

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

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Крот Алексей Романович

**ИССЛЕДОВАНИЯ ОПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
НАНОРАЗМЕРНЫХ ФОРМ ТЕТРАПИРОЛЬНЫХ
ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ФАКТОРАХ**

Специальность:

1.3.6. Оптика

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
кандидат физико-математических наук
Сергеева Ирина Александровна

Москва – 2025

Оглавление

	Стр.
Введение	4
 Глава 1. Современное состояние исследований наночастиц фотосенсибилизаторов третьего поколения	
24	
1.1 Основы фотодинамического эффекта	24
1.2 Этапы фотодинамической терапии	28
1.3 Типы фотосенсибилизаторов	33
1.4 Оптические методы анализа фотосенсибилизаторов	44
1.5 Выводы к Главе 1	50
Глава 2. Исследуемые объекты	53
2.1 Наночастицы на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера	56
2.2 Способные к самосборке амфифильные ФС	63
2.3 Сывороточный альбумин	67
2.4 Выводы к Главе 2	70
Глава 3. Основы методов измерений	72
3.1 Метод динамического светорассеяния	72
3.2 Спектрофотометрия и флуориметрия	77
3.3 Учёт влияния артефактного пика	84
3.4 Выводы к Главе 3	85
 Глава 4. Наночастицы на основе гидрофобных фотосенсибилизаторов и амфифильного полимера: IB-25, PT-5, PT-1, VP-6	
87	
4.1 Описание экспериментальных установок	87
4.2 Специфика взаимодействия ПВП с сывороточным альбумином	94
4.3 Исследование взаимодействия сывороточного альбумина с комплексом наночастиц IB-25	99

4.4	Исследование комплекса наночастиц РТ-5	105
4.5	Контроль наноразмерности фотосенсибилизаторов тетрапиррольных комплексов цинка (VP-6)	107
4.6	Контроль наноразмерности фотосенсибилизаторов тетрапиррольных комплексов магния (РТ-1)	114
Глава 5. Способные к самосборке амфифильные фотосенсибилизаторы:		
	S27_Na и РТ_peg	122
5.1	Статистический способ усреднения данных рассеяния света	122
5.2	Модификации гетероциклического аналога фталоцианина магния (РТ_peg) и сывороточный альбумин	124
5.3	Модификации гетероциклического аналога фталоцианина магния (S27_Na) и сывороточный альбумин	131
5.4	Флуоресцентный и спектрофотометрический анализ способных к самосборке амфифильных ФС	135
Заключение. Основные результаты и выводы		143
Благодарности		146
Публикации автора по теме диссертации		147
Список литературы		149

Введение

Актуальность темы данного исследования обусловлена высокой важностью поиска доступных методов терапии злокачественных новообразований (ЗНО). Среди множества концепций лечения ЗНО традиционно выделяют фотодинамическую терапию (ФДТ) – популярный метод лечения, основанный на фотохимической реакции кислорода с биологическим субстратом. Под воздействием лазерного излучения, поглощаемого молекулами фотосенсибилизатора (ФС), образуется синглетный кислород, инициирующий апоптоз опухолевых тканей. Эффективность ФДТ во многом определяется физико-химическими и оптическими свойствами ФС. В данной работе представлен комплексный анализ перспективных отечественных наночастиц ФС третьего поколения на основе ряда тетрапиррольных макроциклов – аннелированных порфиразинов, в том числе, фталоцианинов, а также метилфеофорбида *a* [1].

В случае реализации концепции пассивного таргетинга ключевым параметром, определяющим эффективное накопление наночастиц ФС в опухоли, является их средний размер. Исследование гидродинамических радиусов ФС в данной работе проводилось методом динамического рассеяния света (ДРС). ДРС имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами определения размера наночастиц, позволяя определять эффективный гидродинамический радиус частиц в жидких средах, в условиях, близких к физиологическим, при этом, не оказывая влияния на строение самого ФС [2].

Однако, при наличии взаимодействия наночастиц ФС с сывороточным альбумином, различить размеры многокомпонентной дисперсной системы может быть практически невозможным. Использование оптических методов спектрофотометрии и спектрофлуориметрии позволяет анализировать изменения спектральных свойств в процессе взаимодействия частиц ФС с белком. Такой

анализ позволяет определить характерные времена взаимодействия при заданных концентрациях, установить химическую кинетику протекания реакции. Анализ разгорания или тушения флуоресценции мономеров в водных растворах позволяет количественно оценить концентрации мономерных и ассоциированных форм наночастиц ФС в зависимости от их строения и, как следствие, кинетику процесса взаимодействия.

При глубоких расположениях опухолей в организме особое внимание уделяется селективности накопления в них ФС, чтобы минимизировать поражение здоровых тканей. Одним из перспективных направлений в этой области является создание наноразмерных контейнеров, содержащих активные препараты [3]. Данный подход продолжает свое активное развитие, однако, существуют сложности в проведении клинических испытаний, связанных в первую очередь с необходимостью использования относительно высоких концентраций поверхностно-активных веществ (ПАВ) в качестве стабилизирующей оболочки. Липосомальные наноконтейнеры представляют собой наночастицы на основе гидрофобных ФС и амфифильного ПАВ, например, такого как: поливинилпирролидон (ПВП), полиэтиленгликоль (ПЭГ), плуроник и др. [4] Такие ПАВ формируют с тетрапиррольными соединениями стабильные ассоциаты в водных растворах, однако их использование может приводить к невозможности корректного определения летальной дозы самих терапевтических препаратов [5, 6].

Другим распространённым подходом является создание амфифильных ФС, способных к самосборке. ФС на основе тетрапиррольных соединений с гидрофильными заместителями могут самостоятельно растворяться в воде, формируя при этом стабильные наноразмерные мицеллярные структуры и, тем самым, обеспечивая пассивный таргетинг. Порфиразины и их производные являются эффективными ФС благодаря интенсивному оптическому поглощению от видимого до ближнего инфракрасного спектра и высокому квантовому

выходу синглетного кислорода. Их структурная гибкость, широкие возможности для введения функциональных групп и способность образовывать устойчивые комплексы с различными металлами позволяют использовать эти соединения не только как амфифильные ФС для целевой доставки, но и в качестве молекулярных ФС, флуоресцентных маркеров для диагностики опухолевых тканей, а также радиосенсибилизаторов при использовании тяжёлых металлов, что потенциально расширяет область их применения до ФДТ, активируемой рентгеновским излучением [7, 8]. Кроме того, свойства порфиразинов делают возможным их использование в качестве агентов для фототермальной терапии и в мультимодальных подходах, сочетающих диагностику и лечение (тераностика) [9, 10].

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

Так как основным способом введения ФС в организм больного является внутривенная инъекция, то первичные стадии механизма доставки лекарственного препарата в опухоль реализуются через кровотоки. Таким образом, поиск эффективных способов доставки фармакоформы к ЗНО предполагает изучение процессов ее взаимодействия с компонентами крови, в частности, основными белками сыворотки крови человека, при этом сывороточный альбумин составляет около 55 % от всех белков, содержащихся в плазме крови человека.

В случае реализации пассивного таргетинга ключевым параметром, определяющим эффективное накопление наночастиц ФС в опухолевых тканях, является их средний размер. Исследование гидродинамических радиусов ФС в данной работе проводились методом динамического рассеяния света (ДРС). ДРС имеет ряд преимуществ, по сравнению с другими методами определения размера

наночастиц, позволяя определять эффективный гидродинамический радиус частиц в жидких средах, в условиях, близких к физиологическим, при этом, не оказывая влияния на структуру самого фотосенсибилизатора.

Однако при наличии взаимодействия наночастиц ФС с сывороточным альбумином, разрешение вкладов итоговых размеров водных растворов может стать практически невозможным [11]. Использование методов спектрофотометрии и флуориметрии позволяют анализировать спектры поглощения, а также их изменение в процессе взаимодействия частиц ФС с белком. Такой анализ позволяет определить характерные времена взаимодействия при заданных концентрациях, установить химическую кинетику протекания реакции во времени. Анализ разгорания или тушения флуоресценции мономеров компонент водных растворов способен дать количественную оценку концентраций итоговых размеров ассоциатов или мономерных компонент в зависимости от типа взаимодействия, обусловленного структурой наночастиц ФС.

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

Для достижения поставленной цели в работе сформулирован ряд следующих практических задач:

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

2. Исследовать изменение оптических параметров наночастиц с течением времени, от длительности светового воздействия и различного уровня pH;

3. Изучить возможное влияние концентрации ПВП на средний гидродинамический радиус наночастиц гидрофобных ФС с амфифильным полимером;

4. Исследовать возможное взаимодействие ФС с основным транспортным белком сыворотки крови – сывороточным альбумином и определить кинетику данного процесса.

Объект и предмет исследования

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

Методология и методы исследования

В рамках работы использовались современные оптические методы для исследования наночастиц ФС и их взаимодействия с биомолекулами. Экспериментальная работа включала комплекс приборов, таких как спектрофотометр HITACHI U-2900 для анализа спектров поглощения и спектрофлуориметр Cary Eclipse для оценки флуоресцентных свойств ФС. Для

измерения гидродинамического радиуса наночастиц и их стабильности применялся метод динамического рассеяния света с использованием установки Photocor «Complex».

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

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

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

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

- С помощью метода динамического рассеяния света были получены гидродинамические радиусы для двух типов уникальных ФС: наночастицы на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера (VP-6, PT-1, PT-5, IB-25) и способные к самосборке амфифильные ФС (S_27_Na, PT_peg).

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

Научно-практическая значимость исследования заключается в совершенствовании методики исследования ФС третьего поколения отечественного производства, основанной на использовании оптических методов.

Данная методика, включающая ДРС, спектрофотометрию и спектрофлуориметрию, представляет собой мощный инструментарий для точного определения гидродинамических радиусов наночастиц и их стабильности, а также анализа взаимодействия ФС с основным транспортным белком крови – альбумином.

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

злокачественных новообразований ЗНО).

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

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Средние гидродинамические радиусы наночастиц на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера лежат в диапазоне [46; 124] нм, а размеры способных к самосборке амфифильных ФС в диапазоне [31; 237] нм для РТ_рег и [39; 198] нм для S_27_Na соответственно.
2. Срок сохранения фотофизических характеристик ФС составляет не менее 3 месяцев для наночастиц на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера и более 6 месяцев для способных к самосборке амфифильных ФС.
3. Воздействие лазерного излучения ($\lambda = 647$ нм) не приводит к значимым структурным изменениям наночастиц в течение времени до 4,5 часов.
4. Увеличение мольного соотношения ФС/ПВП в диапазоне от 1:1 до 1:5 приводит к контролируемому изменению гидродинамического радиуса частиц в среднем до 2 раз.
5. Для способных к самосборке амфифильных ФС с сывороточным альбумином константы связывания составляют от 10^2 до 10^8 М⁻¹ в зависимости от условий и времени взаимодействия не менее 60 минут.

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

Апробация работы. Основные результаты научно-квалификационной работы были представлены соискателем лично на следующих 14 научных конференциях и семинарах: Международные конференции студентов, аспирантов и молодых ученых по фундаментальным наукам «Ломоносов-2016, 2017, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023» (Москва, 2016, 2017, 2019, 2020, 2021, 2022, 2023), Научная конференция «Ломоносовские чтения – 2024, 2025» (Москва, 2024, 2025), Международный симпозиум Saratov Fall Meeting Optics and Biophotonics «SFM'15, 21, 23» (Саратов, 2015, 2021, 2023), XIV Междуна-родная конференция «Синтез и применение порфиринов и их аналогов» (ICPC-14) (Иваново, 2022), The International Conference on Coherent and Nonlinear Optics (ICONO 2016) (Минск, 2016).

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

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

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

Краткое содержание диссертации.

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

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

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

Основное внимание в обзоре уделено методам ДРС, спектрофотометрии и спектрофлуориметрии, которые являются ключевыми для оценки гидродинамического радиуса наночастиц, их стабильности и кинетики

взаимодействий с биомолекулами. Показано, что метод ДРС, обладая высокой чувствительностью и точностью, позволяет изучать гидродинамические радиусы наночастиц в жидких средах, приближенных к физиологическим условиям. Описаны преимущества ДРС в сравнении с другими методами определения размеров наночастиц, такими как электронная микроскопия, и обоснована необходимость точного подбора параметров эксперимента для измерения полидисперсных систем.

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

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

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

физиологическим.

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

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

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

В разделе 2.3 рассматриваются особенности взаимодействия всех исследуемых наночастиц с сывороточным альбумином — основным транспортным белком крови. Описаны различия в поведении наночастиц на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера ПВП и способных к самосборке амфифильных ФС при взаимодействии с белками, включая образование крупных агрегатов и изменение гидродинамических радиусов.

Представлены данные о кинетике взаимодействий и отмечены особенности связывания альбумина с ФС, которые являются ключевыми для понимания поведения наночастиц в организме.

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

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

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

Отдельно рассмотрены комплексные подходы к обработке данных, полученных оптическим методом динамического светорассеяния. Использование

программного обеспечения DynaLS позволяет автоматизировать анализ данных ДРС и точно определять параметры диффузии и гидродинамический радиус наночастиц. В разделе главы описаны методы статистической обработки данных для полидисперсных систем, что позволяет минимизировать влияние шумов и улучшить точность измерений, особенно при работе с многокомпонентными системами, включающими белки и наночастицы.

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

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

В завершении данной главы представлена разработанная методика исследования *in vitro*, основанная на последовательном применении оптических методов — динамического рассеяния света, спектрофотометрии и спектрофлуориметрии. Предложенная методика является универсальным подходом, обеспечивающим необходимый и достаточный инструментарий для системного исследования наночастиц ФС, их стабильности и взаимодействий с

молекулами сыворотки белка крови. Подход создает исследовательскую основу для реализации процесса поиска успешного ФС третьего поколения.

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

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

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

В разделе 4.3 проведено исследование взаимодействия сывороточного альбумина с комплексом наночастиц IB-25. Установлено, что IB-25 формирует стабильные наночастицы с ПВП, которые сохраняют свои средние гидродинамические радиусы и не вступают в значимое взаимодействие с

альбумином. Полученные данные подтверждают перспективность использования IB-25 для ФДТ с минимальными побочными эффектами.

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

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

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

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

где важна высокая селективность и минимизация повреждения тканей.

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

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

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

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

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

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

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

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

1. Определены характерные гидродинамические радиусы исследуемых типов наночастиц ФС:

- наночастицы на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера:
 $IB-25 \quad R_h = 88 \pm 15 \text{ нм}; \quad PT-5 \quad R_h \in [50; 80] \text{ нм};$
 $VP-6 \quad R_h = 96 \pm 28 \text{ нм}; \quad PT-1 \quad R_h = 64 \pm 18 \text{ нм};$
 - способные к самосборке амфифильные ФС:
 $S_{27_Na} \quad R_h = 92 \pm 38 \text{ нм без ПВП и } R_h = 62 \pm 23 \text{ нм и } R_h = 162 \pm 36 \text{ нм}$
 $\text{с ПВП}; \quad PT_{reg} \quad R_h = 45 \pm 14 \text{ нм и } R_h = 112 \pm 37 \text{ нм без ПВП, } R_h =$
 $90 \pm 28 \text{ нм и } R_h = 197 \pm 40 \text{ нм с ПВП.}$
2. Исследована стабильность наночастиц в зависимости от временного фактора (общая стабильность), а также светового воздействия: для всех исследованных ФС было показано, что наночастицы сохраняют стабильность на протяжении нескольких месяцев (более 3 месяцев для VP-6 и более 6 месяцев для PT-1). Также установлено, что световое воздействие ($\lambda = 647 \text{ нм}$) не оказывает значительного влияния на строение наночастиц в течение до 4,5 часов эксперимента;
 3. Исследовано возможное влияние концентрации ПВП на средний гидродинамический радиус наночастиц на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера: для VP-6 с мольным соотношением ПВП 1:1, 1:2 и 1:5 были получены следующие значения гидродинамических радиусов: $R_h = 37,2 \pm 4,7 \text{ нм}$, $R_h = 43,6 \pm 6,5 \text{ нм}$ и $R_h = 59,3 \pm 15,2 \text{ нм}$ соответственно. Для PT-1 в тех же условиях значения радиусов варьировались от $R_h = 112 \pm 28 \text{ нм}$ до $R_h = 265 \pm 39 \text{ нм}$;
 4. Исследовано взаимодействие наночастиц ФС с основным транспортным белком крови — сывороточным альбумином:
- наночастицы на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера:
 Для IB-25, VP-6 и PT-1 показано отсутствие значимого взаимодействия с сывороточным альбумином, что свидетельствует о

сохранении их стабильности в белковой среде.

- способные к самосборке амфифильные ФС:

Для S_27_Na и PT_reg без ПВП выявлены новые пики ~ 200 нм (взаимодействие с альбумином). При добавлении ПВП наблюдаются дополнительные пики (~ 400 нм), что обусловлено не только связыванием свободного ПВП с белком, но и ослаблением взаимодействия между наночастицами S_27_Na вследствие экранирования π - π стекинг-взаимодействий, приводящего к формированию менее устойчивых комплексов ФС.

- Константа связывания для свежеприготовленного образца S_27_Na составила $3,16 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}$, с кинетикой процесса, продолжающейся не менее 60 минут. Сайт связывания $n = 1,7$. Константа связывания для образца S_27_Na составила $1,02 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1}$, с кинетикой процесса, продолжающейся не менее 60 минут. Сайт связывания $n = 0,5$.
 - Константа связывания для S_27_Na ПВП составила $2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, с кинетикой процесса, продолжающейся не менее 60 минут. Сайт связывания $n = 1,4$.
5. Разработан процесс обработки данных ДРС, включающий методику подбора оптимальных концентраций для полидисперсных систем и статистический подход к анализу корреляционных функций, исключающий субъективное влияние корректировок погрешности аппроксимации.

Глава 1. Современное состояние исследований наночастиц фотосенсибилизаторов третьего поколения

Фотодинамическая терапия – минимально инвазивная терапевтическая процедура, оказывающая селективную цитотоксическую активность в отношении злокачественных новообразований. ФДТ включает в себя введение в локализованную опухоль фотосенсибилизирующего агента с последующей активацией светом определенной длины волны. Данная терапия, в присутствии кислорода, приводит к серии фотохимических и фотобиологических процессов, которые вызывают необратимые фотоповреждения опухолевых тканей. Клинические исследования показали, что ФДТ является успешным методом лечения некоторых видов рака, особенно при ЗНО ранней стадии. Минимальная токсичность здоровых тканей, незначительные системные эффекты, значительное снижение долгосрочного течения болезни, отсутствие внутренней или приобретенной резистентности, а также щадящее действие, обеспечивающее сохранение поврежденного органа и дающее отличный косметический эффект, делают его ценным, высокоэффективным терапевтическим методом комбинированных процедур. Благодаря ряду недавних технологических улучшений, ФДТ может стать одним из основных методов лечения рака [10].

1.1. Основы фотодинамического эффекта

Фотохимические превращения молекул красителей происходят в электронно-возбужденном состоянии и вызываются поглощенным светом. Поглощая квант света, молекулы переходят в возбужденное состояние (более высокие энергетические уровни) с временем жизни порядка 10^{-8} - 10^{-9} с далее, в процессе интеркомбинационной конверсии переходят в долгоживущее триплетное состояние со временем жизни 10^{-4} - 10^2 с. Данный процесс схематично изображен на рисунке 1 [11].

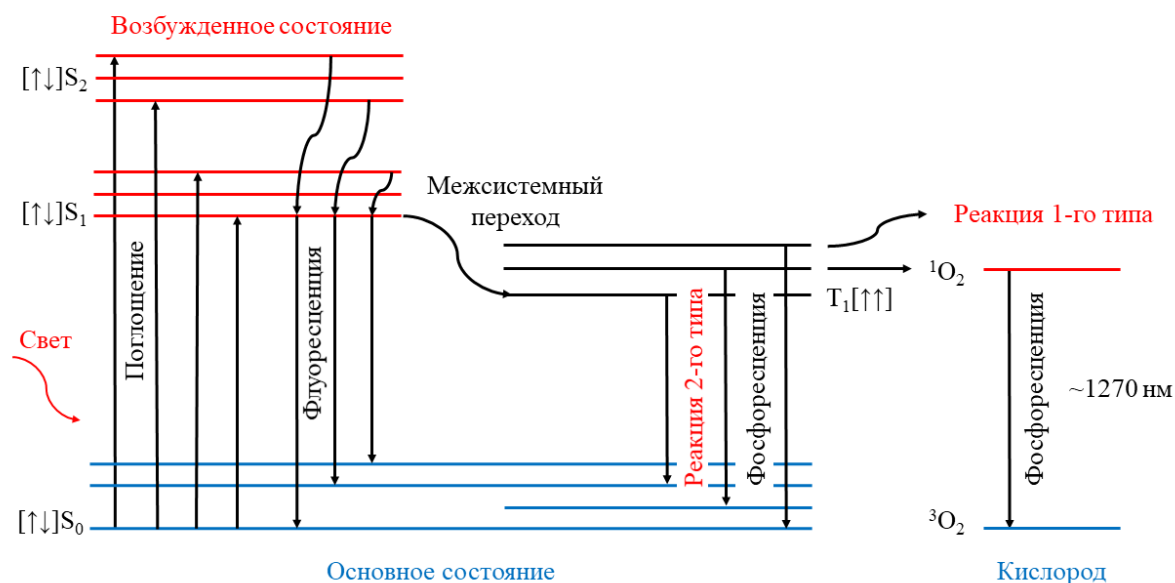
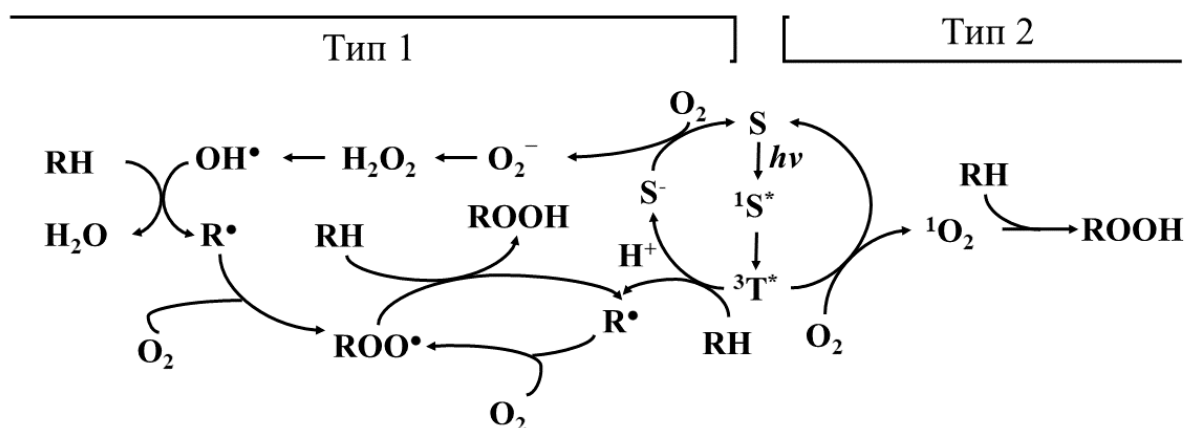


Рисунок 1 – Энергетически уровни и переходы на модифицированной схеме Яблонского. S_0 , S_1 и S_2 – синглетные уровни; T_1 – триплетный уровень; 1O_2 – синглетный кислород; 3O_2 – триплетный кислород [10, 11].

Возбужденные молекулы могут непосредственно вступать в окислительно-восстановительные реакции с переносом протонов или электронов и образованием промежуточных радикалов, которые затем взаимодействуют с кислородом. Данный процесс называется фотодинамической реакцией 1-го типа. Также возбужденные молекулы способны сначала реагировать с кислородом, переводя его в высокоактивную форму (синглетный кислород 1O_2), которая в последствии окисляет широкий круг биомолекул (фотодинамическая реакция 2-го типа). В любом из данных вариантов возбужденные молекулы повышают чувствительность клеток к световому воздействию. Такие молекулы красителей называются фотосенсибилизаторами. Следует отметить, что в отдельности свет и краситель могут быть нетоксичными (что необходимо для современных ФС) и только совместное действие света, ФС и кислорода вызывает фотохимическую реакцию.

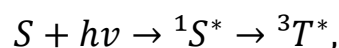
При фотодинамической (ФД) реакции первого типа возбужденные молекулы ФС переходят в триплетное состояние и напрямую реагируют с субстратом или молекулами среды, в частности с водой (рисунок 2). После поглощения фотона $h\nu$ фотосенсибилизатор переходит из основного состояния S



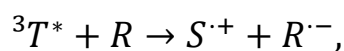
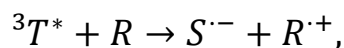
сначала в синглетное $^1S^*$, а затем в триплетное возбужденное состояние $^3T^*$.

Рисунок 2 – Фотохимическая реакция 1-го и 2-го типа [11, 12].

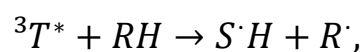
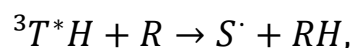
Фотодинамическая реакция 1-го типа представима следующими реакциями [13]:



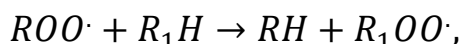
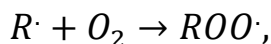
далее происходит перенос электронов на субстрат R :



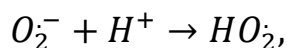
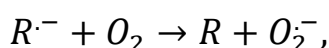
или перенос протонов:



Далее радикалы участвуют в различных реакциях, а в присутствии кислорода инициируют цепное перекисное окисление, которому подвержены ненасыщенные липиды в биомембранах:

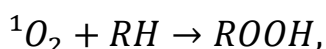
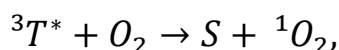
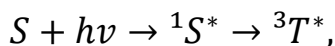


и образование супероксид-аниона и других активных форм кислорода:



Супероксид-анион $O_2^{\cdot-}$, получающийся в данных реакциях является высокоактивной формой кислорода, но ещё большей активностью отличается гидроксил-радикал $OH\cdot$. Такие активные формы кислорода (АФК) при взаимодействии с ненасыщенными жирными кислотами образуют радикалы липидов ($L\cdot$), алкоксильные радикалы ($LO\cdot$), перекисные радикалы ($LOO\cdot$) или гидроперекиси липидов ($LOOH$), входящие в состав биомембран. Полученные радикалы инициируют цепное окисление липидов и ведут к повреждению мембран.

При протекании фотохимических реакций 2-го типа (рисунок 2) сначала происходит перенос энергии от ФС к кислороду, что приводит к образованию высокоактивной синглетной формы 1O_2 , затем синглетный кислород окисляет субстраты в клетках:



запуская тем самым цепь перекисных процессов. 1O_2 может повреждать только биоструктуры, находящиеся в непосредственной близости от молекул ФС

(диффузионная длина 1O_2 в клетках не превышает 10-20 нм). Таким образом фотодинамическое повреждение клеток определяется внутриклеточной локализацией ФС [11].

Фотодинамические реакции с участием гидрофильных ФС преимущественно протекают по первому типу, в то время как с участием гидрофобных – по второму. В водных средах реакции 2-го типа намного эффективнее реакций 1-го, вследствие большего коэффициента диффузии 1O_2 и более высоких констант скоростей реакции. Таким образом, реакции 2-го типа преобладают в повреждающем действии большинства ФС, в том числе порфирина, хлорина, фталоцианина и порфиразина. Однако реакции 1-го типа также могут вносить значительный вклад в фотоповреждение клеток, которым, в ряде случаев, нельзя пренебрегать. В большинстве случаев реализуются смешанные реакции с участием механизмов обоих типов. Поскольку ФД воздействие быстро снижает уровень кислорода в ткани, с течением времени вклад реакций 1-го типа начинает преобладать над реакциями 2-го типа.

Таким образом, при ФД воздействии интенсивная генерация радикальных активных форм кислорода или синглетного кислорода приводит к окислению, повреждению белков, нарушению клеточных функций и развитию окислительного стресса, что в конечном итоге, приводит к гибели клеток, содержащих фотосенсибилизатор.

1.2. Этапы фотодинамической терапии

Фотодинамическая терапия (ФДТ) представляет собой многоэтапный процесс, эффективность которого определяется как молекулярными характеристиками используемого фотосенсибилизатора (ФС), так и физиологическими особенностями организма. Ключевые стадии включают доставку и накопление ФС в патологических тканях, активацию молекул под действием света соответствующей длины волны, генерацию активных форм

кислорода (прежде всего синглетного), а также реализацию фотохимического воздействия на клетки и ткани.

Каждый этап тесно взаимосвязан с физико-химическими свойствами ФС и параметрами облучения. Успешная реализация терапии требует не только высокой селективности накопления ФС в опухолевой ткани, но и его эффективного внутриклеточного распределения и способности генерировать фототоксические агенты в достаточном количестве.

В настоящем разделе рассматриваются все ключевые этапы, определяющие эффективность и селективность фотодинамического воздействия при лечении злокачественных новообразований.

Доставка ФС к опухолевой ткани

Специфика доставки ФС зависит как от свойств тканей, так и от физико-химических характеристик самого фотосенсибилизатора, в частности от их гидрофильности или липофильности. Гидрофильные ФС локализуются преимущественно в кровеносных сосудах, а гидрофобные – в опухолевой ткани. Через несколько часов после внутривенного введения (для различных тканей время накопления отличается) концентрация фотосенсибилизатора в опухоли достигает своего максимального значения, а затем ФС постепенно выводится из организма. Существуют трудности доставки гидрофобных ФС, заключающиеся в их склонности к агрегации или связывании с белками крови. В настоящее время разрабатываются искусственные носители для доставки фотосенсибилизатора к клеткам опухоли – липосомы, антитела, наночастицы и др.

Данный процесс также зависит от физико-химических свойств фотосенсибилизаторов. Гидрофобные вещества локализуются в клеточных мембранах, а гидрофильные попадают в эндосомы и лизосомы. При освещении происходит разрушение лизосомальных мембран, краситель перераспределяется внутри клетки и неспецифически окрашивает внутриклеточные структуры [14].

Фотофизические процессы

На практике в качестве источника света выступают: лазеры, светодиоды, светодиодные матрицы или мощные лампы, излучающие в красном или ближнем инфракрасном (ИК) диапазоне в области длины волны света от 600 до 800 нанометров. Данный диапазон обусловлен наличием «окна прозрачности» или, так называемым «терапевтическим окном», где поглощение тканей уменьшается, и свет способен проникать глубже с минимальным повреждающим эффектом (рисунок 3). Необходимо отметить, что несмотря на лучшее проникновение в биологические ткани света в ближнем ИК диапазоне, излучение оказывается неэффективным (при дальнейшем увеличении длины волны света) ввиду неспособности низкоэнергетических фотонов интенсивно генерировать синглетный кислород. Энергия, необходимая для перевода молекулярного кислорода из основного триплетного состояния в возбужденное синглетное, составляет 0.97 эВ ($\lambda \sim 1270$ нм). Для обеспечения эффективного переноса возбуждения нижняя граница энергии, необходимая ФС для образования $^1\text{O}_2$, составляет ~ 1.5 эВ ($\lambda \sim 850$ нм). Таким образом, оптимальный диапазон длин волн для ФДТ: 650-850 нм [15]. При этом глубина проникновения света не превышает 1 см. Эффективно повреждаются плоские опухоли, однако возможно и послойное разрушение более крупных злокачественных новообразований при многократной терапии. В современной практике часто используют световоды (световые волокна), для доставки лазерного излучения на большую глубину, что повышает эффективность терапии [4].

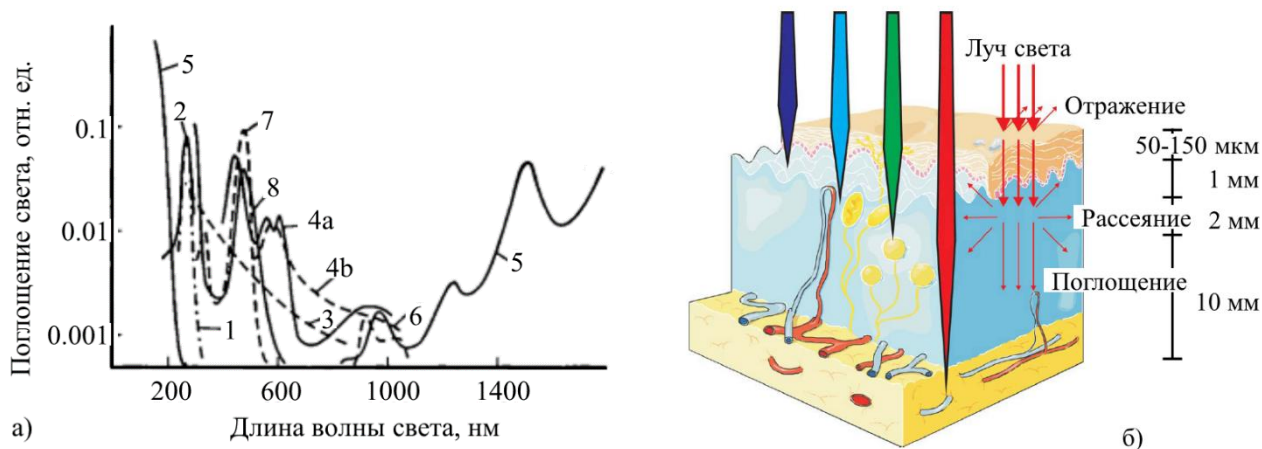


Рисунок 3 – а) Спектры поглощения тканей. 1 – ДНК, 2 – уроканиновая кислота, 3 – меланин, 4a – оксигемоглобин, 4b – дезоксигемоглобин, 5 – вода, 6 – жир, 7 – билирубин, 8 – каротин [16]. б) Распространение света через ткани [10].

Первичные фотохимические реакции

После поглощения световых квантов молекулы ФС переходят в возбуждённое состояние и в соответствии с модифицированной схемой Яблонского переходят на верхний синглетный уровень (рисунок 1). Энергия возбуждения безизлучательно расходуется на тепло, высвечивается в виде квантов флуоресценции либо идёт на поддержание фотохимической реакции. Последний процесс наиболее эффективно протекает с участием долгоживущих возбужденных триплетных состояний, что предъявляет требование наличия высокого квантового выхода интеркомбинационной конверсии синглетного состояния в триплетное для современного фотосенсибилизатора. В результате переноса энергии фотовозбуждения на кислород генерируются различные радикалы и активные формы кислорода.

Вторичные темновые процессы

Наличие АФК и радикальных интермедиатов приводит к свободнорадикальным процессам окисления липидов и белков, вызывающих повреждение биомембран и клеточных органелл. В клетках развиваются

цитотоксические каскады, ведущие к двум типам гибели клеток, – некрозу и апоптозу.

На данном этапе происходит высвобождение продуктов распада, стимулирующих как гибель соседних клеток, так и фагоцитоз клеточных обломков соседними клетками и лейкоцитами. Фагоцитоз продуктов распада больших опухолей представляет серьёзную угрозу для организма и приводит к развитию ряда метаболических нарушений, обобщенно называемых синдромом распада опухоли (СРО) [17].

При преимущественном развитии апоптоза продукты распада клеток успевают расщепляться соседними макрофагами, в результате чего заживление проходит интенсивнее, рубцовых тканей не образуется и достигается наилучший косметический эффект. В случае массивной некротической гибели клеток под влиянием мощного ФД воздействия происходит формирование рубцовых тканей.

Выведение фотосенсибилизатора

Процесс выведения ФС из организма может занимать относительно значительное время (до нескольких месяцев). При этом, необходимо ограничивать любое световое воздействие на пациента после проведения терапии. Приобретённая кожная фоточувствительность снижает качество жизни и трудоспособность. Поэтому одной из ключевых задач является разработка ФС, способных быстро выводиться из организма после проведения терапии.

Опухолевые клетки, их капиллярные сети, а также периферические нервные элементы и иммунные клетки являются основными мишенями фотодинамической терапии. Однако прямое фотоповреждение опухолевых клеток не вносит доминирующего вклада в разрушение опухоли. Для разрушения всех опухолевых клеток каждая из них должна получить достаточно большие дозы фотосенсибилизатора и света, при этом в опухоли должно быть достаточное количество кислорода. Однако клетки неодинаково аккумулируют ФС, при этом

свет неравномерно распределяется в гетерогенной опухолевой ткани, а массивные ЗНО характеризуются низким содержанием кислорода (гипоксией). Поэтому предполагают важную роль фотодинамического повреждения сосудов и нарушения кровотока [18].

1.3. Типы фотосенсибилизаторов

Фотосенсибилизаторы – это молекулы, способные вызывать химическое изменение в другой молекуле в результате фотохимического процесса.

