданном соотношении) (Рис. 32).

Основные характерные полосы поглощения в этих спектрах (Рис. 32) дают информацию о структурах ФС и ФФ при взаимодействии (ковалентной

конъюгации) с НЧ. На рис. 32А представлен спектр НЧ/ФС, где две наиболее интенсивные полосы поглощения, соответствующие симметричным (950.8 см^{-1}) и асимметричным (1011.0 см^{-1}) валентным колебаниям групп С-О-С (С-О-С_s и С-О-С_{as} соответственно) относящихся к структуре ПЭГ. Также зафиксированы полосы колебаний поглощения (1437.8 см^{-1} , 1407.2 см^{-1}) обусловленные колебаниями ароматических колец в структуре ДФУК. Наконец, наиболее значимыми являются две полосы поглощения 1666.1 см^{-1} (Амид I) и 1566.2 см^{-1} (Амид II), которые образованы двумя амидными функциональными группами, которые и образуются от двух имеющихся пептидных связей в структуре образца НЧ/ФС (между ДФУК и ПЭГ, между ПЭГ и ФС).

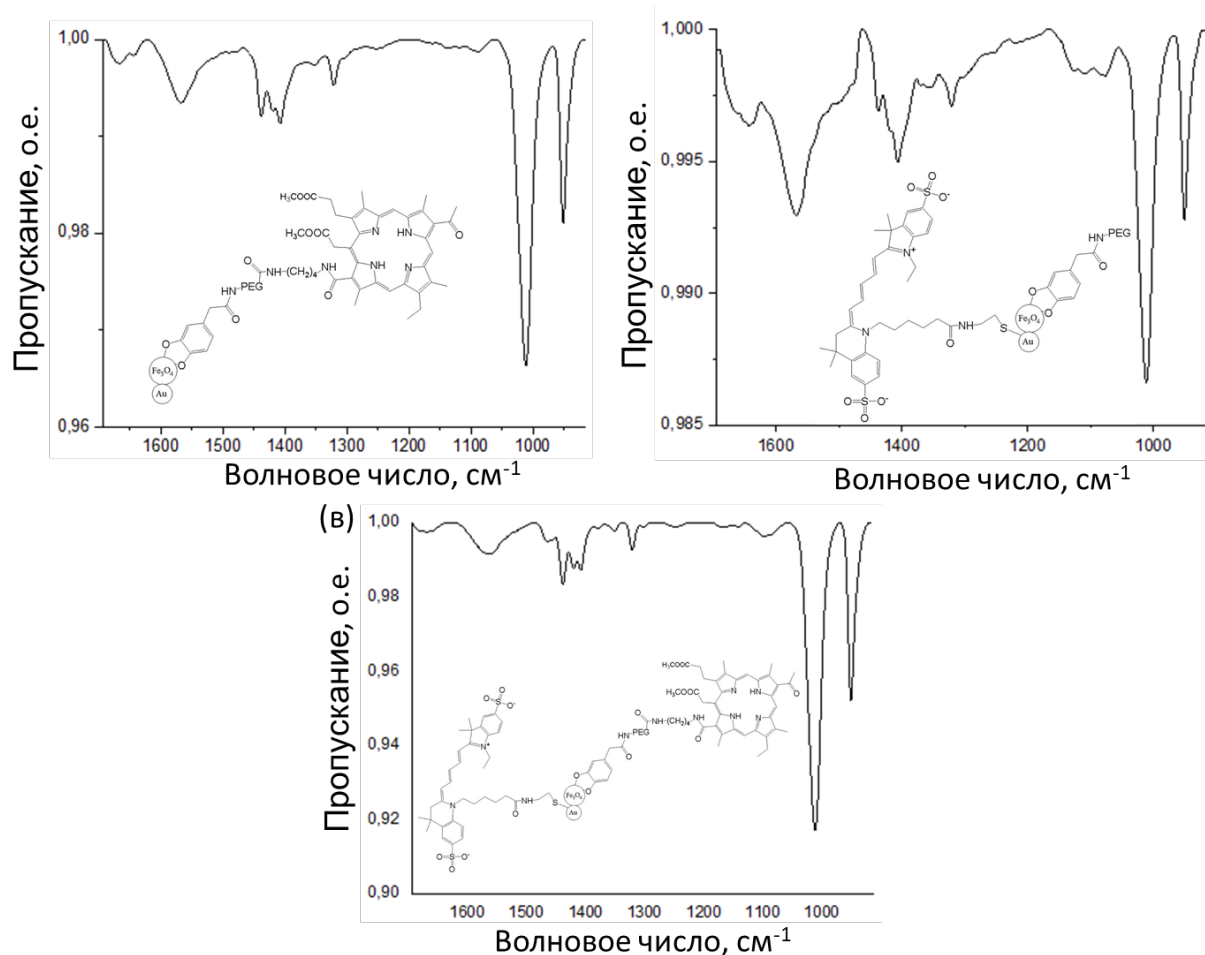


Рис. 32. ИК-спектры растворов НЧ, зарегистрированные для каждого образца: (а) – ИК-спектр НЧ/ФС, (б) – ИК-спектр НЧ/ФФ, (в) – ИК-спектр НЧ/ФС/ФФ, растворитель – вода

На Рис. 32Б представлен спектр НЧ/ФФ, где также две наиболее интенсивные полосы поглощения, соответствующие симметричным (950.9 см^{-1}) и асимметричным (1011.4 см^{-1}) валентным колебаниям групп С-О-С (С-О-С_s и С-О-С_{as} соответственно) относящихся к структуре ПЭГ. Детекция двух полос поглощения 1642.6 см^{-1} и 1567.5 см^{-1} описывается формированием в структуре двух пептидных связей в структуре образца НЧ/ФФ (между ДФУК и ПЭГ, внутри структуры ФФ). Наконец, наиболее значимыми являются зафиксированные полосы колебаний поглощения (1109.1 см^{-1} , 1406.4 см^{-1} , 1437.1 см^{-1}) обусловленные колебаниями ароматических колец в структуре ДФУК и ФФ, где можно заметить третий пик (полосу), который отражает наличие дополнительных ароматических системы ФФ, что подтверждает наличие ФФ в системе НЧ/ФФ, также косвенно подтверждает образование связи Au-S ($\sim 315\text{ см}^{-1}$, не виден в пределах регистрации спектрометра), связь S-C также не входит в пределы обнаружения прибора.

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

ИК-спектр системы НЧ/ФС/ФФ (Рис. 32В) имеет также несколько характерных полос поглощения. Аналогично предыдущим изученным системам видны две наиболее интенсивные полосы поглощения, соответствующие симметричным (950.8 см^{-1}) и асимметричным (1011.4 см^{-1}) валентным колебаниям групп С-О-С (С-О-С_s и С-О-С_{as} соответственно) относящихся к структуре ПЭГ, полосы амидных групп фиксируются как Амид I (1668.1 см^{-1}) и Амид II (1565.7 см^{-1}), показывающие наличие двух пептидных связей между ДФУК и ПЭГ, а также между ПЭГ и ФС. Описанные группы полос фиксируются во всех образцах (системах), так как каждая была модифицирована ДФУК и ПЭГ (магнитная поверхность НЧ). Важным отличительным моментом в ИК-спектре у НЧ/ФС/ФФ является наличие четырех полос колебаний (1407.8 см^{-1} , 1419.6 см^{-1} , 1438.0 см^{-1} и 1464.4 см^{-1}),

где можно заметить дополнительное колебание, которое происходит за счет участие ароматического кольца (системы) в структуре ФФ во внешнемоллекулярных взаимодействиях происходящих в растворе.

Финализируя полученные данные НПВО ИК-спектроскопии с Фурье преобразованием, можно сделать вывод об эффективности проведенных синтезов для получения систем НЧ/ФС, НЧ/ФФ, НЧ/ФС/ФФ и для физической смеси НЧ/ФС+НЧ/ФФ (приготовлена путем смешения НЧ/ФС и НЧ/ФФ в соотношении по концентрации железа 1:1) и о соответствии структур экспериментально полученных систем с теоретическими.

Зная структурные и магнитные свойства гибридных НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{--Au}$, стоит исследовать и проанализировать, влияет ли наличие ФС и/или ФФ на поверхностях НЧ на характеристики финальных образцов на МРТ изображений. Исследуемые образцы: НЧ/ФС, НЧ/ФФ, НЧ/ФСФФ и смесь НЧ/ФС+НЧ/ФФ имеют гидродинамические диаметры от 20 до 26 нм, согласно данным динамического светорассеяния (Таблица 3).

Способность магнетитовых НЧ усиливать T_2 -контраст в МРТ возникает благодаря созданию сильных градиентов магнитного поля, что ускоряет скорость релаксации протонов воды вблизи НЧ. В литературе подробно обсуждается корреляция r_2 -релаксации с размером наночастиц Fe_3O_4 и их кластеров [195,196]. Эти агрегаты можно рассматривать как магнитные объемы, в которых диполь-дипольное взаимодействие между наночастицами создает сильный градиент магнитного поля, ведущий к преобладанию эффекта T_2 . На r_2 -релаксивность влияет агрегация наночастиц, и можно выделить три различных режима. Во-первых, для малых кластеров r_2 описывается теорией внешней сферы. Наночастицы равномерно распределены, и протоны воды диффундируют между магнитными ядрами, прежде чем полностью выйти из фазы. В этом случае r_2 увеличивается с увеличением размера наночастиц. Этот режим называется режимом среднего движения (MAR). Таким образом, MAR предсказывается для относительно малых НЧ оксида железа, где диффузия воды около НЧ происходит на значительно более коротких временных

масштабах, чем сдвиг частоты резонанса, что приводит к увеличению значений r_2 с увеличением размера НЧ. Например, изменение диаметров НЧ от 4 нм до 6 нм, 9 нм и 12 нм привело к значениям r_2 78, 106, 130 и 218 $\text{мМ}^{-1} \cdot \text{с}^{-1}$ соответственно [197]. При дальнейшем увеличении диаметра значение r_2 остается постоянным до определенного предела размера. Размер и соответствующее поле рассеяния настолько велики, что молекулы воды испытывают почти постоянное магнитное поле во время своей T_2 -релаксации. Поэтому НЧ находятся в так называемом статическом режиме дефазировки (SDR) [198], который определяет предел релаксации, и значение r_2 достигает плато. В SDR режиме индуцированное возбуждающее поле вокруг более крупных НЧ намного сильнее, и диффузия протонов становится не доминирующей для затухания сигнала.

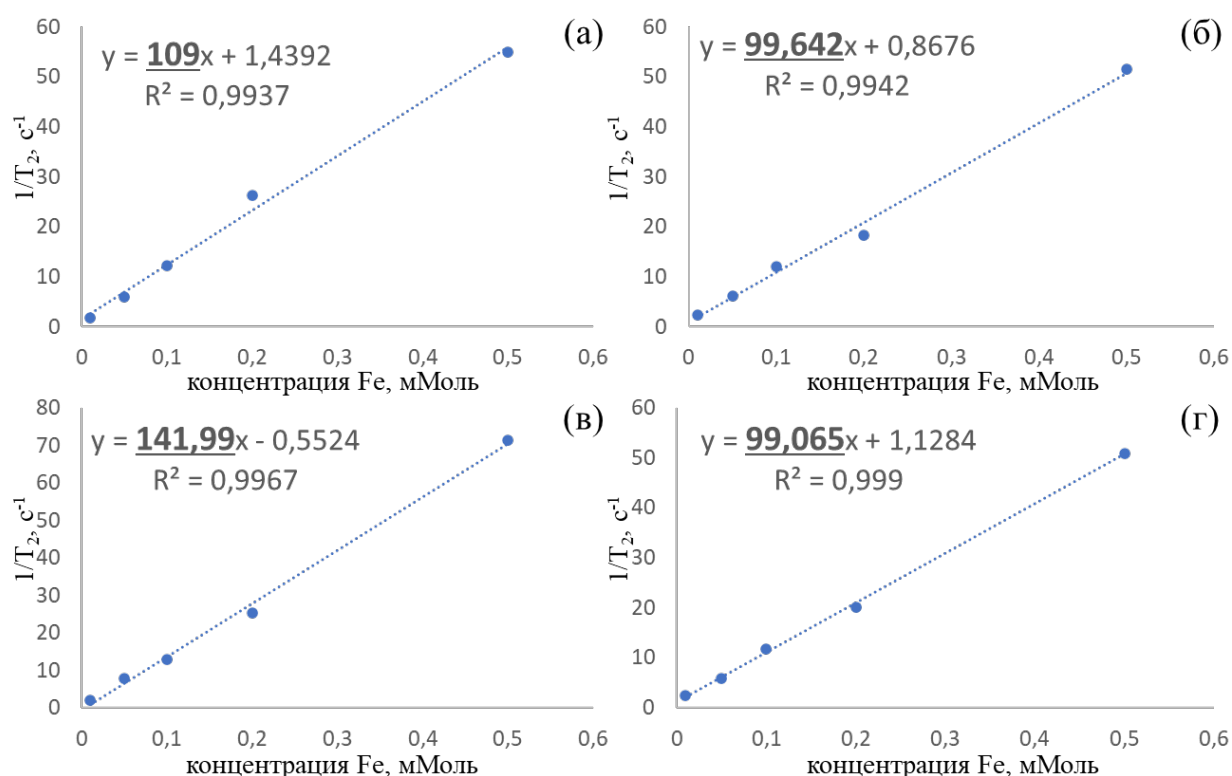


Рис. 33. Обратное время T_2 -релаксации протона МРТ как функция концентрации Fe водных растворов: (а) НЧ/ФС; (б) НЧ/ФФ; (в) НЧ/ФС/ФФ; (г) НЧ/ФС+НЧ/ФФ

Например, значения r_2 быстро увеличивались от 173 до 204 и 240 $\text{мМ}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$ при 7 Т для наночастиц размером от 8 нм до 23 нм и 37 нм соответственно [198]. Для более крупных наночастиц оксида железа размером 65 нм [199] релаксация r_2 лишь немного увеличивается до 249 $\text{мМ}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$. Наконец, по мере дальнейшего увеличения размера НЧ r_2 уменьшается. Скорость уменьшения r_2 зависит от времени эха (TE) в модели частичной перефокусировки.