Краткая история использования фотосенсибилизаторов

Фотодинамический эффект был открыт в 1900 году О. Раабом. Он обнаружил, что при освещении инфузорий и других простейших, окрашенных флуоресцентными красителями акридина, простейшие останавливались и погибали. Фон Таппейнер продолжил изучение данного явления и назвал его «фотодинамическим явлением», то есть, влияющим на динамику клеток, на их подвижность. Также данное явление называют фотосенсибилизацией – придание фоточувствительности клеткам или организмам. В 1902 году Леду-Лебарте показал, что для повреждения клеток кроме света и красителя необходим кислород. В 1903 году была оценена терапевтическая ценность данного явления и фон Таппейнер совместно с А. Джезиоником провели опыты по фотодинамической терапии злокачественных новообразований кожи с помощью окрашивания эозином и освещением ярким солнечным светом. Им впервые удалось вылечить рак кожи данным методом. Однако ещё в 1902 году Г. Дрейер открыл болевой эффект при фотоповреждении кожи. Ряд побочных эффектов, нестабильное лечебное действие, ограниченное фотоповреждение с использованием токсичных красителей акридина и эозина, приостановило дальнейшее развитие данного метода. В 1911 году была показана высокая фототоксичность гематопорфирина (рисунок 4), а в 1924 году А. Поликар обнаружил его избирательное накопление в опухолевых тканях.

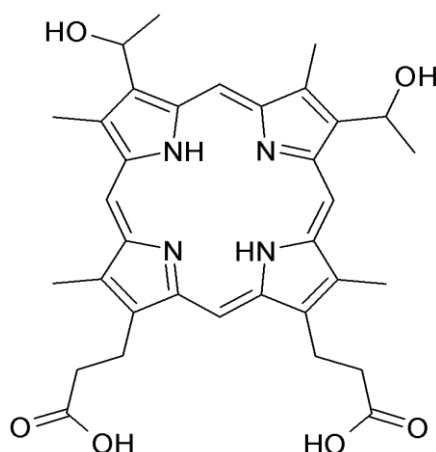


Рисунок 4 – Структура гематопорфирина [19].

В конце 1950-х С. Шварц и Р. Липсон показали, что препараты гематопорфирина способны накапливаться в опухолях, их красную флуоресценцию можно было наблюдать во время хирургических операций. После был получен очищенный гематопорфирин, который имел более высокую склонность к селективному накоплению в тканях опухоли. С 1955 года авторы указывали на возможность его использования для флуоресцентной диагностики и разрушения опухолей. Широкое распространение ФДТ началось в середине 1970-х годов после работ Т. Догерти и соавторов. В первых работах они добились полной или частичной ремиссии 111 из 113 кожных и подкожных опухолей и метастазов после внутривенного введения производных гематопорфирина (ГпП) и последующим облучением красным светом ксеноновой лампы (600 – 700 нм).

Первый отечественный ФС «Фотогем» был создан в 1990 году в Московской государственной академии тонкой химической технологии имени М.В.Ломоносова под руководством профессора А.Ф.Миронова [22]. На сегодняшний день курс ФДТ с этим препаратом прошли более 1500 больных. Выраженный терапевтический эффект получен у 91% пациентов. При этом в 62% случаев наблюдалось полное исчезновение опухолей, а частичная регрессия (уменьшение опухоли более чем в два раза) - в 29% случаев. При ранних формах рака полное излечение наблюдается у 92% пациентов [22]. В 1994 г. в России начаты клинические испытания фотосенсибилизатора второго поколения –

«Фотосенса», который в последствии успешно применялся в терапии злокачественных новообразований [23].

Однако недостатки «Фотогема» и ряда других фотосенсибилизаторов, применяемых в настоящее время за рубежом и в России (длительное нахождение форм в коже, повышенная фоточувствительность и фототоксичность) побуждают исследователей к разработке следующего поколения фотосенсибилизаторов.

Порфирины и их аналоги – хлорины, фталоцианины, порфиразины и т.п. представляют широкие возможности для создания разнообразных ФС с заданными свойствами. Возможность значительно и гибко изменять структуру, включая размер и строение макроциклов, боковых заместителей, а также центральные атомы металла делают данные формы перспективными ФС.

Классификация и основные требования к ФС

В результате анализ большого числа экспериментальных данных, полученных при применении ФДТ с фотосенсибилизаторами 1-го поколения, были сформулированы основные требования, предъявляемые к оптимальному ФС, включающие в себя фотофизические и биологические критерии [11, 19, 20]:

1. Отсутствие темновой токсичности, мутагенности и стимуляции клеточного деления.
2. Химическая чистота. Установленная химическая формула.
3. Высокий квантовый выход как триплетных возбужденных состояний, так и фотогенерации синглетного кислорода.
4. Высокая молярная экстинкция в дальней красной области видимого излучения.
5. Отсутствие непредсказуемых фотопродуктов.
6. Стабильность в организме при облучении.
7. Стабильность при хранении.
8. Быстрое и селективное накопление в опухоли.

9. Отсутствие накопления в здоровых тканях и быстрое выведение из организма (несколько дней).
10. Гидрофильность, а для гидрофобный ФС – наличие клинически безопасных носителей.
11. Отсутствие побочных явлений.
12. Доступность (низкая цена).
13. Отсутствие сильного агрегирования ФС. Это снижает квантовый выход ФС в триплетное состояние и его коэффициент экстинкции.

Важно отметить смысл данного коэффициента экстинкции. Это молярный коэффициент поглощения, который является мерой того, насколько сильно частицы того или иного вещества поглощают свет с определенной длиной волны. Каждое вещество характеризуется своим молярным коэффициентом поглощения, который не зависит от концентрации и объема. Эта характеристика широко используется в химии, и ее не следует путать с коэффициентом экстинкции, который чаще применяется в физике. Стандартной единицей измерения молярного коэффициента поглощения является литр, деленный на моль и на сантиметр ($\text{лмоль}^{-1}\text{см}^{-1}$) [21].

Традиционно выделяют три поколения ФС:

1. Первое поколение: различные производные гематопорфирина.
2. Второе поколение: препараты на основе хлоринов, порфиринов, фталоцианинов и др. Обладают в большинстве случаев длинноволновым поглощением.

Помимо большей длины волны в области пика поглощения, избирательности накопления и более глубокого проникновения в ткани, более быстрое выведение из организма фотосенсибилизаторов второго поколения позволяет применять ФДТ многократно. Это может привести к более широкому использованию данного варианта лечения.

3. Третье поколение: фотосенсибилизаторы второго поколения с улучшенными общими характеристиками и длинноволновым поглощением порядка 800 нм.

ФС третьего поколения выделяют также по способу доставки, который представляет собой сложный конъюгат ФС второго поколения с системами таргетной доставки препарата, например, с магнитными наночастицами или антителами опухолевых маркеров [18, 20]. Всего выделяют два типа доставки и накопления ФС в злокачественных новообразованиях.

В рамках третьего поколения фотосенсибилизаторов особое внимание уделяется способам их доставки и активации. Существует также подход, направленный на создание функционализированных наноструктур, сочетающих в себе фотосенсибилизирующие свойства с таргетной доставкой и контролируемой активацией. Это позволяет повысить селективность воздействия, снизить системную токсичность и минимизировать побочные эффекты фототерапии.

Одним из таких подходов является разработка агрегационно-индуцированных эмиссионных фотосенсибилизаторов, обладающих яркой флуоресценцией и высокой фототоксичностью только в агрегированном состоянии, что делает их особенно подходящими для работы в физиологических условиях. Эти ФС демонстрируют повышенную фотостабильность, эффективную генерацию активных форм кислорода и могут быть использованы в комбинации с флуоресцентной визуализацией опухолей. Стратегии их дизайна включают использование молекулярных конструкций с управляемым "включением" только в области опухоли, благодаря чему достигается высокая безопасность и сниженный риск поражения здоровых тканей при облучении [44].

Ещё одним важным направлением является создание активируемых фотосенсибилизаторов, способных переходить в активное состояние лишь в ответ на специфические биологические стимулы микроокружения опухоли — изменение pH, наличие ферментов, восстановительные условия, а также

специфическую клеточную интернализацию. Такие системы минимизируют фотоактивацию вне целевой зоны и обеспечивают контролируемое фотодинамическое воздействие. Ключевые механизмы, лежащие в основе этих систем, включают процессы энерго- и электронного переноса, внутренний перенос заряда, а также подавление флуоресценции в агрегированном состоянии и её индукцию при агрегации. Перспективными являются и двойные системы блокировки, включающие множественные механизмы активации, а также конструкции на основе биортогональных реакций [45].

Таким образом, современное развитие фотосенсибилизаторов третьего поколения направлено не только на улучшение оптических характеристик молекул, но и на создание интеллектуальных, саморегулирующихся систем доставки и активации, способных обеспечить максимальную селективность и безопасность терапии. В настоящей работе исследуются наночастицы двух типов: самосборные амфифильные матрицы и гидрофобные комплексы ФС с амфифильным полимером, что соответствует актуальным стратегиям разработки ФС нового поколения. Выбор указанных типов наноструктур обусловлен их высокой перспективностью с точки зрения биосовместимости, управляемости свойств и универсальности применения. Самосборные амфифильные матрицы, как правило, формируются за счёт внутренней амфифильной природы фотосенсибилизатора, что исключает необходимость использования внешних стабилизаторов, таких как поверхностно-активные вещества. Это значительно снижает потенциальные побочные эффекты, связанные с токсичностью носителя, и упрощает фармакокинетическое моделирование таких систем. Кроме того, самосборные системы демонстрируют высокую устойчивость в физиологических условиях и способность к пассивному таргетингу за счёт контроля их наноразмерных характеристик [46 – 51].

Гидрофобные комплексы ФС с амфифильным полимером, в частности с поливинилпирролидоном (ПВП), представляют собой эффективную платформу

для стабилизации труднорастворимых фотосенсибилизаторов. Использование таких полимеров позволяет формировать стабильные коллоидные системы с заданными размерами и расширенным спектром растворимости в водной среде, что особенно важно при разработке препаратов для внутривенного введения [52 – 55].

Способы доставки ФС

Процесс доставки фотосенсибилизатора к опухолевым тканям для их эффективного фотоповреждения делится на два этапа:

1. Доставка ФС путем внутривенного введения в кровеносное русло, к опухоли.
2. Транспортировка ФС внутрь клетки к наиболее чувствительным клеточным структурам.

Для эффективной доставки ФС разрабатываются различные носители. При внутривенном введении фотосенсибилизаторы связываются с белками крови, при этом лишь небольшая часть остаётся в свободном состоянии [25]. Молекулы красителей связываются с белками за счёт электростатических, гидрофобных и водородных взаимодействий, а также ван-дер-ваальсовых сил. Так, например, одна молекула липопротеина низкой плотности (ЛНП) способна переносить до 1000 молекул гидрофобного фотосенсибилизатора [25]. Они не фагоцитируются клетками крови и длительно циркулируют в кровеносном русле. Многие клетки имеют на своей поверхности рецепторы ЛНП, а в опухолевых клетках их особенно много. Поэтому с их помощью можно направленно доставлять ФС в опухоль. Для исследования данной возможности были синтезированы конъюгаты разных ФС с ЛНП, однако существенных результатов получено не было. Гидрофобные фотосенсибилизаторы способны также транспортироваться липопротеинами высокой плотности (ЛВП). Так, хлорины и тетрафенилпорфины

переносятся в основном альбумином, а хлорин примерно в равной степени связывается с ЛВП и альбумином [26].

В настоящее время ведутся работы по направленной доставке фотосенсибилизаторов в клетки. В качестве носителей выступают: липосомы, антитела и полимерные наночастицы.

Липосомы – искусственные бислойные или многослойные мембранные сферические структуры, приготовленные обычно из фосфолипидных молекул (рисунок 5).

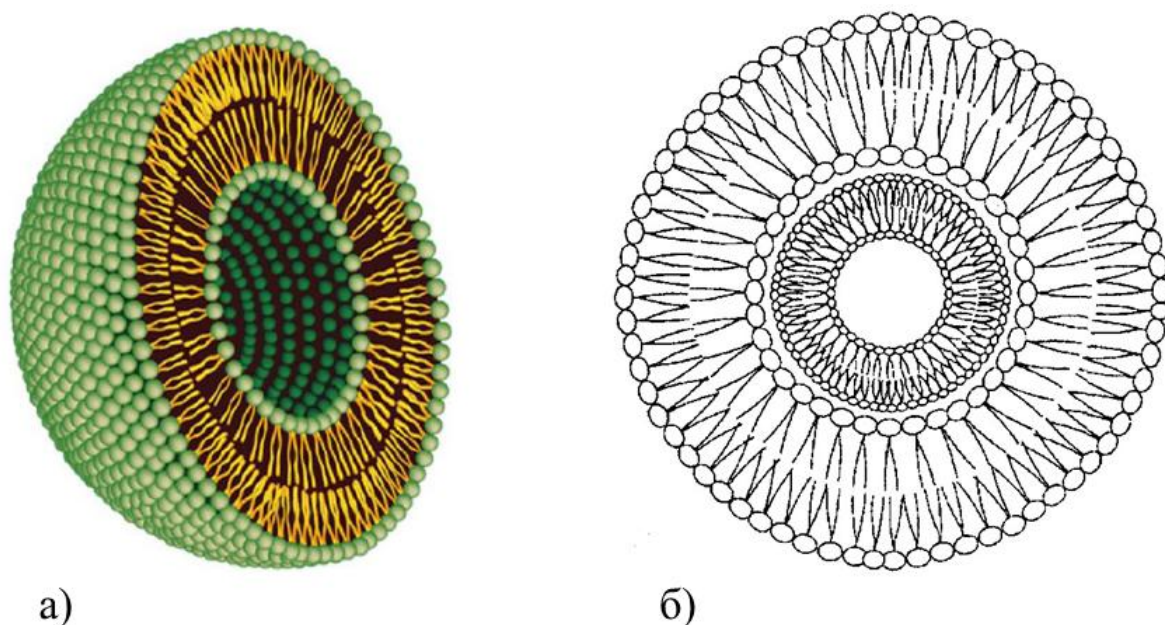


Рисунок 5 – Схематическое изображение липосом: а) моноламеллярная везикула, б) мультиламеллярная везикула [27].

Гидрофильные ФС вводятся внутрь липосом, а гидрофобные включаются в липосомную мембрану. Липосомы облегчают транспортировку гидрофобных фотосенсибилизаторов по кровеносным сосудам. Липосомы способны связываться с липопротеинами плазмы крови, в частности с ЛНП, что повышает селективность доставки ФС в опухоль. Для направленной доставки к опухолевым клеткам в липосомную мембрану также можно включить антитела, факторы роста и другие молекулы, которые могут быть распознаны клетками-мишенями. После связывания с рецепторами или антигенами на поверхности мишени гидрофобный

ФС переходит из липосомной мембраны в плазматическую мембрану клетки-мишени и транспортируется внутрь клетки в составе эндосомных пузырьков [28].

Возможно также осуществление доставки фотосенсибилизатора путем присоединения красителя к полимерным микросхемам или наночастицам. Включение ФС в полимерные биodeградирующие наночастицы может увеличить количество переносимого вещества. При этом, варьируя материалы, его концентрацию, можно добиться желаемых свойств фотосенсибилизатора. Так, покрытие полиэтиленгликолем наночастиц из полилактата для предотвращения связывания ретикулоэндотелиальной системой позволило повысить их доставку в опухоли [29]. Включение гиперидина в наночастицы из поливинилпирролидона повысило его фототоксичность в отношении нервных клеток. Доставка сформированных наночастиц может осуществляться пассивным методом, благодаря существующей разнице в проницаемости здоровых и опухолевых тканей.

Перспективным направлением являются наногелевые структуры, обладающие чувствительностью к внешним стимулам, таким как температура, pH или концентрация глутатиона. Такие системы позволяют не только эффективно доставить ФС в опухолевую ткань, но и осуществлять его контролируемое высвобождение в нужный момент и в нужной области. Наногели представляют собой трёхмерные полимерные сети, способные к значительной набухаемости в водной среде и к инкапсуляции гидрофобных ФС. Особенно перспективны так называемые стимул-чувствительные наногели, способные контролируемо высвобождать активные вещества в ответ на изменения pH, температуры, окислительно-восстановительного потенциала или наличия специфических ферментов, характерных для опухолевой микросреды. Благодаря такой адаптивности наногели могут повышать терапевтический индекс фотосенсибилизаторов и снижать побочные эффекты [57 – 59]. Вместе с тем, наногелевые носители обладают рядом ограничений, среди которых: сложность

масштабируемого синтеза с воспроизводимыми свойствами, потенциальная неустойчивость во внеклеточной среде, а также необходимость индивидуального подбора параметров чувствительности к стимулам для каждой конкретной модели опухоли. Кроме того, остатки мономеров и реагентов, используемых при синтезе, требуют строгого контроля степени очистки, чтобы исключить токсичность. Эти факторы ограничивают широкое клиническое применение наногелей на текущем этапе, хотя потенциал этой технологии остаётся весьма высоким [60, 61].

Для раковой опухоли характерно состояние гипоксии, связанное с постоянным делением данных тканей и поглощение большого количества питательных веществ. Находясь в состоянии гипоксии, раковые клетки вызывают неконтролируемый и неупорядоченный рост сосудов – ангиогенез опухоли [30]. Данные сосуды имеют межклеточные промежутки, обеспечивающие их проницаемость. В [31] было показано, что размер такого рода «промежутков» в межклеточных контактах сосудов опухоли составляет 100-780 нм в зависимости от типа опухоли, её локализации. Данный эффект назван EPR-эффектом (Enhanced Permeability and Retention (повышенная проницаемость и удержание)), а сам метод доставки, основанный на данном эффекте – «пассивный» (рисунок 6).

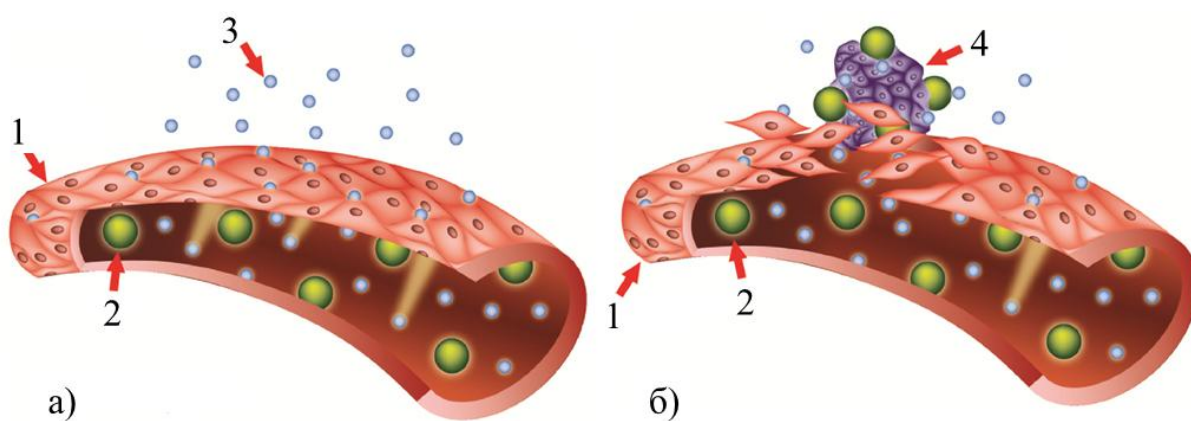


Рисунок 6 – Схематическое изображение доставки наночастиц за счёт EPR-эффекта. а) – здоровая ткань. б) – опухолевая ткань. 1 – Эндотелиальные клетки, 2 – наночастицы фотосенсибилизатора, 3 – малые частицы (менее 50 нм), 4 – опухолевая ткань [27].

Таким образом, данный способ доставки основывается на различии сосудов в нормальной и опухолевой ткани и обеспечивает проникновение и концентрирование наночастиц в области опухоли.

Наиболее оптимальными условиями для проявления EPR-эффекта принято считать размер частиц порядка 100 нм (от 20 до 200 нм) [32]. Нижняя граница обусловлена возможной проницаемостью здоровых тканей, функциональная проницаемость пор которых около 7 нм [33, 34]. Современные разработки в области фотодинамической терапии направлены также на создание активируемых фотосенсибилизаторов, которые остаются неактивными в системном кровотоке и активируются только в патологической микросреде опухоли. Такие системы чувствительны, например, к снижению pH, активности специфических протеаз или повышенной восстановительной активности. Это позволяет снизить системную токсичность и минимизировать повреждение здоровых тканей.

Наночастицы (VP-6-ПВП, PT-1-ПВП), исследуемые в данной работе также ориентированы на пассивный таргетинг с дальнейшей возможностью введения вектора, способного селективно связываться с клеточными органеллами раковых клеток.

Также изучается возможность направленной доставки ФС или лекарств путем связывания их с моноклональными антителами, специфичными к антигенам на поверхности раковых клеток. Альтернативный данному подходу – метод, использующий молекулы, способные селективно накапливаться в опухоли благодаря наличию специфических рецепторов. К ним относятся белок трансферин, некоторые гормоны (стероиды, инсулин), эпидермальный фактор роста и фолиевая кислота. Существуют и более сложные конструкции, реализующие селективную доставку. Так, было показано, что сывороточный альбумин человека (САЧ) способен выступать в качестве носителя ФС, а эпидермальный фактор роста стимулировал его поглощение клеткой [35]. Однако возможны и более сложные структуры для достижения максимально селективной

доставки препарата. В статье [26] было показано, что структуры, содержащие белок-носитель (САЧ), фотосенсибилизатор (хлорин), лиганд (инсулин или эпидермальный фактор роста) и специальный пептид – сигнал ядерной локализации, обеспечивают доставку ФС в ядро и повышение фотодинамической эффективности более чем в 2000 раз по сравнению с исходным хлорином. Однако синтез настолько сложных белковых комплексов крайне дорог, а процедура изготовления таких наночастиц занимает много времени.

1.4. Оптические методы анализа фотосенсибилизаторов

Разработка эффективных фотосенсибилизаторов третьего поколения требует не только знания их молекулярной структуры, но и комплексной оценки физических свойств, включая размеры частиц, стабильность, взаимодействие с биомолекулами, а также спектральные характеристики. Одним из ключевых инструментов в таком анализе являются оптические методы, позволяющие получать информацию о параметрах наночастиц в условиях, приближенных к физиологическим. В число таких методов входят динамическое рассеяние света (ДРС), спектрофотометрия (включая УФ-видимый диапазон), флуориметрия, а также методы кругового дихроизма и электронная микроскопия, которые дополняют спектрофотометрические данные визуализацией морфологии частиц [62 – 64]. Комбинация этих подходов позволяет не только охарактеризовать физико-химические параметры наночастиц, но и выявить возможные механизмы их взаимодействия с белками крови, что является важным для доклинического этапа разработки лекарственных форм.

Помимо ключевых оптических методов, в ряде специфических случаев к анализу фотосенсибилизаторов может привлекаться ряд дополнительных физико-химических подходов. Так, тензиометрия применяется для оценки поверхностного и межфазного натяжения, например, при изучении взаимодействия фотосенсибилизаторов с модельными мембранами или на границе раздела фаз в случае липосомальных и мицеллярных систем. Это

позволяет судить о возможной способности ФС к самосборке или включению в липидный бислой. Кондуктометрия, в свою очередь, может использоваться для определения степени ионизации и электропроводности растворов, содержащих ФС и полимерные носители, что полезно при изучении механизмов стабилизации и ассоциации в водной среде.

Подобные методы применяются эпизодически, главным образом при необходимости получения дополнительной информации о критических концентрациях мицеллообразования, зарядовых характеристиках коллоидных систем или проверке стабильности системы в нестандартных условиях. В совокупности с основными оптическими методами они позволяют более точно охарактеризовать физико-химические параметры исследуемых наночастиц и подтвердить релевантность полученных данных при интерпретации биомедицинских свойств систем [66].

Метод динамического рассеяния света

Метод динамического светорассеяния (ДРС, англ. DLS — Dynamic Light Scattering) является одним из наиболее распространённых и широко применяемых оптических методов для анализа коллоидных и нанодисперсных систем в растворах. Основанный на регистрации флуктуаций интенсивности рассеянного света, возникающих вследствие броуновского движения частиц, метод позволяет с высокой точностью определять гидродинамический радиус наночастиц, а также косвенно судить об их агрегатном состоянии и полидисперсности.

Широкое распространение ДРС обусловлено рядом его преимуществ. Прежде всего, метод является неразрушающим и высокочувствительным, не требует специфической подготовки образцов и позволяет проводить измерения в водных и биологических средах, приближенных к физиологическим. Это особенно важно при исследовании фотосенсибилизаторов, поскольку они, как правило, чувствительны к условиям окружающей среды и могут подвергаться

агрегации или деградации при механическом или химическом воздействии [52, 57, 67 – 71].

Ключевая роль метода ДРС в рамках данной работы обусловлена его способностью определять размерные характеристики наночастиц фотосенсибилизаторов в водных растворах, что критически важно при оценке их потенциала в пассивной таргетной доставке. Как известно, средний размер наночастиц напрямую влияет на эффективность накопления ФС в опухолевых тканях за счёт реализации эффекта повышенной проницаемости и удерживания (Enhanced Permeability and Retention, EPR-эффекта). Таким образом, корректное определение гидродинамического радиуса ФС является одним из ключевых этапов при разработке новых фармакоформ для фотодинамической терапии.

Метод также позволяет отслеживать изменения средних гидродинамических радиусов во времени, что делает возможным исследование стабильности частиц как при хранении, так и под воздействием внешних факторов (например, освещения). В сочетании с возможностью анализа многокомпонентных систем, таких как растворы ФС с белками (сывороточным альбумином), полимерами (например, ПВП) и другими компонентами, метод динамического светорассеяния становится оптимальным инструментом для изучения поведения наночастиц в сложных биомиметических условиях.

Таким образом, ДРС в рамках настоящего исследования выступает как центральный метод, обеспечивающий получение количественно достоверных данных о гидродинамических радиусах, стабильности и потенциале взаимодействия фотосенсибилизаторов с белками крови — параметрах, имеющих решающее значение для последующих доклинических и клинических этапов разработки фототерапевтических препаратов.

Метод спектрофотометрии

Спектрофотометрия является одним из фундаментальных методов оптического анализа веществ, основанным на измерении поглощения электромагнитного излучения исследуемым образцом в определённом диапазоне длин волн. Для анализа фотосенсибилизаторов метод имеет ключевое значение, поскольку позволяет точно определять положение и интенсивность пиков поглощения, соответствующих электронным переходам в молекуле.

Особая роль спектрофотометрии в контексте фотодинамической терапии связана с необходимостью оценки спектральных характеристик ФС, таких как максимумы поглощения (обычно в видимой и ближней ИК-области), коэффициенты экстинкции, а также изменение спектра во времени или при взаимодействии с биомолекулами. Именно спектрофотометрические данные позволяют судить о пригодности ФС к активации заданным лазерным источником и о его фотофизической стабильности [69, 72 – 74].

В рамках настоящего исследования метод использовался для изучения взаимодействия фотосенсибилизаторов с сывороточным альбумином, главным образом через анализ изменения формы и положения пиков поглощения. Обнаруженные сдвиги пиков и снижение интенсивности мономерных максимумов позволили зафиксировать факт связывания ФС с белком, а также охарактеризовать тип и степень взаимодействия. В некоторых случаях было показано, что по мере добавления альбумина спектр приобретает признаки «мономеризации» ФС, что указывает на диссоциацию агрегатов и образование комплексов ФС-белок.

Преимуществом спектрофотометрии также является её универсальность и точность: метод применим как к низко- так и высокомолекулярным соединениям, позволяет работать с растворами различной концентрации и может быть использован в динамике, что особенно важно при изучении кинетики

взаимодействия ФС с биомолекулами. Современные спектрофотометры (например, использованный в работе двухлучевой HITACHI U-2900) обладают высокой стабильностью и разрешением, что обеспечивает достоверную регистрацию даже слабо выраженных изменений спектров.

Флуориметрия

Флуориметрия — один из важнейших методов анализа фотоактивных соединений, основанный на измерении интенсивности и спектральных характеристик флуоресценции молекул при возбуждении их светом определённой длины волны. Для фотосенсибилизаторов, обладающих выраженными флуоресцентными свойствами, метод позволяет получить критически важную информацию о структурной организации молекул, типах взаимодействий и окружающей микросреде.

Флуориметрия обладает высокой чувствительностью, что делает её незаменимой при работе с разбавленными растворами и позволяет отслеживать даже слабые флуоресцентные отклики в сложных дисперсных системах [57, 69, 72]. Это особенно важно при исследовании взаимодействия фотосенсибилизаторов с сывороточным альбумином, где изменения интенсивности флуоресценции могут свидетельствовать об образовании комплексов, изменении степени агрегирования или перераспределении форм ФС (мономеров, димеров, высокомолекулярных ассоциатов) [75 – 78].

В рамках настоящей работы флуориметрия использовалась для изучения тушения или усиления (разгорания) флуоресценции при взаимодействии наночастиц ФС с альбумином. Анализ зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации белка позволил определить параметры связывания, в том числе константу ассоциации и количество сайтов связывания, а также установить тип кинетики взаимодействия. В частности, при исследовании амфифильных матриц (например, S₂₇-Na) было показано, что связывание

происходит в течение порядка одного часа, и сопровождается значительным изменением флуоресцентного сигнала.

Дополнительным преимуществом метода является возможность разделения мономерной и агрегированной форм по характерным флуоресцентным максимумам, что особенно важно для оценки степени агрегации ФС в присутствии белков или полимеров. В сочетании с ДРС и спектрофотометрией флуориметрия обеспечивает полноценное представление о поведении фотосенсибилизаторов в биомиметических условиях.

Дополнительные оптические и физико-химические методы анализа

В дополнение к основным методам, таким как динамическое рассеяние света, спектрофотометрия и флуориметрия, в ряде научных исследований для исследования наночастиц фотосенсибилизаторов применяются и другие оптические и физико-химические методы. Среди них — круговой дихроизм, просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ), тензиометрия, кондуктометрия и другие подходы [62 – 64, 66, 79].

Метод кругового дихроизма (КД), основанный на измерении различий в поглощении лево- и правополяризованного света, используется для определения пространственной структуры молекул и их конформационных изменений. Однако в случае высоко полидисперсных систем с несколькими фракциями наночастиц и сильной светорассеивающей способностью водных растворов, применение КД может быть существенно затруднено из-за низкого отношения сигнал/шум и сложности интерпретации спектров.

Просвечивающая электронная микроскопия позволяет получать изображения наночастиц с нанометровым разрешением, обеспечивая информацию о морфологии, агрегатных формах и возможной структуре ассоциатов. Тем не менее, необходимость использования вакуумной среды, предварительной сушки или замораживания образца делает метод слабо

применимым для исследований *in vitro* в водных растворах. Кроме того, возможны артефакты, связанные с изменением конформации частиц вне физиологических условий.

Тензиометрия и кондуктометрия относятся к группе методов, позволяющих оценить поверхностную активность, степень диссоциации молекул и их поведение в растворе. Эти методы находят применение при исследовании поверхностно-активных веществ и мицеллярных систем. Однако в случае комплексных водных растворов фотосенсибилизаторов с белками и полимерами, интерпретация таких измерений может быть затруднена из-за множественных конкурирующих эффектов и слабой воспроизводимости данных. Например, кондуктометрия чувствительна к малым изменениям ионной силы среды, что не позволяет с надёжностью оценивать процессы комплексообразования в условиях *in vitro*.

Таким образом, перечисленные методы могут быть полезны при изучении изолированных или хорошо охарактеризованных систем, однако их применимость к исследуемым в данной работе наночастицам фотосенсибилизаторов ограничена. Ввиду сложности их использования в водных многокомпонентных средах, а также потенциальных искажений структуры образца при подготовке, они не рассматривались в рамках экспериментальной части данной работы как приоритетные. Предпочтение было отдано оптическим методам, способным обеспечить достоверный анализ в условиях, максимально приближенных к физиологическим.

1.5. Выводы к Главе 1

В первой главе представлен комплексный обзор теоретических основ, необходимых для понимания ключевых аспектов фотодинамической терапии (ФДТ) и особенностей исследования фотосенсибилизаторов (ФС) нового поколения. Были рассмотрены механизмы фотодинамического эффекта,

включающие образование синглетного кислорода под воздействием света в присутствии кислорода и фотосенсибилизатора, что лежит в основе индуцированного клеточного повреждения опухолевых тканей.

Проанализированы основные этапы реализации ФДТ: от селективного накопления фотосенсибилизатора в опухолевой ткани до механизмов его проникновения внутрь клеток и фотофизических процессов, происходящих после доставки света. Акцентируется внимание на том, что эффективность терапии напрямую связана с особенностями транспорта, локализации и фотохимического поведения ФС.

Особое внимание уделено классификации фотосенсибилизаторов по поколениям, отражающей эволюцию подходов к их химической модификации, селективности доставки и фотофизическим характеристикам. В частности, выделены два типа перспективных ФС третьего поколения: самосборные амфифильные матрицы и комплексы на основе гидрофобных ФС с амфифильными полимерами. Их исследование, как наиболее адаптированных к задачам пассивного и направленного таргетинга, лежит в основе настоящей работы.

Также была представлена классификация и анализ применимых методов исследования фотосенсибилизаторов, с акцентом на оптические подходы. Подробно рассмотрены возможности и ограничения таких методов, как динамическое рассеяние света, спектрофотометрия и флуориметрия, позволяющих с высокой точностью исследовать средние гидродинамические радиусы, стабильность и взаимодействие наночастиц ФС с белками крови в водных растворах. Дополнительные методы, такие как круговой дихроизм, просвечивающая электронная микроскопия, тензиометрия и кондуктометрия, были оценены как потенциально полезные, однако менее приоритетные в контексте условий *in vitro*, близких к физиологическим.

Сформулированный теоретический фундамент позволяет обосновать выбор объектов исследования, подходов к их изучению и применяемых экспериментальных методик, представленных в последующих главах диссертационной работы.

Глава 2. Исследуемые объекты

В данной работе проводились исследования наночастиц в коллоидных формах на основе фотосенсибилизаторов VP-6, PT-1 и полимера поливинилпирролидона (ПВП) в водных растворах, в зависимости от мольного соотношения вещество - ПВП, а также представлено их поведение в водно-белковых растворах.

Образцы (VP-6-ПВП и PT-1-ПВП) были предоставлены лабораторией фталоцианинов и их аналогов института физиологически активных веществ российской академии наук (ИФАВ РАН).

В настоящем исследовании объектами анализа выступали наночастицы фотосенсибилизаторов третьего поколения, полученные на основе тетрапиррольных соединений, находящихся в разработке в лаборатории фталоцианинов и их аналогов Института физиологически активных веществ Российской академии наук (ИФАВ РАН). Исследуемые образцы были представлены в виде стабильных коллоидных растворов, сформированных по двум принципиально различным стратегиям получения наночастиц: самосборные амфифильные матрицы и гидрофобные ФС в присутствии амфифильного полимера.

Первую группу исследуемых образцов составляли наночастицы, образованные на основе гидрофобных фотосенсибилизаторов с применением амфифильного полимера — поливинилпирролидона (ПВП) в качестве стабилизирующей и растворяющей оболочки. Благодаря способности ПВП формировать устойчивые мицеллярные структуры в водной среде, удаётся добиться эффективной коллоидной стабилизации гидрофобных соединений и контроля их наноразмерности, что критически важно для биомедицинского

применения, включая пассивный таргетинг опухолей. К данной группе относятся следующие наноконплексы:

- VP-6–ПВП, содержащий ковалентно-связанный фрагмент метилфеофорбида α и фталоцианин цинка — перспективный тераностик на основе цинкового комплекса;
- РТ-1–ПВП, включающий магниевый тетрапиррольный комплекс с потенциальной возможностью инкапсуляции лантанидов и применения в мультимодальных методах терапии;
- РТ-5–ПВП, представляющий собой производное порфиразина с интенсивным поглощением в ближнем ИК-диапазоне, подходящее для глубокопроникающей ФДТ;
- IB-25–ПВП, построенный на основе ковалентной диады, объединяющей метилфеофорбид и фталоцианиновый фрагмент, с выраженными диагностическими характеристиками и возможностью рентгеновской активации.

Указанные системы были исследованы в водных растворах, а для образца VP-6–ПВП и при различных мольных соотношениях ФС к полимеру, что позволяло контролировать средний размер наночастиц, их стабильность во времени, а также взаимодействие с белковыми компонентами раствора. Особое внимание уделялось влиянию присутствия альбумина на изменение размеров и стабильности данных систем, что позволяет судить о возможных механизмах транспорта и взаимодействия ФС в кровяном русле.

Вторая группа исследуемых объектов включала самосборные амфифильные наноструктуры, в которых молекулы фотосенсибилизаторов, обладая одновременно гидрофобными и гидрофильными фрагментами, способны самостоятельно формировать устойчивые наноразмерные агрегаты в водной среде без необходимости использования внешнего стабилизирующего полимера. Такая архитектура обеспечивает высокую коллоидную стабильность систем,

улучшенную воспроизводимость их свойств, а также минимизацию побочных взаимодействий с компонентами биологических жидкостей, особенно белками плазмы крови.

В настоящем исследовании были подробно изучены два типа амфифильных фотосенсибилизаторов:

– S₂₇-Na — водорастворимое производное порфиразина магния с пониженной симметрией АзВ-типа, содержащее ионогенные карбоксильные группы, обеспечивающие растворимость в воде и потенциал для создания конъюгатов с биомолекулами;

– PT_{peg} — аналогичная по ядру структура порфиразина, модифицированная полиэтиленгликолевыми (ПЭГ) заместителями, которые выполняют одновременно функции гидрофильной маскировки и стабилизации мицеллы, снижая неспецифическое связывание с белками крови и способствуя продлённой циркуляции в организме.

Образцы относятся к перспективным представителям фотосенсибилизаторов третьего поколения, сочетающим в себе свойства активного и пассивного таргетинга, и рассматриваются как платформы для дальнейшей разработки многофункциональных терапевтических агентов.

Оба образца исследовались как в изначальной самосборной форме, так и в присутствии ПВП в качестве пассивной нагрузки. Это позволило оценить изменение гидродинамических характеристик частиц, их возможную агрегацию или дестабилизацию при взаимодействии с альбумином, а также провести сравнительный анализ влияния дополнительного полимерного компонента на свойства самосборных ФС.

Наряду с самими наночастицами, в работе также был исследован сывороточный альбумин человека (САЧ), выступающий модельным биомакромолекулярным компонентом, ответственным за транспорт веществ в

плазме крови. Анализ взаимодействий ФС с альбумином позволил смоделировать поведение наночастиц в условиях, приближенных к физиологическим, и оценить потенциал исследуемых систем для последующего применения в таргетной фотодинамической терапии.

Таким образом, исследуемые объекты охватывают широкий спектр структурных типов перспективных отечественных ФС, обладающих различной природой самоорганизации и способами стабилизации, что позволило провести всесторонний анализ их коллоидно-химических и биофизических свойств в условиях *in vitro*.

2.1. Наночастицы на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера

Гидрофобные фотосенсибилизаторы, представленные в данной работе, характеризуются низкой растворимостью в водных средах, что существенно ограничивает их прямое применение в физиологических условиях. Для преодоления этой трудности и обеспечения стабильного коллоидного состояния, данные соединения были переведены в наноформу с использованием амфифильного полимера — поливинилпирролидона (ПВП). В результате взаимодействия ФС с ПВП формируются мицеллярные ассоциаты, в которых гидрофобные молекулы ФС стабилизированы в водной фазе за счет образования внешней гидрофильной оболочки из полимера. Такая архитектура наночастиц позволяет существенно повысить биосовместимость и растворимость гидрофобных соединений, обеспечивая тем самым условия для эффективного транспорта в биологических средах. Кроме того, варьируя мольное соотношение ФС:ПВП, можно контролировать гидродинамический радиус наночастиц, что критически важно для реализации пассивного таргетинга опухолевых тканей посредством EPR-эффекта. Данные комплексы представляют собой перспективные модели для разработки фотосенсибилизаторов третьего

поколения, сочетающих терапевтический потенциал с возможностями для диагностики и потенциальной модификацией для направленной доставки.

Полимер поливинилпирролидон

Поливинилпирролидон (ПВП) — синтетический полимер. В зависимости от условий синтеза, получают полимеры винилпирролидона с различной молекулярной массой.

Поливинилпирролидон имеет выраженную способность образовывать комплексы с различными веществами. Поливинилпирролидон индифферентен для организма, не поддается расщеплению ферментами и выводится в неизмененном виде почками. Поливинилпирролидон обладает ярко выраженными абсорбционными свойствами (за счет наличия в молекуле группы $-N-C=O$). Поливинилпирролидон способен образовывать комплексы с различными веществами белкового происхождения, в том числе токсинами, продуктами распада тканей, продуктами бактериального происхождения. Они способствуют проведению через почечный барьер соединений, которые без контакта с поливинилпирролидоном не проходят через него. При образовании комплекса отрицательное действие токсинов нейтрализуется практически полностью [80].

В соответствии с литературными данными гидродинамический радиус ПВП составляет около 7 нм [81]. Рассмотренные в работе наночастицы фталоцианинов и порфиразинов для стабилизации и улучшения растворимости в воде покрыты ПВП, образуя с ними стабильные ассоциаты. Известно, что при некоторых концентрациях ПВП начинает взаимодействовать с белком [82], поэтому необходимо точно определить предельные концентрации ПВП, при которых взаимодействие не наблюдается.

Образец РТ-5

Образец РТ-5 – соединение на основе порфиразинов (рисунок 7), которые благодаря своей высокой стабильности, наличию интенсивного поглощения в

ближнем ИК-диапазоне и способности к генерации синглетного кислорода обладают рядом преимуществ перед иными красителями, применяемыми для создания фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии. Все эти свойства позволяют рассматривать данную структуру как перспективную молекулярную платформу для создания ФС третьего поколения.

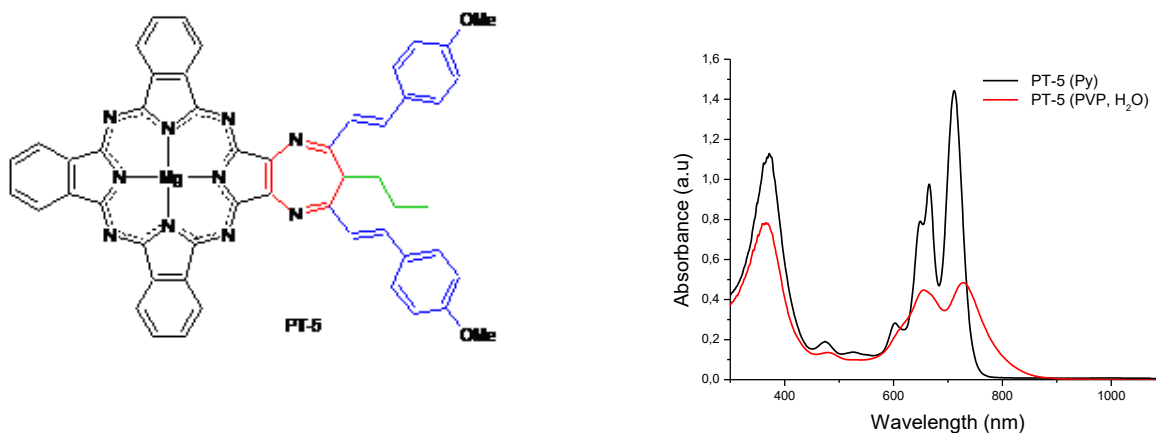


Рисунок 7 – Электронный спектр поглощения индивидуального соединения РТ-5 в пиридине (Py) и мицелл на основе РТ-5 и ПВП-К30 в воде.

Свойства образца РТ-5 позволяют в перспективе использовать его для ФДТ, также имеется возможность модифицировать образец для активного таргетинга. Кроме того, возможно введение в образец тяжелых металлов для нейтронозахватной терапии и возможности рентгеновского возбуждения фотосенсибилизатора, что позволит использовать данный образец для лечения раковых опухолей в более глубоких слоях тканей.

На рисунке 7 также представлены электронные спектры поглощения. Образец РТ-5 в воде обладает меньшей интенсивностью поглощения, чем в растворе пиридина. Пик поглощения в РТ-5 находится около 670 нм, что позволяет использовать частицы в эксперименте с лазерным излучением 650 нм. Характеристики исходных образцов наночастиц РТ-5: $C(\text{вещества}) = 9,4 \cdot 10^{-5}$ моль/л; $C(\text{ПВП}) = 3,8 \cdot 10^{-5}$ моль/л;

Образец IB-25

Образец IB-25 представляет собой раствор мицелл в воде (рисунок 8). В образце присутствует полимер поливинилпирролидон (ПВП), который покрывает структуры и формирует наночастицы, стабилизируя их. Кроме того, данный полимер улучшает растворимость образцов в воде.

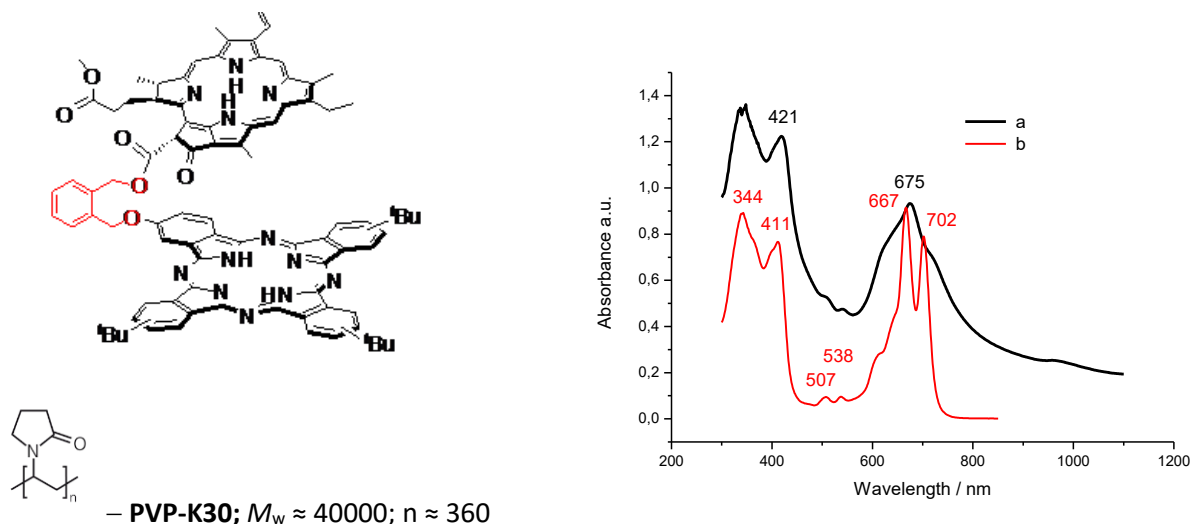


Рисунок 8 – ЭСП мицелл на основе IB-25 и PVP-K30 в воде (a) и индивидуального соединения IB-25 в тетрагидрофуране (b).

Образец IB-25 содержит:

а) Фрагмент метилфеофорбида а – хромофора природного происхождения, который в последние годы также используется в качестве довольно эффективного ФС. Кроме того, он может использоваться для активной доставки при некоторых видах рака.

б) Фрагмент замещенного фталоцианина – синтетического хромофора, который является хорошим люминофором и также проявляет свойства ФС.

Ожидается, что сочетание этих двух фрагментов в одной молекуле в виде ковалентной диады позволит формам на основе IB-25 обладать как хорошими диагностическими, так и терапевтическими характеристиками (т.е. свойствами т.н. «тераностиков»). У данного образца низкий квантовый выход

люминесценции, но высокая интенсивность излучения. Поэтому он может быть успешно использован для диагностики раковых заболеваний.

На рисунке 8 также представлены электронные спектры поглощения. Образец IB-25 в водном растворе проявляет большее поглощение в сравнении с РТ-5. Пик поглощения в образце IB-25 составляет 675 нм, что позволяет использовать частицы в эксперименте с лазерным излучением на 650 нм. Характеристики исходных образцов наночастиц IB-25: $C(\text{вещества}) = 3 \cdot 10^{-4}$ моль/л; $C(\text{ПВП}) = 3 \cdot 10^{-4}$ моль/л;

Образец VP-6-ПВП

Молекулы образца VP-6 содержат (рисунок 9):

- а) Фрагмент метилфеофорбида α – хромофора природного происхождения, который в последние годы используется в качестве довольно эффективного ФС.
- б) Фрагмент замещенного фталоцианина – синтетического хромофора, который является хорошим люминофором и проявляет свойства ФС (рисунок 9).

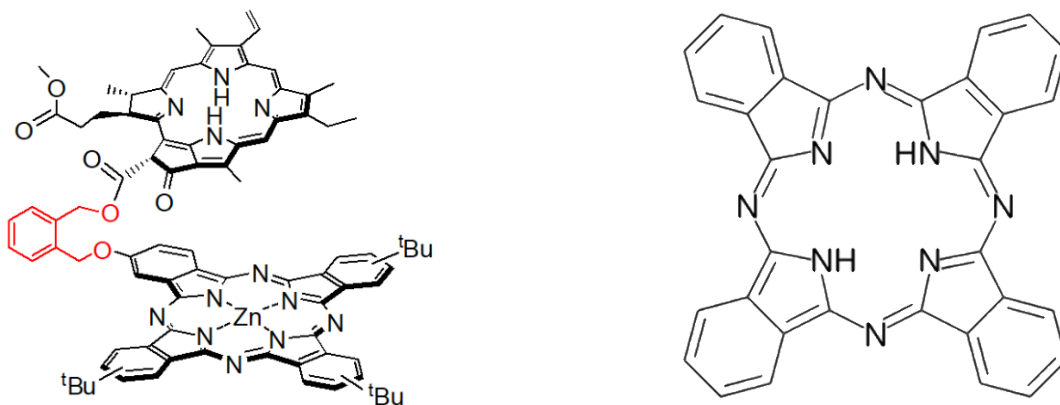


Рисунок 9 – Строение VP-6 и структура фталоцианина

Образец ФС VP-6 синтезировали по методике, ранее разработанной для его ближайшего аналога [37]. Мицеллярные растворы были приготовлены в мольном отношении VP-6 и ПВП 1:1, 1:2 и 1:5.

Ожидается, что сочетание этих двух фрагментов в одной молекуле в виде ковалентной диады позволит формам на основе VP-6 обладать как хорошими

диагностическими, так и терапевтическими характеристиками (то есть свойствами так называемых «тераностиков»).

На рисунке 10 представлен электронный спектр поглощения форм VP-6-ПВП, максимум которого приходится на 674 нм. Такая длина волны обеспечивает хорошую глубину проникновения света в ткани (см. рисунок 3).

Наличие иона Zn в молекуле ФС VP-6 приводит к увеличению его эффективности (терапевтического эффекта) за счет стабилизации триплетного состояния благодаря «эффекту тяжелого атома» (более высокий квантовый выход), что с другой стороны, компенсируется снижением эффективности флуоресценции, то есть некоторым ослаблением возможностей для диагностики.

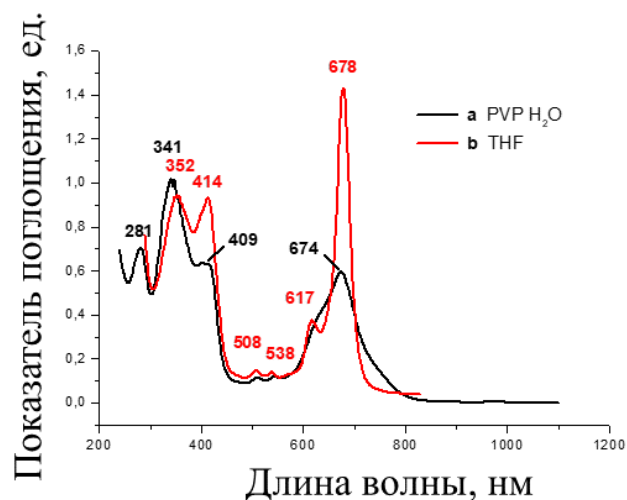


Рисунок 10 – ЭСП наночастиц на основе VP-6 и ПВП в воде (a) и индивидуального соединения VP-6 в THF (b).

Образец РТ-1-ПВП

Индивидуальный ФС РТ–1 синтезировали по ранее разработанной методике [38, 39]. Мицеллярный раствор готовили, смешивая РТ–1 и ПВП в мольных отношениях: 1:1, 1:10 и 1:100. На рисунке 11 представлена структура РТ-1.

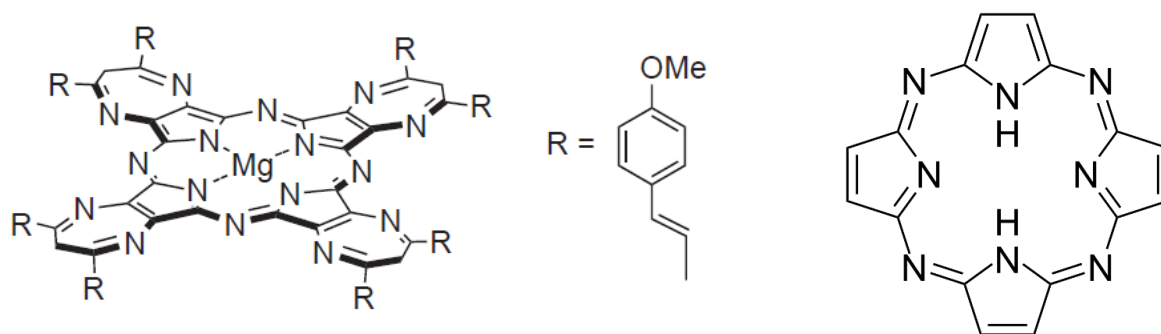


Рисунок 11 – Строение PT-1 и структура порфирина.

Способность соединений типа PT-1 формировать стабильные димеры за счет водородного связывания делает их перспективными для получения устойчивых комплексов с лантанидами большого ионного радиуса (лантаниды середины и начала ряда). Ионы тяжелых металлов в данной структуре полностью экранированы от внешнего воздействия иных комплексонов. Такие особенности открывают перспективы применения данных лигандов в качестве устойчивого контейнера для ионов лантанидов, которые в свободном виде токсичны для организма. Поиск таких контейнеров актуален в виду ряда особенностей ионов лантанидов, обладающих широким спектром полезных физико-химических свойств, благодаря чему активно используются в современных материалах. К примеру, комплексные соединения на основе гадолиния применяются в медицине в качестве МРТ контрастов, КТ контрастов и активно исследуются для применения в нейтронзахватной терапии. Водорастворимые наночастицы содержащие ионы лантана, европия, церия в сочетании с известными ФС исследуются для реализации рентгениндукцированной фотодинамической терапии, что позволит значительно расширить область применения ФДТ.

На рисунке 12 представлен электронный спектр поглощения форм PT-1, максимум которого приходится на 680-700 нм. Такая длина волны обеспечивает хорошую глубину проникновения света в ткани (см. рисунок 3).

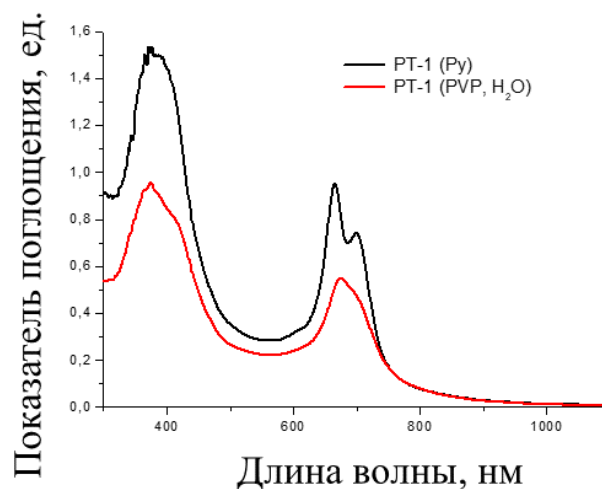


Рисунок 12 – ЭСП соединения РТ-1 в пиридине (черный цвет, а) и формы РТ-1-ПВП в воде (красный цвет, б).

2.2. Способные к самосборке амфифильные ФС

Переход от стабилизированных гидрофобных фотосенсибилизаторов к структурам с интегрированным амфифильным фрагментом является важным этапом в развитии концепции целевой доставки фотосенсибилизирующих агентов. В первой части настоящего исследования были подробно охарактеризованы наночастицы, стабилизированные поливинилпирролидоном (ПВП), что позволило определить оптимальные параметры получения и физико-химические характеристики мицеллярных форм: их размеры, устойчивость во времени, чувствительность к свету, а также степень взаимодействия с сывороточным альбумином. Полученные результаты позволили обоснованно подойти к следующему этапу — исследованию конструктивно более совершенных систем, в которых фрагмент стабилизирующего агента ПВП уже включён в состав молекулы фотосенсибилизатора.

Такой подход позволяет перейти от многокомпонентных систем, потенциально подверженных вариативности состава и нестабильности в биологических средах, к более упорядоченным, самосборным амфифильным матрицам. Эти структуры формируют устойчивые мицеллярные образования в

водных растворах без добавления внешних стабилизаторов, что снижает влияние дополнительных факторов на размер частиц, их кинетику взаимодействия и поведение в условиях кровяного русла. Таким образом, обеспечивается высокий уровень воспроизводимости получаемых форм, а также улучшается биосовместимость и фармакокинетический профиль за счёт отсутствия свободного ПАВ во внешней фазе раствора.

В рамках настоящей главы рассматриваются два представителя данной группы — наночастицы на основе PT_peg и S_27_Na. Оба соединения являются гетероциклическими аналогами фталоцианина магния с низкой симметрией, способными к самосборке в водной среде и демонстрирующими перспективные свойства для реализации пассивного и активного таргетинга при фотодинамической терапии.

Образец Pt_peg

Данный образец представляет собой мицеллярный водный раствор на основе порфиразина с молярной концентрацией $1 \cdot 10^{-4}$ (моль/литр). Концентрация поливинилпирролидона составила $4 \cdot 10^{-5}$ (моль/литр).

Порфиразины Pt_Reg (рисунок 13) представляют собой гетероциклические аналоги фталоцианина магния с пониженной симметрией A_3V типа. При этом в 1,4-дiazепиновый гетероцикл введены гидрофильные заместители (карбоксильная группа и полиэтиленгликолиевая) для придания гидрофильно-гидрофобной анизотропии данным порфиразинам, что позволяет им самостоятельно растворяться в воде формируя при этом стабильные наноразмерные мицеллярные структуры и обеспечивая тем самым пассивный таргетинг при внутривенном введении (EPR-эффект). Карбоксильная группа дополнительно несет функцию возможности формирования пептидной или эфирной связи при создании конъюгатов с векторными лигандами обеспечивая тем самым возможность реализации активного таргетинга (рецепторно-опосредованный доставки

порфиразинов в клетки). Полиэтиленгликолиевая группа дополнительно несет функцию маскировки мицеллы от взаимодействия ее с белками крови обеспечивая тем самым повышенную стабильность наноразмерных мицелярных структур в кровяном русле и усиливает пассивный таргетинг.

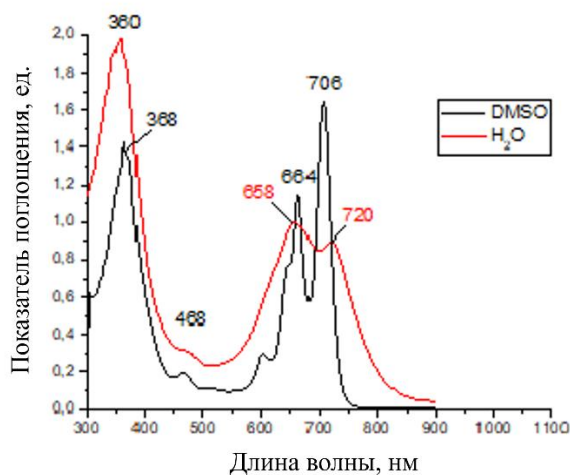


Рисунок 13 – ЭСП соединения PT-ред в диметилсульфоксиде (DMSO, черный цвет, а) и в воде (красный цвет, b).

Образец S27_Na

Мицеллярные водные растворы на основе порфиразина S_27_Na были получены при молярной концентрации 2×10^{-4} моль/л, при этом концентрация стабилизирующего полимера поливинилпирролидона (ПВП) составила 8×10^{-5} моль/л.

Исследуемое соединение представляет собой гетероциклический аналог фталоцианина магния по типу A₃B-симметрии, обладающий удлинённой π-системой и способный к эффективному поглощению света в ближней инфракрасной области спектра (рисунок 14).

По фотофизическим характеристикам S_27_Na близок к хлоринам — коммерчески доступным фотосенсибилизаторам, применяемым в клинической практике [83, 84]. При этом он может обладать рядом преимуществ, включая

повышенную фотостабильность и потенциал для модификации молекулы под конкретные задачи фотодинамической терапии.

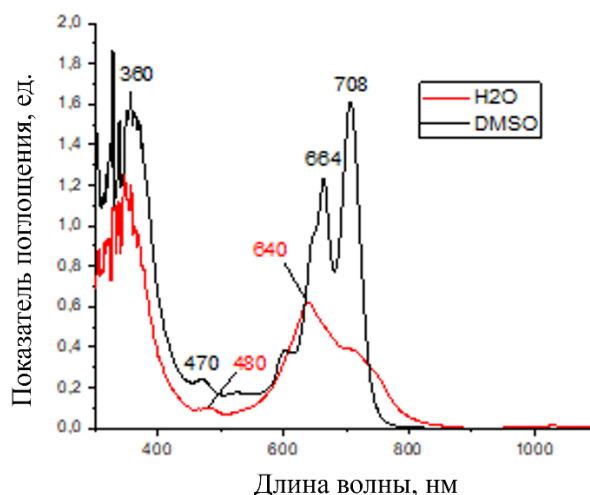


Рисунок 14 – ЭСП соединения S27_Na в диметилсульфоксиде (DMSO, черный цвет, а) и в воде (красный цвет, б).

В отличие от PT_reg, в структуре S_27_Na отсутствует экранирующая полиэтиленгликолевая группа, благодаря чему внешняя π -система макроцикла остаётся доступной для взаимодействия. Это приводит, с одной стороны, к повышенной склонности молекул к π - π -стэкингу и агрегации, а с другой — к возможности прямого и специфичного взаимодействия с биомолекулами, в частности, с белками крови. Такая структура делает S_27_Na удобным модельным соединением для изучения механизмов взаимодействия наночастиц с сывороточным альбумином — основным транспортным белком крови, что имеет ключевое значение для оценки *in vivo* поведения и потенциала фотосенсибилизатора в условиях физиологических жидкостей.

Таким образом, S_27_Na можно рассматривать как перспективную платформу для фундаментальных исследований взаимодействия наночастиц с биосредой, а также как прототип «неэкранированных» мицеллярных фотосенсибилизаторов третьего поколения с пассивной адресацией к опухолевым тканям.

2.3. Сывороточный альбумин

Сывороточный альбумин человека (САЧ) является основным белком плазмы крови и выполняет ключевые функции в обеспечении гомеостаза организма. В сухом веществе крови доля альбумина достигает до 60% всех белков, при этом на него приходится около 55% от общего белка плазмы. Благодаря высокой концентрации и способности к обратимому связыванию различных молекул, альбумин играет важнейшую транспортную роль, осуществляя перенос широкого спектра эндогенных и экзогенных соединений — билирубина, жирных кислот, гормонов, лекарственных препаратов, в том числе фотосенсибилизаторов (ФС) [86 – 89]. Именно эта особенность делает САЧ приоритетным объектом для *in vitro*-исследований взаимодействия наночастиц ФС с компонентами биологических жидкостей.

Структурно молекула САЧ представляет собой одиночную полипептидную цепь, состоящую из 585 аминокислотных остатков и стабилизированную 17 дисульфидными мостиками, формирующими 9 структурных доменов. В водной среде она принимает форму эллипсоида вращения с осями приблизительно 38 и 150 Å, а её гидродинамический радиус составляет около 3,5 нм, что согласуется как с литературными данными [85], так и с результатами, полученными в настоящем исследовании методом динамического рассеяния света.

В работе использовался САЧ марки Sigma A9511, полученный из человеческой сыворотки и представленный в виде лиофилизированного порошка с чистотой $\geq 97\%$. Его физико-химические характеристики позволяют использовать данный белок в качестве репрезентативной модели биологической среды при оценке стабильности и взаимодействия коллоидных наночастиц фотосенсибилизаторов в условиях, приближённых к физиологическим.

В серии экспериментов с участием сывороточного альбумина pH среды строго контролировался с использованием фосфатного буфера (PBS,

Biotechnology Grade), содержащего 10 мМ фосфатный буфер, 137 мМ NaCl и 2,7 мМ KCl. Такая буферная система обеспечивает стабильное значение pH $7,4 \pm 0,1$, соответствующее физиологическим условиям человеческого организма. Поддержание стабильного pH среды является критически важным для сохранения конформационной стабильности белка, предотвращения его денатурации, а также для достоверной оценки характера взаимодействия между наночастицами фотосенсибилизаторов и альбумином. Отклонение pH от физиологического уровня может существенно изменить поверхностный заряд как наночастиц, так и белковых молекул, что приводит к искажению результатов, связанных с комплексообразованием, агрегацией или электростатическим отталкиванием между компонентами системы. Использование PBS позволяет проводить измерения в условиях, максимально приближённых к физиологическим, что особенно важно при моделировании поведения нанофотосенсибилизаторов в биологических жидкостях.

Особое значение изучения взаимодействия ФС с альбумином заключается в возможности оценки степени специфического или неспецифического связывания, а также изменения наноразмерных параметров коллоидной системы. Наличие или отсутствие комплексообразования с альбумином определяет биодоступность, фармакокинетику и потенциальную токсичность ФС, а также влияет на их транспорт в опухолевую ткань, в том числе по механизму пассивного таргетинга (EPR-эффекта).

В рамках настоящей работы проведено сравнительное исследование взаимодействия САЧ с представителями обеих групп наночастиц ФС, включая:

- гидрофобные ФС с ПВП-стабилизацией: VP-6–ПВП, PT-1–ПВП, PT-5–ПВП и IB-25–ПВП;
- самосборные амфифильные матрицы: S_27_Na и PT_peg — с ПВП и без соответственно.

Показано, что при использовании гидрофобных наночастиц с ПВП возможно формирование многокомпонентных систем, в которых различие вклада отдельных компонентов в рассеяние света и оценка стабильности требует дополнительных методов анализа. В случае самосборных ФС с полиэтиленгликолевыми фрагментами (например, РТрег) наблюдается высокая устойчивость к взаимодействию с альбумином, что свидетельствует о потенциале таких структур как монокомпонентных коллоидных форм с повышенной биостабильностью.

Таким образом, САЧ выступает в настоящей работе в роли физиологически релевантного биомакромолекулярного индикатора, позволяющего количественно и качественно оценить перспективность наноформ ФС для последующего применения в доклинической практике.

2.4. Выводы к Главе 2

В данной главе представлены основные объекты исследования, включающие два типа перспективных фотосенсибилизирующих наноструктур третьего поколения, отличающихся механизмами стабилизации в водных средах, а также модельный биомакромолекулярный компонент — сывороточный альбумин.

Первую группу объектов составили гидрофобные фотосенсибилизаторы, стабилизированные амфифильным полимером поливинилпирролидоном (ПВП), что позволяет формировать в воде устойчивые мицеллярные наночастицы. Представители этой группы (VP-6–ПВП, PT-1–ПВП, PT-5–ПВП, IB-25–ПВП) различаются по своей хромофорной природе (порфиразины, фталоцианины, метилфеофорбидные производные) и демонстрируют различные оптические характеристики и потенциал к генерации синглетного кислорода. Благодаря введению ПВП обеспечивается коллоидная стабильность в водных растворах и контролируемая наноразмерность, что критически важно для реализации пассивного таргетинга при фотодинамической терапии.

Вторую группу составили самосборные амфифильные матрицы фотосенсибилизаторов (S_27_Na и PT_peg), в которых за счёт внутренней молекулярной амфифильности обеспечивается формирование стабильных наноструктур без использования дополнительных стабилизаторов. Это позволяет получить монокомпонентные системы с высокой воспроизводимостью свойств и сниженным риском взаимодействия с компонентами крови. Введение ионогенных или ПЭГ-заместителей в структуру молекулы обеспечивает растворимость в водной среде, устойчивость к агрегации и потенциал к активной или пассивной адресной доставке.

Кроме того, объектом исследования выступал сывороточный альбумин — основной транспортный белок крови человека, широко используемый в качестве

модели биомолекулярной среды. Его изучение позволило оценить стабильность и взаимодействие наночастиц фотосенсибилизаторов в условиях, приближённых к физиологическим, а также определить перспективность конкретных образцов для последующего применения в биомедицинских целях.

Таким образом, в данной главе обоснован выбор исследуемых объектов и их соответствие современным требованиям к фотосенсибилизаторам третьего поколения, что создает основу для последующего экспериментального изучения их стабильности, взаимодействия с белками и параметров наноразмерности.

Глава 3. Основы методов измерений

Глава посвящена теоретическим основам и принципам оптических методов, применяемых для анализа наночастиц фотосенсибилизаторов в растворах. Особое внимание уделяется методу динамического светорассеяния, спектрофотометрии и флуориметрии — совокупности инструментальных подходов, обеспечивающих комплексное описание коллоидных систем, включая определение гидродинамических радиусов наночастиц, стабильности образцов, а также характера и кинетики их взаимодействия с биомолекулами. Эти методы основаны на фундаментальных представлениях о броуновском движении, поглощении и испускании света, а также об изменении спектральных характеристик в зависимости от молекулярной среды, что делает их высокоинформативными при исследовании свойств современных фотосенсибилизаторов третьего поколения.

3.1. Метод динамического светорассеяния

Для измерения гидродинамических радиусов (R_h) наночастиц использовался метод динамического рассеяния света (ДРС). Данный метод позволяет определить коэффициент диффузии дисперсных частиц в жидкости путем анализа корреляционной функции флуктуаций интенсивности рассеянного света.

Гидродинамический радиус рассчитывается по формуле Стокса-Эйнштейна, которая связывает R_h частиц с их коэффициентом диффузии и вязкостью жидкости.

В качестве примера рассмотрим диффузию монодисперсных частиц, диспергированных в жидкости. Хаотическое броуновское движение дисперсных частиц приводит к микроскопическим флуктуациям их локальной концентрации и соответствующим локальным неоднородностям показателя преломления среды. При прохождении лазерного луча через такую среду часть света будет рассеяна на этих неоднородностях. Флуктуации интенсивности рассеянного света будут соответствовать флуктуациям локальной концентрации дисперсных частиц.

Информация о коэффициенте диффузии частиц содержится в зависящей от времени корреляционной функции флуктуаций интенсивности. Временная автокорреляционная функция согласно определению, имеет следующий вид:

$$G(\tau) = \langle I(0)I(t - \tau) \rangle = \lim_{t_m \rightarrow \infty} \frac{1}{t_m} \int_0^{t_m} I(t)I(t - \tau) dt \quad (1)$$

где интенсивность I имеет различные значения во времени t и $(t - \tau)$. t_m - это время интегрирования (время накопления корреляционной функции). Очевидно, что при $\tau = 0$, автокорреляционная функция равна среднеквадратичной интенсивности рассеяния $\langle I^2 \rangle$.

В соответствии с гипотезой Онзагера, релаксация микроскопических флуктуаций концентрации к равновесному состоянию может быть описана первым законом Фика (уравнением диффузии):

$$\frac{\partial c(\mathbf{r}, t)}{\partial t} \quad (2)$$

где $c(\mathbf{r}, t)$ - концентрация и D - коэффициент диффузии частиц. Можно показать, что в такой системе автокорреляционная функция интенсивности рассеяния света экспоненциально затухает во времени, и характерное время релаксации однозначно связано с D . Корреляционная функция интенсивности рассеянного света (для случая квадратичного детектирования) имеет вид:

$$G(\tau) = a \exp\left(\frac{-2\tau}{t_c}\right) + b \quad (3)$$

где в соответствии с решением уравнения диффузии обратное время корреляции равно:

$$\frac{1}{t_c} \quad (4)$$

Волновой вектор флуктуаций концентрации описывается выражением:

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (5)$$

В выражениях 4-6: a и b – экспериментальные константы, n – показатель преломления жидкости, в которой взвешены дисперсные частицы, λ – длина волны лазерного света и θ – угол рассеяния.

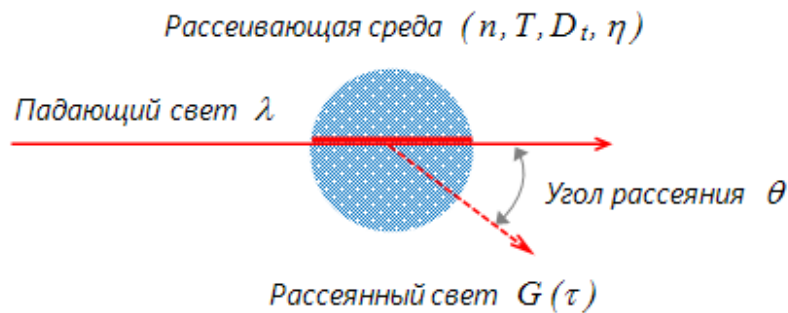


Рисунок 15.1 – Схема процесса рассеяния света.

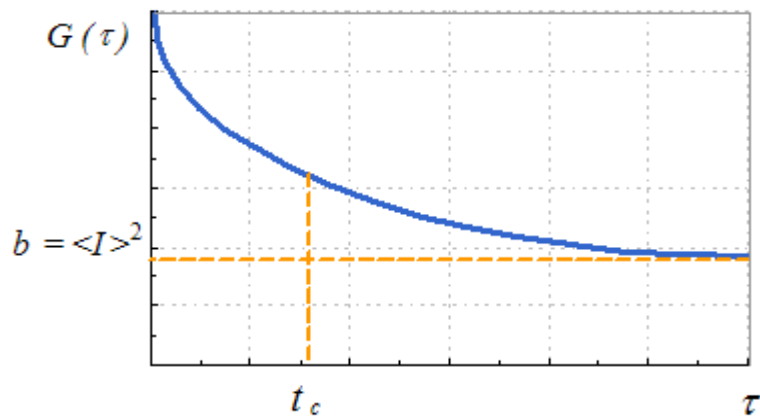


Рисунок 15.2 – Автокорреляционная функция рассеянного света.