В наших экспериментах значения r_2 гибридных образцов НЧ/ФС, НЧ/ФФ, НЧ/ФСФФ и смеси НЧ/ФС+НЧ/ФФ измерялись в воде (Рис. 33). Наблюдаются значения r_2 -релаксации в интервале от 99 до 142 $\text{мМ}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$ в воде. Стоит отметить, что значения трех систем (НЧ/ФС, НЧ/ФФ и их физической смеси НЧ/ФС+НЧ/ФФ) имеют идентичные значения r_2 -релаксации, что коррелирует с литературными данными. У НЧ/ФС/ФФ наблюдается относительно других образцов более высокое значение (141.9 $\text{мМ}^{-1}\cdot\text{с}^{-1}$), скорее всего данное изменение обуславливается увеличением гидродинамического размера образца (до 26 нм). Согласно режимам релаксации, НЧ размером до 20–25 нм находятся в режиме MAR, где процессы диффузии являются преобладающим фактором для r_2 -релаксации.

Функционализация НЧ с ДФУК–ПЭГ–СООН дополнительно увеличивает r_2 -релаксацию, поскольку субъединицы цепей ПЭГ обычно связаны с двумя или тремя молекулами воды посредством комплексообразования и/или водородных связей. Эти сильные взаимодействия в некоторой степени замедляют диффузию молекул воды и увеличивают значение r_2 [196]. Это подтверждается увеличением значений r_2 -релаксации у НЧ/ФС/ФФ (Рис. 33В), поскольку происходит увеличение гидродинамического размера системы. Это означает, что эффективность гибридных материалов в качестве контрастных агентов будет также увеличиваться в условиях эксплуатации *in vitro* и *in vivo*.

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) (Рис. 34). 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.

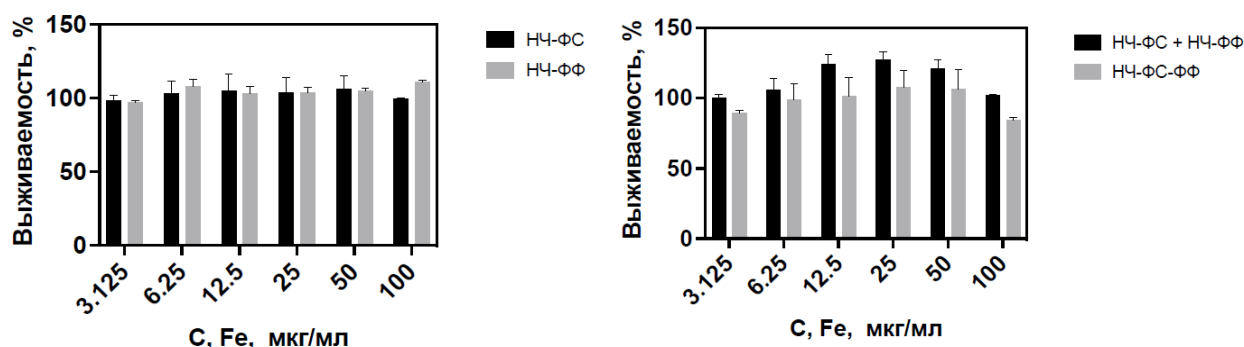


Рис. 34. Данные цитотоксичности, полученные спустя 48 ч инкубации НЧ с клетками СТ26.

Отсутствие токсичности для клеточных линий после простой инкубации обязательна, но не коррелирует со способностью НЧ вызывать гибель клеток под действием светового облучения. Фотоиндуцированную токсичность (активность) систем НЧ/ФС, НЧ/ФФ, НЧ/ФС/ФФ и смеси конъюгатов НЧ/ФС+НЧ/ФФ (Таблица 4) 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.

Таблица 4. Фотоиндуцированная активность субстанций (культура клеток СТ26).

Субстанции	<i>ИК₅₀, нг/мл</i>		
	<i>Время инкубации, ч</i>		
	<i>0,5</i>	<i>2</i>	<i>4</i>
<i>НЧ/ФС</i>	> 4000	3320±19	1799±14
<i>НЧ/ФФ</i>	> 4000	> 4000	> 4000
<i>НЧ/ФС/ФФ</i>	2318±16	1172±13	483±7
<i>смесь (НЧ/ФС+НЧ/ФФ)</i>	> 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 рис. 28г и рис. 30в, 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. Как описано в разделе «Материалы и методы» 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 бóльшего межмолекулярного расстояние, обусловленного раздельным нахождением в смеси конъюгатов НЧ/ФФ и НЧ/ФС.

Интернализация систем

На основании измерений флуоресценции и поглощения можно сделать заключение, что предложенный подход позволяет разделить молекулы ФФ и ФС, чтобы в достаточной степени снизить FRET-эффект. Однако, интернализовавшись в клетках, НЧ могут агрегировать или может происходить ферментативное расщепление связей, соединяющих ФФ и ФС с НЧ. 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 (Рис. 35). 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 (Рис. 35в) и сигнала ФФ в клетках, инкубированных с НЧ/ФС/ФФ, не демонстрируя ту же картину, что наблюдается для НЧ/ФФ (Рис. 35б).

Таким образом, все системы демонстрируют внутриклеточную флуоресценцию в соответствующем диапазоне длин волн и способны интернализироваться в цитоплазме раковых клеток (Рис. 35а-з). На рис. 35в 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 (Рис. 35г) 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.

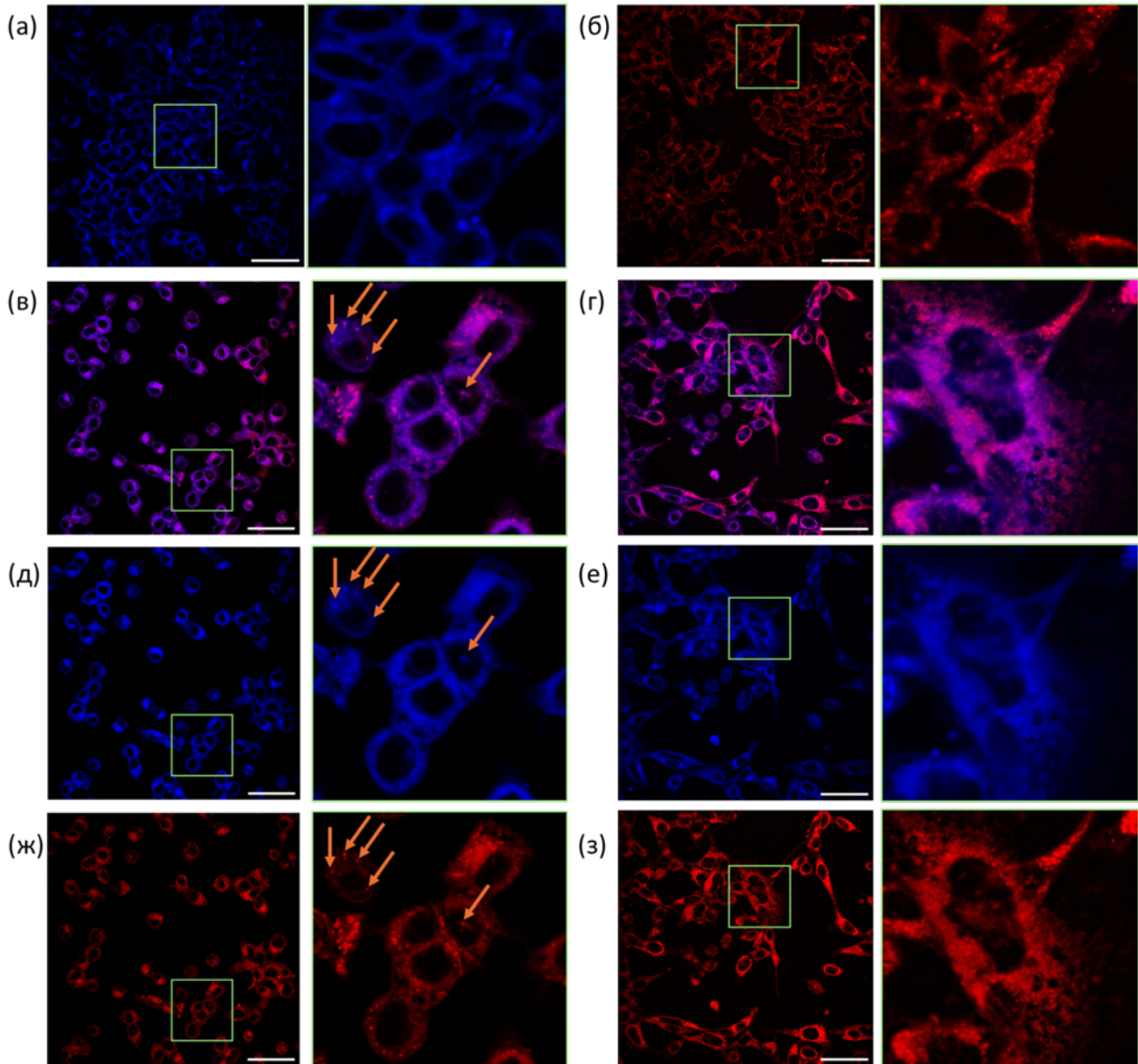


Рис. 35. Конфокальная визуализация клеток СТ26, инкубированных в течение 2 часов с системами: (а) НЧ/ФС; (б) НЧ/ФФ; (в) НЧ/ФС/ФФ (слияние); (г) НЧ/ФС+НЧ/ФФ (слияние); (д) НЧ/ФС/ФФ (длина волны возбуждения = 405 нм); (е) НЧ/ФС+НЧ/ФФ (длина волны возбуждения = 405 нм); (ж) НЧ/ФС/ФФ (длина волны возбуждения = 642 нм); (з) НЧ/ФС+НЧ/ФФ (длина волны возбуждения = 642 нм), масштаб 50 мкм.

3.4 Флуоресцентная диагностика, исследование биораспределения систем

Хотя тераностические НЧ имеют большие перспективы в наномедицине и биомедицинских приложениях, сохраняется недостаток понимания

механизмов биораспределения и побочных эффектов НЧ. Идеальная модель тераностических НЧ должна обладать несколькими важными свойствами. Для доставки НЧ должны воздействовать на целевые ткани и демонстрировать соответствующую кинетику высвобождения препарата в оптимальных концентрациях в месте действия, иллюстрируя их эффективную терапевтическую эффективность. Поскольку они также обладают диагностическими возможностями, они должны помогать определять точное местоположение и характеристики заболевания. Наряду с этими свойствами, очень важно, чтобы НЧ были нетоксичными и легко выводились или удалялись из организма [169]. Доступность и эффективность наночастиц *in vivo* в основном определяются их фармакокинетикой, биораспределением и потенциальной токсичностью.

Для биомедицинской визуализации предпочтительным способом доставки является внутривенная (в/в) инъекция. Увеличение времени циркуляции наносистем доставки лекарств при внутривенном введении является важным фактором, способствующим накоплению в раковой ткани. С увеличением времени циркуляции в крови дисперсные лекарственные системы имеют большую вероятность проникновения в пористую и гиперваскулярную неопластическую ткань. При этом средний размер капиллярных пор в нормальных тканях составляет всего ≈ 5 нм [200]. Таким образом, малые молекулы быстро равномерно распределяются между внутрисосудистым и внесосудистым пространствами, а НЧ — нет. Гидрофобные покрытия НЧ, циркулирующих в крови, будут способствовать быстрому захвату РЭС и удалению из кровеносного русла [201]. Только определенные гидрофильные (т. е. цвиттерионные) и нейтральные поверхности могут предотвратить адсорбцию белков плазмы и увеличить время циркуляции в крови [202]. В целом, поверхностная модификация наночастиц с использованием биологически инертных, гидрофильных и нейтральных полимеров, таких как полиэтиленгликоль (ПЭГ), замедляет скорость выведения из крови и захвата РЭС [203]. Подводя итог, можно

сказать, что внутривенная инъекция гарантирует, что наночастица может потенциально иметь доступ ко всему организму, при этом структура нормальных сосудов препятствует попаданию НЧ в здоровые ткани, а модификация поверхности гидрофильными полимерами обеспечивает увеличенное время циркуляции в крови достаточное для доставки в опухолевую ткань.