Величины t_c , a и b могут быть найдены путем аппроксимации измеренной корреляционной функции теоретической экспоненциальной функцией. Для сферических невзаимодействующих между собой частиц, их средний гидродинамический радиус может быть рассчитан с использованием формулы Стокса-Эйнштейна:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta R} \quad (6)$$

где k_B - константа Больцмана, T - абсолютная температура и η - сдвиговая вязкость среды, в которой взвешены частицы радиуса R_h [90].

Процесс измерения гидродинамического радиуса частиц

Образец с исследуемым раствором помещается в кюветное отделение анализатора. Свет от лазера, проходя через раствор, рассеивается на полимерных молекулах или дисперсных частицах, имеющих в растворе. Рассеянный свет принимается системой счета фотонов, сигнал с выхода которой подается на вход коррелятора. Коррелятор накапливает корреляционную функцию флуктуаций интенсивности рассеянного света.

Результатом измерений является корреляционная функция второго порядка – корреляционная функция флуктуаций интенсивности рассеянного света. Для расчета характерного времени релаксации флуктуаций и последующего вычисления коэффициента диффузии и R_h частиц необходимо найти исходную корреляционную функцию первого порядка, т.е. решить обратную задачу рассеяния.

Решение обратной задачи тривиально лишь для монодисперсного случая, когда рассеяние света происходило на частицах только одного размера. В случае полидисперсного распределения частиц по размерам обратная задача становится некорректной.

Некорректные задачи имеют неединственное и неустойчивое решение. Эта неустойчивость имеет место по отношению даже к малым входным возмущениям, к малым ошибкам измерения. Незначительные ошибки в измерении корреляционной функции могут приводить к различным результирующим распределениям. Для решения таких задач используются специальные методы регуляризации [40].

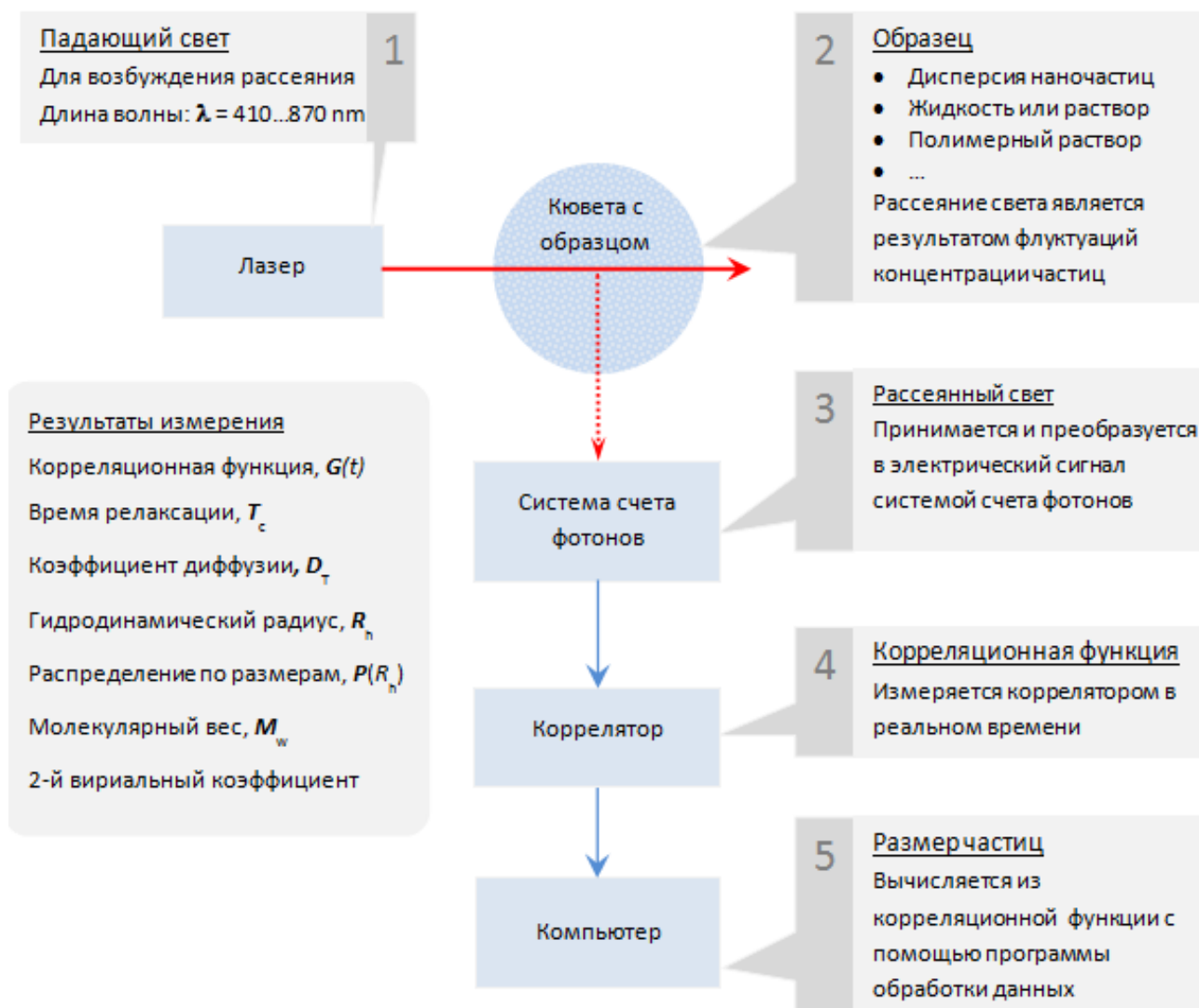


Рисунок 15.3 – Схема процесса измерения R_h частиц

3.2. Спектрофотометрия и флуориметрия

Существует множество физических методов, применяемых для изучения динамики молекулярных частиц и их комплексов в растворах. К числу таких методов относятся ультразвуковая спектрофотометрия, ядерный магнитный резонанс, рассеяние медленных нейтронов, спектрофотометрия диэлектрической релаксации, рэлеевское и комбинационное рассеяние света, а также люминесцентная спектрофотометрия. Они предоставляют ценные сведения о взаимодействиях и движениях молекул в конденсированных средах.

Люминесцентные методы исследования получили широкое распространение в химии, биологии, медицине и технике благодаря своей высокой чувствительности и уникальным возможностям изучения структуры и свойств сложных химических и биологических систем. К данной группе методов относятся исследования, основанные на явлениях флуоресценции и фосфоресценции. Наиболее широко люминесцентные методы применяются для анализа и мониторинга протекания химических и биохимических реакций, а также для кинетического изучения быстрых процессов, связанных с электронно-возбужденными молекулами.

В аналитической практике люминесценция используется для идентификации веществ, обнаружения их низких концентраций, а также контроля изменений, происходящих с веществами. Высокая чувствительность данного метода позволяет регистрировать даже незначительные преобразования веществ. В ряде случаев по люминесценции промежуточных состояний возможно восстановление механизма химической реакции. Кроме того, люминесцентные методы активно применяются для исследования структуры белков с использованием флуоресцентных меток и зондов.

Флуоресцентная спектроскопия — эффективный метод исследования динамических процессов в растворах, с учетом времени жизни возбужденных

состояний. Абсорбционная спектроскопия может дать информацию только об усредненных характеристиках основного состояния молекул, поглотивших свет. Поскольку только те молекулы растворителя, которые непосредственно соседствуют с поглощающими частицами, будут влиять на их спектр поглощения, абсорбционная спектроскопия может дать информацию лишь о некоторой средней сольватной оболочке растворителя, соседствующей с хромофором, и не отражает молекулярную динамику. В отличие от других методов, параметры флуоресцентной спектроскопии являются чувствительными к совокупности процессов, происходящих в течение времени жизни возбужденного состояния, при этом участие в этих процессах могут принимать молекулы, находящиеся на расстояниях до 100 Å от флуорофора в момент возбуждения. Несмотря на то, что продолжительность жизни возбуждённого состояния порядка 10 нс может казаться короткой, данное время значительно превышает временные масштабы диффузионного движения малых молекул в жидком растворе. Аналогично, вращательная диффузия флуорофоров, связанных с белками и мембранами, также происходит в пределах этого временного интервала.

Метод поляризованной флуоресценции базируется на измерении различных компонент интенсивности излучения биологических жидкостей, в частности растворов белков. Флуоресцентный анализ характеризуется высокой простотой выполнения, универсальностью, а также сравнительно высокой чувствительностью и точностью, что обеспечивает его широкое применение в биохимических исследованиях.

Данный метод относится к разряду «неразрушающих» исследований и предполагает проведение оптической биопсии исследуемой ткани или клетки, объем которой определяется характеристиками используемых оптических систем и, как правило, составляет величину порядка λ^3 [91]. В контексте изучения фотосенсибилизаторов в водных растворах с белком крови — альбумином — данный подход обеспечивает высокую точность и локализованность измерений

без нарушения структуры биологического образца. Из-за сложности составов реальных физических объектов, различий в составе и характеристиках отдельных проб, с помощью оптических методов зачастую удается получить качественную информацию о составе вещества. Поэтому наиболее эффективным является использование методов лазерной спектроскопии для анализа искусственно приготовленных проб, исследуя которые можно делать выводы о процессах, происходящих в живых организмах.

Флуоресцентный метод анализа характеризуется также повышенным отношением сигнала к шуму и пропорциональностью сигнала флуоресценции концентрации исследуемого вещества при малой интенсивности флуоресценции. Флуоресценция характеризуется рядом параметров, изменение которых несет определенную информацию о структуре объекта, причем эти данные могут взаимодополнять друг друга. Это — интенсивность флуоресценции, измеренная на определенной длине волны $F(\lambda_0)$; спектр испускания $F(\lambda_{\text{изл}})$ — зависимость интенсивности флуоресценции от длины волны испускания при возбуждении на постоянной длине волны $\lambda_{\text{возб}} = \text{const}$; спектр возбуждения $F(\lambda_{\text{возб}})$ — при фиксированном излучении $\lambda_{\text{изл}} = \text{const}$; квантовый выход флуоресценции Θ — отношение числа излучаемых квантов к числу поглощенных за то же время; время затухания флуоресценции $\tau_{\text{фл}}$; поляризация P и анизотропия r флуоресценции, несущие информацию о статических и динамических параметрах молекул исследуемых растворов.

Спектрофлуориметрия

Спектрофлуориметрия относится к оптическим методам анализа, основанным на регистрации излучения, возникающего при переходе молекулы из возбуждённого электронного состояния в основное. Этот процесс, называемый фотолюминесценцией, реализуется после поглощения света определённой длины волны и сопровождается испусканием фотонов меньшей энергии — флуоресценцией. Энергия излучаемого света (флуоресценции), как правило, ниже,

чем энергия поглощаемого света. В результате полосы поглощения и излучения часто выглядят как изображение или зеркальное отражение (рисунок 16) [92].

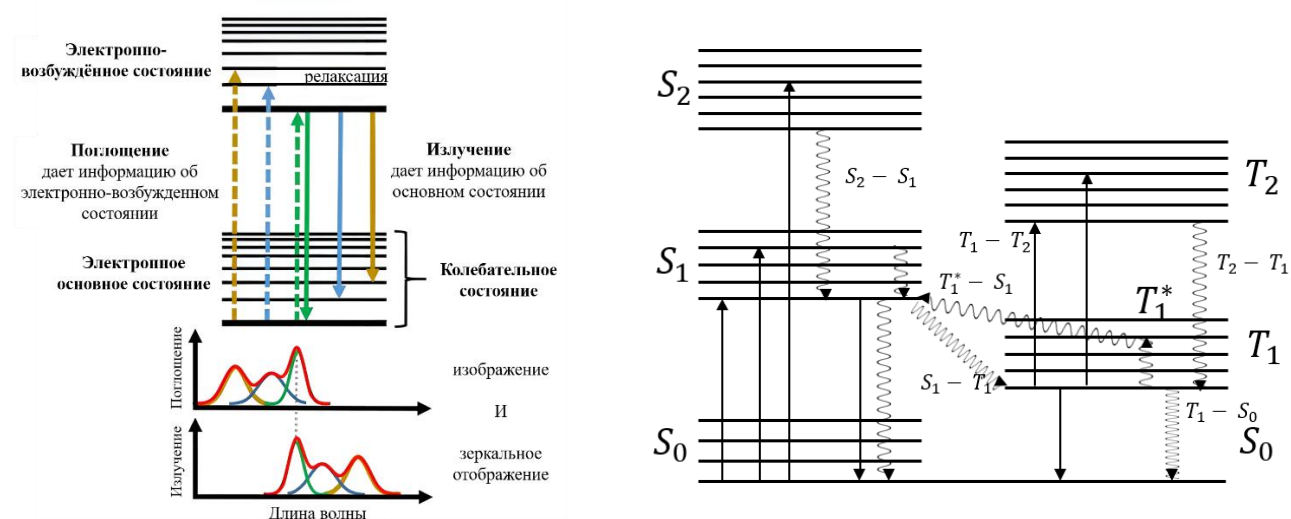


Рисунок 16 – Процессы, происходящие в молекуле при фотолюминесценции (упрощенная схема и диаграмма Яблонского)

Симметричная порода этих спектров определяется тем, что поглощение и испускание обусловлены одними и теми же переходами, а также сходством колебательных энергетических уровней состояний. Согласно принципу Франка-Кондона, все электронные переходы происходят без изменения межъядерного расстояния [93]. В результате, если данная вероятность перехода между нулевым и вторым колебательными уровнями максимальна при поглощении, соответствующий переход наиболее вероятен также и в испускании.

Существует, однако, множество исключений. Отклонения от правила зеркальной симметрии обычно указывают на различное геометрическое расположение ядер в основном и возбужденном состояниях. Смещение ядер может произойти до процесса испускания из-за относительно большого времени жизни состояния S_1 . Иногда наблюдается по две полосы испускания, например, при высоких концентрациях акцепторов протонов.

Фотолюминесценция представляет собой частный случай люминесценции — общего класса явлений, при которых система испускает свет при переходе с

более высокого энергетического уровня на более низкий. Возбуждение может происходить под действием света (фотолюминесценция), электричества (электролюминесценция), радиоактивного излучения (радиолюминесценция) или химических реакций (хемилюминесценция).

При облучении молекулы электромагнитным излучением различной энергии возможны различные процессы возбуждения: вращательные (при микроволновом излучении), колебательные (ИК и ближний ИК диапазон), и электронные (в видимом и УФ диапазоне). Каждый тип соединений имеет специфическое энергетическое «окно» между основным и возбуждённым состояниями, определяющее его спектры поглощения и эмиссии.

После возбуждения молекула может либо передать энергию окружению (например, через столкновения с растворителем), либо вернуться в основное состояние с испусканием света — флуоресценцией. Это излучение обычно имеет меньшую энергию по сравнению с поглощённой, что объясняется сдвигом Стокса — разницей между максимумом полос поглощения и эмиссии (рисунок 17):

$$\Delta\nu_{\text{Стокс}} = \nu_{\text{в}} - \nu_{\text{фл}} = \left(\frac{1}{\lambda_{\text{в}}} - \frac{1}{\lambda_{\text{фл}}} \right), \quad (7)$$

где $\lambda_{\text{в}}$ — соответствует максимуму в спектре возбуждения; $\lambda_{\text{фл}}$ — максимум в спектре флуоресценции.

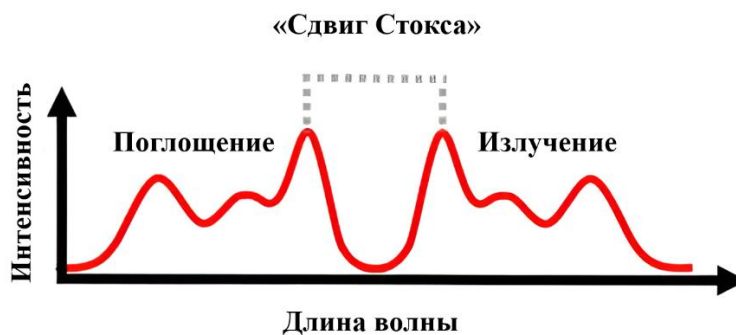


Рисунок 17 – Иллюстрация «смещения Стокса», характеризующая разницу в энергии между поглощением и излучением.

Флуоресцентный сигнал зависит от количества молекул в возбуждённом состоянии и квантового выхода флуоресценции ϕ . Последний отражает вероятность того, что поглощённый фотон приведёт к испусканию нового фотона. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации вещества описывается уравнением: $F = \phi \cdot I_0 \cdot (1 - 10^{-\varepsilon \cdot l \cdot c})$

, где I_0 — интенсивность возбуждающего света, ε — коэффициент экстинкции, l — длина кюветы, c — концентрация [93].

В настоящей работе метод флуориметрии применялся для исследования взаимодействия наночастиц фотосенсибилизаторов с сывороточным альбумином. Наблюдались изменения интенсивности флуоресценции при добавлении белка, что интерпретировалось как процесс тушения или разгорания сигнала. Это позволяло строить графики $\log [(F_0 - F)/F]$ в зависимости от $\log [Q]$, где F_0 — начальная флуоресценция, F — наблюдаемая, Q — концентрация альбумина. Линейная аппроксимация таких графиков позволила определить константу связывания и число сайтов связывания (binding site) для отдельных наночастиц.

Переход возбуждения сывороточного альбумина (максимум около 280 нм) не входил в диапазон возбуждения наночастиц (650–700 нм), что исключает вклад белка в регистрируемую флуоресценцию. Соответственно, изменения сигнала напрямую отражают поведение ФС в растворе и взаимодействие с белком.

Спектрофотометрия

Метод ультрафиолетово-видимой (UV-Vis) спектроскопии основан на способности веществ поглощать электромагнитное излучение, соответствующем переходам электронов на более высокие энергетические уровни в ультрафиолетовом (200—400 нм), видимом (400—760 нм) и инфракрасном (>760 нм) областях спектра. Поглощение происходит, если энергия фотона соответствует разности между энергетическими уровнями молекулы, что позволяет идентифицировать и количественно оценить соединения.

Поглощение света измеряется как абсорбция (A), которая рассчитывается по уравнению Бугера–Ламберта–Бера:

$$A = \lg\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon * c * L, \quad (8)$$

где A – оптическая плотность (абсорбция), I_0 – интенсивность падающего света, I – интенсивность прошедшего света, ε – молярный коэффициент экстинкции ($\text{л} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$), c — концентрация вещества (моль/л), L — длина оптического пути (см).

Измерение выполняется в кюветах из кварцевого стекла, обеспечивающих прозрачность в UV-области. Полученные спектры позволяют определить длину волны максимального поглощения (λ_{max}), связанную с типом электронной конфигурации молекулы. Важно учитывать влияние полярности растворителя, pH среды и наличие электролитов, которые могут исказить форму спектра. При этом анализ обычно проводится в разбавленных растворах, при которых линейность закона Бера сохраняется.

Используемый в работе спектрофотометр Hitachi U-2900/2910 имеет двулучевую оптическую схему (рисунок 21), в которой пучок света от источника делится полупрозрачным зеркалом на два канала — исследуемый и референсный. Оба сигнала попадают на фотодетекторы, и измерение проводится относительно эталонного луча, что позволяет автоматически компенсировать нестабильность источника света и повышает долговременную воспроизводимость результатов. Это позволяет компенсировать флуктуации интенсивности излучения источника, обеспечивая высокую стабильность измерений в течение длительного времени. Такой подход принципиально отличает его от однолучевых систем.

3.3. Учёт влияния артефактного пика

В число факторов, искажающих результаты, полученные методом ДРС, таких как пыль, нестабильность лазерного излучения и т.п., входит появление артефактного пика в распределения частиц по размерам при исследовании сильно разбавленных сред. Данная особенность становится существенной, когда появляется необходимость исследования взвесей малых концентраций, а также полидисперсных взвесей.

Метод ДРС применяется для определения R_h частиц в растворах, в общем случае в полидисперсных системах, поэтому выявление артефактного пика, которому не соответствуют никакие реально существующие в растворе частицы – важная задача, особенно при определении соотношения концентраций частиц различных размеров.

Статистика поля рассеянного света оказывается Гауссовой, когда в объеме рассеяния имеется много частиц. Объем рассеяния — это область пространства, где пересекаются поле зрения фотоумножителя и луч лазера. Точность результатов определения гидродинамического радиуса частиц зависит от числа частиц N , находящихся в объеме рассеяния или концентрации исследуемого объекта. В статье [41] было показано, что при изучения латексных частиц ($N < 100$ частиц) в распределении частиц по R_h появляется артефактный пик со значениями $r_p = (0.1 - 1)$ мкм, хотя частиц такого размера в исследуемом растворе не существует (рисунок 18). Появление этого пика приводит к смещению остальных пиков распределения по гидродинамическим радиусам частиц в сторону уменьшения R_h . Аналогичный артефактный пик наблюдался также в распределении по размерам комплексов белков плазмы крови [42], а также в распределении по размерам наночастиц ФС, полученных в данной работе. С целью уменьшения влияния артефактного пика на достоверность сравнительно анализа по гидродинамическим радиусам одних и тех же образцов с различными мольными отношениями ФС-ПВП, в настоящей работе было проведено

определение средних гидродинамических радиусов наночастиц как при одинаковой интенсивности рассеянного света, так и при максимально оптимальной интенсивности для отдельно взятого образца.

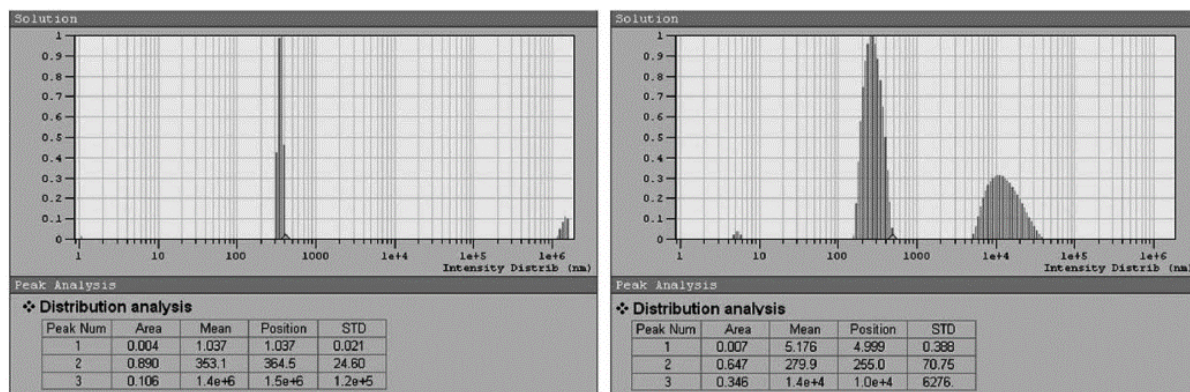


Рисунок 18 – Примеры распределения гидродинамического радиуса частиц взвеси латекса радиуса $R = 375$ нм в воде. Слева для $N \sim 620$ частиц в объеме рассеяния, справа - для $N \sim 80$ частиц [41].

3.4. Выводы к Главе 3

В третьей главе были рассмотрены теоретические основы и практические особенности основных методов измерений, применяемых в данной работе для исследования фотосенсибилизаторов в наноформе. Показано, что метод динамического светорассеяния является высокочувствительным инструментом для определения гидродинамического радиуса наночастиц в условиях, близких к физиологическим. Его применимость охватывает широкий диапазон размеров и типов частиц, включая как коллоидные мицеллы, так и белковые комплексы.

Методы спектрофотометрии и флуориметрии, в свою очередь, обеспечивают качественное и количественное определение взаимодействия фотосенсибилизаторов с белками, а также позволяют отслеживать изменения в структуре или состоянии вещества по спектральным характеристикам. Использование флуоресценции особенно важно для оценки процессов ассоциации и диссоциации в растворе, а также для анализа кинетики взаимодействия в реальном времени.

Таким образом, представленный набор методов составляет достаточный и взаимодополняющий инструментарий для комплексного анализа структуры, стабильности и поведения наночастиц фотосенсибилизаторов третьего поколения в водных и биомолекулярных средах.

В завершении главы, представлена универсальная методика *in vitro*-анализа, основанная на последовательном применении оптических методов — динамического рассеяния света, спектрофотометрии и спектрофлуориметрии. Разработанный подход обеспечивает необходимый и достаточный инструментарий для комплексного исследования наночастиц фотосенсибилизаторов, их стабильности и взаимодействий с сывороточным альбумином крови. Методика представляет собой исследовательскую основу для отбора и валидации перспективных фотосенсибилизаторов третьего поколения (рисунок 18.1).

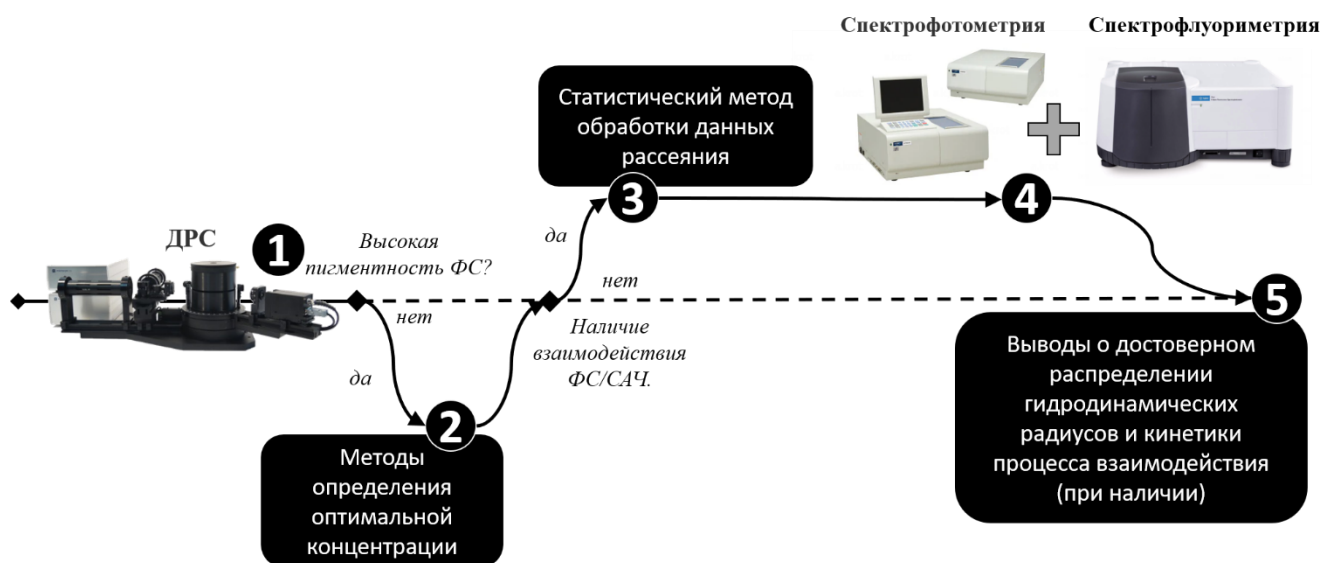


Рисунок 18.1 – Схема последовательного применения оптических методов исследования для определения основных параметров фоточувствительных нанообъектов.

Глава 4. Наночастицы на основе гидрофобных фотосенсибилизаторов и амфифильного полимера:

IB-25, PT-5, PT-1, VP-6

Основные результаты данной главы представлены в статьях [A3 – A5].

4.1. Описание экспериментальных установок

Многоугловой анализатор размеров частиц Photocor Complex.

Исследования проводились на оптической установке «Photocor-Complex» (таблица 1), с диодным лазером длины волны 647 нм и мощностью 25 мВт. Прибор собран по схеме спектрометра ДРС, предназначенного для многоугловых измерений ДРС и измерения R_h наночастиц (рисунок 19).

Диапазон измерения	Д частиц: 0.5 нм – 10 мкм
Типичная погрешность измерения	$\pm 1\%$
Объем образца	От 50 мкл до 10 мл
Углы рассеяния	$10^\circ \dots 150^\circ$, погрешность 0.01°
Анализ сигналов	Программируемый коррелятор Photocor-FC для авто- и кросскорреляционных измерений. Линейная и логарифмическая (мульти-тау) шкала времени. Минимальное время выборки 10 нс.
Лазер	Термостабилизированный полупроводниковый лазер: 647 нм (красный) или 455 нм (синий); Мощность: 25 мВт
Термостат	Диапазон температур: $5^\circ\text{C} - 80^\circ\text{C}$ (термоэлектрический модуль), погрешность 0.1°C

Таблица 1 – Технические характеристики установки Photocor-Complex.

Пучок света попадает на фокусирующий узел и проходит через кювету с исследуемым раствором, рассеянный под углом 90° регистрируется лавинным фотодиодом фирмы «PerkinElmer».

В кювете с исследуемым образцом поддерживалась температура (20°C) при помощи встроенного в прибор термостата. Используется многоканальный (288 каналов) коррелятор, а обработка сигнала производится на компьютере в автоматическом режиме с помощью программы DynaLS, которая позволяет получать результаты в виде значений коэффициента трансляционной диффузии D_t и гидродинамического радиуса R_h [40].

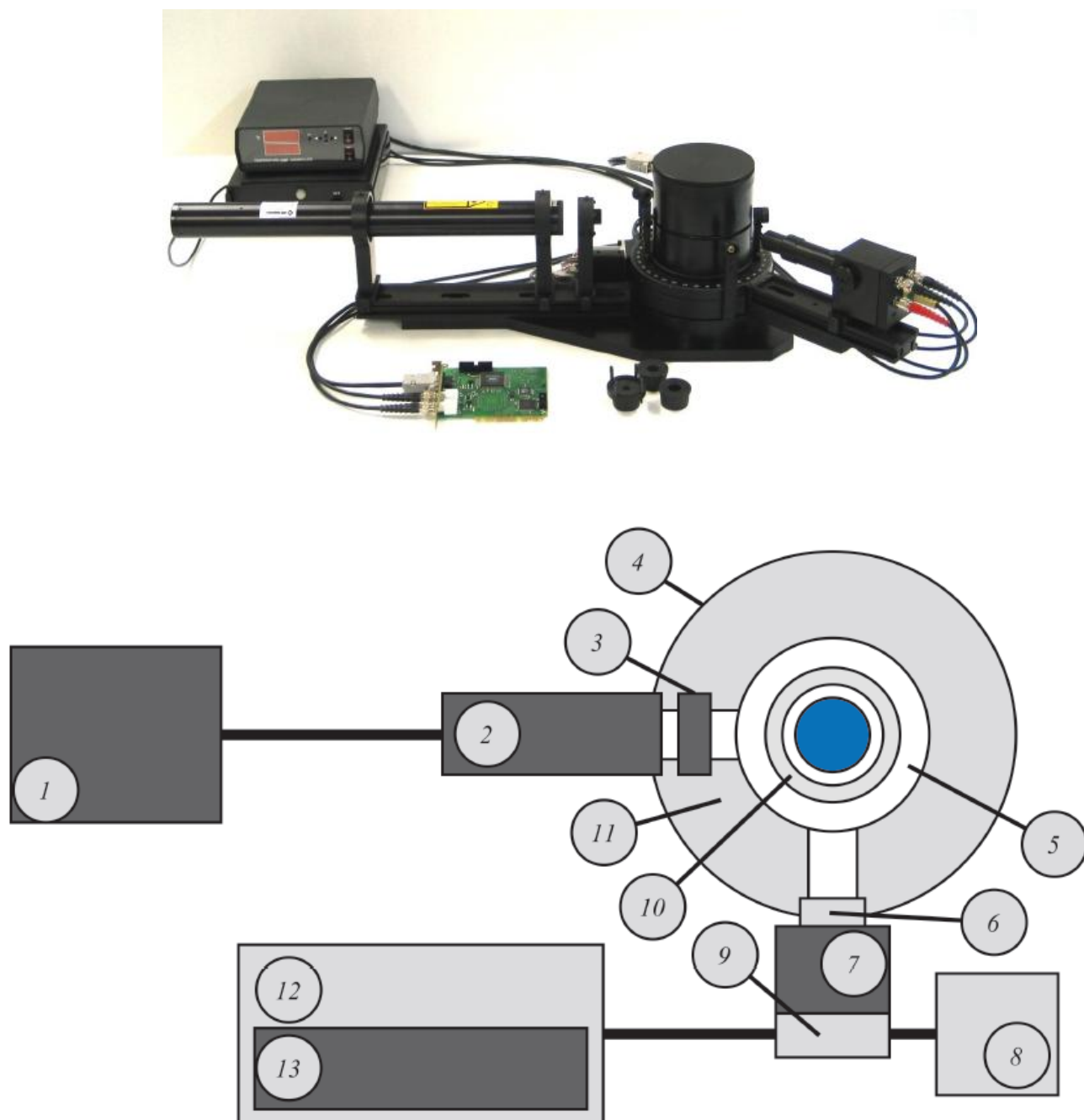


Рисунок 19 – Экспериментальная установка Photocor-Complex и ее схема. Где: 1 — источник питания, 2 — лазер (445 нм или 647 нм), 3 — фокусирующая линза, 4 — адаптер кювет, установленный коаксиально оси гониометра, 5 — консоль гониометра, 6 — приемная оптическая система, 7 — фотоумножитель, работающий в режиме счета фотонов, 8 — специальный высоко-вольтный источник питания ФЭУ без паразитных корреляций, 9 — усилитель-дискриминатор со сквозным по постоянному току трактом, 10 — термостат, 11 — жесткое основание, 12 — персональный компьютер, 13 — коррелятор, подключенный непосредственно к персональному компьютеру.

Флуоресцентный спектрометр Cary Eclipse

Исследования проводились на спектрофлуориметре Cary Eclipse (Agilent Technologies), предназначенном для регистрации флуоресцентного излучения в широком диапазоне длин волн с высокой чувствительностью и спектральным разрешением (рисунок 20). Прибор реализует ортогональную геометрию измерений (угол между возбуждением и эмиссией — 90°), что позволяет эффективно подавлять фоновое возбуждающее излучение и минимизировать рассеяние.



Рисунок 20 – Экспериментальная установка флуоресцентного спектрометра «Cary Eclipse» и ее оптическая схема [95]

Оптический диапазон	от 190 до 1100 нм – конструктивный, 200 – 900 нм рабочий
Спектральная точность	± 1.5 нм
Ширина щели	Возбуждение: 1,5 нм; 2,5 нм; 5 нм; 10 нм; 20 нм и круглая 10 нм. Эмиссия: 1,5 нм; 2,5 нм; 5 нм; 10 нм; 20 нм и круглая 10 нм, при использовании горизонтальной щели минимальный объем образца 0,5 мл в стандартной 10 мм кювете
Длина волны	$\pm 0,2$ нм
Монохроматор	Конструкция Черни-Тернера 0,125 м, дифракционные решетки 30×35 мм, 1200 линий/мм
Источник света	Импульсная ксеноновая лампа. Частота импульсов 80

	Гц. Ширина импульса на полувисоте 2 мкс, пиковая мощность 75 кВт
Детектор	Высокоэффективный ФЭУ R928. Один на весь диапазон. Отдельный ФЭУ R928 для опорного сигнала.
Скорость сканирования	0,01–24000 нм/мин (400 нм/сек)

Таблица 2 – Основные технические характеристики установки Cary Eclipse (Agilent Technologies).

В качестве источника возбуждающего света используется импульсная ксеноновая лампа, генерирующая широкий непрерывный спектр в диапазоне 190–900 нм. Импульсный режим работы (вспышки длительностью около 2–3 мкс) позволяет реализовать высокое отношение сигнал/шум при минимальном фотоповреждении образца и низком тепловом вкладе. Излучение лампы направляется в возбуждающий монохроматор, собранный по схеме Черни–Тернера. Он включает: входную щель, сферическое зеркало, выпуклую дифракционную решётку с плотностью 1200 линий/мм, отражающее зеркало и выходную щель, что обеспечивает дисперсию и выбор длины волны возбуждения с высокой точностью и стабильностью. Конструкция Черни–Тернера позволяет эффективно управлять «паразитной» засветкой и добиваться спектрального разрешения порядка 1–2 нм. Из монохроматора возбуждающий свет направляется в кюветный отсек, где проходит через исследуемый образец, помещённый в стандартную кварцевую кювету с оптическим путём 10 мм.

Излучение, испускаемое молекулами образца в процессе флуоресценции, регистрируется под углом 90° к направлению возбуждающего пучка, что позволяет минимизировать фоновое излучение и светорассеяние.

Флуоресцентный свет сначала попадает на эмиссионный монохроматор, аналогичной конструкции Черни–Тернера, который позволяет выбрать нужную длину волны регистрации (λ_{em}). После выхода из монохроматора излучение фиксируется фотоумножителем (PMT) — чувствительным детектором,

способным регистрировать низкоинтенсивные сигналы с высокой временной и фотонной чувствительностью.

Управление системой и обработка данных осуществляются с помощью программного обеспечения Cary Eclipse Scan Application, позволяющего выполнять: спектральные сканирования возбуждения и эмиссии, кинетические исследования, спектры квантового выхода, коррекцию фона, автоматическую калибровку и контроль параметров (сила света, температура, сдвиги и др.).

Встроенный термостатический блок позволяет поддерживать температуру образца с высокой точностью (обычно ± 0.1 °C), что особенно важно при изучении термочувствительных соединений или биомолекул.

Спектрофотометр HITACHI U-2900

Исследования проводились на двухлучевом спектрофотометре Hitachi U-2900, предназначенном для регистрации спектров поглощения в ультрафиолетовой и видимой (UV-Vis) области. Прибор обеспечивает высокую спектральную точность и устойчивость за счёт использования референсного канала и широкого набора оптических компонентов. Оптическая схема прибора представлена на рисунке 21.

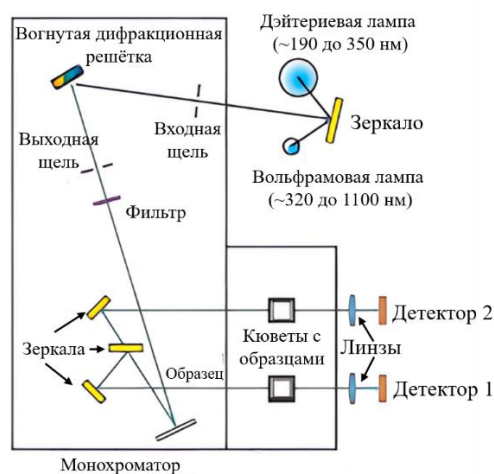


Рисунок 21 – Экспериментальная установка спектрофотометра «HITACHI U-2900» и ее оптическая схема [94]

Оптическая схема	двухлучевая схема Сейя-Намиока
Дифракционная решетка	параболическая с механическим нанесением штрихов
Источник света	дейтериевая и вольфрамовая лампы
Детектор	кремниевые фотодиоды
Спектральный диапазон	от 190 до 1100 нм
Ширина щели	1,5 нм
Уровень рассеянного излучения	менее 0.05% (220 нм NaI.340 нм NaNO ₂)
Погрешность по шкале длин волн	± 0.3 нм (весь диапазон)
Воспроизводимость по шкале длин волн	± 0.1 нм

Таблица 3 – Основные технические характеристики установки «HITACHI U-2900» [94].

В спектрофотометре реализовано два источника излучения: дейтериевая лампа — для УФ-области (190–360 нм) и вольфрамовая лампа накаливания — для видимой области (360–1100 нм). Переключение между источниками осуществляется автоматически в зависимости от заданной длины волны. Свет от источников направляется в оптическую систему, включающую входную щель и конденсорную линзу, после чего попадает на дифракционную решётку, установленную в монохроматоре.

Спектральное разложение света осуществляется при помощи конкавной (вогнутой) дифракционной решётки, выполненной по схеме Черни–Тернера, сочетающей: входную щель, отражающие зеркала, вогнутую дифракционную решётку и выходную щель.

Такая конструкция позволяет эффективно разложить белый свет на спектр с минимальными aberrациями и высокой спектральной разрешающей способностью (~ 1.5 нм), а также обеспечивает компактность и стабильность оптической схемы.

Световой пучок после прохождения монохроматора разделяется на измерительный и референсный. Это реализуется с помощью вращающегося галогенного зеркала, которое попеременно направляет свет на кювету с образцом и кювету с опорным раствором. Такое чередование лучей позволяет проводить относительные измерения с компенсацией флуктуаций интенсивности источника и «дрейфа» прибора.

Оба пучка проходят через свои кюветы, после чего фокусируются оптической системой на фотодиодный детектор. Прибор регистрирует интенсивность исходного излучения (I_0) и интенсивность прошедшего через образец (I_t), вычисляя по ним коэффициент пропускания или оптическую плотность по формуле (8). Сигналы от обоих каналов регистрируются с помощью кремниевого фотодиода, отличающегося высокой чувствительностью в диапазоне 190–1100 нм и низким уровнем шумов. Высокая стабильность базовой линии и возможность работы с малыми объёмами обеспечивают надёжность количественного анализа.

Управление прибором осуществляется через ПК с использованием программного обеспечения UV Solutions, предоставляющего функции: спектрального сканирования (по длинам волн), кинетических измерений (по времени), калибровок и построения градуировочных кривых, расчёта концентраций, оптической плотности и пр. Температура образца при необходимости может контролироваться с помощью внешнего термостатируемого держателя кювет.

4.2. Специфика взаимодействия ПВП с сывороточным альбумином

Все измерения образцов производились в водной среде. Использовалась вода для инъекций (ОАО «Биохимик», $\text{pH} \approx 7.5$). Измерения проводились при температуре 20 °С.

Для измерений по взаимодействию наночастиц с САЧ были подобраны такие концентрации, чтобы вклад в интенсивность рассеянного света, как от САЧ, так и от наночастиц был примерно одинаковым. Наночастицы обладают довольно крупным размером (диаметр порядка 200 нм), а размер САЧ составляет несколько нанометров. Интенсивность света в растворе САЧ с концентрацией 1 мг/мл составляет порядка 7 кГц (при данных параметрах экспериментальной установки), а в растворе наночастиц с концентрацией $0,6 \cdot 10^{-7}$ М – 20 кГц. Таким образом, интенсивность примерно совпадает по порядку, что позволяет прибору разрешить как малые, так и большие компоненты в растворе.

Для исследования взаимодействия наночастиц и САЧ были подготовлены следующие растворы:

- при постоянной концентрации наночастиц и переменной концентрации САЧ: в 5 мл воды для инъекций добавляется 2 мкл исходного образца наночастиц IB-25, при этом концентрация наночастиц в разбавленном растворе составляет $C = 1,2 \cdot 10^{-7}$ М. Затем в полученный разбавленный раствор наночастиц добавляется 20 мкл белка из раствора с концентрацией $c_0 = 50$ мг/мл и шагом 20 мкл. Таким образом, измерения проводятся для концентраций альбумина от 0,2 мг/мл до 1,4 мг/мл с шагом 0,2 мг/мл.
- при постоянной концентрации САЧ и переменной концентрации наночастиц: в 5 мл чистой воды добавляется 100 мкл белка из раствора с концентрацией $c_0 = 50$ мг/мл, при этом концентрация белка в разбавленном растворе составляет 1 мг/мл. Затем в полученный разбавленный раствор САЧ добавляется 1 мкл наночастиц из исходного образца IB-25 с шагом 1 мкл. Таким образом, измерения проводятся для концентраций наночастиц от $0,6 \cdot 10^{-7}$ М до $4,2 \cdot 10^{-7}$ М с шагом от $0,6 \cdot 10^{-7}$ М.

Для измерений по взаимодействию ПВП и САЧ были приготовлены также 2 типа раствора:

- при постоянной концентрации ПВП и переменной концентрации белка: в 5 мкл воды добавляется 200 мкл ПВП из исходного раствора с концентрацией $c_0 = 12,5$ мг/мл. Таким образом, концентрация ПВП в полученном разбавленном растворе составляет 0,5 мг/мл. Затем в разбавленный раствор ПВП добавляется 20 мкл белка из раствора с концентрацией $c_0 = 50$ мг/мл и шагом 20 мкл. Таким образом, измерения проводятся для концентраций альбумина от 0,2 мг/мл до 1,4 мг/мл с шагом 0,2 мг/мл.
- при постоянной концентрации белка и переменной концентрации ПВП: в 5 мл чистой воды добавляется 60 мкл белка из раствора с концентрацией $c_0 = 50$ мг/мл, при этом концентрация белка составляет 0,6 мг/мл. Затем в разбавленный раствор белка добавляется 100 мкл ПВП из исходного раствора с концентрацией $c_0 = 12,5$ мг/мл с шагом 100 мкл. Таким образом, измерения проводятся для концентраций ПВП от 0,25 мг/мл до 2,25 мг/мл с шагом 0,25 мг/мл.

Так как наночастицы ФС в водном растворе покрыты полимером, который позволяет зафиксировать их структуру и улучшает растворимость образцов, то необходимо проверить, возможно ли взаимодействие белков с ПВП. Для этого изначально были проведены измерения для чистого образца ПВП в разбавленном водном растворе. В результате измерения был определен средний гидродинамический радиус ПВП: $7,2 \pm 2,1$ нм. Этот результат отлично согласуется с литературными данными, полученными для аналогичного образца ПВП К-30. В чистом растворе ПВП может присутствовать агрегат ПВП порядка 80 нм, что также подтверждается литературными данными [96].

Устойчивость образца ПВП проверялась при его различных концентрациях в водном растворе. На рис. 22 видно, что средний размер ПВП не изменяется и, следовательно, образец довольно устойчив.

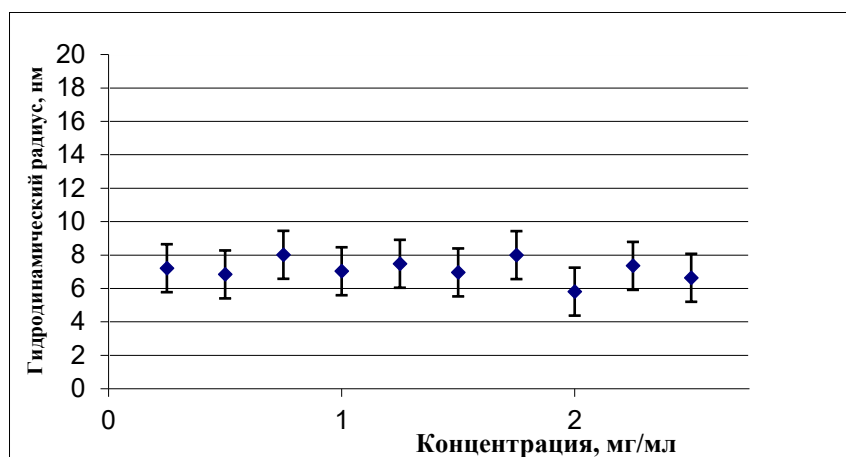


Рисунок 22 – Гидродинамический радиус ПВП в зависимости от его концентрации. В конце измерения pH 6,5

Далее была измерена зависимость гидродинамического радиуса в растворе САЧ и ПВП. При концентрации сывороточного альбумина человека 0,6 мг/мл измерения проводились при различных концентрациях ПВП от 0,25 до 2,25 мг/мл. Рисунок 23 иллюстрирует полученный результат.

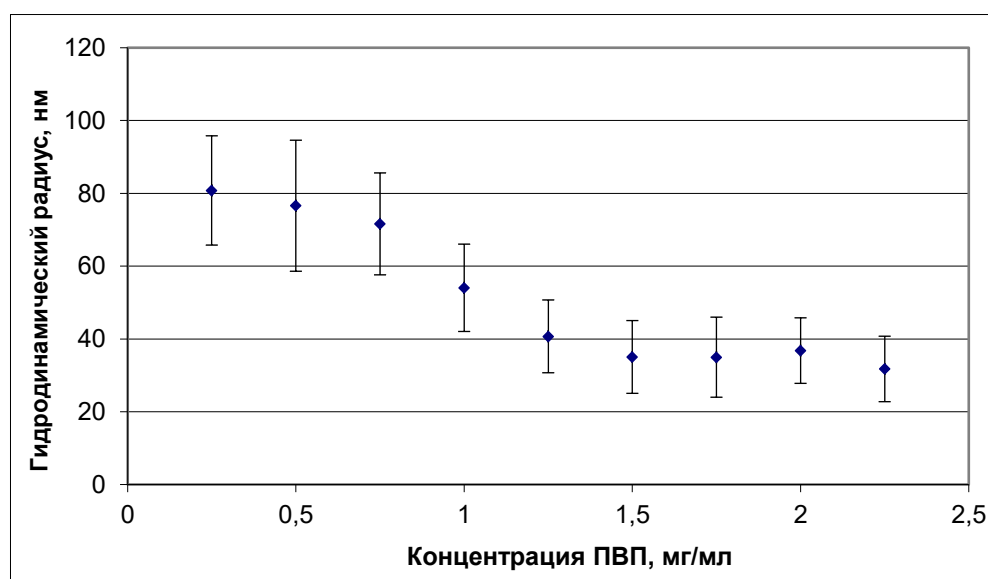


Рисунок 23 – Гидродинамический радиус интрамолекулярных комплексов ПВП и САЧ (концентрация белка 0,6 мг/мл) при увеличении концентрации ПВП.

Данный эффект связан с тем, что с увеличением концентрации ПВП, в растворе формируются комплексы ПВП и белка, причем, когда относительная концентрация ПВП мала в сравнении с концентрацией САЧ, на одну молекулу ПВП приходится большое число свободных молекул САЧ, образуя таким образом агрегаты большего размера. При увеличении концентрации ПВП, на 1 молекулу полимера приходится все меньше число свободных молекул белка и, следовательно, агрегат уменьшается.

Аналогичный результат наблюдался в работе [97]. Было установлено, что в водных растворах при смешивании белка и нейтральных водорастворимых полимеров происходит образование интрамолекулярных комплексов, состоящих из одной полимерной цепи и нескольких связанных белков (рис. 24).

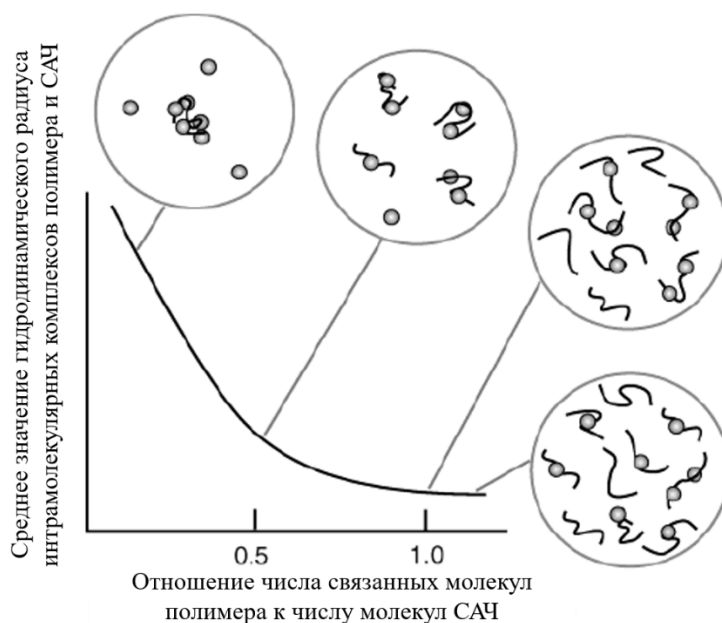


Рисунок 24 – Схематическое представление образования интрамолекулярного комплекса белка с водорастворимым полимером при различных условиях смешивания [97]

В предыдущих исследованиях было показано, что число связанных белков на полимер уменьшается с увеличением концентрации полимера при фиксированной концентрации белка. При высоких значениях отношения числа молекул полимера к числу молекул белка, увеличивается вероятность

взаимодействия между сегментами полимерных цепей (в том числе межмолекулярных), что создает пространственные и стерические препятствия для присоединения дополнительных молекул белка к полимеру. Это приводит к образованию меньшего числа белок-полимерных контактов на одну цепь и, следовательно, к уменьшению гидродинамического радиуса (R_h) комплекса. Дополнительно, снижение отношения числа молекул сопровождается изменением конформации комплекса, который переходит от расширенного состояния (в случае множества связанных белков) к более компактной структуре с меньшими размерами. Такой эффект особенно выражен для комплексов на основе поли(N-изопропилакриламида), где гидрофобные взаимодействия усиливают пространственные ограничения, тогда как в системах с полиэтиленгликолем изменения R_h при изменении отношения числа рассматриваемых молекул выражены значительно слабее, что связано с особенностями химического строения и меньшей склонностью к кооперативным взаимодействиям с белками.

4.3. Исследование взаимодействия сывороточного альбумина с комплексом наночастиц IB-25

На первом этапе исследования охарактеризованы физико-химические свойства наночастиц на основе фталоцианина IB-25 в водной среде, в частности: их гидродинамический радиус, устойчивость к агрегации, а также воспроизводимость результатов во времени. Все измерения образцов производились в водной среде. Использовалась вода для инъекций (ОАО «Биохимик», $pH \approx 7.5$). Динамическое светорассеяние (рисунок 25) выявило наличие основного пика, соответствующего наночастицам с характерным размером порядка 88 ± 15 нм. Второй пик, наблюдаемый на кривых корреляции, является артефактным, возникающий при анализе сильно разбавленных растворов вследствие флуктуаций интенсивности рассеяния. Данное явление было подробно рассмотрено в разделе 3.3. настоящей работы.

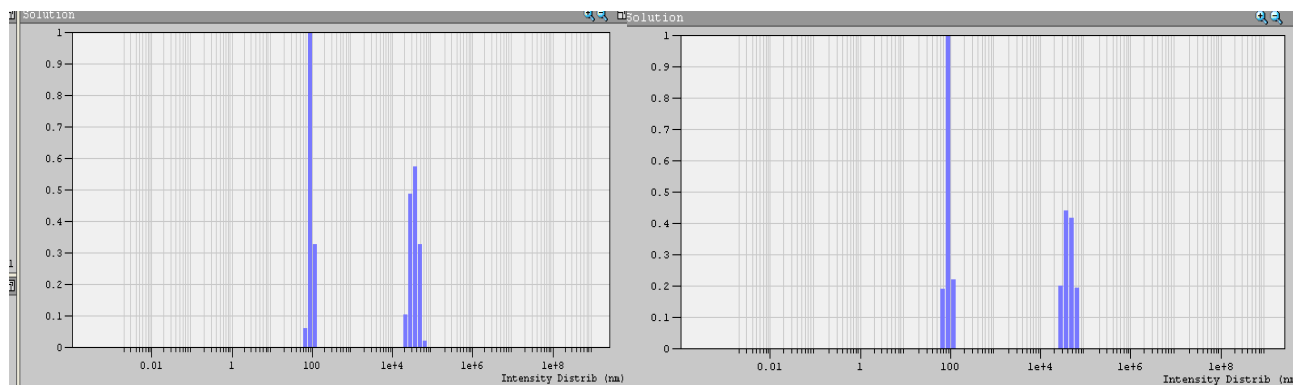


Рисунок 25 – Распределение нормированного вклада интенсивности (относ. ед.) от значений гидродинамического радиуса (нм) в программе DynaLS: сравнение двух измерений образца IB-25 при различном времени измерения. Слева – 50 с, справа – 100с.

Анализ полученных данных показал, что наночастицы демонстрируют стабильное поведение при хранении и измерениях во времени, а также не проявляют выраженной тенденции к агрегации при исследуемых условиях. Это указывает на их коллоидную устойчивость и пригодность для дальнейшего исследования взаимодействия с белковыми компонентами.

Учитывая, что характеристики наночастиц IB-25 в водной среде исследовались впервые, возникла необходимость в подборе оптимальных концентраций для последующего исследования их взаимодействия с сывороточным альбумином, в частности с ЧСА. Основным критерием при выборе условий соотношения концентраций было достижение сопоставимого вклада обоих компонентов — наночастиц и белка — в результирующую систему при спектроскопических и светорассеивающих измерениях. Поскольку наночастицы значительно превышают альбумин по размеру, их концентрация в смешанных растворах была выбрана предельно низкой, в диапазоне $0.6\text{--}1.2 \times 10^{-7}$ М, что позволило избежать перекрытия сигналов и обеспечило достоверность интерпретации результатов по взаимодействию белок–наночастица.

На рисунке 26 представлена средняя интенсивность рассеянного излучения при различных концентрациях белка.

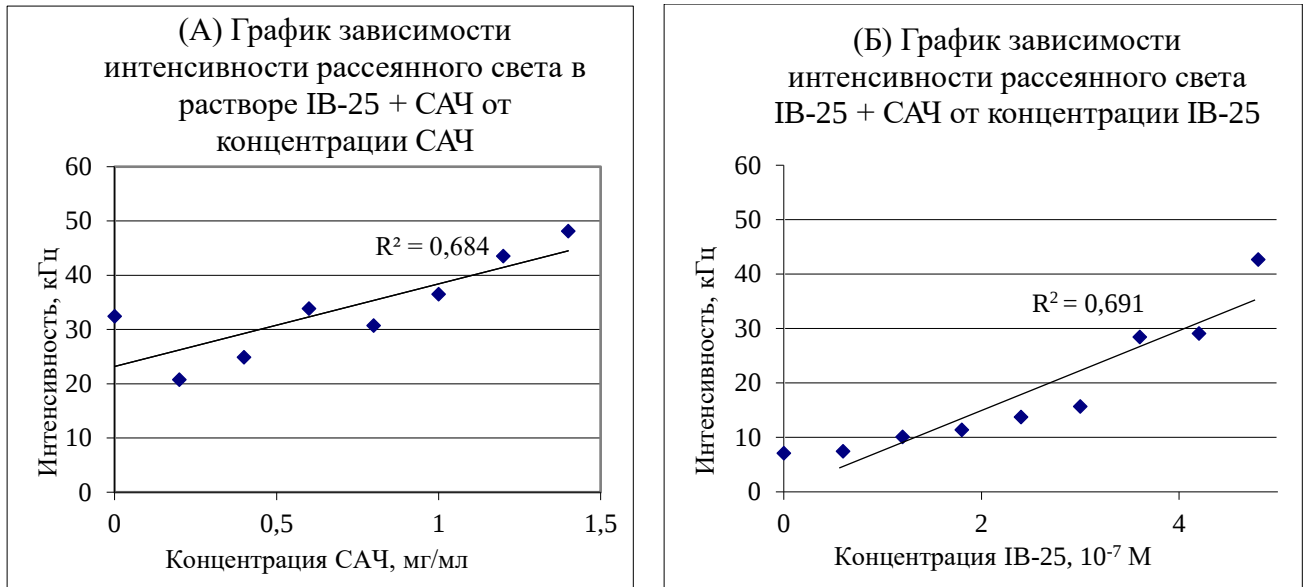


Рисунок 26 – Распределение средней интенсивности рассеянного света в растворах IB-25 и САЧ от концентрации САЧ (А) и IB-25 (Б). R^2 - величина достоверности аппроксимации.

Видно, что с увеличением концентрации интенсивность растет в полном соответствии с теорией релеевского рассеяния [98]. Напомним, что полный вид зависимости интенсивности рассеянного света имеет следующее выражение:

$$I = I_0 \frac{\pi^2 V}{2\lambda^4 L^2} \left(\rho \frac{\partial \varepsilon}{\partial \rho} \right)_T^2 \beta_T kT (1 + \cos^2 \theta), \quad (9)$$

где I_0 – интенсивность падающего света, λ – его длина волны, L – расстояние от рассеивающего объема до точки наблюдения, θ – угол рассеяния между направлением электрического вектора светового поля и направлением распространения рассеянной волны, k – постоянная Больцмана, T – температура, ρ – дипольный момент молекулы, V – рассеивающий объем и ε – диэлектрическая проницаемость. Следствием данной формулы является пропорциональность интенсивности рассеянного света числу молекул в растворе, а также закон Рэлея:

$$I \sim n \quad \text{или} \quad I \sim \frac{1}{\lambda^4} \quad (10)$$

Интенсивность в растворе с чистым белком ($C = 1$ мг/мл) составляет около 7 кГц, интенсивность в растворе с чистыми наночастицами ($C = 0,6 \cdot 10^{-7}$ М) составляет около 30 кГц. При добавлении наночастиц интенсивность увеличивается сильнее, так как средний гидродинамический радиус наночастиц IB-25 значительно превышает размеры САЧ.

После проведения серии предварительных измерений, направленных на характеристику наночастиц, были изучены их водные растворы в присутствии человеческого сывороточного альбумина. Эксперименты проводились при варьировании концентрации белка, а также концентрации наночастиц, с целью выявления возможных межмолекулярных взаимодействий между компонентами.

Результаты динамического светорассеяния представлены на рисунке 27, где красными маркерами обозначены измерения для растворов САЧ, а синими — для наночастиц IB-25.

Было установлено, что сигнал, соответствующий альбумину, становится детектируемым при концентрации белка, превышающей 0,6 мг/мл, что согласуется с его низкой молекулярной массой и малым размером (порядка 3,5–4 нм). Гидродинамический радиус наночастиц оставался стабильным и составлял около 80 нм во всём диапазоне исследуемых условий.

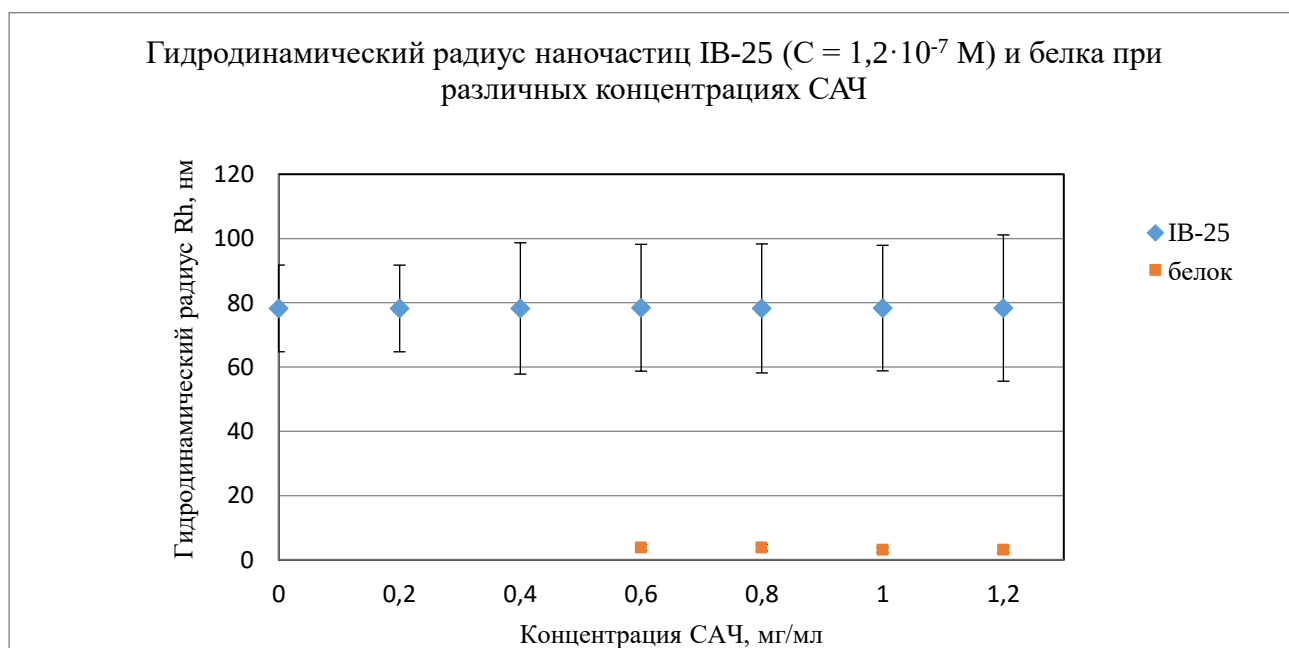
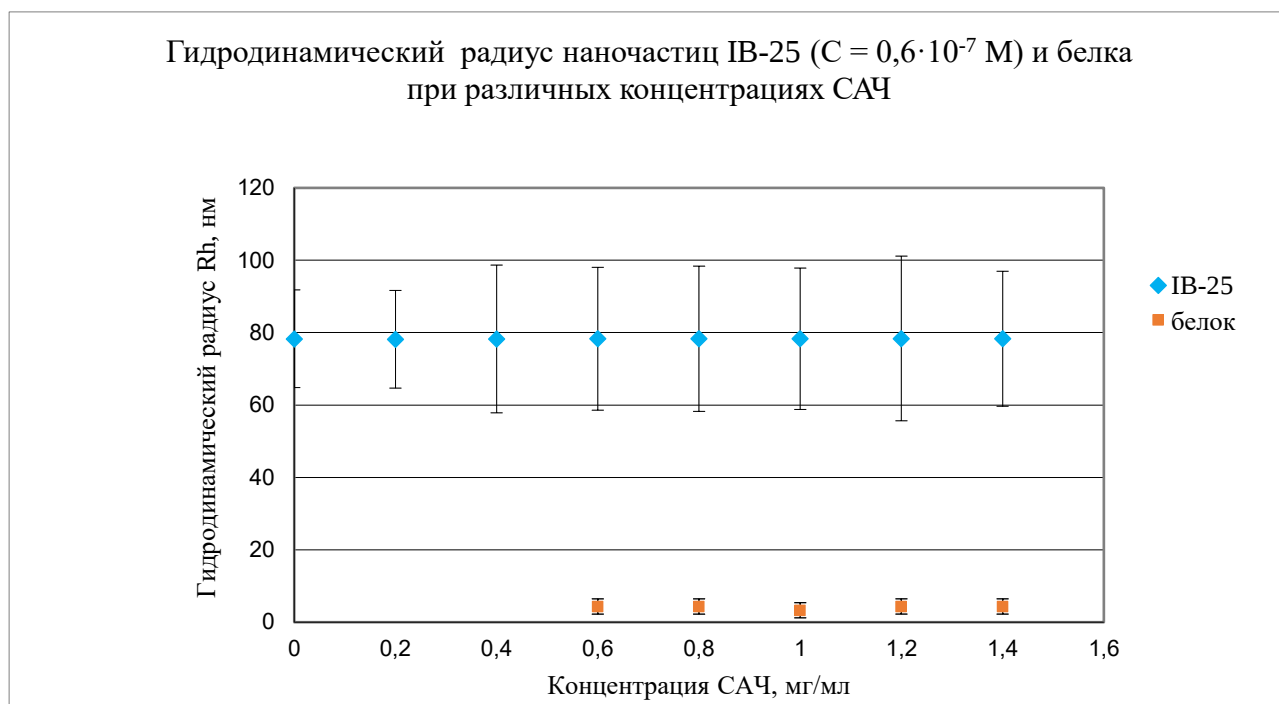


Рисунок 27 – Распределение средних гидродинамических радиусов компонент водного раствора IB-25 и САЧ от концентрации САЧ.

При этом, анализ полученных кривых автокорреляции (рисунок 28), проведённый с использованием программного обеспечения DynaLS, показал наличие строго двух компонентов в системе — наночастиц и САЧ. Отсутствие появления дополнительных пиков свидетельствует о том, что образование устойчивых межмолекулярных комплексов между наночастицами и САЧ при заданных условиях ($\text{pH} \approx 6,9$) не происходит.

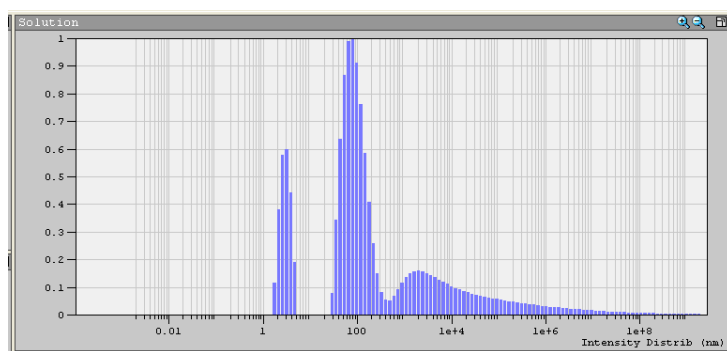


Рисунок 28 – Распределение нормированного вклада интенсивности (относ. ед.) от значений гидродинамического радиуса (нм). Фрагмент обработки результатов измерений в программе DynaLS: 1 пик – САЧ, 2 – IB-25, 3 – артефактный пик.

Дополнительно было исследовано влияние изменения концентрации наночастиц на параметры системы (рисунок 29).

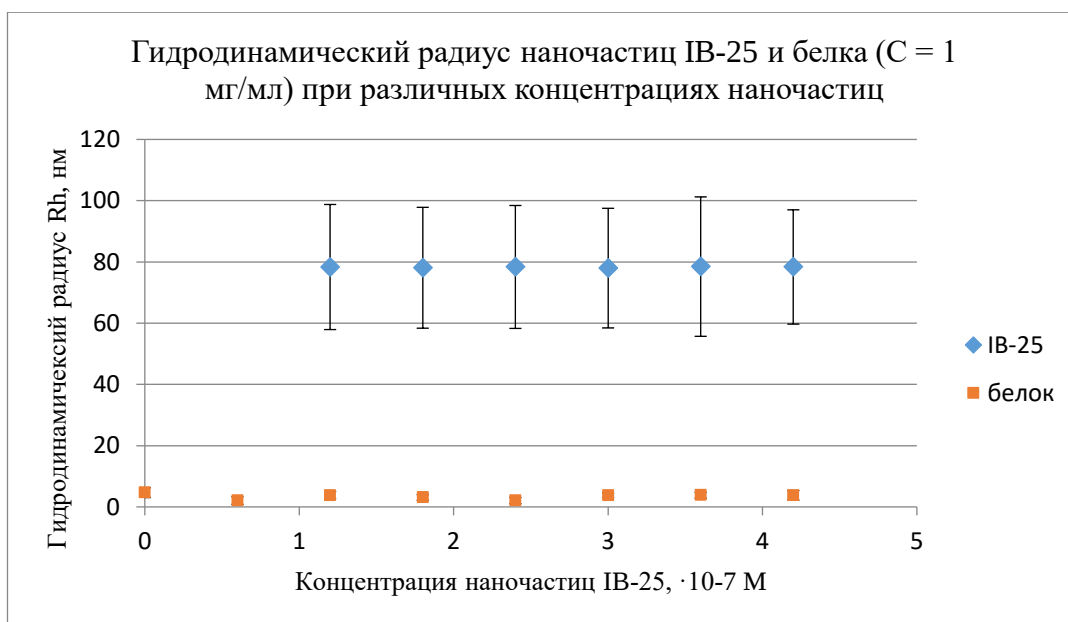


Рисунок 29 – Распределение средних гидродинамических радиусов компонент водного раствора IB-25 и САЧ от концентрации IB-25.

В ходе экспериментов было установлено, что ни размер наночастиц, ни размер белка не изменяются в ответ на увеличение концентрации наночастиц в растворе. Это подтверждает как отсутствие специфического взаимодействия между компонентами, так и коллоидную стабильность наночастиц в присутствии белка.

Важным аспектом данной серии измерений является их временной диапазон: все эксперименты были выполнены в течение 2–3 часов после приготовления растворов. Константность гидродинамических параметров на протяжении этого времени указывает на устойчивость морфологии наночастиц и отсутствие их агрегации или взаимодействия с сывороточным альбумином в течение как минимум нескольких часов. Таким образом, можно заключить, что в исследуемых условиях не наблюдается формирования комплексов между IB-25 и САЧ, а компоненты сосуществуют в растворе независимо.

4.4. Исследование комплекса наночастиц РТ-5

В рамках настоящего исследования, наряду с наночастицами на основе фталоцианина IB-25, был проанализирован диазепинопорфиразин магния РТ-5. Проведённые измерения выявили, что данный образец обладает существенно меньшей коллоидной стабильностью в водной среде. В частности, уже в исходных растворах наночастиц наблюдается выраженный полидисперсный характер распределения по гидродинамическим радиусам, причём полученные значения значительно варьируют от измерения к измерению. Это указывает на отсутствие устойчивой структуры коллоидной системы и затрудняет количественный анализ получаемых данных.

На рисунке 30 представлен характерный результат обработки автокорреляционной функции для водного раствора РТ-5.

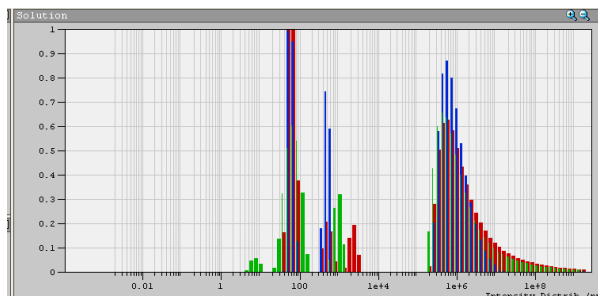


Рисунок 30 – Распределение нормированного вклада интенсивности (относ. ед.) от значений гидродинамического радиуса (нм) РТ-5. Фрагменты обработки результатов измерений в программе DynaLS.

Анализ корреляционных функций демонстрирует наличие сразу нескольких компонент ФС: доминируют две фракции — мелкодисперсная с размером порядка 50 нм и агрегированная, достигающая 400 – 450 нм. Такое распределение свидетельствует о склонности наночастиц к агрегации и возможному протеканию процессов коагуляции в растворе в отсутствие внешнего воздействия. Вероятной причиной наблюдаемой нестабильности может быть недостаточная стабилизация поверхности наночастиц (например, отсутствие эффективных зарядовых или стерических барьеров), что приводит к их агрегации через ван-дер-ваальсовы и гидрофобные взаимодействия.

В ходе экспериментов было установлено, что коллоидный раствор РТ-5 сохраняет свои свойства на протяжении 1,5–2 часов и не проявляет прогрессирующей деструкции. Однако сохраняющийся широкий разброс размеров и нестабильность формы делают невозможной воспроизводимую интерпретацию данных, полученных методами динамического светорассеяния. Полидисперсность системы усложняет анализ водного раствора, полностью исключая возможность корректного анализа взаимодействия РТ-5 с белковыми компонентами, такими как сывороточный альбумин. В системах с высоким уровнем полидисперсности затрудняется как определение индивидуального вклада каждой популяции частиц, так и отслеживание изменений, вызванных

специфическим связыванием белка. Вследствие этого применение наночастиц РТ-5 в качестве модели для изучения взаимодействий с белками требует предварительной оптимизации условий синтеза и стабилизации системы для обеспечения репрезентативности и однозначности получаемых данных.