В целом, было доказано, что НЧ с гидродинамическими размерами в диапазоне 15–100 нм являются оптимальными, поскольку НЧ этих размеров демонстрируют самое длительное время циркуляции в кровотоке и тем самым имеют больше шансов достичь других органов и целей, таких как, например, мозг, стенки артерий, лимфатические узлы или опухоли [204–207]. Более крупные частицы ($dH > 100$ нм) легко захватываются фагоцитарными клетками и накапливаются в печени и селезенке [205,207], при этом частицы диаметром >200 нм показывают более высокие скорости поглощения селезенкой по сравнению с печенью. Очень мелкие НЧ (<10 – 15 нм) выводятся почками. Как правило, сверхмалые НЧ попадают в кровеносные сосуды клубочков нефронов и в конечном итоге попадают в мочу через мочеточник, а затем выводятся мочевым пузырем.

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 (Рис. 37). Флуоресценцию ФС детектировали при длине возбуждения 745 нм и длине волны испускания 800 нм (Рис. 38).

Стоит отметить, что численные значения флуоресценции систем с ФФ в опухоли превосходят таковые для систем с ФС чуть более чем на порядок (Рис. 40). 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 наночастиц в опухолях после внутривенного введения показало, что пик накопления ФФ и ФС находится во временном диапазоне 1-2 часов после внутривенного введения (Рис. 40). После введения в системный кровоток наночастицы с одной стороны проникают через гистогематический барьер в опухоли, где накапливаются за счет EPR эффекта, а с другой стороны подвергаются элиминации РЭС. При этом в первые два часа скорость процесса накопления наночастиц в опухоли преобладает над скоростью их выведения, тогда как спустя 4-6 часов скорость процесса выведения выходит на первое место, что можно наблюдать по постепенному снижению интенсивности флуоресценции для всех групп животных (Рис. 36). 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.

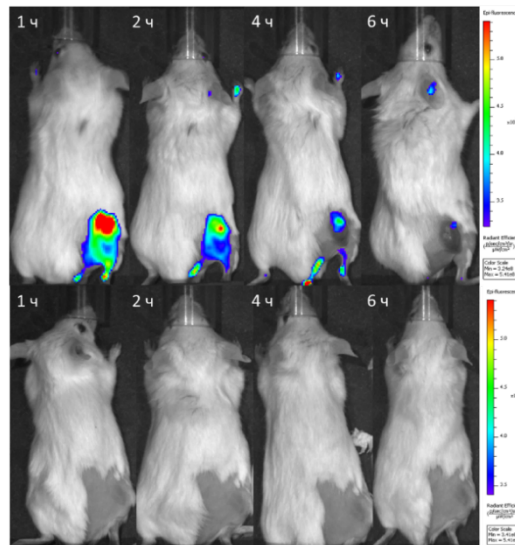


Рис. 36. Интенсивность флуоресценции, при внутривенном введении НЧ/ФФ (сверху), НЧ/ФС (снизу) при длине волны возбуждения 640 нм и длине волны испускания 700 нм

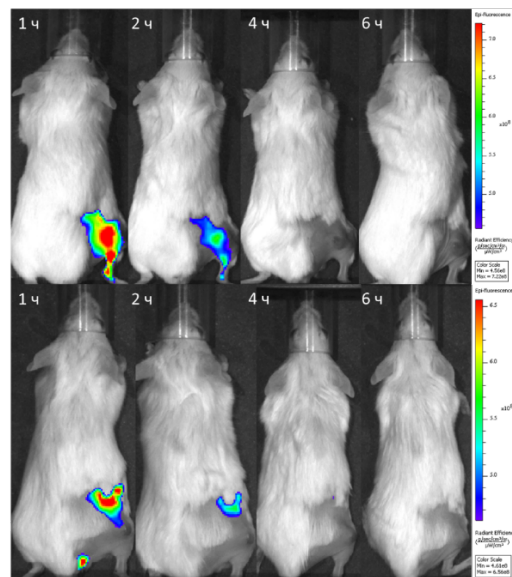


Рис. 37. Интенсивность флуоресценции, при внутривенном введении НЧ/ФФ/ФС (сверху), НЧ/ФС+НЧ/ФФ (снизу) при длине волны возбуждения 640 нм и длине волны испускания 700 нм

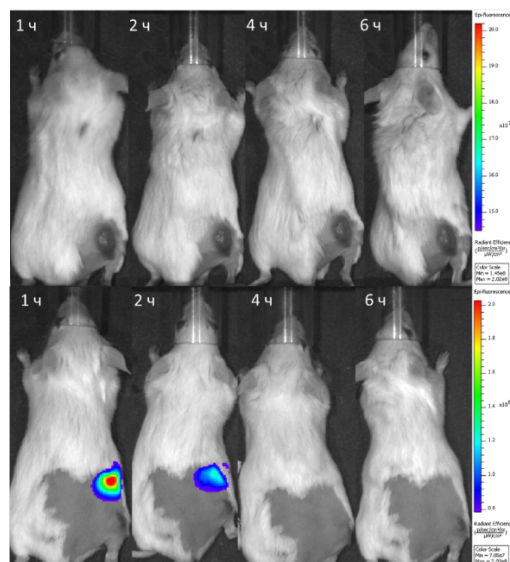


Рис. 38. Интенсивность флуоресценции, при внутривенном введении НЧ/ФФ (сверху), НЧ/ФС (снизу) при длине волны возбуждения 745 нм и длине волны испускания 800 нм

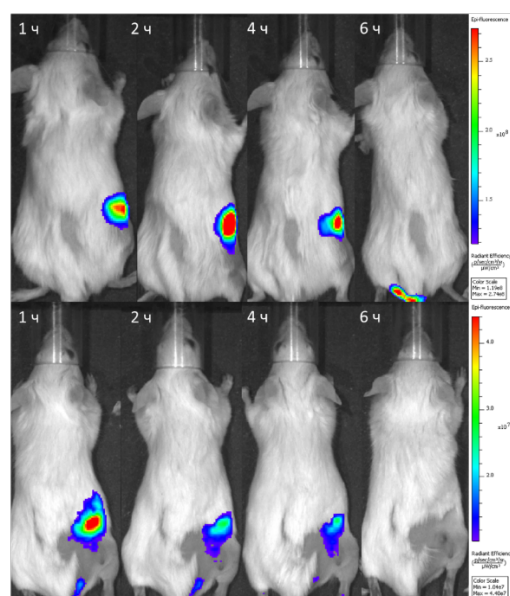


Рис. 39. Интенсивность флуоресценции, при внутривенном введении НЧ/ФФ/ФС (сверху), НЧ/ФС+НЧ/ФФ (снизу) при длине волны возбуждения 745 нм и длине волны испускания 800 нм

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 ($P \geq 0.05$) (Рис. 41).

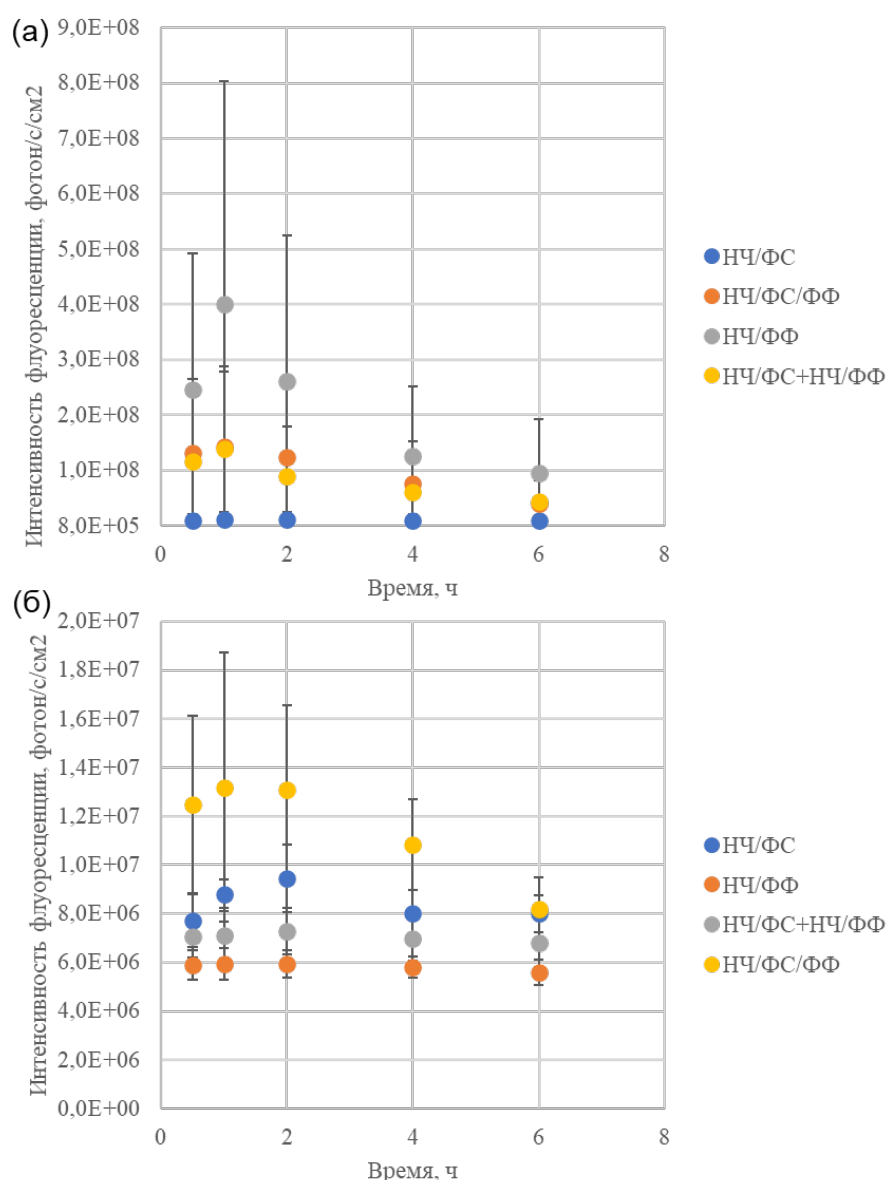


Рис. 40. Накопление систем НЧ/ФФ, НЧ/ФС, НЧ/ФС/ФФ и НЧ/ФС+НЧ/ФФ в опухоли после инъекции: (а) при длине волны возбуждения 640 нм и длине волны испускания 700 нм; (б) при длине волны возбуждения 745 нм и длине волны испускания 800 нм

При прохождении через селезенку наночастицы взаимодействуют с макрофагами и В-клетками белой пульпы, а на венозной стороне они могут быть захвачены макрофагами красной пульпы при прохождении между эндотелиальными клетками [208]. Кроме того, селезенка может захватывать наночастицы через макрофаги краевой зоны, путем рецептор-опосредованного захвата рецепторами-мусорщиками [209].

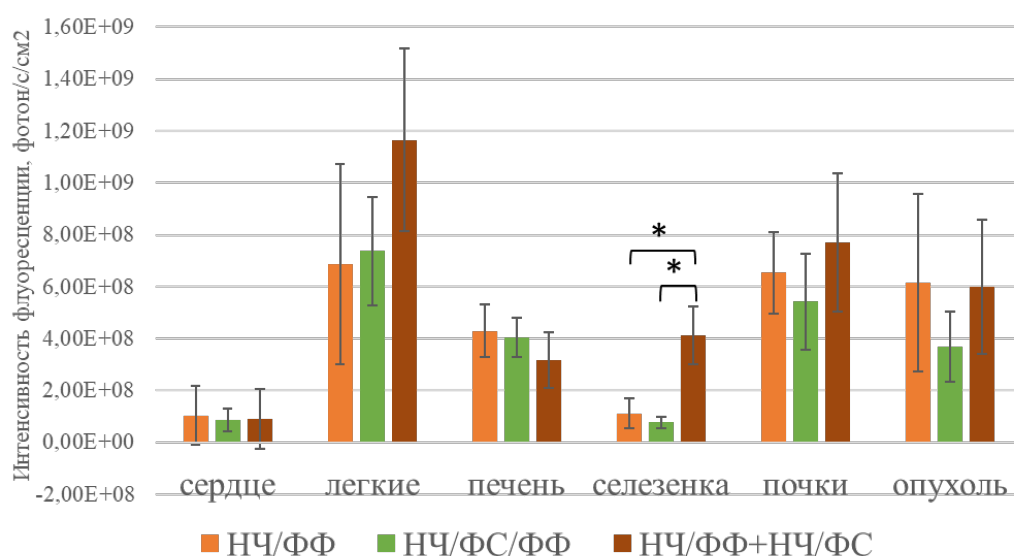


Рис. 41. Биораспределение систем в органах и опухоли спустя 6 ч. после инъекции при длине волны возбуждения 640 нм и длине волны испускания 700 нм. Результаты представлены как среднее $\pm$ SD; * $p \leq 0.05$ (ANOVA)

Примечательно, что краевая зона хорошо определена у крыс и мышей, тогда как у людей она представлена перифолликулярной зоной, содержащей не менее трех слоев [210]. Было отмечено, что макрофаги, являясь основными клетками секвестрации наночастиц, накапливают большую часть наночастиц в опухолях [211]. Кроме того, селезенка является источником макрофагов, ассоциированных с опухолью. Во время отторжения рака селезенка и лимфатические узлы являются местами пролиферации клеток. То есть, при наличии опухоли наблюдается значительное кратное снижение поглощения частиц в селезенке для штаммов мышей BALB/с для частиц размером около

50 нм [212]. В целом, это предполагает, что иммунные клетки, связанные с опухолью, перемещаются между селезенкой и опухолью. Одна из многих возможных гипотез заключается в том, что опухолевые клетки увеличивают секвестрацию НЧ как через макрофаги селезенки, так и через МАО. Таким образом, НЧ будут проникать и накапливаться больше в опухолевой ткани, что подтверждается данными (Рис. 41), где видно относительно высокое накопление препарата в опухоли, что вероятнее всего ещё связано с высокой гидрофильностью поверхности НЧ за счет модификации ПЭГ, а значит 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 (Рис. 41).

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 (Рис. 41).

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 (Рис. 42), кроме сигнала в печени, где видна более высокая интенсивность флуоресценции для НЧ/ФС/ФФ и НЧ/ФС+НЧ/ФФ.

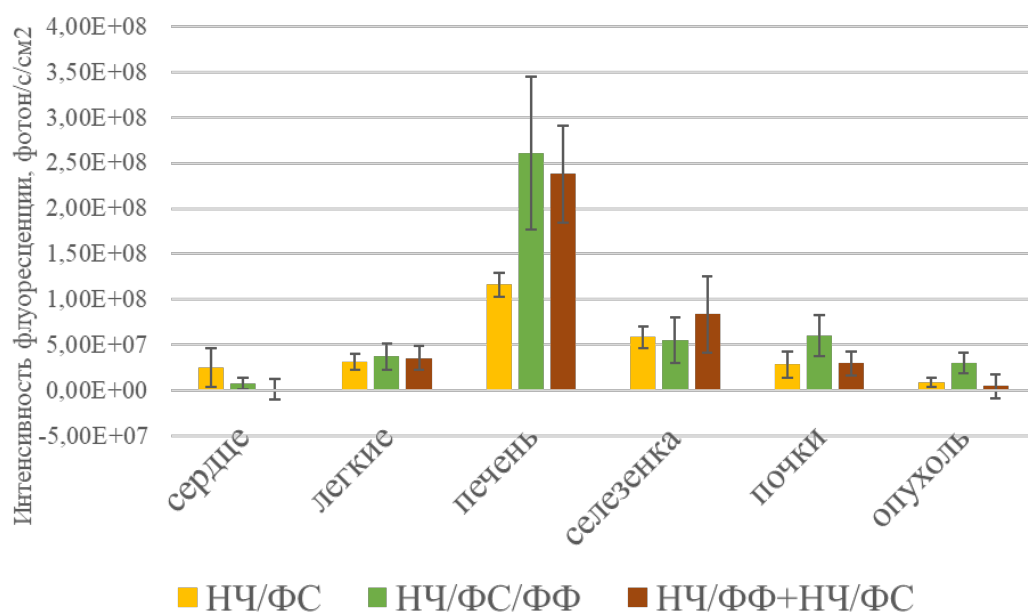


Рис. 42. Биораспределение систем в органах и опухоли спустя 6 ч. после инъекции при длине волны возбуждения 745 нм и длине волны испускания 800 нм. Результаты представлены как среднее $\pm$ SD

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. Печень является активным местом биосинтеза гема и порфириногенов/порфиринов, которые являются промежуточными продуктами пути биосинтеза гема, поскольку гем необходим для функциональной активности системы цитохрома Р 450 и других критических печеночных гемопротеинов. Производство печеночного гема регулируется в первую очередь через активность синтазы аминолевулиновой кислоты, которая является первым и обычно лимитирующим скоростью ферментом пути. Печень катаболизирует гем в билирубин посредством активности микросомальной гемоксигеназы и выделяет гем в желчь вместе с порфиринами. Таким образом, 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. 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 (Рис. 42) при длине волны возбуждения 745 нм и длине волны испускания 800 нм.

Гибридные димерные НЧ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ накапливаются в опухолях за счет повышенной проницаемости и эффекта удержания (эффект EPR). При внутривенной инъекции печень и селезенка секвестрируют до 99% НЧ, что значительно снижает их доставку в целевые ткани (опухоль). Стабильность систем в кровотоке и сниженный клиренс крови (увеличенное время циркуляции) являются предпосылками для их эффективной доставки в ткани опухоли. Многие исследования показали эффективность НЧ для специфического нацеливания и уничтожения клеток *in vitro*, однако менее 1% введенной дозы НЧ доставляется *in vivo* в саму опухоль [213,214].

Низкий процент введенной дозы, накапливающейся в злокачественных тканях, является основной проблемой для клинического применения НЧ, поэтому повышение эффективности доставки является центральной стратегией в этой области. Повышенная проницаемость и эффект удержания (эффект EPR) являются основным фактором пассивной доставки НЧ в злокачественные ткани [215]. Стоит отметить, что даже спустя 6 часов детектируется отличимый от фоновой флуоресценции сигнал в опухолях, при этом сигнал в печени превосходит сигнал от опухоли всего в 10 раз, что позволяет предположить доставку более 1% НЧ в опухолевый очаг по данным IVIS.

В дополнении количественно оценивалось биораспределение НЧ (всех образцов) у мышей BALB/c *ex vivo*, путем измерения концентрации Fe с помощью метода АЭС. Опухоль, почки, легкие, сердце, селезенка и печень собирались через 24 ч после внутривенных инъекций НЧ/ФС, НЧ/ФФ, НЧ/ФС/ФФ, смеси НЧ/ФС+НЧ/ФФ и растворялись в царской водке. Можно заметить, что относительные концентрации Fe (мкг/г ткани) в селезенке выше, чем в опухолях (Рис. 43), что, на первый взгляд, противоречит данным IVIS.

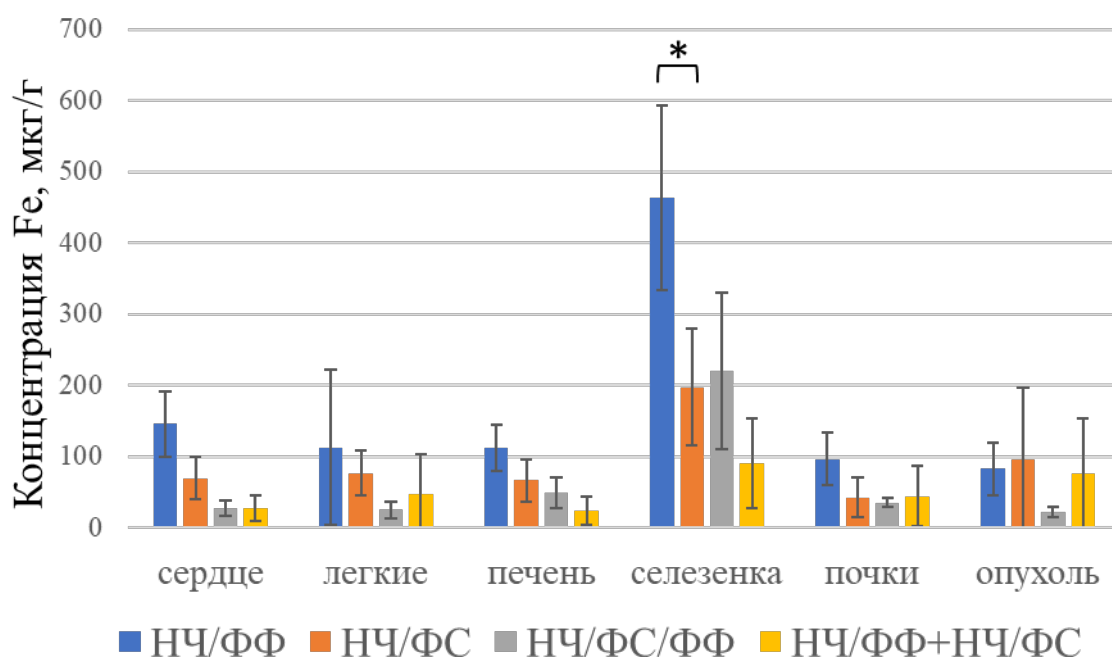


Рис. 43. Биораспределение систем в органах и опухоли *ex vivo* после в/в инъекции методом АЭС. Результаты представлены как среднее $\pm$ SD; * $p \leq 0.001$ (ANOVA)

Однако была выдвинута гипотеза, что IVIS недооценивает накопление НЧ в глубоко залегающих внутренних органах вследствие рассеяния света от тканей. Тем не менее, 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 %) [214].

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*.

3.5 Исследование фотоиндуцированной противоопухолевой эффективности *in vivo*

ФДТ у мышей проводили на 9-й день после начала роста опухоли, когда средний объем опухолевых образований составлял 135.0 ± 15.0 мм³. Субстанции вводили однократно внутривенно в дозировке 5.0 мг/кг. Для облучения использовали светодиодный источник с длиной волны 754 ± 28 нм. В качестве контроля использовали группу животных, которым вводили PBS без светового воздействия. Облучение проводилось в монопозиционном режиме (одно поле облучения) при плотности мощности 150.0 мВт/см². Световая доза составила 150 Дж/см², а время экспозиции — 60 минут. Экспериментальная и контрольная группы состояли из 5 животных каждая. Рост опухоли отслеживали в течение 21 дня. Полученные результаты представлены на рис. 44, рис. 45, рис. 46 и в таблицы 5.

В течение первой недели после лечения у животных, которым проводилась ФДТ с инъекциями систем НЧ/ФС/ФФ и НЧ/ФС+НЧ/ФФ (Рис. 44Б, В), наблюдалась задержка роста опухоли по сравнению с контрольной группой (Рис. 44Г). 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» (Рис. 44В) 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. Среди нескольких возможных механизмов, вовлеченных в цитотоксичность ФДТ, апоптоз был описан для широкого спектра фотосенсибилизаторов, включая ФС феофорбидного ряда [216]. Предполагается, что апоптоз, вызванный ФДТ, происходит быстро и зависит от порога лазерного света, а также от концентрации фотосенсибилизатора [217]. При облучении происходит фрагментация ДНК и этот процесс является дозозависимым (чем выше концентрация введенного ФС, тем быстрее происходит гибель раковых клеток). По мнению Кесселя [218], апоптоз является результатом лизосомального или митохондриального фотоповреждения с высвобождением цитохрома c.

Реакция опухоли представлена на кривых Каплана-Майера (Рис. 45), где процент мышей с объемом опухоли менее 2000 мм³, 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.

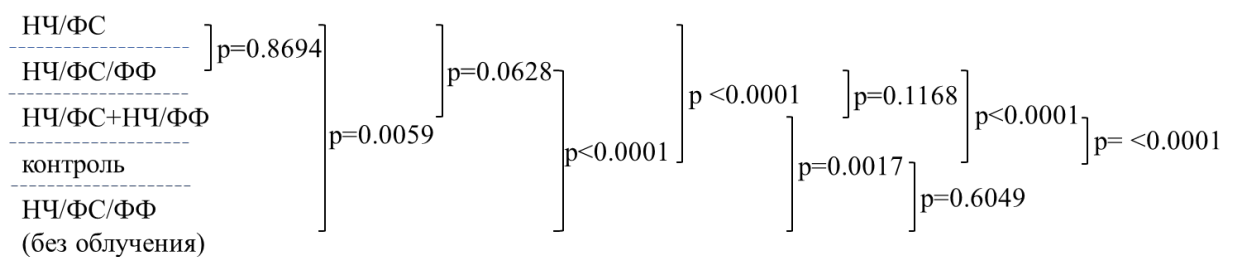
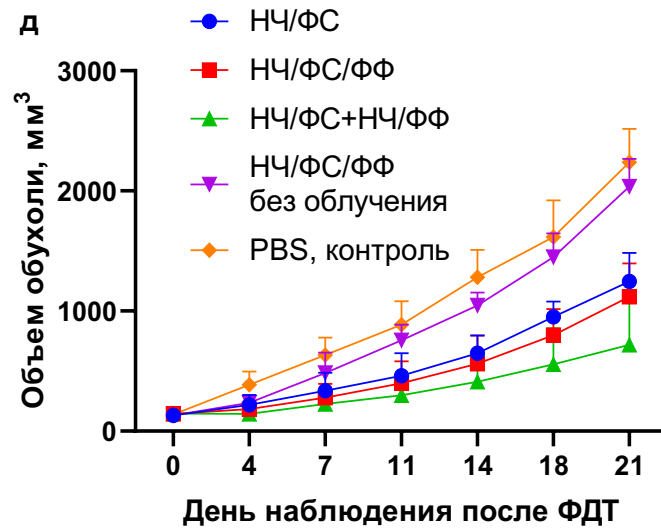
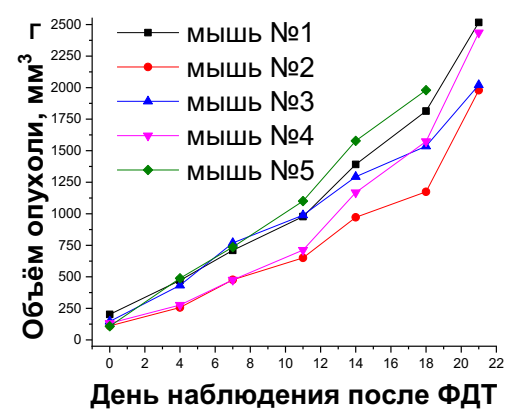
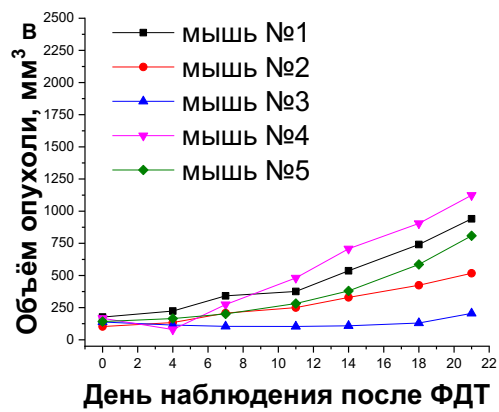
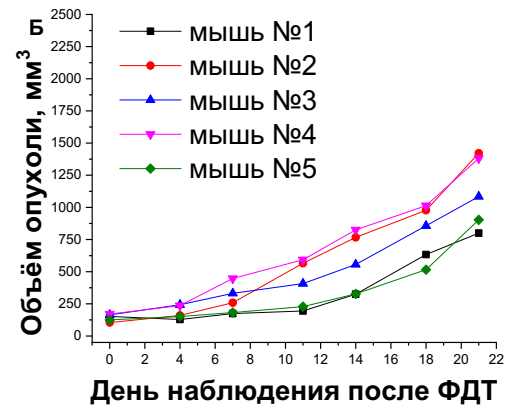
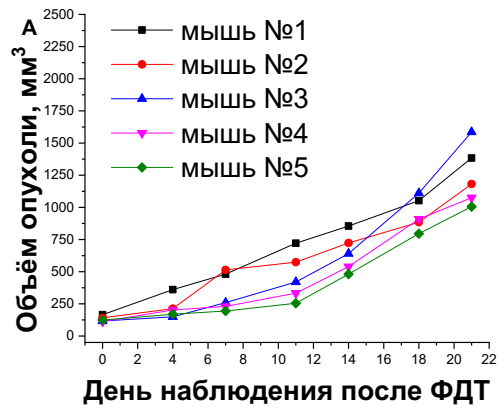
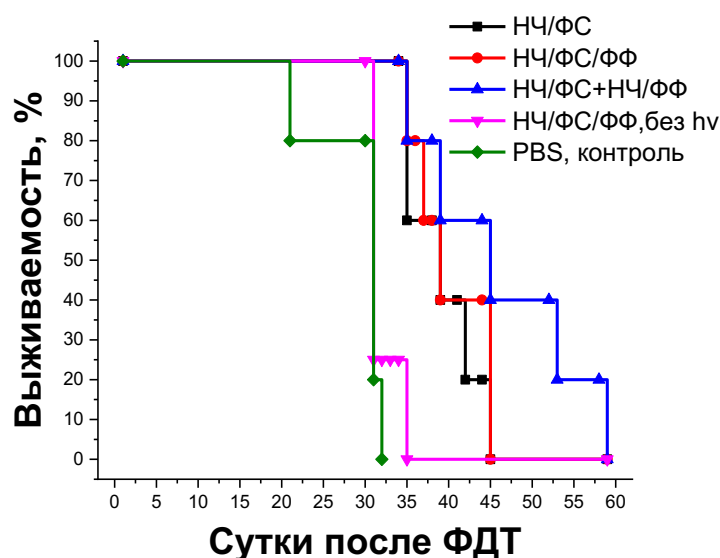