4.5. Контроль наноразмерности фотосенсибилизаторов тетрапиррольных комплексов цинка (VP-6)

Приготовление исследуемых растворов

Все измерения образцов производились в водной среде. Использовалась вода для инъекций (ОАО «Биохимик», pH ≈ 7.5). Измерения проводились при температуре 20 °С.

В качестве полимерной основы, способствующей солюбилизации ФС в воде, в изучаемых формах использован поливинилпирролидон фирмы Sigma-Aldrich (ПВП-К30, средняя $M_w = 40000$ г/моль). Молярная масса соединений: $M_{VP-6} = 1457$ г/моль, $M_{РТ-1} = 1658$ г/моль.

В данной работе были исследованы образцы VP-6 с различными молярными отношениями образец – ПВП (таблица 4). Причем значения, указанные в таблицы величины связаны следующими отношениями:

$$C_{\text{ФС}} = \frac{m_{\text{ФС}}}{M_{\text{ФС}} * V_{\text{р-ра}}};$$

$$C_{\text{ПВП}} = \frac{m_{\text{ПВП}}}{M_w * V_{\text{р-ра}}}.$$

ФС	С _{ФС} , моль/л	С _{ПВП} , моль/л	m _{ФС} , мг	m _{ПВП} , мг	Мольное отношение	V _{р-ра} , мл
VP-6	$3.7 \cdot 10^{-4}$	$3 \cdot 10^{-4}$	2.7	60	1:1	5
	$3 \cdot 10^{-4}$	$6.25 \cdot 10^{-4}$	2.2	125	1:2	5
	$3 \cdot 10^{-4}$	$15.46 \cdot 10^{-4}$	2.8	396	1:5	6.4

Таблица 4 – Данные состава исходных образцов

Для определения гидродинамического радиуса каждого из образцов были приготовлены растворы: в кювету, где находилось 5 мл воды, добавлялось сначала с шагом 5 мкл исходного образца ($V_{р-ра}$), а затем с шагом 10 мкл. Таким образом, были получены зависимости гидродинамического радиуса от концентрации для трех образцов: три раствора VP-6 с тремя различными мольными отношениями с тремя соответствующими мольными отношениями вещество-ПВП. При этом, для удобства, на графике откладывалось значение добавленного количества исходного образца, выраженное в микролитрах (С), которое связано с исходной концентрацией ($C_{исх} = C_{ФС} + C_{ПВП}$) и концентрацией исследуемого образца в кювете ($C_{исх. в р-ре}$) по формуле:

$$C_{исх. в р-ре} = \frac{C_{исх} * C}{V},$$

где V – объем кюветы: V = 5мл.

Результаты экспериментальной части

Исследования, проведенные ранее, показали тенденцию к увеличению среднего гидродинамического радиуса ФС VP-6 [43]. Исследование показало устойчивость исследуемых образцов VP-6 и РТ-1 к облучению на длинах волн 445 нм и 647 нм, что позволяет успешно проводить исследования наночастиц методом ДРС, с учетом ЭСП частиц (рисунок 10 и 12). Однако для проверки данного факта необходимо провести более детальное исследование, включающее в себя исследование гидродинамических радиусов частиц при одинаковом вкладе

интенсивности, что позволит минимизировать различное влияние артефактного пика в сильно разбавленных средах (см. раздел 3.3.)

Для образцов VP-6-ПВП с различными мольными отношениями были построены зависимости интенсивности рассеянного света от концентрации частиц ФС, данные зависимости представлены на одном графике для удобства сравнительного анализа (рисунок 31).

Образец 1:1 t – это образец 1:1, измеренный после 3 месяцев хранения, в тёмном помещении при температуре 24-26 °С.

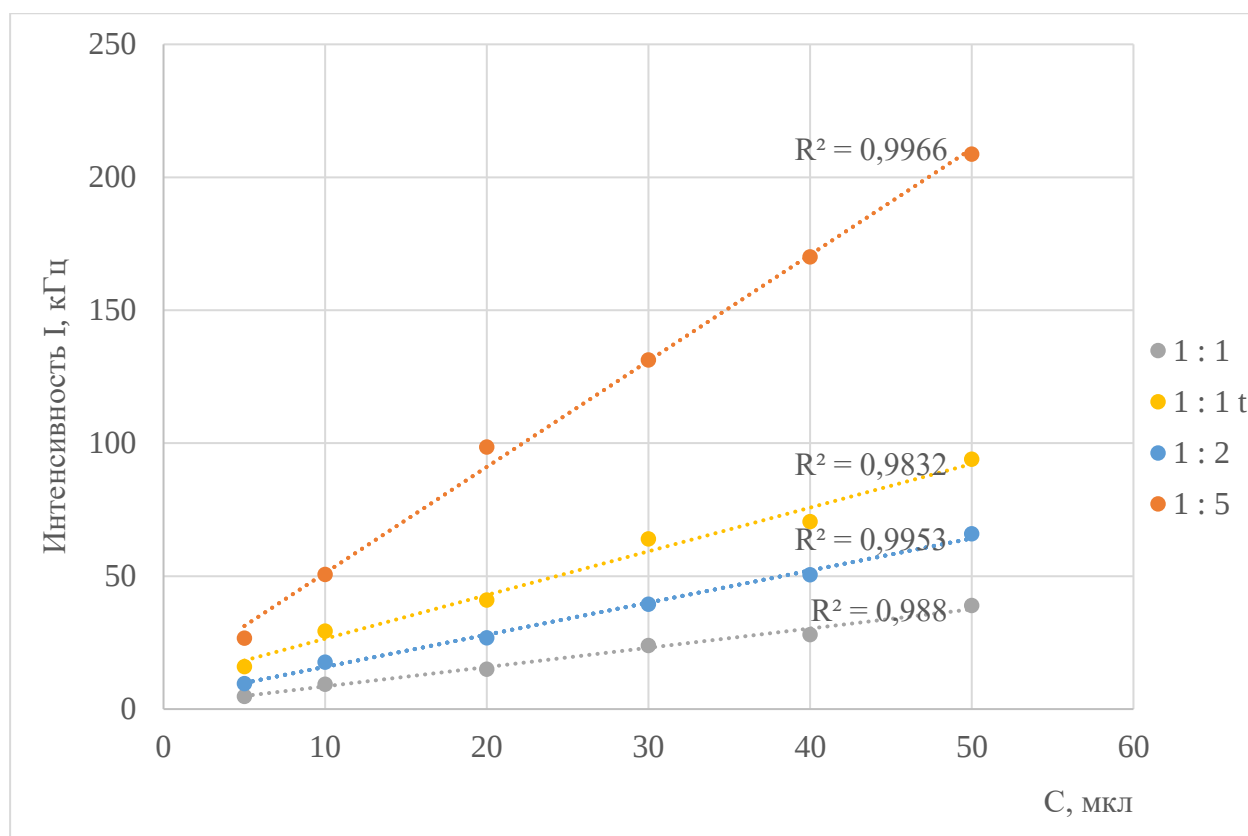


Рисунок 31 – График зависимости интенсивности рассеянного света в растворе наночастиц VP-6-ПВП для мольных отношений 1:1, 1:2 и 1:5 соответственно от концентрации в водном растворе, где образец 1:1 t – образец 1:1, измеренный после длительного хранения, R^2 – величина достоверной линейной аппроксимации. Погрешность величины интенсивности для каждого из значений не превышает 5%.

Каждая точка графика является усреднением, в общем случае, пяти экспериментальных значений для данной концентрации с суммарным временем накопления корреляционной функции – 100 секунд (таким образом суммарное время нахождения одного образца под лазерным излучением > 50 минут). Погрешность величины интенсивности для каждого из значений не превышает 5%, что достигалось путём удаления из серии экспериментов значений интенсивности, превышающих заданный диапазон отклонения.

Распределения гидродинамических радиусов от концентрации образцов в водных растворах представлены на рисунках 32 – 35 для различных мольных соотношений.

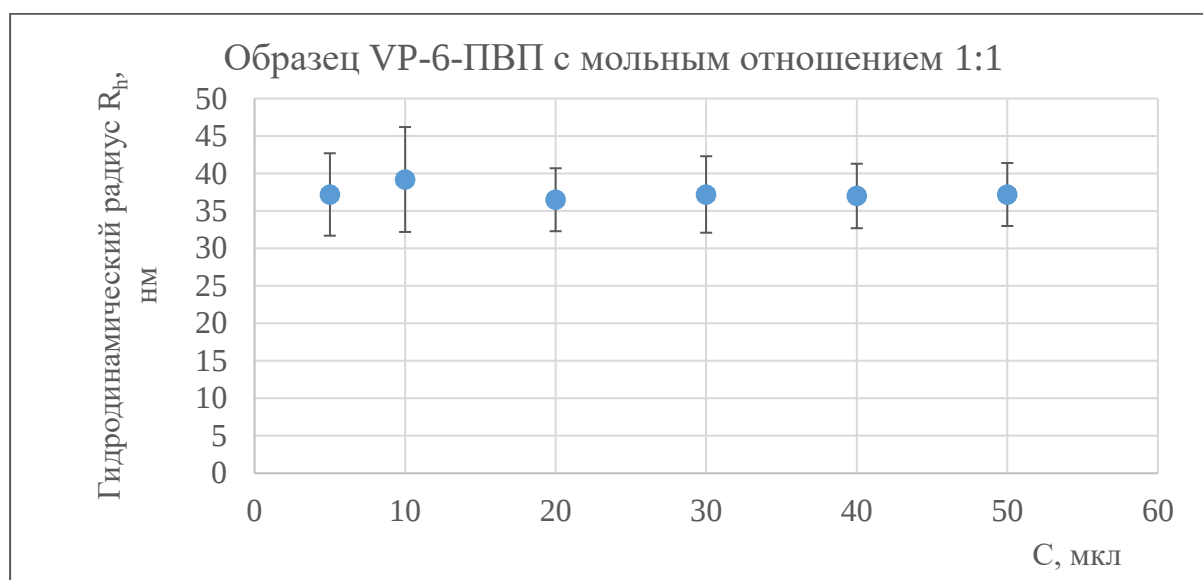


Рисунок 32 – График зависимости гидродинамического радиуса R_h наночастиц VP-6-ПВП (1:1) от концентрации в водном растворе.

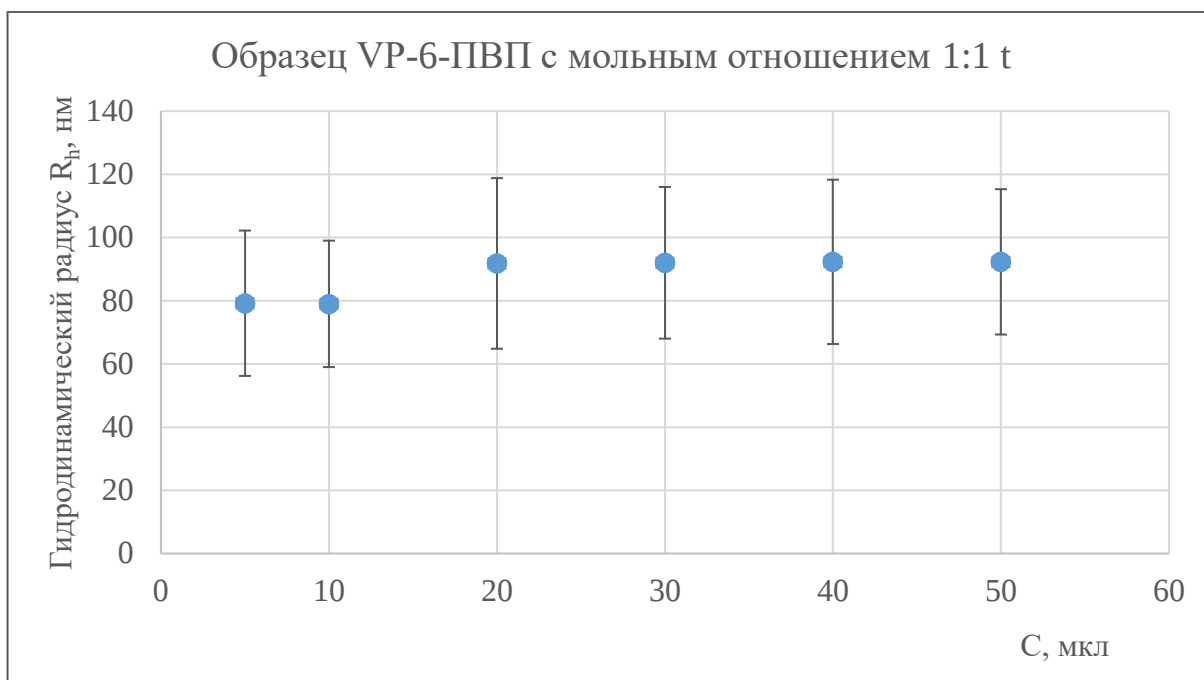


Рисунок 33 – График зависимости гидродинамического радиуса R_h наночастиц VP-6-ПВП (1:1t) от концентрации в водном растворе.

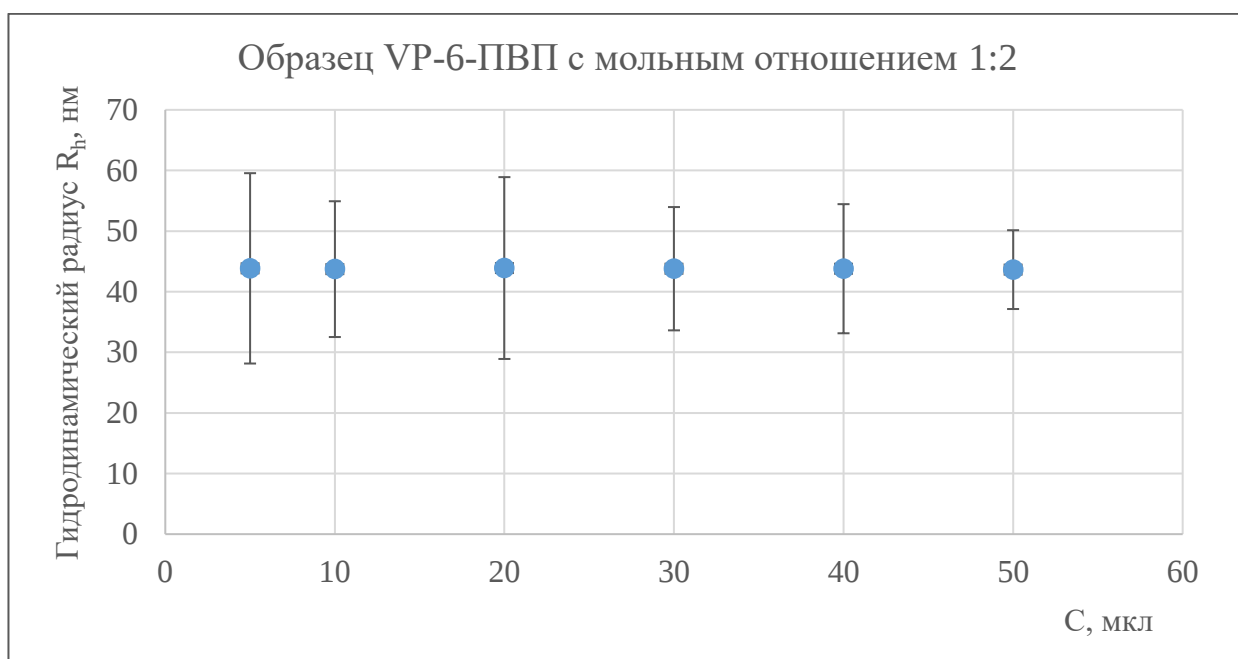


Рисунок 34 – График зависимости гидродинамического радиуса R_h наночастиц VP-6-ПВП (1:2) от концентрации в водном растворе.

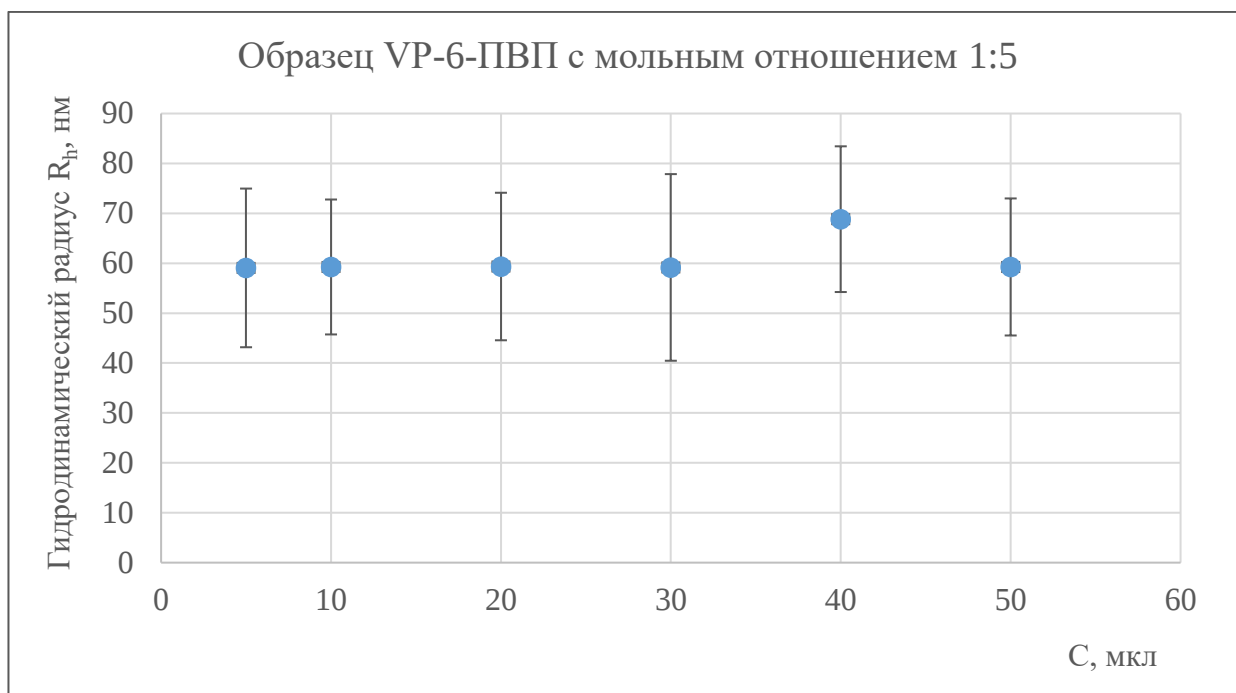


Рисунок 35 – График зависимости гидродинамического радиуса R_h наночастиц VP-6-ПВП (1:5) от концентрации в водном растворе.

Для проведения сравнительного анализа гидродинамических радиусов наночастиц в зависимости от мольного соотношения вещество-ПВП, сравнение гидродинамических радиусов проводилось двумя способами.

Первый способ основан на определении гидродинамического радиуса частиц различных образцов при одинаковой интенсивности рассеянного света. В данном случае, максимально оптимальным значением интенсивности является максимум по интенсивности для образца VP-6-ПВП (1:1), для остальных образцов выбираются экспериментальные точки, соответствующие данной интенсивности (таблица 5). Во втором способе (таблица 6), определение гидродинамического радиуса осуществляется по экспериментальным точкам, соответствующим максимально оптимальным значениям интенсивности для каждого из образцов в отдельности (для точки $C = 50$ мкл из рисунка 31).

	1:1	1:1 t	1:2	1:5
R_1 , нм	$37,2 \pm 4,7$	$79,2 \pm 20,3$	$43,8 \pm 10,2$	$59,1 \pm 16,9$
$\langle I \rangle$, кГц	39	38,2	39,4	38,7

Таблица 5 – Сравнение гидродинамического радиуса R_1 частиц VP-6-ПВП при одинаковом среднем значении интенсивности рассеянного света $\langle I \rangle \approx 39$ кГц (1 способ).

	1:1	1:1 t	1:2	1:5
R_1 , нм	$37,2 \pm 4,7$	$92,1 \pm 24,8$	$43,6 \pm 6,5$	$59,3 \pm 15,2$
$\langle I \rangle$, кГц	39	94	65,9	208,7

Таблица 6 – Сравнение гидродинамического радиуса R_1 частиц VP-6-ПВП при максимально оптимальных значениях интенсивности рассеянного света (2 способ).

Из представленной таблицы 5 видно, что с увеличением мольного соотношения вещество-ПВП средний гидродинамический радиус частиц возрастает, при одинаковом вкладе образцов в распределение интенсивности рассеянного света ($\langle I \rangle \approx 39$ кГц). При этом размер образца 1:1 t, увеличился почти в 2.5 раза по сравнению с образцом 1:1 (через 3 месяца). Увеличение среднего размера частиц связано с процессом ассоциации-агломерации наночастиц, в результате которого происходит снижение общей энергии системы, за счёт снижения сил поверхностного натяжения. Механизм ассоциации наночастиц может быть связан со связыванием нескольких первоначальных частиц (порядка 6-ти) без внутренней перестройки, за счёт действия поверхностных сил. При таком взаимодействии гидрофобные ядра ФС не сливаются и нарушения гидрофильной оболочки не происходит. С другой стороны, слияние частиц может происходить с формированием общей оболочки. При сравнении размеров наночастиц вторым способом ситуация остаётся прежней, при повышении мольного соотношения вещество-ПВП средний гидродинамический радиус увеличивается, при этом равенство соответствующих значений радиуса для одних и тех же образцов при различных концентрациях ФС свидетельствует о высокой повторяемости результата, что говорит о стабильном состоянии образца в водном растворе. В частности, образец 1:1 t, имеет тенденцию к увеличению среднего радиуса при повышении концентрации.

4.6. Контроль наноразмерности фотосенсибилизаторов тетрапиррольных комплексов магния (РТ-1)

Приготовление исследуемых растворов

Все измерения образцов производились в водной среде. Использовалась вода для инъекций (ОАО «Биохимик», pH ≈ 7.5).

В качестве полимерной основы, способствующей солюбилизации ФС в воде, в изучаемых формах использован поливинилпирролидон фирмы Sigma-Aldrich (ПВП-К30, средняя $M_w = 40000$ г/моль). Молярная масса соединений: $M_{VP-6} = 1457$ г/моль, $M_{РТ-1} = 1658$ г/моль.

В данной работе были исследованы образцы РТ-1 с различными молярными соотношениями образец – ПВП (таблица 7). Аналогично образцу VP-6, указанные в таблицы величины связаны следующими соотношениями:

$$C_{\text{ФС}} = \frac{m_{\text{ФС}}}{M_{\text{ФС}} * V_{\text{р-ра}}};$$

$$C_{\text{ПВП}} = \frac{m_{\text{ПВП}}}{M_w * V_{\text{р-ра}}}.$$

ФС	$C_{\text{ФС}}$, моль/л	$C_{\text{ПВП}}$, моль/л	$m_{\text{ФС}}$, мг	$m_{\text{ПВП}}$, мг	Молярное отношение	$V_{\text{р-ра}}$, мл
РТ-1	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-4}$	746	$18 \cdot 10^3$	1:1	4-5
	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-3}$	746	$18 \cdot 10^4$	1:10	4-5
	$1 \cdot 10^{-4}$	$1 \cdot 10^{-2}$	746	$18 \cdot 10^5$	1:100	4-5

Таблица 7 – Данные состава исходных образцов

Для определения гидродинамического радиуса каждого из образцов были приготовлены растворы: в кювету, где находилось 5 мл воды, добавлялось сначала с шагом 5 мкл исходного образца ($V_{\text{р-ра}}$), а затем с шагом 10 мкл. Таким образом, были получены зависимости гидродинамического радиуса от

концентрации для трех образцов: три раствора РТ-1 с тремя соответствующими мольными отношениями вещество-ПВП. При этом, для удобства, на графике откладывалось значение добавленного количества исходного образца, выраженное в микролитрах (C), которое связано с исходной концентрацией ($C_{\text{исх}} = C_{\text{ФС}} + C_{\text{ПВП}}$) и концентрацией исследуемого образца в кювете ($C_{\text{исх. в р-ре}}$) по формуле:

$$C_{\text{исх. в р-ре}} = \frac{C_{\text{исх}} * C}{V},$$

где V – объем кюветы: $V = 5\text{мл}$.

Результаты экспериментальной части

Для образцов РТ-1-ПВП с различными мольными отношениями были построены зависимости интенсивности рассеянного света от концентрации частиц ФС, данные зависимости представлены на рисунках 36-38, а также представлены на одном графике для удобства сравнительного анализа (рисунок 39).

Аналогично измерениям образца VP-6-ПВП, каждая точка графика является усреднением, в общем случае, пяти экспериментальных значений для конкретной концентрации с суммарным временем накопления корреляционной функции – 100 секунд (таким образом суммарное время нахождения одного образца под лазерным излучением > 4.5 часов). Так же, как и для образца VP-6-ПВП, погрешность величины интенсивности для каждого из значений не превышает 5%.

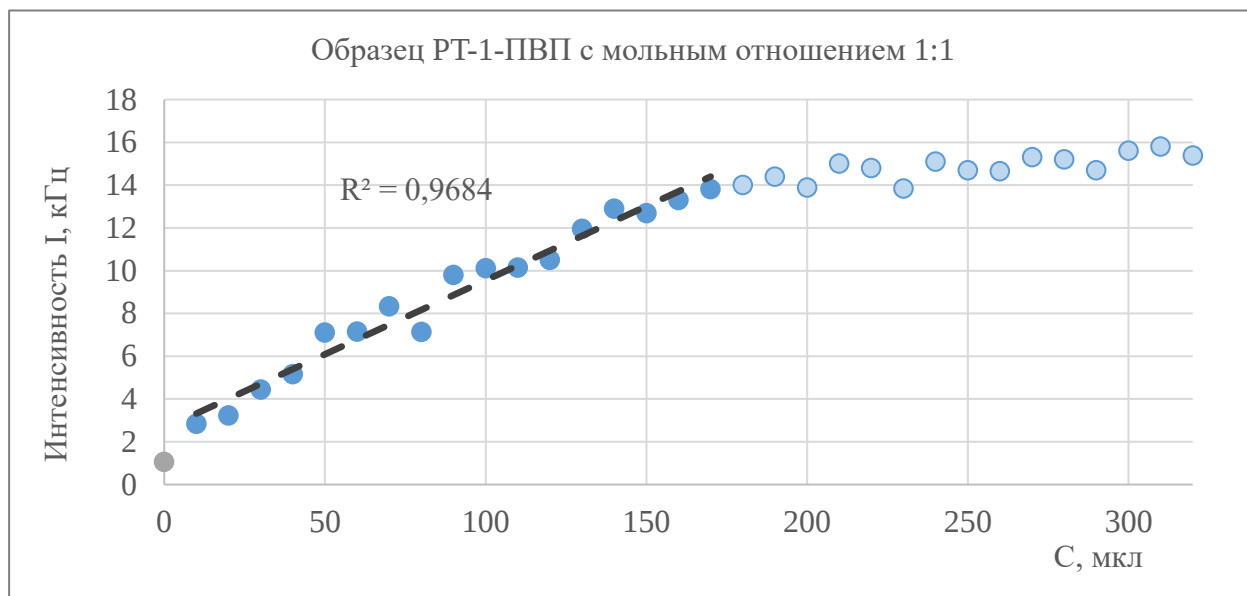


Рисунок 36 – График зависимости интенсивности рассеянного света в растворе наночастиц РТ-1-ПВП для мольного отношения 1:1 от концентрации в водном растворе, где R^2 – величина достоверной линейной аппроксимации. Погрешность величины интенсивности для каждого из значений не превышает 5%. Полупрозрачные точки соответствуют нелинейному участку графика.

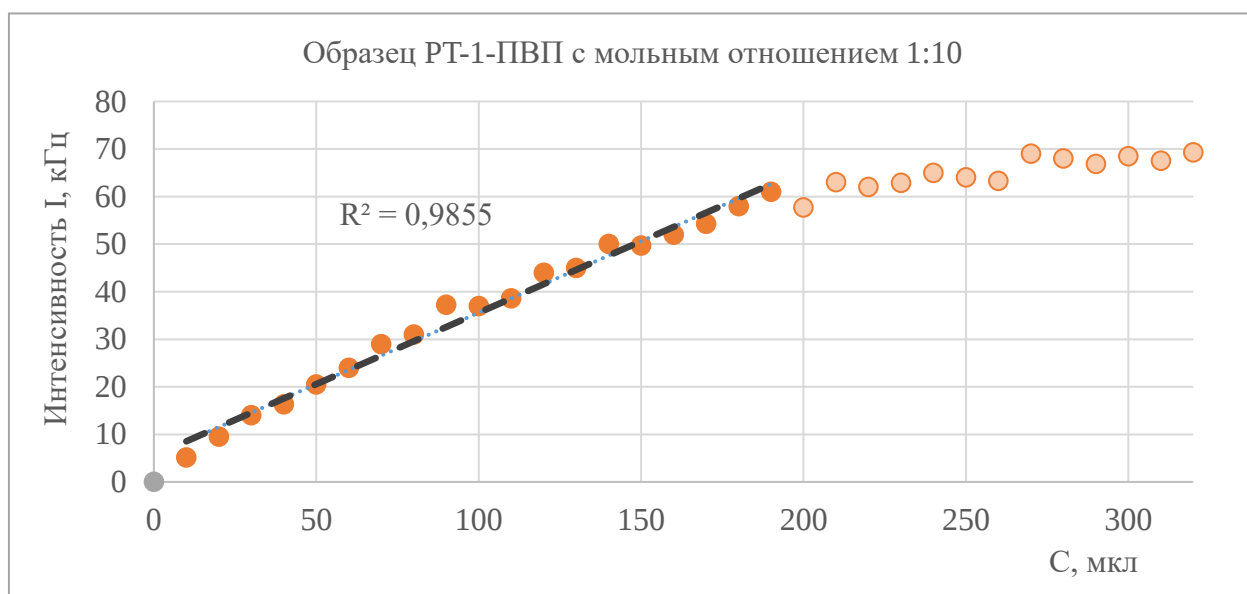


Рисунок 37 – График зависимости интенсивности рассеянного света в растворе наночастиц РТ-1-ПВП для мольного отношения 1:10 от концентрации в водном растворе, где R^2 – величина достоверной линейной аппроксимации. Погрешность величины интенсивности для каждого из значений не превышает 5%. Полупрозрачные точки соответствуют нелинейному участку графика.

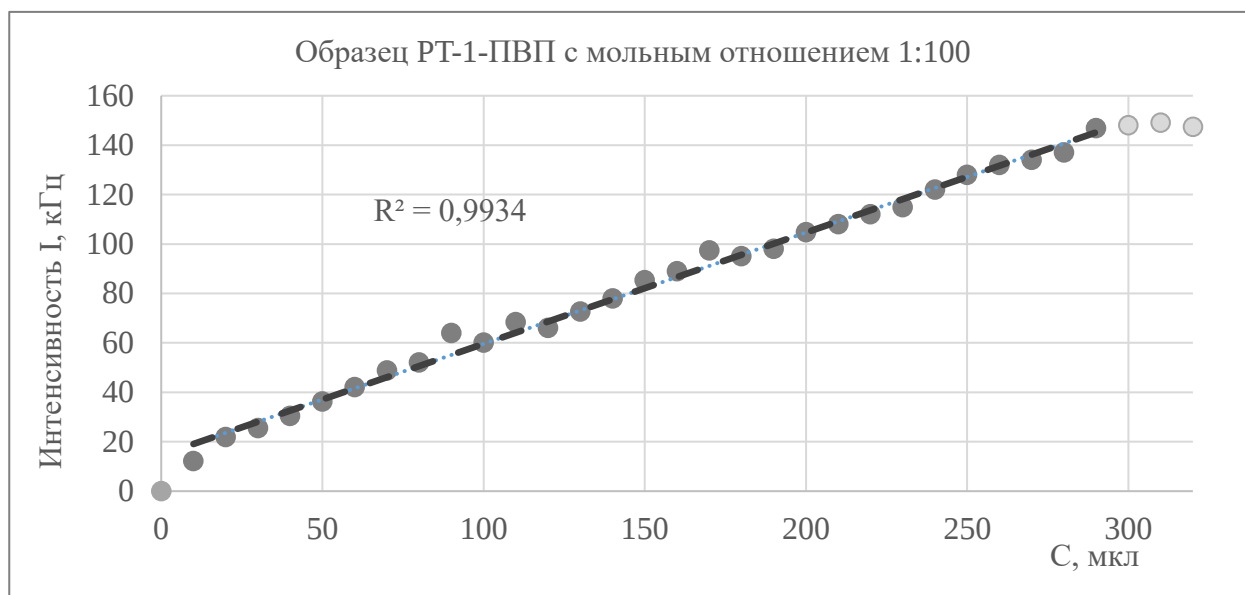


Рисунок 38 – График зависимости интенсивности рассеянного света в растворе наночастиц РТ-1-ПВП для мольного отношения 1:100 от концентрации в водном растворе, где R^2 – величина достоверной линейной аппроксимации. Погрешность величины интенсивности для каждого из значений не превышает 5%. Полупрозрачные точки соответствуют нелинейному участку графика.

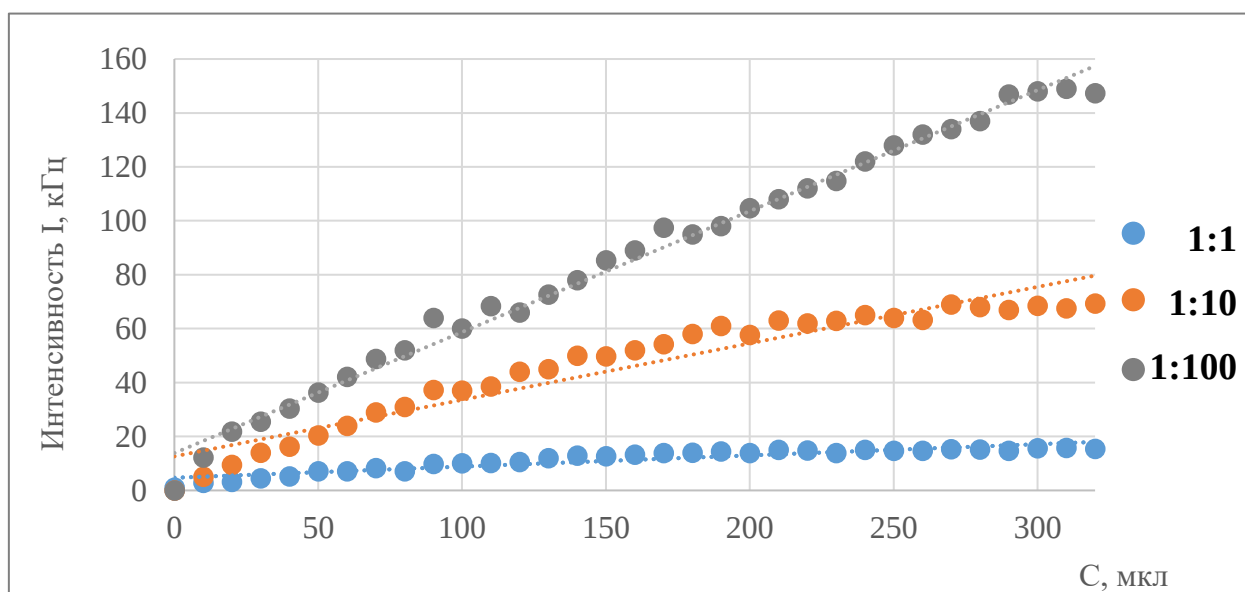


Рисунок 39 – График зависимости интенсивности рассеянного света в растворе наночастиц РТ-1-ПВП для мольных отношений 1:1, 1:10 и 1:100 соответственно от концентрации в водном растворе, R^2 – величина достоверной линейной аппроксимации. Погрешность величины интенсивности для каждого из значений не превышает 5%.

Нелинейная часть графика обусловлена окрашиванием исследуемого раствора при достижении определенной концентрации, что делает раствор менее прозрачным для лазерного излучения.

Таким образом, в данном случае максимально оптимальной интенсивностью будут обладать экспериментальные точки, являющиеся последними точками линейного участка графика для каждого из образцов. Линейная часть графика выбиралась как наибольшее количество точек (начиная с минимальной концентрации), при котором величина достоверной аппроксимации R^2 была максимальна.

Распределения гидродинамических радиусов от концентрации образцов в водных растворах представлены на рисунках 40 – 42 для различных мольных соотношений.

Исследуемый раствор является двухкомпонентной средой. Аналогично рассуждениям, проведенным для образца VP-6-ПВП, были получены таблицы гидродинамических радиус для образца PT-1-ПВП двумя способами (таблицы 8 и 9).

	1:1	1:1	1:100
R_1 , нм	112±28	135±47	197±44
R_2 , нм	21,9±5,3	10,2±3,4	11,1±3,1
$\langle I \rangle$, кГц	13,8	13,9	13,8

Таблица 8 – Сравнение гидродинамических радиусов R_1 и R_2 частиц PT-1-ПВП при одинаковом среднем значении интенсивности рассеянного света $\langle I \rangle \approx 14$ кГц (1 способ).

	1:1	1:10	1:100
R_1 , нм	112±28	135±20	265±39
R_2 , нм	21,9±5,3	10,4±2,9	11,1±1,4
$\langle I \rangle$, кГц	13,8	57,7	146,8

Таблица 9 – Сравнение гидродинамических радиусов R_1 и R_2 частиц PT-1-ПВП при максимально оптимальных значениях интенсивности рассеянного света (2 способ).

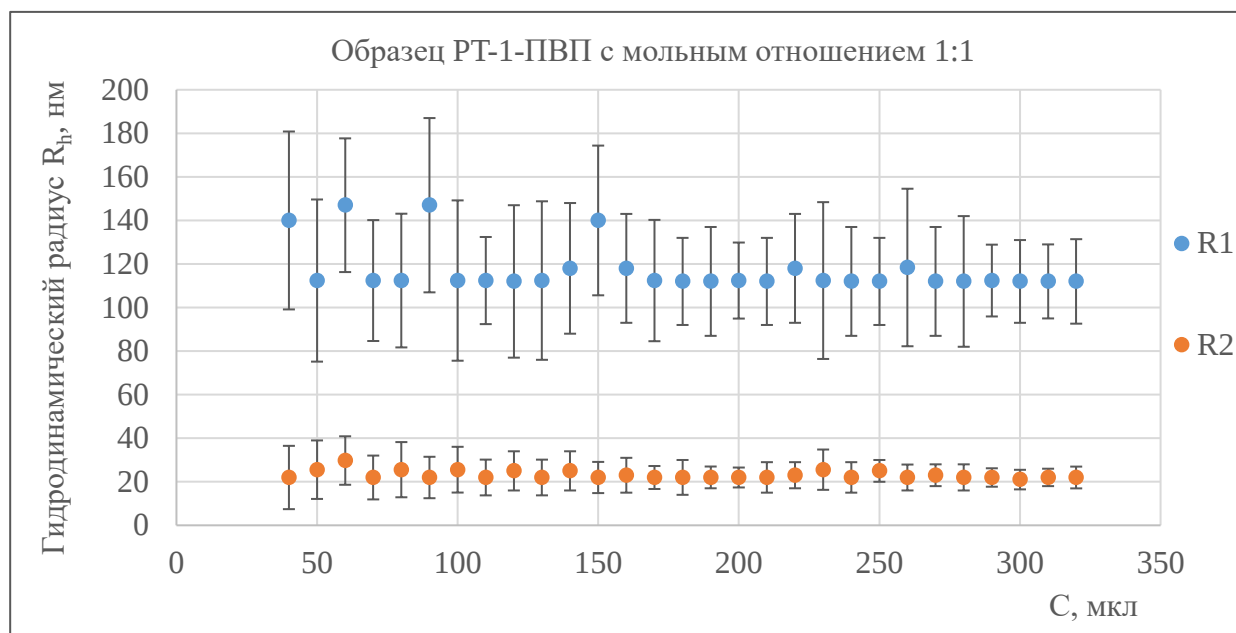


Рисунок 40 – График зависимости гидродинамического радиуса R_h наночастиц РТ-1-ПВП (1:1) от концентрации в водном растворе, где R_1 – первая компонента, R_2 – вторая компонента.

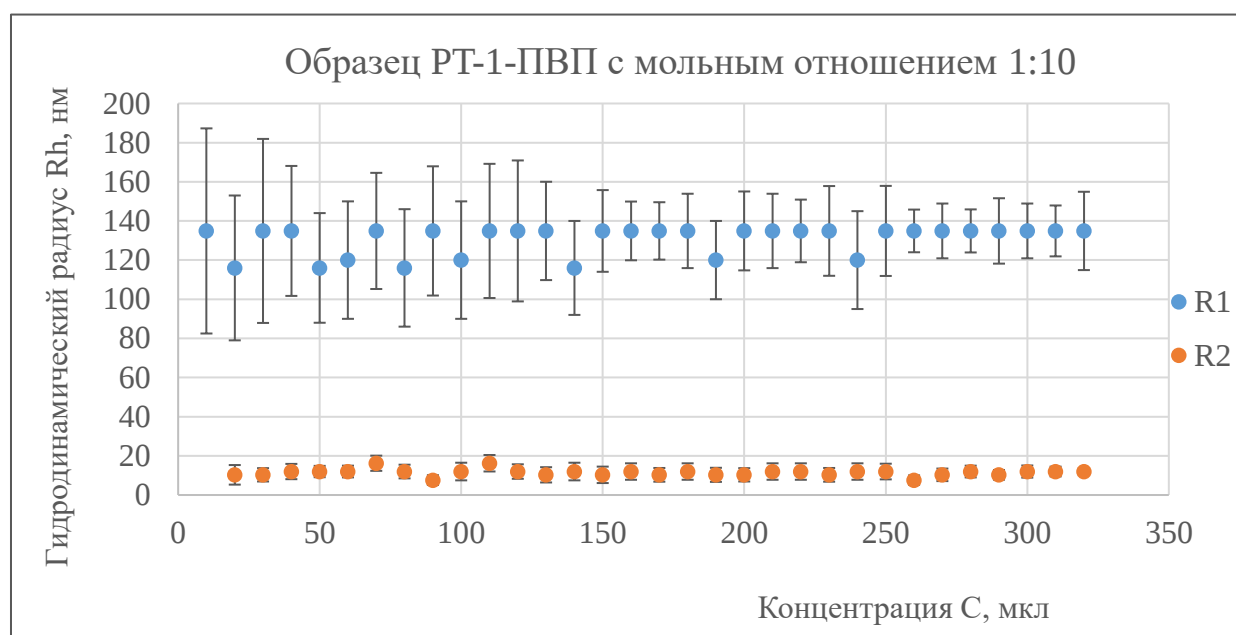


Рисунок 41 – График зависимости гидродинамического радиуса R_h наночастиц РТ-1-ПВП (1:10) от концентрации в водном растворе, где R_1 – первая компонента, R_2 – вторая компонента.

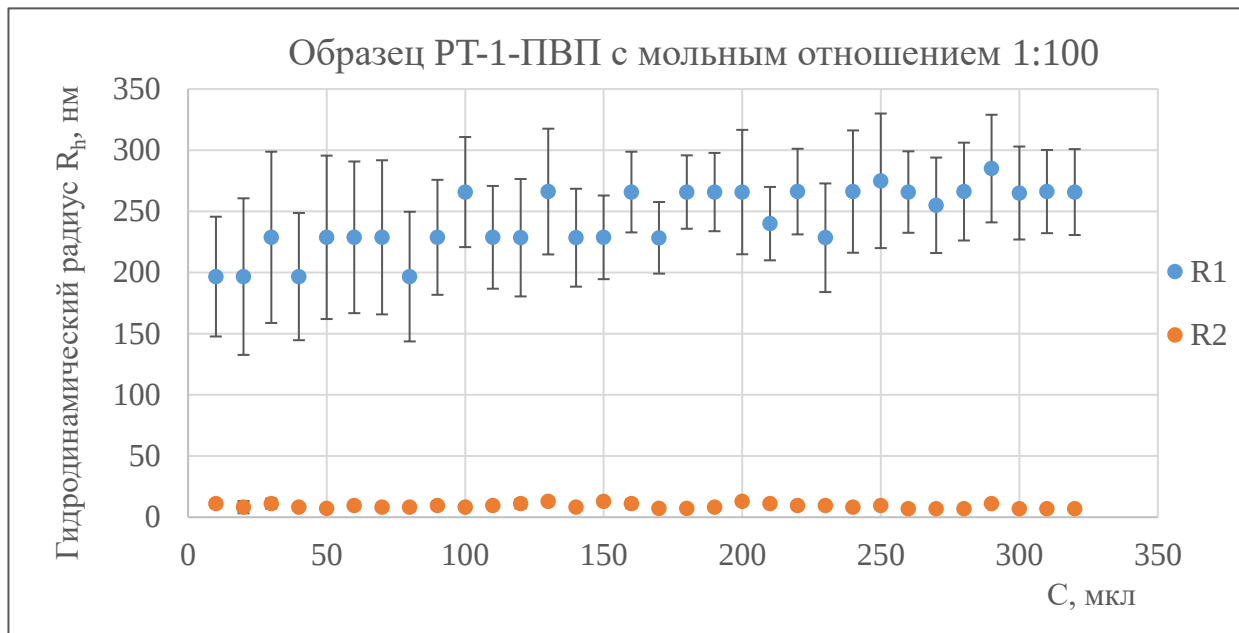


Рисунок 42 – График зависимости гидродинамического радиуса R_h наночастиц PT-1-ПВП (1:100) от концентрации в водном растворе, где R_1 – первая компонента, R_2 – вторая компонента.

Полученные графики зависимости интенсивности от концентрации для всех образцов являются линейными функциями, что соответствует теории о прямой пропорциональности интенсивности рассеянного света от концентрации частиц (10). Нелинейный участок для образцов PT-1-ПВП обусловлен окрашиванием раствора и понижением интенсивности рассеянного света. Следует отметить, что ПВП не вносит существенного вклада в окрашивание, основным элементом, затемняющим раствор, является вещество-краситель (в данном случае PT-1). По графикам 36-38 видно, что растворы, менее разбавленные высокой концентрацией ПВП, имеют меньший линейный участок функции, то есть затемняются при меньшей концентрации. Так, линейный участок для мольного соотношения 1:1 оканчивается при $C = 170$ мкл, для соотношения 1:10, $C = 190$ мкл, для 1:100, $C = 290$ мкл.

Необходимо отметить, что в общем распределении гидродинамического радиуса частиц, присутствует несколько пиков, включающих в себя как артефакты, так и реально существующие размеры. Однако их вклад не превышает 10% от общего вклада интенсивности. Кроме того, такие размеры не обладают

высокой повторяемостью и не могут считаться достоверными. Именно поэтому в итоговых таблицах представлены гидродинамические радиусы основных компонент, имеющих значительный вклад в суммарное распределение интенсивностей.

В таблицах 8 и 9 представлены результаты значений гидродинамических радиусов для образца РТ-1. Результаты были получены для образца РТ-1-ПВП аналогично образцу VP-6, где также была подтверждена тенденция к увеличению среднего гидродинамического радиуса при повышении концентрации ПВП. При этом данные для образцов РТ-1-ПВП (1:1) и VP-6-ПВП (1:2 и 1:5) хорошо соотносятся с результатами, опубликованными ранее для базового мольного соотношения [43]. Из результатов таблиц 8 и 9 видна высокая повторяемость результата для соотношений 1:1 и 1:10, при этом образец 1:100 имеет довольно сильный разброс по средним гидродинамическим радиусам (рисунок 42).

Глава 5. Способные к самосборке амфифильные фотосенсибилизаторы: S_27_Na и PT_reg

Основные результаты данной главы представлены в статьях [A1 – A2].

5.1. Статистический способ усреднения данных рассеяния света

В рамках настоящего исследования изучались наночастицы на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера ПВП: S27_Na и PT_reg. Особенность исследуемых коллоидных систем заключалась в выраженной полидисперсности, затрудняющей интерпретацию результатов при использовании классических эмпирических методов анализа динамического светорассеяния, основанных на декомпозиции индивидуальных автокорреляционных функций с помощью программного обеспечения DynaLS.

С целью повышения воспроизводимости анализа и минимизации субъективного фактора при интерпретации многокомпонентных спектров была реализована стратегия статистической обработки данных, аналогичная подходу, реализованному в онлайн-платформе Raynals [99]. Разработанный подход основывался на численном восстановлении распределения гидродинамических радиусов по множеству измерений, объединённых в единую статистическую модель. В частности, автокорреляционные функции нормированного второго порядка $g^{(2)}(\tau)$ были преобразованы в функции первого порядка $g^{(1)}(\tau)$ с использованием уравнения Зигерта:

$$g^2(\tau) = 1 + \beta r |g^{(1)}(\tau)|^2,$$

где β - коэффициент, определяющийся геометрией и ориентацией лазерного луча в установке. В отличие от обработки индивидуальных максимумов распределений или усреднения $g^2(\tau)$, данный подход позволяет: сохранить

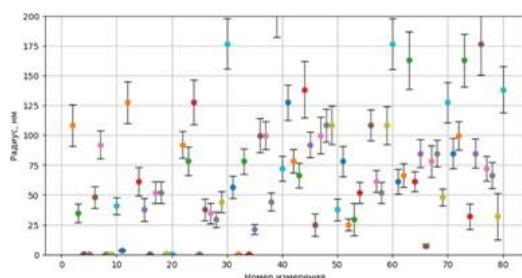
информацию о полной структуре распределения, минимизировать влияние шумов и случайных выбросов и повысить воспроизводимость интерпретации многокомпонентных систем.

После чего последовало численное восстановление распределения скоростей декорации с помощью регуляризованной инверсии типа Тихонова–Филлипса. Эта задача представляет собой некорректно поставленную задачу обратного типа, для решения которой использовалась регуляризация второго порядка, минимизирующая кривизну восстановленного распределения. В реализованном алгоритме, распределение гидродинамических радиусов R_h строилось на основе невзвешенной суммы экспоненциальных распадов с фиксированными коэффициентами дискретизации в логарифмическом масштабе. Основным критерий выбора параметра регуляризации (λ) осуществлялся с помощью L-кривой, отражающей компромисс между точностью аппроксимации и гладкостью полученного решения. Для этого строилась зависимость логарифма нормы невязки (ошибки восстановления) от логарифма нормы регуляризованного решения, после чего точка излома определялась методом треугольника [100].

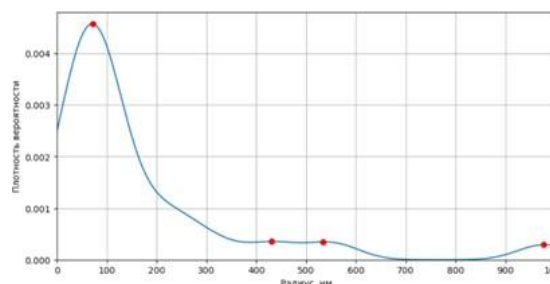
Для практической реализации статистической реконструкции распределения размеров на экспериментальных данных было произведено усреднение не менее 20 функций распределения, полученных из отдельных измерений. Были протестированы различные способы агрегации: по локальным максимумам, по функциям, восстановленным из усреднённой корреляционной функции, а также по прямому среднему по распределениям (рисунок 43). Последний метод, выбранный в качестве основного, позволил сохранить максимум информации об амплитуде и вариативности компонент, а также учесть статистические флуктуации сигналов.

Параллельно проводился сравнительный анализ с результатами, полученными средствами DynaLS, что подтвердило эквивалентность основных характеристик (например, радиусов преобладающих фракций), но при этом

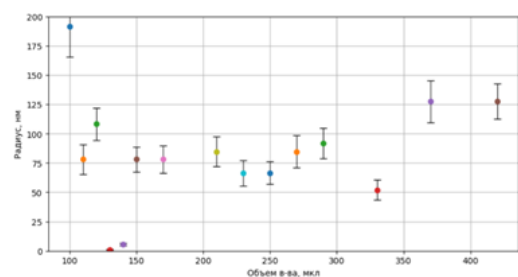
статистическая обработка обеспечила более высокую устойчивость и автоматизированность анализа, особенно в условиях полидисперсных систем.



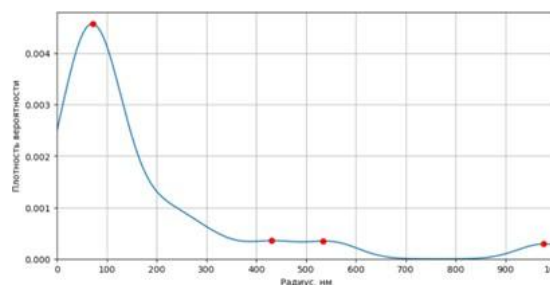
(а) Всевозможные результаты R_h для Pt_reg без ПВП для каждого измерения



(б) Функция плотности распределения интенсивности рассеянного света для Pt_reg без ПВП построенная по всем измерениям



(в) Всевозможные результаты R_h для усредненных корреляционных функций Pt_reg без ПВП для отдельных концентраций



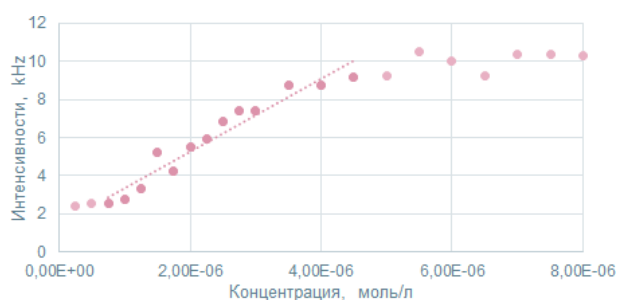
(г) Функция плотности распределения интенсивности рассеянного света Pt_reg без ПВП усредненных корреляционных функций для отдельных концентраций

Рисунок 43 – Сравнение методов усреднения корреляционных функций на примере образца Pt_reg без ПВП

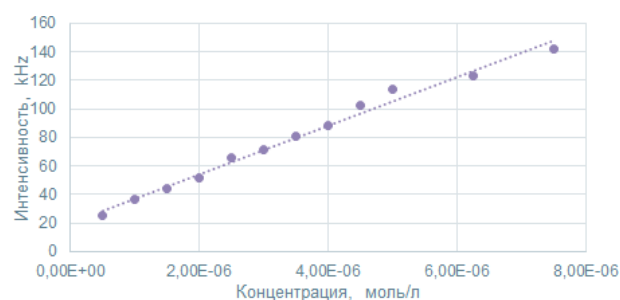
5.2. Модификации гетероциклического аналога фталоцианина магния (PT_reg) и сывороточный альбумин

На предварительном этапе исследований была проведена оценка влияния длины волны лазерного излучения на качество данных, получаемых методом динамического светорассеяния. Сравнительный анализ характеристик рассеяния растворов фотосенсибилизаторов и сывороточного альбумина человека проводился с использованием лазеров с красной (647 нм) и синей (455 нм) длиной волны (рисунок 44). В результате было установлено, что применение синего

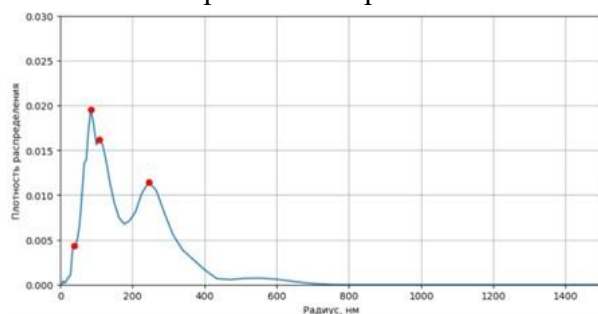
лазера обеспечивает более широкую область линейности зависимости интенсивности рассеянного света от концентрации рассеивателей. Кроме того, измерения, выполненные на синем лазере, демонстрировали более высокую степень воспроизводимости и стабильности. В связи с этим во всех последующих экспериментах использовался преимущественно синий лазер.



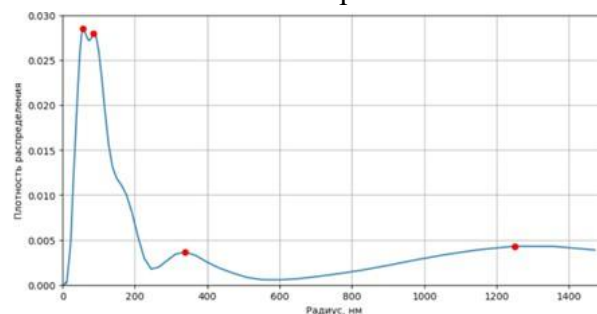
(а) Распределение интенсивности рассеянного света от концентрации ФС Pt_reg при использовании красного лазера.



(б) Распределение интенсивности рассеянного света от концентрации ФС Pt_reg при использовании синего лазера.



(в) Функция плотности распределения интенсивности рассеянного света Pt_reg с использованием красного лазера.



(г) Функция плотности распределения интенсивности рассеянного света Pt_reg с использованием синего лазера.

Рисунок 44 – Сопоставление распределений при использовании красного (647 нм) и синего (455 нм) лазера соответственно

Все измерения проводились в водной среде. В качестве растворителя применялась стерильная вода для инъекций (производства ОАО «Биохимик», pH ≈ 7.5), что обеспечивало необходимую биосовместимость и минимизацию фонового рассеяния. Для приготовления исследуемых растворов наночастиц (Pt_reg и S27_Na) в объём 4 мл воды добавлялись различные объёмы (20–50 мкл) исходного водного раствора ФС. Концентрации подбирались таким образом, чтобы охватить широкий диапазон условий, пригодных для последующего анализа взаимодействий с белком.

В рамках контроля стабильности условий в процессе измерений производился мониторинг кислотно-основного состояния среды: значения pH регистрировались в начале и в конце каждой серии экспериментов, в том числе при максимальной концентрации ФС. Во всех случаях pH оставался в физиологически допустимых пределах (7.0–8.0), что исключает возможность pH-индуцированных изменений в структуре белка или агрегативном состоянии наночастиц.

Для всех образцов была экспериментально определена зависимость интенсивности рассеянного света от концентрации ФС. На основе полученных данных была выбрана оптимальная концентрация, обеспечивающая надёжный сигнал при минимальном фоновом рассеянии. Для обеспечения сопоставимости условий измерений во всех смесях с альбумином использовалась концентрация фотосенсибилизатора, представленная в таблице 10.

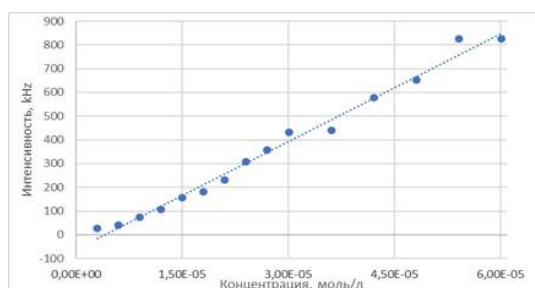
Образец	Концентрация в начале, моль/л	Концентрация в конце, моль/л	Объем в начале и в конце, мкл	Интенсивность в начале и в конце, kHz
Pt_peg	$1,25 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$	50 - 600	25 - 165
Pt_peg (ПВП)	$1,25 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-5}$	50 - 600	40 - 300
Альбумин	$1 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-5}$	14 - 40	110 - 400

Таблица 10 – Сводная информация об используемых концентрациях и соответствующих интенсивностях рассеянного света для PT_peg.

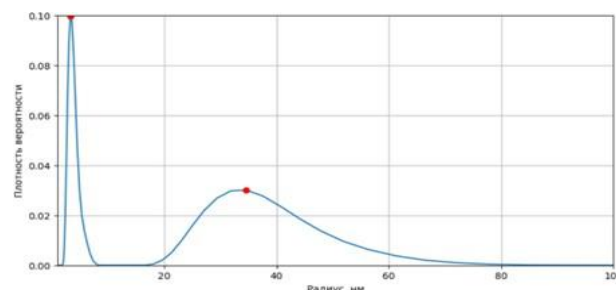
Сывороточный альбумин человека

В рамках валидации методики и оценки влияния условий измерения на параметры САЧ была проведена серия экспериментов с водными растворами сывороточного альбумина человека. Результаты анализа распределения по гидродинамическому радиусу, полученные как методами статистической обработки, так и при помощи программного обеспечения DynaLS, представлены на рисунке 45 и в таблице 11. В обоих случаях наблюдалось наличие двух пиков: основной пик с максимумом около 3.6 нм, соответствующий мономерной форме альбумина, и дополнительный пик на уровне 36 нм, который, вероятно, отражает

наличие агрегированных форм белка или временно ассоциированных молекул. Значение основного радиуса согласуется с данными, представленными в разделе 4.3. настоящей работы.



(а) Распределение интенсивности рассеянного света от концентрации САЧ.



(б) Функция плотности распределения интенсивности рассеянного света САЧ.

Рисунок 45 – Сопоставление распределений при использовании DynaLS и статистического метода

DynaLS		Статистический подход	
1 пик	2 пик	1 пик	2 пик
2.5 ± 0.2 нм	29 ± 3 нм	3.6 ± 0.9 нм	36 ± 10 нм

Таблица 11 – Сопоставление гидродинамических радиусов мономерной формы САМ и временно ассоциированной в водном растворе.

Сопоставление результатов, полученных при помощи DynaLS и реализованной в данной работе статистической обработки, показало высокую степень согласия. В связи с этим для дальнейшего анализа использовался исключительно статистический подход, как менее трудоёмкий и более устойчивый к вариативности многократных измерений.

Для определения оптимальной концентрации альбумина была построена зависимость гидродинамического радиуса от его концентрации в растворе (рисунок 46).

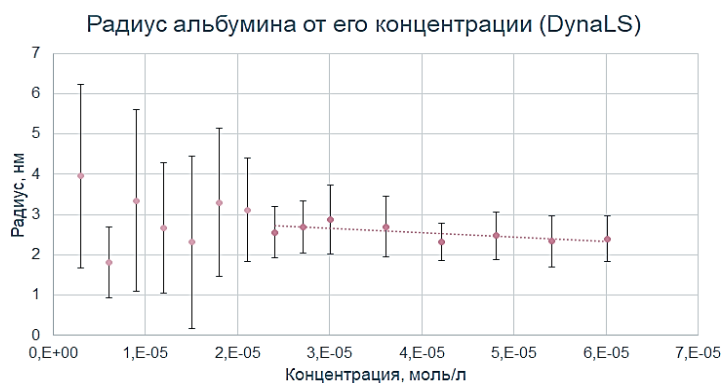
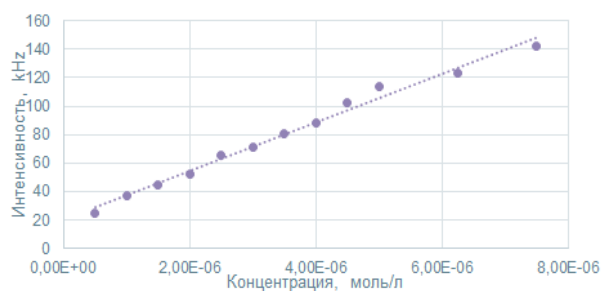


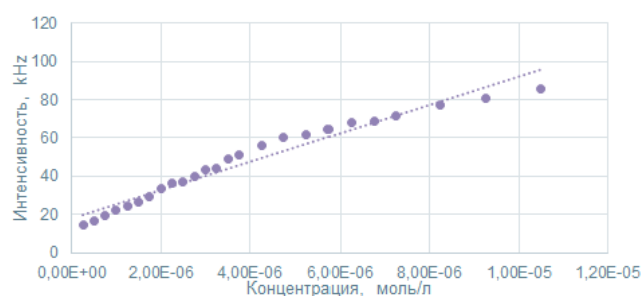
Рисунок 46 – График зависимости гидродинамического радиуса САЧ от его концентрации в водном растворе для мономерной формы

Анализ данного распределения позволил выделить область, в которой измерения характеризуются наименьшей дисперсией. В результате в качестве стандартной рабочей концентрации была выбрана величина 3×10^{-5} моль/л. Эта концентрация использовалась во всех последующих экспериментах по исследованию взаимодействия альбумина с фотосенсибилизаторами.

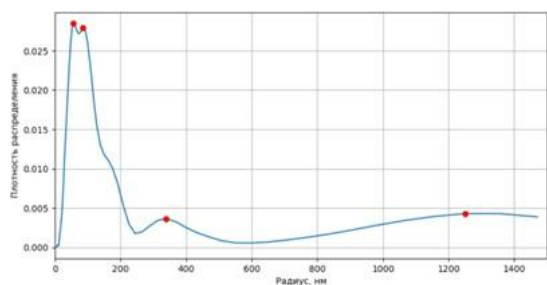
Результаты распределений по гидродинамическому радиусу ФС РТ_рег, полученные методами статистической обработки, указывают на двухкомпонентный характер исходного раствора. Основные пики локализованы в областях 90 нм и 197 нм (рисунок 47 и таблица 12), что свидетельствует о наличии двух преобладающих компонент наночастиц. Малый пик около 22 нм был отнесён к свободным молекулам поливинилпирролидона, использованному при стабилизации системы. Его интерпретация как ПВП обусловлена характерно низкой интенсивностью рассеяния и подтверждается результатами раздела 4.2. настоящей работы.



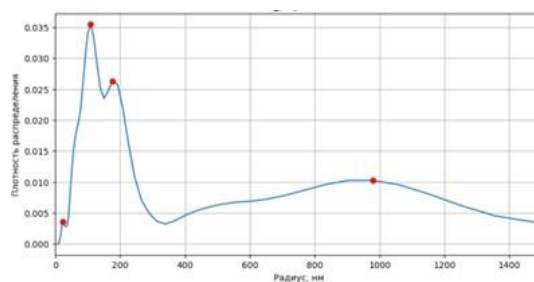
(а) Распределение интенсивности рассеянного света ФС от концентрации РТ_рег.



(б) Распределение интенсивности рассеянного света ФС от концентрации РТ_рег с ПВП.



(в) Функция плотности распределения интенсивности рассеянного света РТ_рег.



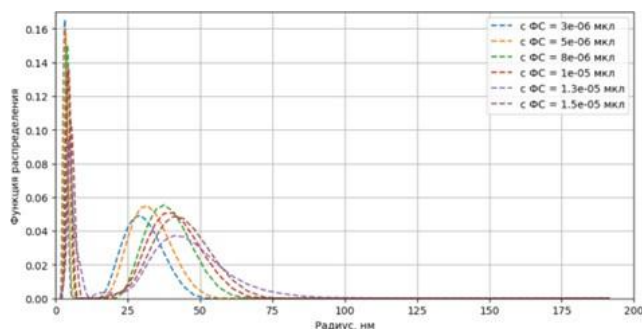
(г) Функция плотности распределения интенсивности рассеянного света РТ_рег_ПВП.

Рисунок 47 – Сопоставление распределений ФС РТ_рег без/с ПВП

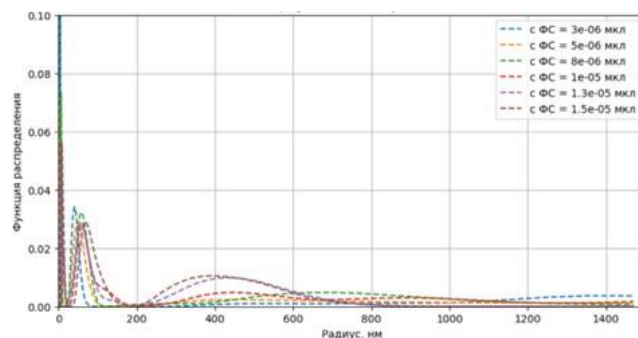
	РТ_рег	РТ_рег ПВП
1 пик	45 ± 14 нм	Ассоциаты ПВП
2 пик	112 ± 37 нм	90 ± 28 нм
3 пик	Артефактный пик	197 ± 40 нм
4 пик	Артефактный пик	Артефактный пик

Таблица 11 – Сопоставление гидродинамических радиусов ФС РТ_рег без/с ПВП в водном растворе соответственно.

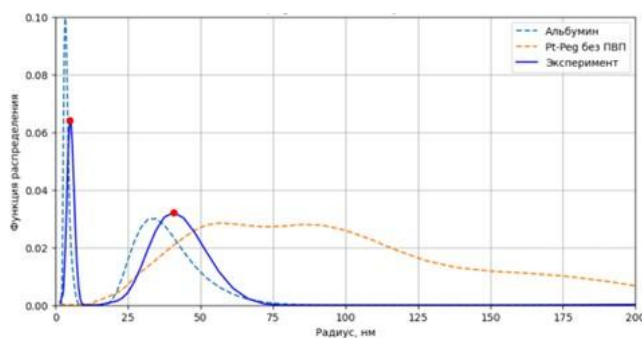
Для анализа взаимодействия РТ_рег с САЧ были проведены измерения в водных растворах при фиксированной концентрации САЧ. На рисунке 48 представлена усреднённая функция распределения для водного раствора РТ_рег без ПВП с альбумином.



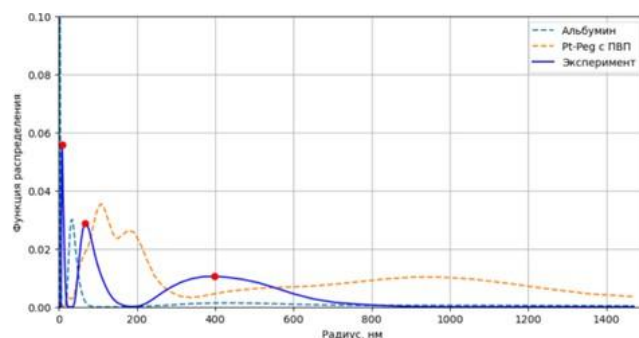
(в) Функция плотности распределения интенсивности рассеянного света РТ_рег для различных концентраций ФС в водном растворе с САЧ.



(б) Функция плотности распределения интенсивности рассеянного света РТ_рег ПВП для различных концентраций ФС в водном растворе с САЧ.



(в) Функция плотности распределения интенсивности рассеянного света Pt_reg при максимальной концентрации ФС в водном растворе с САЧ.



(г) Функция плотности распределения интенсивности рассеянного света Pt_reg ПВП при максимальной концентрации ФС в водном растворе с САЧ.

Рисунок 48 – Сопоставление распределений ФС Pt_reg без/с ПВП в водном растворе с САЧ

Анализ показал, что структура распределения остаётся неизменной — новых пиков не возникает, что указывает на отсутствие специфического взаимодействия между наночастицами Pt_reg и альбумином. Данный результат согласуется с литературными предпосылками, согласно которым прямое связывание данного ФС с альбумином не предполагается.

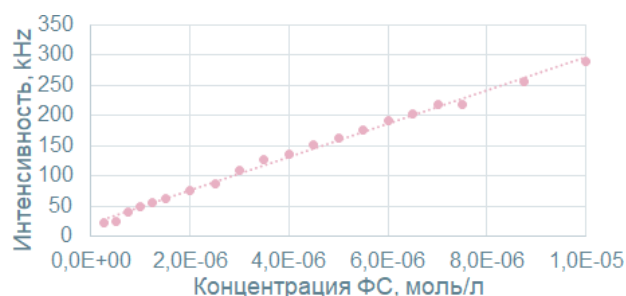
Однако в случае системы, содержащей как Pt_reg, так и ПВП, наблюдаются иные результаты: на распределении появляется новый пик в области 400 нм (рисунок 48 (г)), что может быть интерпретировано как формирование крупных белково-полимерных комплексов. Появление данного пика подтверждает, что ПВП способен взаимодействовать с альбумином с образованием агрегатов значительных размеров, как было показано в разделе 4.2. настоящей работы, а также подтверждается независимыми данными из литературы [97]. Следовательно, хотя сам фотосенсибилизатор Pt_reg не проявляет взаимодействия с белком, присутствие ПВП существенно влияет на поведение системы и должно учитываться при интерпретации данных.

5.3. Модификации гетероциклического аналога фталоцианина магния (S27_Na) и сывороточный альбумин

Образец	Концентрация в начале, моль/л	Концентрация в конце, моль/л	Объем в начале и в конце, мкл	Интенсивность в начале и в конце, kHz
S27_Na без ПВП	$2,5 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-5}$	50-600	50 - 422
S27_Na с ПВП	$2,5 \cdot 10^{-6}$	$3 \cdot 10^{-5}$	50-600	10 - 72
Альбумин	$1 \cdot 10^{-5}$	$3 \cdot 10^{-5}$	14 - 40	110 - 400

Таблица 12 – Сводная информация об используемых концентрациях и соответствующих интенсивностях рассеянного света для S27_Na.

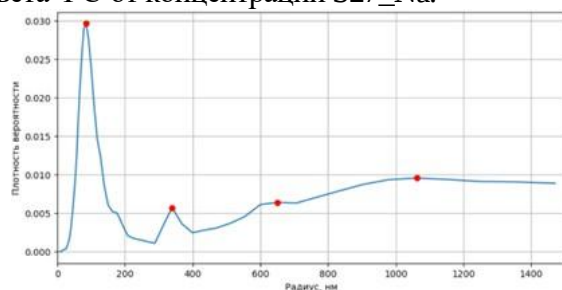
Фотосенсибилизатор S27_Na представляет собой многокомпонентную коллоидную систему, характеризующуюся высокой степенью полидисперсности. Распределение гидродинамических радиусов, полученное методом динамического светорассеяния, демонстрирует наличие множества пиков в интервале от 0 до 400 нм (рисунок 49 и таблица 13).



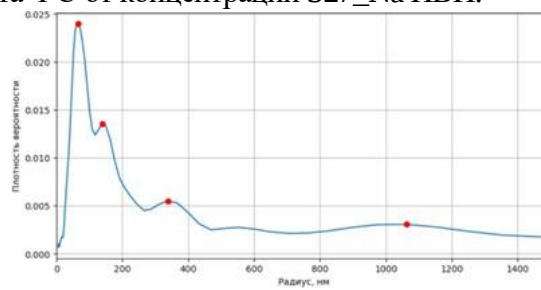
(а) Распределение интенсивности рассеянного света ФС от концентрации S27_Na.



(б) Распределение интенсивности рассеянного света ФС от концентрации S27_Na ПВП.



(в) Функция плотности распределения интенсивности рассеянного света S27_Na.