Рис. 44. Динамика роста опухоли СТ26 у мышей после ФДТ (количество животных в группе n=5): (А) НЧ/ФС; (Б) НЧ/ФС/ФФ; (В) НЧ/ФС+НЧ/ФФ; (Г) контроль; (Д) объединенные данные. Двухфакторный дисперсионный анализ $p \leq 0.05$ (ANOVA), результаты представлены как среднее $\pm$ SD

У мышей контрольной группы (контроль и НЧ/ФС/ФФ без облучения) без какого-либо лечения опухоли достигли объема более 2000 мм³ — размера, при котором мыши были выведены из исследования — между 21 и 35 днем. Помимо лечения, различия между группами зависят от количества животных в группах и от размера опухоли в начале терапии.



НЧ/ФС
 НЧ/ФС/ФФ
 НЧ/ФС+НЧ/ФФ
 контроль

$p = 2.18e^{-8}$
 $p = 3.18e^{-4}$
 $p = 1.47e^{-4}$
 $p = 6.08e^{-5}$
 $p = 6.05e^{-4}$
 $p = 1.25e^{-2}$

Рис. 45. Выживаемость мышей с карциномой толстой кишки СТ26 после сеанса ФДТ (Каплан-Майер). Двухфакторный дисперсионный анализ $p \leq 0.05$ (ANOVA)

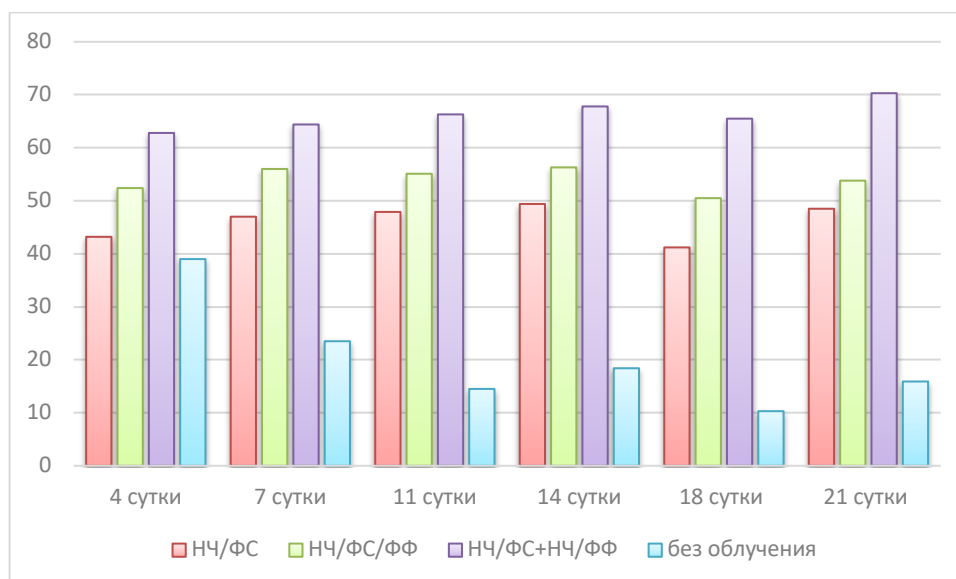


Рис. 46. Торможение роста опухоли после лечения ФДТ

Нами было рассчитано, что размеры опухоли в день ФДТ (0 день) не имели статистически значимых различий в объеме опухоли (Таблица 5). Однако, на рис. 46 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. Терапия опухолей, основанная на воздействии на сосудистую сеть опухоли, действительно эффективна, как показано в нескольких исследованиях [219].

Таблица 5. Фотоиндуцированная противоопухолевая эффективность субстанций у мышей с подкожной карциномой толстой кишки СТ26

№ групп	Воздействи е	V опухоли, мм ³ ТРО, %							Т/С (21 сутки после лечен ия), %	СПЖ , сутк и УПЖ , %
		Сутки после ФДТ								
		0 день (день ФДТ)	4 сутки	7 сутки	11 сутки	14 сутки	18 сутки	21 сутки		
1	НЧ/ФС	132,0± 19,2	219,0± 72,9 43,2	336,1±1 31,4 47,0	461,1±1 65,6 47,9	648,0±1 30,3 49,4	950,6±1 12,9 41,2	1246,5± 208,2 48,5	51,5	38,2± 3,8 29,1
2	НЧ/ФС /ФФ	143,4± 24,6	183,6± 45,9 52,4	278,8±9 9,7 56,0	397,7±1 61,6 55,1	560,2±2 06,8 56,3	799,5±1 90,5 50,5	1118,0± 243,8 53,8	46,2	39,2± 4,0 32,4
3	НЧ/ФС + НЧ/ФФ	145,5± 25,2	143,3± 47,6 62,8	225,6±7 7,8 64,4	298,6±1 23,9 66,3	412,4±1 97,2 67,8	557,2±2 61,2 65,5	719,0±3 17,7 70,3	29,7	45,2± 8,6 52,7
4	НЧ/ФС /ФФ без облуче ния	130,7± 15,9	235,2± 44,1 39,0	484,9±1 48,1 23,5	757,0±1 13,2 14,5	1045,1± 94,4 18,4	1448,7± 173,4 10,3	2035,9± 222,6 15,9	84,1	31,2± 1,6 4,7
5	PBS, контро ль	139,9± 33,6	385,3± 96,7	633,6±1 26,9	885,9±1 70,2	1280,6± 200,4	1615,5± 268,3	2420,0± 413,5	-	29,6± 1,3

Примечание: $V_{оп} = a \times b \times c \times 0,52$, мм³; ТРО – торможение роста опухоли, %; СПЖ – средняя продолжительность жизни мышей, сутки; УПЖ – увеличение продолжительности жизни, %

Таким образом, баланс между общим воздействием на сосудистую систему и более специфическим воздействием на клетки опухоли и её сосуды можно эффективно регулировать за счет изменения продолжительности интервала между введением препарата и облучением во время ФДТ в сочетании с концентрацией ФС и дозой света.

4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

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 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$, 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.

На основании полученных экспериментальных данных были сделаны следующие выводы:

1) Метод термического разложения пентакарбонила железа в октадецене с использованием в качестве ПАВ олеиновой кислоты и олеиламина с последующим добавлением тетрахлоаурата 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 использованиемДФУК 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 ИК₅₀ 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 ЛИТЕРАТУРЫ

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. Itoo A.M. et al. Nanotherapeutic Intervention in Photodynamic Therapy for Cancer // *ACS Omega*. 2022. Vol. 7, № 50. P. 45882–45909.
3. Zhao Q. et al. Spinels: 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 (MFe_2O_4) nanoparticles: From synthesis to application // *Heliyon*. 2023. Vol. 9, № 6. P. e16601.
5. Yousuf M.A. et al. The impact of yttrium cations (Y^{3+}) on structural, spectral and dielectric properties of spinel manganese ferrite nanoparticles // *Ceram Int*. 2019. Vol. 45, № 8. P. 10936–10942.
6. Mmesesi O.K. et al. Cobalt ferrite nanoparticles and nanocomposites: Photocatalytic, antimicrobial activity and toxicity in 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 // *Biomed Pharmacother*. Biomed Pharmacother, 2018. Vol. 106. P. 1098–1107.
9. Деев С.М., Лебеденко Е.Н. Супрамолекулярные агенты для тераностики // *Биоорганическая химия*. 2015. Vol. 41, № 5. P. 539–539.
10. Sadikovic B. et al. Cause and consequences of genetic and epigenetic alterations in human cancer // *Curr Genomics*. Curr Genomics, 2008. Vol. 9, № 6. P. 394–408.

11. Malanchi I. et al. Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization // *Nature*. Nature, 2011. Vol. 481, № 7379. P. 85–91.
12. Rycaj K., Tang D.G. Cell-of-Origin of Cancer versus Cancer Stem Cells: Assays and Interpretations // *Cancer Res*. Cancer Res, 2015. Vol. 75, № 19. P. 4003–4011.
13. Nimmakayala R.K., Batra S.K., Ponnusamy M.P. Unraveling the journey of cancer stem cells from origin to metastasis // *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2019. Vol. 1871, № 1. P. 50–63.
14. Walcher L. et al. Cancer Stem Cells-Origins and Biomarkers: Perspectives for Targeted Personalized Therapies // *Front Immunol*. Front Immunol, 2020. Vol. 11.
15. Bu Y., Cao D. The origin of cancer stem cells // *Front Biosci (Schol Ed)*. Front Biosci (Schol Ed), 2012. Vol. 4, № 3. P. 819–830.
16. Clayton S.M. et al. Immunoregulatory Potential of Exosomes Derived from Cancer Stem Cells // *Stem Cells Dev*. Stem Cells Dev, 2020. Vol. 29, № 6. P. 327–335.
17. Bi X. et al. Loss of interferon regulatory factor 5 (IRF5) expression in human ductal carcinoma correlates with disease stage and contributes to metastasis // *Breast Cancer Res*. Breast Cancer Res, 2011. Vol. 13, № 6.
18. Taylor R.C., Cullen S.P., Martin S.J. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level // *Nat Rev Mol Cell Biol*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. Vol. 9, № 3. P. 231–241.
19. Dey A., Verma C.S., Lane D.P. Updates on p53: modulation of p53 degradation as a therapeutic approach // *Br J Cancer*. Br J Cancer, 2008. Vol. 98, № 1. P. 4–8.
20. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance // *Nature Reviews Cancer* 2005 5:4. Nature Publishing Group, 2005. Vol. 5, № 4. P. 263–274.

21. Sakai C., Nishikawa H. [Immunosuppressive Environment in Tumors]. // Gan To Kagaku Ryoho. Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy Publishers Inc., 2018. Vol. 45, № 2. P. 222–226.
22. De Souza A.P., Bonorino C. Tumor immunosuppressive environment: effects on tumor-specific and nontumor antigen immune responses // Expert Rev Anticancer Ther. Expert Rev Anticancer Ther, 2009. Vol. 9, № 9. P. 1317–1332.
23. Baguley B.C. Multidrug resistance in cancer // Methods Mol Biol. Methods Mol Biol, 2010. Vol. 596. P. 1–14.
24. Parmar K. et al. Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia // Proc Natl Acad Sci U S A. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. Vol. 104, № 13. P. 5431–5436.
25. Finlay G.J., Baguley B.C. Effects of protein binding on the in vitro activity of antitumour acridine derivatives and related anticancer drugs // Cancer Chemother Pharmacol. Cancer Chemother Pharmacol, 2000. Vol. 45, № 5. P. 417–422.
26. Hicks K.O. et al. Extravascular Transport of the DNA Intercalator and Topoisomerase Poison N-[2-(Dimethylamino)ethyl]acridine-4-carboxamide (DACA): Diffusion and Metabolism in Multicellular Layers of Tumor Cells // J Pharmacol Exp Ther. Elsevier, 2001. Vol. 297, № 3. P. 1088–1098.
27. Nakagawa T. et al. Expression of copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) correlates with cisplatin resistance in human non-small cell lung cancer xenografts // Oncol Rep. Spandidos Publications, 2008. Vol. 20, № 2. P. 265–270.
28. Chen K.G. et al. Melanosomal sequestration of cytotoxic drugs contributes to the intractability of malignant melanomas // Proc Natl Acad Sci U S A. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. Vol. 103, № 26. P. 9903–9907.
29. Ling V. Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance // Cancer Chemother Pharmacol. Cancer Chemother Pharmacol, 1997. Vol. 40 Suppl.

30. Sarkadi B. et al. ABCG2 - A transporter for all seasons // FEBS Lett. FEBS Lett, 2004. Vol. 567, № 1. P. 116–120.
31. Loebinger M.R. et al. Squamous cell cancers contain a side population of stem-like cells that are made chemosensitive by ABC transporter blockade // Br J Cancer. Br J Cancer, 2008. Vol. 98, № 2. P. 380–387.
32. Sharma S. V. et al. A common signaling cascade may underlie “addiction” to the Src, BCR-ABL, and EGF receptor oncogenes // Cancer Cell. Cancer Cell, 2006. Vol. 10, № 5. P. 425–435.
33. Hersey P., Zhuang L., Zhang X.D. Current strategies in overcoming resistance of cancer cells to apoptosis melanoma as a model // Int Rev Cytol. Int Rev Cytol, 2006. Vol. 251. P. 131–158.
34. Forte M., Bernardi P. The permeability transition and BCL-2 family proteins in apoptosis: co-conspirators or independent agents? // Cell Death Differ. Cell Death Differ, 2006. Vol. 13, № 8. P. 1287–1290.
35. Pham C.G. et al. Upregulation of Twist-1 by NF-kappaB blocks cytotoxicity induced by chemotherapeutic drugs // Mol Cell Biol. Mol Cell Biol, 2007. Vol. 27, № 11. P. 3920–3935.
36. Oxford S. et al. Current strategies to target the anti-apoptotic Bcl-2 protein in cancer cells // Curr Med Chem. Curr Med Chem, 2004. Vol. 11, № 8. P. 1031–1040.
37. McDermott K.M. et al. p16(INK4a) prevents centrosome dysfunction and genomic instability in primary cells // PLoS Biol. PLoS Biol, 2006. Vol. 4, № 3. P. 0350–0365.
38. Loeb L.A., Bielas J.H., Beckman R.A. Cancers exhibit a mutator phenotype: clinical implications // Cancer Res. Cancer Res, 2008. Vol. 68, № 10. P. 3551–3557.
39. Lucky S.S., Soo K.C., Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy // Chem Rev. Chem Rev, 2015. Vol. 115, № 4. P. 1990–2042.
40. Little J.B. Cellular, Molecular, and Carcinogenic Effects of Radiation // Hematol Oncol Clin North Am. Elsevier, 1993. Vol. 7, № 2. P. 337–352.

41. Brown J.M., Carlson D.J., Brenner D.J. The tumor radiobiology of SRS and SBRT: are more than the 5 Rs involved? // *Int J Radiat Oncol Biol Phys. Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2014. Vol. 88, № 2. P. 254–262.
42. Mueller L.E. et al. Clinical outcomes and tumor microenvironment response to radiofrequency ablation therapy: a systematic review and meta-analysis // *Gland Surg. AME Publishing Company*, 2024. Vol. 13, № 1. P. 4–18.
43. GRAY L.H. et al. The concentration of oxygen dissolved in tissues at the time of irradiation as a factor in radiotherapy // *Br J Radiol. Br J Radiol*, 1953. Vol. 26, № 312. P. 638–648.
44. Thomlinson R.H., Gray L.H. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy // *Br J Cancer. Br J Cancer*, 1955. Vol. 9, № 4. P. 539–549.
45. Paulet E. et al. Factors limiting complete tumor ablation by radiofrequency ablation // *Cardiovasc Intervent Radiol*. 2008. Vol. 31, № 1. P. 107–115.
46. Couzin-Frankel J. Breakthrough of the year 2013. Cancer immunotherapy // *Science. Science*, 2013. Vol. 342, № 6165. P. 1432–1433.
47. Chevolet I. et al. Characterization of the in vivo immune network of IDO, tryptophan metabolism, PD-L1, and CTLA-4 in circulating immune cells in melanoma // *Oncoimmunology. Oncoimmunology*, 2015. Vol. 4, № 3. P. 1–8.
48. Steinman R.M., Cohn Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution // *J Exp Med. J Exp Med*, 1973. Vol. 137, № 5. P. 1142–1162.
49. Banchereau J., Steinman R.M. Dendritic cells and the control of immunity // *Nature. Nature*, 1998. Vol. 392, № 6673. P. 245–252.
50. Gomella L.G., Gelpi-Hammerschmidt F., Kundavram C. Practical guide to immunotherapy in castration resistant prostate cancer: the use of sipuleucel-T immunotherapy // *The Canadian Journal of UrologyTM: International Supplement*. 2014.

51. Sternberg C.N. et al. Progress in the treatment of advanced prostate cancer // Am Soc Clin Oncol Educ Book. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2014. № 34. P. 117–131.
52. Grimm E.A. et al. Lymphokine-activated killer cell phenomenon. Lysis of natural killer-resistant fresh solid tumor cells by interleukin 2-activated autologous human peripheral blood lymphocytes // J Exp Med. J Exp Med, 1982. Vol. 155, № 6. P. 1823–1841.
53. Rosenberg S.A. et al. Observations on the systemic administration of autologous lymphokine-activated killer cells and recombinant interleukin-2 to patients with metastatic cancer // N Engl J Med. N Engl J Med, 1985. Vol. 313, № 23. P. 1485–1492.
54. Cameron R.B., Spiess P.J., Rosenberg S.A. Synergistic antitumor activity of tumor-infiltrating lymphocytes, interleukin 2, and local tumor irradiation. Studies on the mechanism of action // J Exp Med. J Exp Med, 1990. Vol. 171, № 1. P. 249–263.
55. Kolb H.J. et al. Donor leukocyte transfusions for treatment of recurrent chronic myelogenous leukemia in marrow transplant patients // Blood. American Society of Hematology, 1990. Vol. 76, № 12. P. 2462–2465.
56. Westwood J.A., Kershaw M.H. Genetic redirection of T cells for cancer therapy // J Leukoc Biol. J Leukoc Biol, 2010. Vol. 87, № 5. P. 791–803.
57. Carretero F.J. et al. Frequent HLA class I alterations in human prostate cancer: molecular mechanisms and clinical relevance // Cancer Immunol Immunother. Cancer Immunol Immunother, 2016. Vol. 65, № 1. P. 47–59.
58. Seliger B. et al. Association of HLA class I antigen abnormalities with disease progression and early recurrence in prostate cancer // Cancer Immunol Immunother. Cancer Immunol Immunother, 2010. Vol. 59, № 4. P. 529–540.
59. Gross G. et al. Generation of effector T cells expressing chimeric T cell receptor with antibody type-specificity. // Transplant Proc. 1989. P. 127–130.
60. Westwood J.A. et al. Adoptive transfer of T cells modified with a humanized chimeric receptor gene inhibits growth of Lewis-Y-expressing tumors in mice

- // Proc Natl Acad Sci U S A. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. Vol. 102, № 52. P. 19051–19056.
61. Louis C.U. et al. Antitumor activity and long-term fate of chimeric antigen receptor-positive T cells in patients with neuroblastoma // Blood. Blood, 2011. Vol. 118, № 23. P. 6050–6056.
 62. Abken H. et al. A novel strategy in the elimination of disseminated melanoma cells: chimeric receptors endow T cells with tumor specificity // Recent Results Cancer Res. Recent Results Cancer Res, 2001. Vol. 158. P. 249–264.
 63. Chekmasova A.A. et al. Successful eradication of established peritoneal ovarian tumors in SCID-Beige mice following adoptive transfer of T cells genetically targeted to the MUC16 antigen // Clin Cancer Res. Clin Cancer Res, 2010. Vol. 16, № 14. P. 3594–3606.
 64. Hegde M. et al. Combinational targeting offsets antigen escape and enhances effector functions of adoptively transferred T cells in glioblastoma // Mol Ther. Mol Ther, 2013. Vol. 21, № 11. P. 2087–2101.
 65. Kalos M. et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia // Sci Transl Med. Sci Transl Med, 2011. Vol. 3, № 95.
 66. Cruz C.R.Y. et al. Infusion of donor-derived CD19-redirected virus-specific T cells for B-cell malignancies relapsed after allogeneic stem cell transplant: a phase 1 study // Blood. Blood, 2013. Vol. 122, № 17. P. 2956–2973.
 67. Gunaydin G., Gedik M.E., Ayan S. Photodynamic Therapy-Current Limitations and Novel Approaches // Front Chem. Front Chem, 2021. Vol. 9.
 68. Deng X., Shao Z., Zhao Y. Solutions to the Drawbacks of Photothermal and Photodynamic Cancer Therapy // Adv Sci (Weinh). Adv Sci (Weinh), 2021. Vol. 8, № 3.
 69. E R., P W., MR H. Immune response after photodynamic therapy increases anti-cancer and anti-bacterial effects // World J Immunol. World J Immunol, 2014. Vol. 4, № 1. P. 1.

70. Steubing R.W. et al. Activation of macrophages by Photofrin II during photodynamic therapy // *J Photochem Photobiol B. Elsevier*, 1991. Vol. 10, № 1–2. P. 133–145.
71. Jiang Z. et al. Pharmaceutical development, composition and quantitative analysis of phthalocyanine as the photosensitizer for cancer photodynamic therapy // *J Pharm Biomed Anal. Elsevier*, 2014. Vol. 87. P. 98–104.
72. Castano A.P., Mroz P., Hamblin M.R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity // *Nature Reviews Cancer* 2006 6:7. Nature Publishing Group, 2006. Vol. 6, № 7. P. 535–545.
73. Gollnick S.O. et al. Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation // *British Journal of Cancer* 2003 88:11. Nature Publishing Group, 2003. Vol. 88, № 11. P. 1772–1779.
74. Hendrzak-Henlon J.A. et al. Role of the Immune System in Mediating the Antitumor Effect of Benzophenothiazine Photodynamic Therapy // *Photochem Photobiol. John Wiley & Sons, Ltd*, 1999. Vol. 69, № 5. P. 575–581.
75. Chilakamarthi U., Giribabu L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future // *Chemical Record. John Wiley and Sons Inc.*, 2017. Vol. 17, № 8. P. 775–802.
76. Kwiatkowski S. et al. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations // *Biomed Pharmacother. Biomed Pharmacother*, 2018. Vol. 106. P. 1098–1107.
77. Oleinick N.L., Morris R.L., Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how // *Photochemical & Photobiological Sciences. Royal Society of Chemistry*, 2002. Vol. 1, № 1. P. 1–21.
78. Yoon H.Y. et al. Tumor-targeting hyaluronic acid nanoparticles for photodynamic imaging and therapy // *Biomaterials. Elsevier*, 2012. Vol. 33, № 15. P. 3980–3989.
79. Agostinis P. et al. Photodynamic therapy of cancer: an update // *CA Cancer J Clin. CA Cancer J Clin*, 2011. Vol. 61, № 4. P. 250–281.

80. Agostinis P. et al. Photodynamic therapy of cancer: An update // *CA Cancer J Clin.* American Cancer Society, 2011. Vol. 61, № 4. P. 250–281.
81. Xue L.Y., Chiu S.M., Oleinick N.L. Photochemical destruction of the Bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4 // *Oncogene.* Oncogene, 2001. Vol. 20, № 26. P. 3420–3427.
82. Reem Z. Renno et al. Photodynamic Therapy Using Lu-Tex Induces Apoptosis In Vitro, and Its Effect Is Potentiated by Angiostatin in Retinal Capillary Endothelial Cells // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000.
83. Gad F. et al. Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid induces apoptosis and caspase activation in malignant T cells // *J Cutan Med Surg.* J Cutan Med Surg, 2001. Vol. 5, № 1. P. 8–13.
84. Mroz P. et al. Photodynamic therapy of tumors can lead to development of systemic antigen-specific immune response // *PLoS One.* PLoS One, 2010. Vol. 5, № 12.
85. Henderson B.W., Busch T.M., Snyder J.W. Fluence rate as a modulator of PDT mechanisms // *Lasers Surg Med.* Lasers Surg Med, 2006. Vol. 38, № 5. P. 489–493.
86. Moura R.S. et al. Antimicrobial Effects of Photodynamic Therapy Delivered via Hydrogels for Inhibiting *Staphylococcus aureus*: A Systematic Review. 2024.
87. Mroz P. et al. Cell death pathways in photodynamic therapy of cancer // *Cancers (Basel).* Cancers (Basel), 2011. Vol. 3, № 2. P. 2516–2539.
88. Nagata S. et al. Necrotic and apoptotic cell death of human malignant melanoma cells following photodynamic therapy using an amphiphilic photosensitizer, ATX-S10(Na) // *Lasers Surg Med.* Lasers Surg Med, 2003. Vol. 33, № 1. P. 64–70.
89. François A. et al. mTHPC-based photodynamic therapy induction of autophagy and apoptosis in cultured cells in relation to mitochondria and

- endoplasmic reticulum stress // *Int J Oncol*. *Int J Oncol*, 2011. Vol. 39, № 6. P. 1537–1543.
90. Song C. et al. Photodynamic therapy induces autophagy-mediated cell death in human colorectal cancer cells via activation of the ROS/JNK signaling pathway // *Cell Death Dis*. *Cell Death Dis*, 2020. Vol. 11, № 10.
 91. Almeida R.D. et al. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2004. Vol. 1704, № 2. P. 59–86.
 92. Plaetzer K. et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects // *Lasers Med Sci*. 2009. Vol. 24, № 2. P. 259–268.
 93. Buytaert E., Dewaele M., Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 2007. Vol. 1776, № 1. P. 86–107.
 94. Chiaviello A. et al. Combination of photodynamic therapy with aspirin in human-derived lung adenocarcinoma cells affects proteasome activity and induces apoptosis // *Cell Prolif*. 2010. Vol. 43, № 5. P. 480–493.
 95. Juarranz Á. et al. Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications // *Clinical and Translational Oncology*. 2008. Vol. 10, № 3. P. 148–154.
 96. O'Connor A.E., Gallagher W.M., Byrne A.T. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy // *Photochem Photobiol*. 2009. Vol. 85, № 5. P. 1053–1074.
 97. Ding X. et al. Hematoporphyrin monomethyl ether photodynamic damage on HeLa cells by means of reactive oxygen species production and cytosolic free calcium concentration elevation // *Cancer Lett*. 2004. Vol. 216, № 1. P. 43–54.
 98. Triesscheijn M. et al. Photodynamic Therapy in Oncology // *Oncologist*. 2006. Vol. 11, № 9. P. 1034–1044.

99. Bhuvaneswari R. et al. The effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis // *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2009. Vol. 66, № 14. P. 2275–2283.
100. Detty M.R., Gibson S.L., Wagner S.J. Current Clinical and Preclinical Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy // *J Med Chem*. 2004. Vol. 47, № 16. P. 3897–3915.
101. Wang P., Henning S.M., Heber D. Limitations of MTT and MTS-Based Assays for Measurement of Antiproliferative Activity of Green Tea Polyphenols // *PLoS One*. 2010. Vol. 5, № 4. P. e10202.
102. Lim Y. et al. Antitumor effect of photodynamic therapy with chlorin-based photosensitizer DH-II-24 in colorectal carcinoma // *Cancer Sci*. 2009. Vol. 100, № 12. P. 2431–2436.
103. Byrne A.T. et al. Vascular-targeted photodynamic therapy with BF₂-chelated Tetraaryl-Azadipyrromethene agents: a multi-modality molecular imaging approach to therapeutic assessment // *Br J Cancer*. 2009. Vol. 101, № 9. P. 1565–1573.
104. Robertson C.A., Evans D.H., Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT // *J Photochem Photobiol B*. 2009. Vol. 96, № 1. P. 1–8.
105. Kacerovská D. et al. Photodynamic therapy of non-melanoma skin cancer using a local St. John's wort extract - an experimental study. // *Photochem Photobiol*. 2008. Vol. 84, № 3. P. 779–785.
106. Theodossiou T.A. et al. The Multifaceted Photocytotoxic Profile of Hypericin // *Mol Pharm*. 2009. Vol. 6, № 6. P. 1775–1789.
107. Lo P.C. et al. The unique features and promises of phthalocyanines as advanced photosensitisers for photodynamic therapy of cancer // *Chem Soc Rev*. 2020. Vol. 49, № 4. P. 1041–1056.
108. Chen J.J. et al. In vitro and in vivo antitumor activity of a novel porphyrin-based photosensitizer for photodynamic therapy // *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015. Vol. 141, № 9. P. 1553–1561.

109. Nene L.C., Nkune N.W., Abrahamse H. Anticancer photodynamic activities of triphenylphosphine-labelled phthalocyanines and their bovine serum albumin-gold nanoparticles- complexes on melanoma A375 cell lines in vitro // *J Inorg Biochem. J Inorg Biochem*, 2024. Vol. 256.
110. Kuruppuarachchi M. et al. Polyacrylamide nanoparticles as a delivery system in photodynamic therapy // *Mol Pharm. Mol Pharm*, 2011. Vol. 8, № 3. P. 920–931.
111. Düzgüneş N. et al. Photodynamic therapy of cancer with liposomal photosensitizers // *Ther Deliv. Ther Deliv*, 2018. Vol. 9, № 11. P. 823–832.
112. Pegaz B. et al. Effect of nanoparticle size on the extravasation and the photothrombic activity of meso(p-tetracarboxyphenyl)porphyrin // *J Photochem Photobiol B*. 2006. Vol. 85, № 3. P. 216–222.
113. База знаний по биологии человека: флуорохром, флуорофор (fluorochrome, fluorophore). [Электронный ресурс]. [Electronic resource]. URL: <http://humbio.ru/> (accessed: 07.12.2023).
114. Galas L. et al. “Probe, Sample, and Instrument (PSI)”: The Hat-Trick for Fluorescence Live Cell Imaging // *Chemosensors*. 2018. Vol. 6, № 3. P. 40.
115. Стрыгин А.В., Доценко А.М., Морковин Е.И. [и др.]. Флуоресценция в биомедицинских исследованиях: учебное пособие / ed. Стрыгин А.В. Волгоград: Изд-во ВолгГМУ, 2020. 160 p.
116. Cepraga C. Two-photon chromophore-polymer conjugates grafted onto gold nanoparticles as fluorescent probes for bioimaging and photodynamic therapy applications: diss. . INSA de Lyon, 2012.
117. Seah D., Cheng Z., Vendrell M. Fluorescent Probes for Imaging in Humans: Where Are We Now? // *ACS Nano. ACS Nano*, 2023. Vol. 17, № 20. P. 19478–19490.
118. Desmettre T., Devoisselle J.M., Mordon S. Fluorescence properties and metabolic features of indocyanine green (ICG) as related to angiography // *Surv Ophthalmol. Surv Ophthalmol*, 2000. Vol. 45, № 1. P. 15–27.

119. Osayi S.N. et al. Near-infrared fluorescent cholangiography facilitates identification of biliary anatomy during laparoscopic cholecystectomy // *Surg Endosc. Surg Endosc*, 2015. Vol. 29, № 2. P. 368–375.
120. Vutskits L. et al. Adverse effects of methylene blue on the central nervous system. // *Anesthesiology*. Lippincott Williams and Wilkins, 2008. Vol. 108, № 4. P. 684–692.
121. Renschler C.L., Harrah L.A. Determination of quantum yields of fluorescence by op-timizing the fluorescence intensity // *Anal. Chem.* 1983. Vol. 55. P. 798–800.
122. 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.
123. Ушакова Е.В. Перенос энергии фотовозбуждения в системах квантовых точек // *Научно-технический вестник информационных технологий, механики и оптики*. 2008. Vol. 51. P. 283–288.
124. Dietrich A. et al. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) and competing processes in donor–acceptor substituted DNA strands: a comparative study of ensemble and single-molecule data // *Reviews in Molecular Biotechnology*. 2002. Vol. 82, № 3. P. 211–231.
125. Martin K.J. et al. Accepting from the best donor; analysis of long-lifetime donor fluorescent protein pairings to optimise dynamic FLIM-based FRET experiments // *PLoS One*. 2018. Vol. 13, № 1. P. e0183585.
126. Clegg R.M. Chapter 1 Förster resonance energy transfer—FRET what is it, why do it, and how it's done / ed. Gadella T.W.J. 2009. P. 1–57.
127. Ali A. et al. Review on Recent Progress in Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Diverse Applications // *Front Chem.* 2021. Vol. 9.
128. Włodarczyk A. et al. Magnetite Nanoparticles in Magnetic Hyperthermia and Cancer Therapies: Challenges and Perspectives // *Nanomaterials*. 2022. Vol. 12, № 11. P. 1807.

129. Рудаковская П.Г. et al. СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТ–ЗОЛОТО, ИМЕЮЩИХ СТРУКТУРУ ТИПА ЯДРО–ОБОЛОЧКА // Вестник Московского Университета. 2015. Vol. 56, № 3. P. 181–189.
130. Wang X. et al. Preparation of $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$ nano-composites by self-assembly technique for immobilization of glucose oxidase // Sci Bull (Beijing). 2009. Vol. 54, № 7. P. 1176–1181.
131. Singh N. et al. Glutathione conjugated superparamagnetic $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ core shell nanoparticles for pH controlled release of DOX // Materials Science and Engineering: C. 2019. Vol. 100. P. 453–465.
132. Alves T.E.P. et al. Magnetic-plasmonic properties of $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{Au}$ nanocomposite // Journal of Physics and Chemistry of Solids. 2022. Vol. 164. P. 110630.
133. Darling S.B., Bader S.D. A materials chemistry perspective on nanomagnetism // J Mater Chem. 2005. Vol. 15, № 39. P. 4189.
134. Rana S., Philip J., Raj B. Micelle based synthesis of cobalt ferrite nanoparticles and its characterization using Fourier Transform Infrared Transmission Spectrometry and Thermogravimetry // Mater Chem Phys. 2010. Vol. 124, № 1. P. 264–269.
135. Ahmed M.A., EL-Khawlani A.A. Enhancement of the crystal size and magnetic properties of Mg-substituted Co ferrite // J Magn Magn Mater. 2009. Vol. 321, № 13. P. 1959–1963.
136. Duff D.G., Baiker A., Edwards P.P. A new hydrosol of gold clusters // J Chem Soc Chem Commun. 1993. № 1. P. 96.
137. Levin C.S. et al. Magnetic–Plasmonic Core–Shell Nanoparticles // ACS Nano. 2009. Vol. 3, № 6. P. 1379–1388.
138. Liz-Marzán L.M., Giersig M., Mulvaney P. Synthesis of Nanosized Gold–Silica Core–Shell Particles // Langmuir. 1996. Vol. 12, № 18. P. 4329–4335.
139. Chauhan A.S. Dendrimers for Drug Delivery // Molecules. 2018. Vol. 23, № 4. P. 938.

140. Tekade R.K. et al. Exploring dendrimer towards dual drug delivery: pH responsive simultaneous drug-release kinetics // *J Microencapsul.* 2009. Vol. 26, № 4. P. 287–296.
141. Quintana A. et al. Design and function of a dendrimer-based therapeutic nanodevice targeted to tumor cells through the folate receptor // *Pharm Res.* 2002. Vol. 19, № 9. P. 1310–1316.
142. Gu H. et al. Heterodimers of Nanoparticles: Formation at a Liquid–Liquid Interface and Particle-Specific Surface Modification by Functional Molecules // *J Am Chem Soc.* 2005. Vol. 127, № 1. P. 34–35.
143. Choi J. et al. Biocompatible Heterostructured Nanoparticles for Multimodal Biological Detection // *J Am Chem Soc.* 2006. Vol. 128, № 50. P. 15982–15983.
144. Ma Z., Dai S. Development of novel supported gold catalysts: A materials perspective // *Nano Res.* 2011. Vol. 4, № 1. P. 3–32.
145. Wang C. et al. A General Approach to Noble Metal–Metal Oxide Dumbbell Nanoparticles and Their Catalytic Application for CO Oxidation // *Chemistry of Materials.* 2010. Vol. 22, № 10. P. 3277–3282.
146. Huang X. et al. Simplifying the Creation of Dumbbell-Like Cu-Ag Nanostructures and Their Enhanced Catalytic Activity // *Chemistry – A European Journal.* 2012. Vol. 18, № 31. P. 9505–9510.
147. Song J. et al. Double-Layered Plasmonic-Magnetic Vesicles by Self-Assembly of Janus Amphiphilic Gold-Iron(II,III) Oxide Nanoparticles // *Angew Chem Int Ed Engl.* *Angew Chem Int Ed Engl*, 2017. Vol. 56, № 28. P. 8110–8114.
148. Shiji R et al. Fluorescent Gold Nanoclusters as a Powerful Tool for Sensing Applications in Cancer Management. 2017. P. 385–428.
149. Bardhan R. et al. Theranostic Nanoshells: From Probe Design to Imaging and Treatment of Cancer // *Acc Chem Res.* 2011. Vol. 44, № 10. P. 936–946.
150. Albanese A., Tang P.S., Chan W.C.W. The effect of nanoparticle size, shape, and surface chemistry on biological systems // *Annu Rev Biomed Eng.* *Annu Rev Biomed Eng*, 2012. Vol. 14. P. 1–16.

151. Liu T. et al. Two-Stage Size Decrease and Enhanced Photoacoustic Performance of Stimuli-Responsive Polymer-Gold Nanorod Assembly for Increased Tumor Penetration // *Adv Funct Mater.* Wiley-VCH Verlag, 2019. Vol. 29, № 16.
152. Gratton S.E.A. et al. The effect of particle design on cellular internalization pathways // *Proc Natl Acad Sci U S A.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. Vol. 105, № 33. P. 11613–11618.
153. Jo D.H. et al. Size, surface charge, and shape determine therapeutic effects of nanoparticles on brain and retinal diseases // *Nanomedicine.* Elsevier, 2015. Vol. 11, № 7. P. 1603–1611.
154. Suk J.S. et al. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery // *Adv Drug Deliv Rev.* Adv Drug Deliv Rev, 2016. Vol. 99, № Pt A. P. 28–51.
155. Owens D.E., Peppas N.A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles // *Int J Pharm.* Int J Pharm, 2006. Vol. 307, № 1. P. 93–102.
156. Han L., Tang C., Yin C. pH-Responsive Core-Shell Structured Nanoparticles for Triple-Stage Targeted Delivery of Doxorubicin to Tumors // *ACS Appl Mater Interfaces.* ACS Appl Mater Interfaces, 2016. Vol. 8, № 36. P. 23498–23508.
157. Ge Z., Liu S. Functional block copolymer assemblies responsive to tumor and intracellular microenvironments for site-specific drug delivery and enhanced imaging performance // *Chem Soc Rev.* Chem Soc Rev, 2013. Vol. 42, № 17. P. 7289–7325.
158. Bertrand N. et al. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology // *Adv Drug Deliv Rev.* Adv Drug Deliv Rev, 2014. Vol. 66. P. 2–25.
159. Ma X., Zhao Y., Liang X.J. Theranostic nanoparticles engineered for clinic and pharmaceuticals // *Acc Chem Res.* Acc Chem Res, 2011. Vol. 44, № 10. P. 1114–1122.

160. Zhang H., Wang G., Yang H. Drug delivery systems for differential release in combination therapy // *Expert Opin Drug Deliv*. *Expert Opin Drug Deliv*, 2011. Vol. 8, № 2. P. 171–190.
161. Davis M.E. The first targeted delivery of siRNA in humans via a self-assembling, cyclodextrin polymer-based nanoparticle: from concept to clinic // *Mol Pharm*. *Mol Pharm*, 2009. Vol. 6, № 3. P. 659–668.
162. Rao D.A. et al. Biodegradable PLGA based nanoparticles for sustained regional lymphatic drug delivery // *J Pharm Sci*. *J Pharm Sci*, 2010. Vol. 99, № 4. P. 2018–2031.
163. Xu C., Wang B., Sun S. Dumbbell-like Au–Fe₃O₄ Nanoparticles for Target-Specific Platin Delivery // *J Am Chem Soc*. 2009. Vol. 131, № 12. P. 4216–4217.
164. Díez A.G. et al. Multicomponent magnetic nanoparticle engineering: the role of structure-property relationship in advanced applications // *Mater Today Chem*. 2022. Vol. 26. P. 101220.
165. Yu H. et al. Dumbbell-like Bifunctional Au–Fe₃O₄ Nanoparticles // *Nano Lett*. 2005. Vol. 5, № 2. P. 379–382.
166. Leung K.C.-F. et al. Gold and iron oxide hybrid nanocomposite materials // *Chem. Soc. Rev*. 2012. Vol. 41, № 5. P. 1911–1928.
167. Malekpour M.R. et al. Combination nanochemotherapy of brain tumor using polymeric nanoparticles loaded with doxorubicin and paclitaxel: An in vitro and in vivo study // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2023. Vol. 193. P. 175–186.
168. Mitchell M.J. et al. Engineering precision nanoparticles for drug delivery // *Nat Rev Drug Discov*. 2021. Vol. 20, № 2. P. 101–124.
169. Chen F., Ehlerding E.B., Cai W. Theranostic Nanoparticles // *Journal of Nuclear Medicine*. 2014. Vol. 55, № 12. P. 1919–1922.
170. Vagena I.-A. et al. Enhancement of EPR Effect for Passive Tumor Targeting: Current Status and Future Perspectives // *Applied Sciences* 2025, Vol. 15, Page

3189. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2025. Vol. 15, № 6. P. 3189.
171. Ostroverkhov P. et al. HSA-Coated Magnetic Nanoparticles for MRI-Guided Photodynamic Cancer Therapy // *Pharmaceutics*. Pharmaceutics, 2018. Vol. 10, № 4.
172. Grin M.A. et al. Novel bacteriochlorophyll-based photosensitizers and their photodynamic activity // *J Porphyr Phthalocyanines*. 2014. Vol. 18, № 01n02. P. 129–138.
173. Efremova M. V. et al. Magnetite-Gold nanohybrids as ideal all-in-one platforms for theranostics // *Sci Rep*. 2018. Vol. 8, № 1. P. 11295.
174. Plotnikova E.A. et al. Primary screening of substances-photosensibilizers of the bacteriochlorin range for photodynamic therapy of malignant neoplasms // *Biomeditsinskaya Khimiya*. 2018. Vol. 64, № 3. P. 283–289.
175. Nguyen M.D. et al. Fe₃O₄ Nanoparticles: Structures, Synthesis, Magnetic Properties, Surface Functionalization, and Emerging Applications // *Applied Sciences*. 2021. Vol. 11, № 23. P. 11301.
176. Wei Y. et al. Synthesis of Fe₃O₄ Nanoparticles and their Magnetic Properties // *Procedia Eng*. 2012. Vol. 27. P. 632–637.
177. Li Q. et al. Correlation between particle size/domain structure and magnetic properties of highly crystalline Fe₃O₄ nanoparticles // *Sci Rep*. 2017. Vol. 7, № 1. P. 9894.
178. Upadhyay S., Parekh K., Pandey B. Influence of crystallite size on the magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles // *J Alloys Compd*. 2016. Vol. 678. P. 478–485.
179. Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. // *Pharmacol Rev*. 2001. Vol. 53, № 2. P. 283–318.
180. Moore T.L. et al. Nanoparticle administration method in cell culture alters particle-cell interaction // *Sci Rep*. 2019. Vol. 9, № 1. P. 900.

181. Nowak-Jary J., Machnicka B. Pharmacokinetics of magnetic iron oxide nanoparticles for medical applications // *J Nanobiotechnology*. 2022. Vol. 20, № 1. P. 305.
182. 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.
183. Huang R.B. et al. Dynamic and cellular interactions of nanoparticles in vascular-targeted drug delivery (review) // *Mol Membr Biol*. 2010. Vol. 27, № 7. P. 312–327.
184. Gao H., He Q. The interaction of nanoparticles with plasma proteins and the consequent influence on nanoparticles behavior // *Expert Opin Drug Deliv*. 2014. Vol. 11, № 3. P. 409–420.
185. Walkey C.D. et al. Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake // *J Am Chem Soc*. 2012. Vol. 134, № 4. P. 2139–2147.
186. Shi L. et al. Effects of polyethylene glycol on the surface of nanoparticles for targeted drug delivery // *Nanoscale*. 2021. Vol. 13, № 24. P. 10748–10764.
187. 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.
188. Pietraszewska-Bogiel A., Gadella T.W.J. FRET microscopy: from principle to routine technology in cell biology // *J Microsc. J Microsc*, 2011. Vol. 241, № 2. P. 111–118.
189. Xu X. et al. Secondary Structure in Overcoming Photosensitizers' Aggregation: α -Helical Polypeptides for Enhanced Photodynamic Therapy // *Adv Healthc Mater*. 2023. Vol. 12, № 21.
190. Langhals H. et al. Förster Resonant Energy Transfer in Orthogonally Arranged Chromophores // *J Am Chem Soc*. 2010. Vol. 132, № 47. P. 16777–16782.

191. 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.
192. Brandis A.S., Salomon Y., Scherz A. Bacteriochlorophyll Sensitizers in Photodynamic Therapy // *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls*. Dordrecht: Springer Netherlands. P. 485–494.
193. Lee E.J., Kasper F.K., Mikos A.G. Biomaterials for Tissue Engineering // *Ann Biomed Eng*. 2014. Vol. 42, № 2. P. 323–337.
194. Ash C. et al. Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods // *Lasers Med Sci*. 2017. Vol. 32, № 8. P. 1909–1918.
195. Ni D. et al. Engineering of inorganic nanoparticles as magnetic resonance imaging contrast agents // *Chem Soc Rev*. 2017. Vol. 46, № 23. P. 7438–7468.
196. Blanco-Andujar C. et al. Design of Iron oxide-based Nanoparticles for MRI and Magnetic Hyperthermia // *Nanomedicine*. 2016. Vol. 11, № 14. P. 1889–1910.
197. Jun Y. et al. Nanoscale Size Effect of Magnetic Nanocrystals and Their Utilization for Cancer Diagnosis via Magnetic Resonance Imaging // *J Am Chem Soc*. 2005. Vol. 127, № 16. P. 5732–5733.
198. Paquet C. et al. Clusters of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Encapsulated in a Hydrogel: A Particle Architecture Generating a Synergistic Enhancement of the T₂ Relaxation // *ACS Nano*. 2011. Vol. 5, № 4. P. 3104–3112.
199. Huang J. et al. Effects of Nanoparticle Size on Cellular Uptake and Liver MRI with Polyvinylpyrrolidone-Coated Iron Oxide Nanoparticles // *ACS Nano*. 2010. Vol. 4, № 12. P. 7151–7160.
200. Vink H., Duling B.R. Capillary endothelial surface layer selectively reduces plasma solute distribution volume // *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 2000. Vol. 278, № 1. P. H285–H289.

201. Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C. Long-Circulating and Target-Specific Nanoparticles: Theory to Practice // *Pharmacol Rev.* 2001. Vol. 53, № 2. P. 283.
202. Choi H.S. et al. Design considerations for tumour-targeted nanoparticles // *Nat Nanotechnol.* 2010. Vol. 5, № 1. P. 42–47.
203. Schipper M.L. et al. Particle Size, Surface Coating, and PEGylation Influence the Biodistribution of Quantum Dots in Living Mice // *Small.* 2009. Vol. 5, № 1. P. 126–134.
204. Pultrum B.B. et al. Detection of lymph node metastases with ultrasmall superparamagnetic iron oxide (USPIO)-enhanced magnetic resonance imaging in oesophageal cancer: a feasibility study. // *Cancer Imaging.* 2009. Vol. 9, № 1. P. 19–28.
205. Briley-Saebo K.C. et al. Targeted iron oxide particles for in vivo magnetic resonance detection of atherosclerotic lesions with antibodies directed to oxidation-specific epitopes. // *J Am Coll Cardiol.* 2011. Vol. 57, № 3. P. 337–347.
206. Veisheh O. et al. Specific targeting of brain tumors with an optical/magnetic resonance imaging nanoprobe across the blood-brain barrier. // *Cancer Res.* 2009. Vol. 69, № 15. P. 6200–6207.
207. Rosen J.E. et al. Iron oxide nanoparticles for targeted cancer imaging and diagnostics. // *Nanomedicine.* 2012. Vol. 8, № 3. P. 275–290.
208. Moghimi S.M. et al. An investigation of the filtration capacity and the fate of large filtered sterically-stabilized microspheres in rat spleen // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 1993. Vol. 1157, № 2. P. 233–240.
209. Chao Y. et al. Recognition of Dextran–Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle Conjugates (Feridex) via Macrophage Scavenger Receptor Charged Domains // *Bioconjug Chem.* 2012. Vol. 23, № 5. P. 1003–1009.

210. Cataldi M. et al. Emerging Role of the Spleen in the Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies, Nanoparticles and Exosomes // *Int J Mol Sci*. 2017. Vol. 18, № 6. P. 1249.
211. Dai Q. et al. Quantifying the Ligand-Coated Nanoparticle Delivery to Cancer Cells in Solid Tumors // *ACS Nano*. 2018. Vol. 12, № 8. P. 8423–8435.
212. Zelepukin I. V. et al. Fast processes of nanoparticle blood clearance: Comprehensive study // *Journal of Controlled Release*. 2020. Vol. 326. P. 181–191.
213. Zhang R.X. et al. Design of nanocarriers for nanoscale drug delivery to enhance cancer treatment using hybrid polymer and lipid building blocks // *Nanoscale*. 2017. Vol. 9, № 4. P. 1334–1355.
214. Wilhelm S. et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours // *Nat Rev Mater*. 2016. Vol. 1, № 5. P. 16014.
215. Nakamura Y. et al. Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer? // *Bioconjug Chem*. 2016. Vol. 27, № 10. P. 2225–2238.
216. Hajri A. et al. Human pancreatic carcinoma cells are sensitive to photodynamic therapy *in vitro* and *in vivo* // *Journal of British Surgery*. 1999. Vol. 86, № 7. P. 899–906.
217. Dellinger M. Apoptosis or Necrosis Following Photofrin® Photosensitization: Influence of the Incubation Protocol // *Photochem Photobiol*. 1996. Vol. 64, № 1. P. 182–187.
218. Kessel D. et al. The Role of Subcellular Localization in Initiation of Apoptosis by Photodynamic Therapy // *Photochem Photobiol*. 1997. Vol. 65, № 3. P. 422–426.
219. Chen B., Roskams T., de Witte P.A.M. Antivascular Tumor Eradication by Hypericin-mediated Photodynamic Therapy¶ // *Photochem Photobiol*. 2002. Vol. 76, № 5. P. 509.