(г) Функция плотности распределения интенсивности рассеянного света S27_Na ПВП.

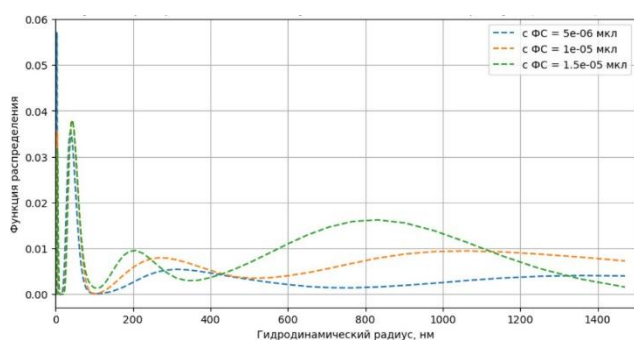
Рисунок 49 – Сопоставление распределений ФС S27_Na без/с ПВП в водном растворе с САЧ

	S27_Na	S27_Na ПВП
1 пик	92 ± 38 нм	62 ± 23 нм
2 пик	336 ± 24 нм	162 ± 36 нм
3 пик	Артефактный пик	339 ± 52 нм
4 пик	Артефактный пик	Артефактный пик

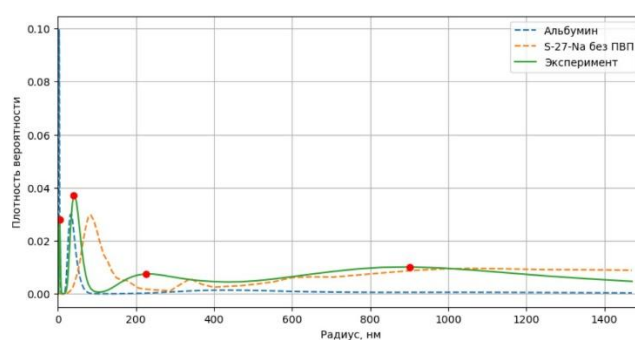
Таблица 13 – Сопоставление гидродинамических радиусов ФС S27_Na без/с ПВП в водном растворе соответственно.

Основные пики, соответствующие стабильным фракциям наночастиц, представлены в таблице 13. Их положение и относительная интенсивность указывают на наличие нескольких устойчивых агрегатных состояний в системе, что может быть обусловлено как внутренней структурной неоднородностью, так и частичной агрегацией отдельных фракций.

Для оценки взаимодействия наночастиц S27_Na с белком была проведена серия измерений в водном растворе с САЧ, как в присутствии, так и в отсутствие стабилизирующего полимера — поливинилпирролидона (ПВП). Результаты анализа водных растворов S27_Na без ПВП с САЧ показали появление нового пика в области 250 нм (рисунок 50), что свидетельствует о формировании новых структурных агрегатов.



(а) Функция плотности распределения интенсивности рассеянного света РТрег для различных концентраций ФС в водном растворе с САЧ.

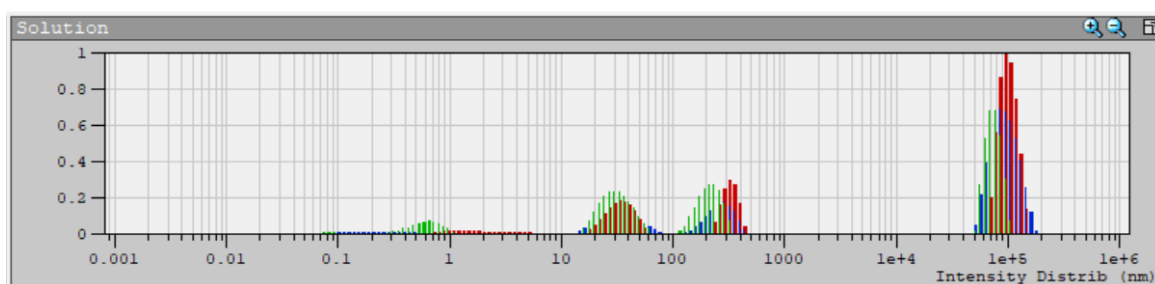


(б) Функция плотности распределения интенсивности рассеянного света РТрег при максимальной концентрации ФС в водном растворе с САЧ.

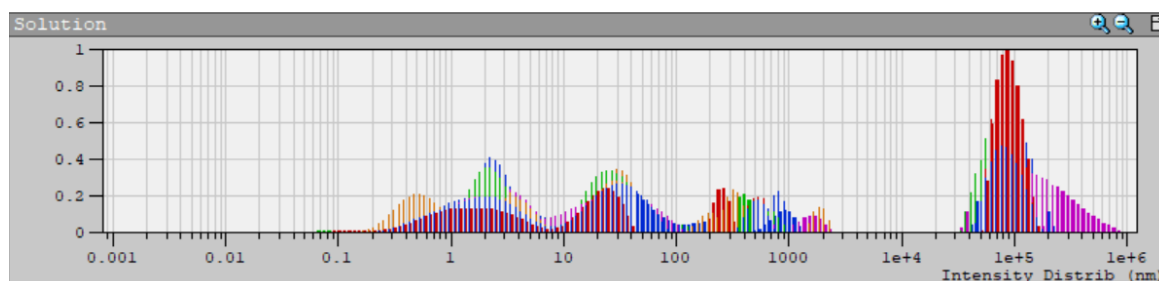
Рисунок 49 – Сопоставление распределений ФС S27_Na без/с ПВП в водном растворе с САЧ

Появление данного пика можно интерпретировать как результат специфического взаимодействия между наночастицами и белковыми молекулами, приводящего к образованию белково-полимерных комплексов, отличающихся по размеру от исходных компонентов.

Дополнительно были проанализированы распределения размеров для двух образцов: (1) S27_Na, стабилизированного ПВП в чистом виде (рисунок 50 (а)), и (2) того же образца в присутствии альбумина (рисунок 50 (б)).



(а) Распределение нормированного вклада интенсивности (относ. ед.) от значений гидродинамического радиуса (нм) S27_Na ПВП. Фрагменты обработки результатов измерений в программе DynaLS.



(б) Распределение нормированного вклада интенсивности (относ. ед.) от значений гидродинамического радиуса (нм) S27_Na ПВП в водном растворе САЧ. Фрагменты обработки результатов измерений в программе DynaLS.

Рисунок 50 – Сопоставление гидродинамических радиусов ФС РТ_ред без/с ПВП в водном растворе соответственно.

В последнем случае наблюдается существенное усложнение распределения: фиксируется появление большого количества дополнительных пиков, отражающих образование множественных агрегатных форм. Высокая плотность и перекрытие этих пиков делают невозможным их индивидуальную идентификацию, однако сам факт появления новых компонентов в распределении

однозначно указывает на наличие интенсивного взаимодействия между компонентами системы.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что наночастицы S27_Na склонны к взаимодействию с сывороточным альбумином как в чистом виде, так и в присутствии ПВП. При этом присутствие ПВП усиливает полидисперсность системы и приводит к формированию сложноорганизованных агрегатов. Для исследуемых образцов ФС S27_Na–ПВП взаимодействие с альбумином сопровождается образованием многокомпонентной дисперсной среды, содержащей свободные молекулы САЧ, ПВП, агрегаты ФС различной природы, а также их ассоциаты. В таких условиях метод динамического рассеяния света (ДРС) теряет свою эффективность, так как становится невозможно корректно интерпретировать автокорреляционные функции, и, следовательно, невозможно надёжно определить гидродинамические радиусы отдельных фракций. Особенно это затруднительно в случае, когда интенсивности рассеяния от всех компонентов находятся в пределах одного порядка величины.

В связи с этим, для изучения параметров взаимодействия фотосенсибилизатора с белком были привлечены методы спектрофотометрии и спектрофлуориметрии, позволяющие анализировать характер взаимодействий на основе сдвига полос поглощения, появления или исчезновения флуоресцентных максимумов, а также изменения интенсивности флуоресценции при варьировании концентрации белка. Эти методы обладают достаточной чувствительностью и разрешающей способностью для анализа как кинетических, так и равновесных параметров связывания, и тем самым обеспечивают возможность комплексной характеристики взаимодействия ФС с основными белками крови.

5.4. Флуоресцентный и спектрофотометрический анализ способных к самосборке амфифильных ФС

Исследование взаимодействий способных к самосборке амфифильных ФС с белками крови имеет ключевое значение для оценки их стабильности и поведения в биологических средах. Особый интерес представляет фотосенсибилизатор S27_Na, способный самостоятельно формировать мицеллярные агрегаты в водных растворах за счёт амфифильной природы молекулы. Для оценки его взаимодействия с основным транспортным белком плазмы крови — БСА, как характерный модельный пример — были применены спектрофотометрический и флуориметрический методы, позволяющие оценить степень дезагрегации, а также кинетику и аффинность связывания.

В ходе эксперимента проводилось титрование 2,5 мл свежеприготовленного раствора S27_Na (концентрация 10 мкМ) 4%-ным раствором БСА в фосфатно-солевом буфере с pH 7,0–7,2. Концентрация альбумина варьировалась от $10^{-7,6}$ до $10^{-3,26}$ моль/л, что сопоставимо с диапазоном физиологической концентрации БСА в крови человека (порядка 0,6 мМ). Полученные спектры поглощения показали, что при увеличении концентрации альбумина спектральный профиль S27_Na претерпевает существенные изменения: спектр приобретает форму, близкую к спектру индивидуального раствора S27_Na в диметилсульфоксиде (ДМСО). Это указывает на дезагрегацию мицеллярных наночастиц под действием белка и формирование мономерных форм ФС, что может быть обусловлено взаимодействием молекул S27_Na с гидрофобными участками альбумина (рисунок 51). Где $c_1 = 10^{-7,6} \frac{\text{моль}}{\text{л}}$; $\text{pc}(\text{BSA}) = -\lg c_1 = 7,6$.

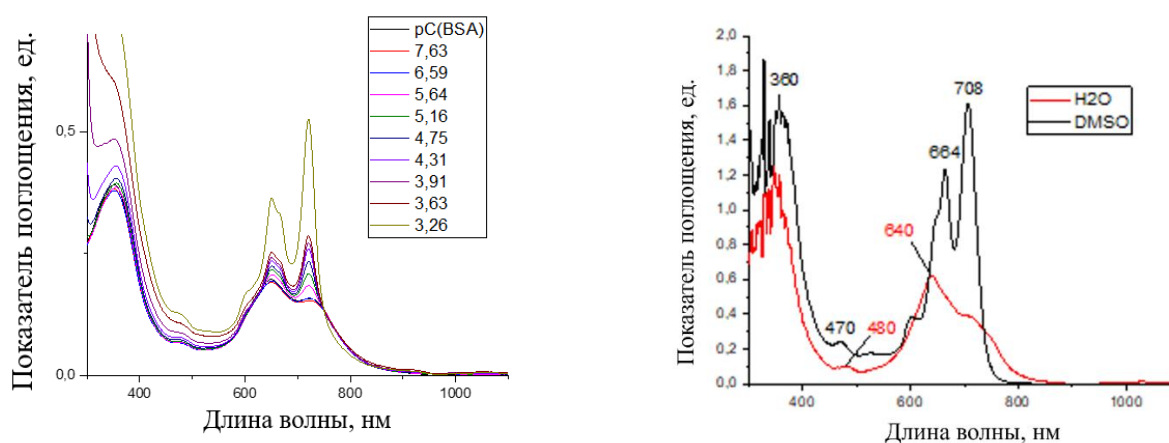


Рисунок 51 – Спектры поглощения S27_Na при добавлении раствора альбумина (слева) и в водном растворе и диметилсульфоксиде (DMSO, справа).

Дополнительно, метод спектрофлуориметрии подтвердил данные наблюдения: при увеличении концентрации альбумина регистрируется рост интенсивности флуоресценции, характерный для мономерной формы S27_Na (рисунок 52).

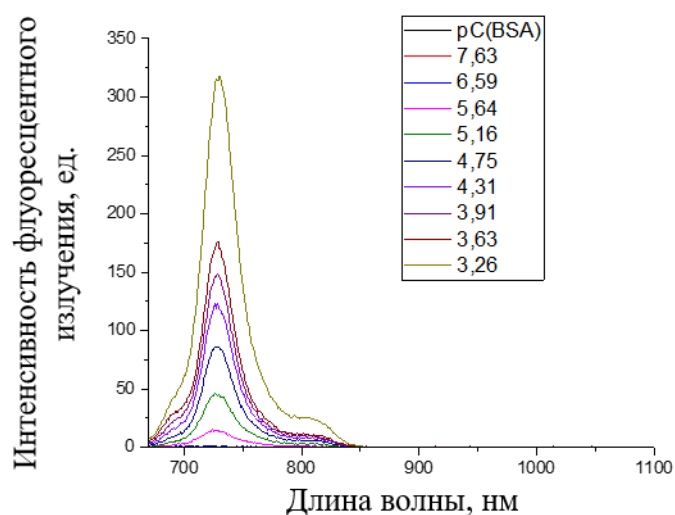


Рисунок 52 – Разгорание флуоресценции (увеличение интенсивности флуоресценции) мономера S27_Na при добавлении БСА.

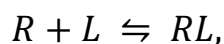
Данное явление интерпретируется как «разгорание» флуоресценции, отражающее уменьшение межмолекулярного тушения в агрегированных формах и стабилизацию мономеров в гидрофобных карманах белка. Наблюдаемая зависимость между ростом концентрации альбумина и усилением флуоресценции

служит прямым доказательством специфического связывания между ФС и белком, приводящего к структурной дезагрегации исходных мицеллярных наночастиц.

Определение константы связывания методом флуориметрии

Для количественного анализа взаимодействия фотосенсибилизаторов (ФС) с белками, в частности с БСА, применялся метод флуориметрии, основанный на измерении изменений интенсивности флуоресценции при последовательном титровании раствора ФС раствором белка. Полученные данные интерпретировались с использованием логарифмического уравнения Бенези–Хильдбранда (Benesi–Hildebrand) или его модификаций, применяемых для оценки параметров связывания.

Рассматривается равновесие:



где R – рецептор (сывороточный альбумин), L – лиганд, молекула альбумина и RL – их комплекс. Общая формула уравнения связывания, применяемая в логарифмической формуле:

$$\log\left(\frac{[RL]}{[L]}\right) = \log K_a + n \log [R],$$

где K_a – константа ассоциации, n – число связывающих сайтов. Однако невозможно напрямую измерить концентрации $[RL]$, $[R]$, $[L]$ — вместо этого используется интенсивность флуоресценции, которая в первом приближении линейно связана с концентрацией флуорофора. Пусть: F_0 – интенсивность флуоресценции ФС в отсутствии сывороточного белка (все молекулы находятся в свободной форме в водном растворе), F – интенсивность флуоресценции при заданной концентрации белка, тогда выражение $F_0 - F$ пропорционально

количеству связанных молекул ФС. Это позволяет перейти от концентраций к наблюдаемым величинам:

$$\frac{F_0 - F}{F} \propto \frac{[RL]}{[L]}$$

Логарифмируя, получим:

$$\log\left(\frac{F_0 - F}{F}\right) = \log K_a + n \log [Q],$$

где $[Q]$ – концентрация сывороточного альбумина, n – число сайтов связывания, K_a – константа ассоциации (binding constant). Такое логарифмическое уравнение лежит в основе модели Стерна-Фолмера, часто применяемой при анализе динамического или статического тушения флуоресценции, и позволяет по углу наклона прямой определить число сайтов связывания (n), а также по пересечению с осью — логарифм константы ассоциации $\log K_a$. Такое приближение справедливо, если квантовый выход флуоресценции различается между свободной и связанной формой ФС, а связывание происходит в состоянии равновесия [101, 102]. Аналогично вышеизложенным рассуждениям, построим функцию $\log\left(\frac{[RL]}{[L]}\right)$ от логарифмической концентрации БСА $\text{pc}(\text{BSA}) = -\lg c_1$ (рисунок 53).

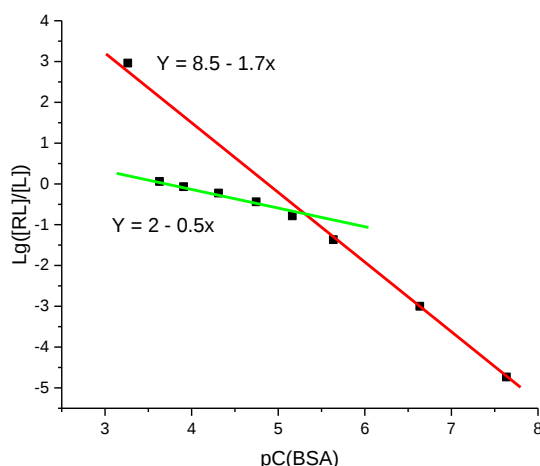


Рисунок 52 – Линейная функция зависимости для S27_Na в соответствии с уравнением Бенези–Хильдбранда

Результаты полученных констант представлены в таблице 14.

	Константа связывания K_a (M^{-1})	Сайт связывания, n
S27_Na	$3,16 \times 10^8 M^{-1}$	1,7
	$1,02 \times 10^2 M^{-1}$	0,5

Таблица 14 – Константы для образца S27_Na, полученные по результатам флуориметрии.

В результате флуоресцентного анализа взаимодействия фотосенсибилизатора S27_Na с БСА были получены численные значения констант связывания (binding constant) и числа сайтов связывания (binding site) в двух экспериментальных сериях.

Для свежеприготовленного раствора фотосенсибилизатора установлена высокая константа связывания $K_a = 3,16 \times 10^8 M^{-1}$, что соответствует высокой аффинности — то есть высокой степени сродства молекул фотосенсибилизатора к белку. Это означает, что взаимодействие протекает эффективно даже при низких концентрациях белка. Расчётное значение числа сайтов связывания $n = 1,7$ указывает, что в среднем одна молекула альбумина способна связывать до двух молекул фотосенсибилизатора, что подтверждает мультицентрический характер взаимодействия.

Во второй серии эксперимента, проведённой через 6 часов после приготовления образца, наблюдается резкое снижение константы связывания: $K_a = 1,02 \times 10^2 \text{ M}^{-1}$, что соответствует низкой аффинности взаимодействия. Значение $n = 0,5$ указывает, что лишь часть молекул белка способна к связыванию, или же взаимодействие происходит менее эффективно — вероятно, за счёт частичной агрегации ФС, снижающей доступность отдельных молекул для связывания.

Полученные зависимости аппроксимировались в логарифмической форме уравнения: $\log\left(\frac{[RL]}{[L]}\right) = \log K_a + n \log[R]$, где углы наклона прямых (определяемые значением n) и их сдвиг по оси ординат (связанной с $\log K_a$) позволяют визуально различить два режима взаимодействия: один — для свежего, активного состояния ФС, другой — после хранения, при частичной деградации или агрегации. Это подчёркивает временную нестабильность агрегатов S27_Na и актуальность изучения кинетики их взаимодействия с белком для оценки стабильности фармакоформы.

Аналогичные результаты были получены для образца S27_Na с пассивной нагрузкой – ПВП (рисунок 53, 54, 55 и таблица 15).

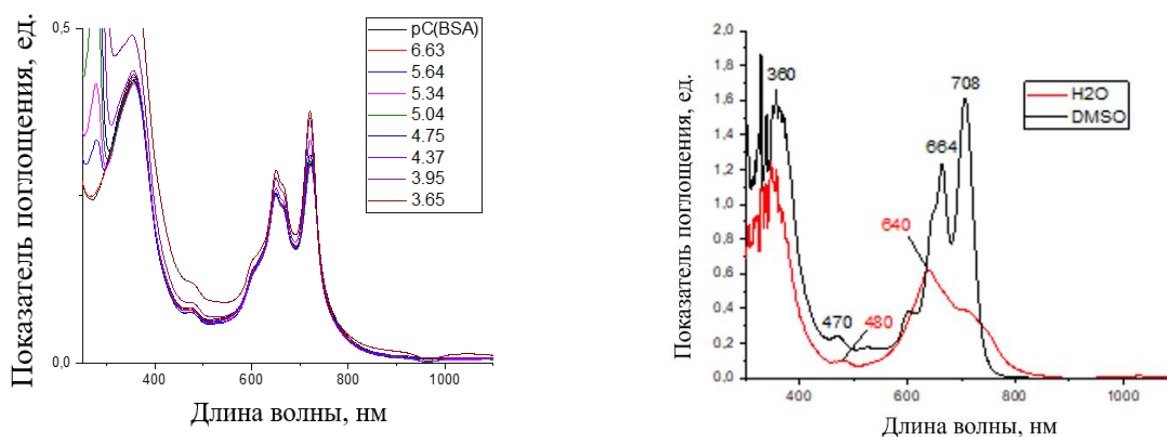


Рисунок 53 – Спектры поглощения S27_Na ПВП при добавлении раствора альбумина (слева) и в водном растворе и диметилсульфоксиде (DMSO, справа).

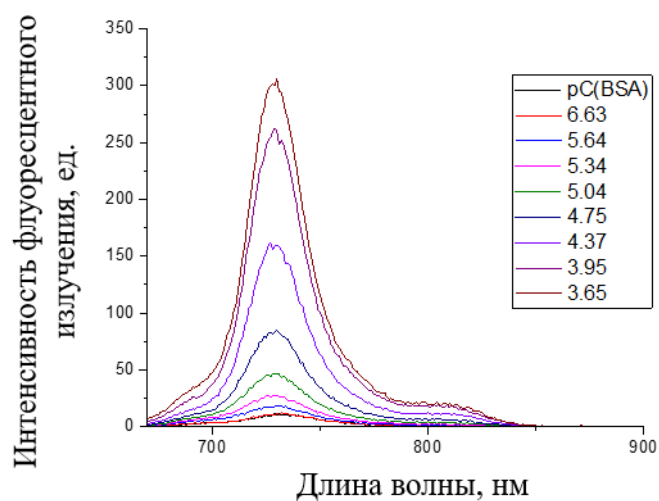


Рисунок 54 – Разгорание флуоресценции (увеличение интенсивности флуоресценции) мономера S27_Na ПВП при добавлении БСА.

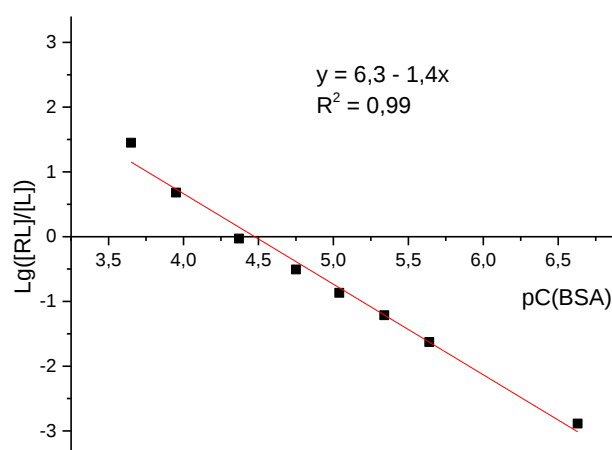


Рисунок 55 – Линейная функция зависимости для S27_Na ПВП в соответствии с уравнением Бенези–Хильдбранда

	Константа связывания K_a (M^{-1})	Сайт связывания, n
S27_Na	$2 \times 10^6 M^{-1}$	1,4

Таблица 15 – Константы для образца S27_Na ПВП, полученные по результатам флуориметрии.

В случае образца S27_Na ПВП спектральные изменения при титровании сывороточным альбумином не демонстрируют чёткой картины перехода фотосенсибилизатора в мономерное состояние, характерной для индивидуального S27_Na. Вместе с тем, расчёты по логарифмической аппроксимации зависимости $\log\left(\frac{[RL]}{[L]}\right) = \log K_a + n \log[R]$ показали, что значение константы связывания составляет $2 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, а число сайтов связывания — $n = 1.4$. Эти данные указывают на несколько сниженную аффинность комплекса к белку по сравнению с индивидуальным S27_Na ($3.16 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$) и менее выраженную кооперативность связывания.

Следует отметить, что теоретически наличие в составе наночастиц поливинилпирролидона (ПВП) должно снижать степень π – π агрегации порфиразинового хромофора, тем самым повышая доступность молекул ФС к взаимодействию с белком. Однако экспериментально такого усиления не наблюдается. Это может быть объяснено конкурентной природой взаимодействия в системе: при разрушении структуры наночастиц сывороточный альбумин высвобождает как индивидуальные молекулы фотосенсибилизатора, так и свободные молекулы ПВП. Последние, как было показано ранее в разделе 4.2. настоящей работы, обладают собственной способностью связываться с альбумином, снижая тем самым доступность белка для ассоциации непосредственно с ФС. Таким образом, для достижения сопоставимой степени связывания ФС с белком, в системе с ПВП требуется большее количество молекул альбумина, чем в случае индивидуального ФС. Это подчёркивает необходимость учёта многокомпонентной природы растворов при интерпретации данных флуоресцентного анализа.

Заключение. Основные результаты и выводы.

В настоящей диссертационной работе проведено комплексное экспериментальное исследование наночастиц фотосенсибилизаторов третьего поколения, разработанных на основе как способных к самосборке амфифильных ФС, так и наночастиц на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера. С помощью совокупности оптических методов — динамического рассеяния света, спектрофотометрии и спектрофлуориметрии — были получены количественные и качественные характеристики частиц в водной и белковой средах, а также проанализирована их стабильность, кинетика взаимодействий и селективность связывания в модельных водных растворах с транспортным белком плазмы крови. Результаты работы позволяют расширить представления о поведении фотосенсибилизаторов в физиологических условиях и определить критерии их пригодности для дальнейшего доклинического применения в составе фармакологических форм, используемых в фотодинамической терапии.

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

1. Впервые определены характерные гидродинамические радиусы исследуемых типов наночастиц ФС:
 - наночастицы на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера:
 - IB-25 $R_h = 88 \pm 15$ нм;
 - PT-5 $R_h \in [50; 80]$ нм;
 - VP-6 $R_h = 96 \pm 28$ нм;
 - PT-1 $R_h = 64 \pm 18$ нм;
 - способные к самосборке амфифильные ФС:
 - S_27_Na без ПВП: $R_h = 92 \pm 38$ нм;
 - S_27_Na с ПВП: $R_h = 62 \pm 23$ нм и $R_h = 162 \pm 36$ нм;
 - PT_peg без ПВП: $R_h = 45 \pm 14$ нм и $R_h = 112 \pm 37$ нм;

PT_peg с ПВП: $R_h = 90 \pm 28$ нм и $R_h = 197 \pm 40$ нм.

2. Исследована стабильность наночастиц в зависимости от временного фактора (общая стабильность), а также светового воздействия: для всех исследованных ФС было показано, что наночастицы сохраняют стабильность на протяжении нескольких месяцев (более 3 месяцев для VP-6 и более 6 месяцев для PT-1). Также установлено, что световое воздействие ($\lambda = 647$ нм) не оказывает значительного влияния на строение наночастиц в течение до 4,5 часов эксперимента;
3. Исследовано возможное влияние концентрации ПВП на средний гидродинамический радиус наночастиц на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера: для VP-6 с мольным соотношением ПВП 1:1, 1:2 и 1:5 были получены следующие значения гидродинамических радиусов: $R_h = 37,2 \pm 4,7$ нм, $R_h = 43,6 \pm 6,5$ нм и $R_h = 59,3 \pm 15,2$ нм соответственно.

Для PT-1 в тех же условиях значения радиусов варьировались от $R_h = 112 \pm 28$ нм до $R_h = 265 \pm 39$ нм;

4. Исследовано взаимодействие наночастиц ФС с основным транспортным белком крови — сывороточным альбумином:

- наночастицы на основе гидрофобных ФС и амфифильного полимера:

Для IB-25, VP-6 и PT-1 показано отсутствие значимого взаимодействия с сывороточным альбумином, что свидетельствует о сохранении их стабильности в белковой среде.

- способные к самосборке амфифильные ФС:

Для S_27_Na и PT_peg без ПВП выявлены новые пики ~ 200 нм (взаимодействие с альбумином). При добавлении ПВП наблюдаются дополнительные пики (~ 400 нм), что обусловлено не только связыванием свободного ПВП с белком, но и ослаблением взаимодействия между наночастицами S_27_Na вследствие экранирования π - π стекинг-взаимодействий, приводящего к формированию менее устойчивых комплексов ФС.

- Константа связывания для свежеприготовленного образца S_27_Na составила $3,16 \cdot 10^8$ M^{-1} , с кинетикой процесса, продолжающейся не менее 60 минут. Сайт связывания $n = 1,7$. Константа связывания для образца S_27_Na составила $1,02 \cdot 10^2$ M^{-1} , с кинетикой процесса,

продолжающейся не менее 60 минут. Сайт связывания $n = 0,5$.

- Константа связывания для S_27_Na ПВП составила $2 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, с кинетикой процесса, продолжающейся не менее 60 минут. Сайт связывания $n = 1,4$.
- 5. Разработан процесс обработки данных ДРС, включающий методику подбора оптимальных концентраций для полидисперсных систем и статистический подход к анализу корреляционных функций, исключающий субъективное влияние корректировок погрешности аппроксимации.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю — к.ф.-м.н., доценту Сергеевой И.А. — за всестороннюю помощь, научное руководство, поддержку и конструктивные рекомендации на всех этапах выполнения диссертационной работы.

Особая признательность выражается оппонентам — д.ф.-м.н., профессору Белогорохову И.А. (ИФАВ РАН), д.ф.-м.н., старшему научному сотруднику Дубровину Е.В. (кафедра физики полимеров и кристаллов МГУ), д.ф.-м.н., профессору Короленко П.В. (кафедра оптики, спектроскопии и физики наносистем МГУ) — за внимательное прочтение работы, конструктивные замечания и ценные предложения, способствовавшие улучшению содержания и качества диссертации.

Автор благодарит кафедру молекулярных процессов и экстремальных состояний вещества физического факультета МГУ, а также Группу анизотропных жидкостей и растворов за предоставленные возможности и научную среду, способствующую проведению настоящего исследования.

Выражается благодарность д.х.н. Пушкареву В.Е. и к.х.н. Тарakanову П.А. (ИФАВ РАН) за помощь, ценные советы и постоянную поддержку на всех этапах работы.

Автор также благодарит всех коллег и сотрудников научных коллективов, чья работа и обсуждения внесли вклад в развитие темы настоящей диссертации.

И, наконец, автор выражает глубокую признательность своим родителям — Крот Р.И. и Крот Л.В. — за терпение, понимание, поддержку и веру в успех, без которых данная работа не могла бы состояться.

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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

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

статьи = 0,875 п.л., личный вклад = 0,149 п.л.

Прочие публикации по теме диссертации:

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

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

- [1] Каприна А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность) // М.: МНИОИ им. П.А. Герцена. 2018.
- [2] Кабанова М.А., Волгин В.Н., Попова Н.М., Сачек О.И., Шелепова Е.А. Клинические проявления базальноклеточного рака кожи и результативность лечения пациентов // Современные проблемы здравоохранения и медицинской статистики. № 2. 2018.
- [3] Горохов В.В. К оценке результатов фотодинамической терапии рака кожи // Креативная хирургия и онкология. 2014. С. 7 -8.
- [4] Капинус В.Н., Каплан М.А., Ярославцева-Исаева Е.В., Спиченкова И.С. Фотодинамическая терапия базальноклеточного рака кожи головы и шеи с дополнительным внутритканевым лазерным облучением // Biomedical photonics. 2017. Vol. 6, № 4. PP. 20-26.
- [5] Церковский Д.А., Маслаков Е.А., Багринцев Д.А., Семак И.А., Протопович Е.Л., Чиж А.Г., Татур А.А., Фоменков И.С., Ступак Д.С. Роль фотодинамической терапии в лечении первичных, рецидивных и метастатических злокачественных опухолей головного мозга // Biomedical photonics. 2018. Vol. 7, № 2. PP. 37-49.
- [6] Е.В. Бережная. Изменение митохондриального метаболизма и роль факторов транскрипции NF-κB, AP-1 И NIF-1 при фотодинамическом повреждении нейронов и глиальных клеток // Диссертация. ЮФУ. Ростов-на-Дону. 2016.
- [7] Молочков А.В., Каприн А.Д., Галкин В.Н., Молочков В.А., Каплан М.А., Сухова Т.Е., Иванов С.А., Романко Ю.С., Попучиев В.В., Эпатова Т.В. Лечение базально-клеточной карциномы с использованием фотодинамической терапии и локальном применении

- фотосенсибилизатора фотолон // Радиация и риск. 2015. Т. 24, № 1. С. 108–117.
- [8] *Elvin Blanco, Haifa Shen, Mauro Ferrari*. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery // *Nature Biotechnology*. 2015. Vol. 33. PP. 941-951.
- [9] *Triantafyllos S.* EPR-effect: Utilizing size-dependent nanoparticle delivery to solid tumors // *Therapeutic delivery*. 2013. Vol. 4, № 4.
- [10] *Agostinis P., Berg K., Cengel K., Foster Th.* Photodynamic Therapy of Cancer // *CA A Cancer Journal for Clinicians*. 2011. Vol. 61, № 4. PP. 250-281.
- [11] *Узденский А.Б.* Клеточно-молекулярные механизмы фотодинамической терапии // Издательство: Наука. 2010. С. 326.
- [12] *Рыбкин А.* Фотофизические и фотодинамические свойства водорастворимых гибридных структур фуллерен-краситель // ФГБУН институт проблем химической физики РАН. Черноголовка. 2015.
- [13] *Krasnovsky A.A.* Singlet oxygen and primary mechanisms of photodynamic therapy and photodynamic diseases // Publisher: Research Signpost, Trivandrum. 2007. PP.17-62.
- [14] *Selbo PK, Hogset A, Prasmickaite L, Berg K.* Photochemical internalisation: a novel drug delivery system // *Tumour Biol*. 2002. Vol. 23. PP. 103-112.
- [15] *Bagdonas S., Dahle J., Kaalhus O. and Moan J.* Cooperative inactivation of cells in microcolnies treated with UVA radiation // *Rad. Res*. 1999. PP. 174-179.
- [16] *Moan J., Brune A., Hellborg R., Persson B.R.R, Pääkkönen R.* Visible light and UV Radiation // *Scandinavian Science Publisher*. 2001. PP. 69-85.
- [17] *Семенова А.И.* Гиперкальциемия и синдром распада опухоли // *Практическая онкология*. 2006. Т. 7, № 2. СС. 101-107.
- [18] *Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Peng Q.* Photodynamic therapy // *Journal of the National Cancer Institute*. 1998. V. 90, № 12. PP. 889-905.
- [19] <https://ru.wikipedia.org/wiki/Hematoporphyrin>

- [20] *Е. Странадоко, А. Радаев.* ФДТ в лечении злокачественных новообразований различных локаций // Центр лазерной медицины "Волшебный луч". Москва.
- [21] Альманах клинической медицины. 2016. Минск. Республика Беларусь.
- [22] *Салмин Р.М., Стенько А.А., Жук И.Г., Брагов М.Ю.* Основные направления фотодинамической терапии в медицине // Новости хирургии. 2008. Т. 16, № 3. СС. 155-162.
- [23] *Аветисов С.Э.* Отечественный фотосенсибилизатор «Радахлорин» в фотодинамической терапии опухолей эпи-бульбарной и хориоидальной локализации (экспериментальные исследования) // Вестник офтальмологии. 2005. № 5. СС. 9-13.
- [24] <http://www.chemguide.co.uk/analysis/uvvisible/beerlambert.html>
- [25] *Sharman W.M., van Lier J.E., Allen C.M.* Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems // Adv. Drug Deliv. Rev. 2004. V. 56. PP. 53-76.
- [26] *Соболев А.С., Розенкранц А.А., Ахлынина Т.В.* Направленный внутриклеточный транспорт фотосенсибилизаторов // Росс. хим. журнал. 2004. Т. 42. СС. 84-88.
- [27] *Bozzuto G., Molinari A.* Liposomes as nanomedical devices // International Journal of Nanomedicine. 2014. V. 10, № 1. PP. 975-999.
- [28] *Konan Y.N., Gurny R., Allemann E.* State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy // Journal of Photochemistry and Photobiology. V. 66, № 2. PP. 89-106.
- [29] *Konan Y.N., Gurny R., Allemann E.* Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles // International Journal of Pharmaceutics. 2002. V. 52, № 1-2. PP. 233-239.
- [30] *Oettgen P.* The role of ets factors in tumor angiogenesis // J Oncol. 2010. Vol. 2010. P. 767384.

- [31] *Hobbs S.K., et al.* Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998. Vol. 95. PP. 4607-4612.
- [32] *С. Терехов.* Биосовместимые полиэлектролитные микрогели для систем направленной доставки лекарств // *Дипломная работа. МГУ им. Ломоносова. Москва. 2012.*
- [33] *Тазина Е.В., Оборотова Н.А.* Селективная доставка препаратов в опухоль с помощью термочувствительных липосом и локальной гипертермии // *Российский биотерапевтический журнал*. 2008. Т. 7, № 3. СС. 4-12.
- [34] *Барышников А.Ю.* Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов // *Вестник РАМН*. 2012. № 3. СС. 23-31.
- [35] *Gijsens A., Missiaen L., Merlevede W., de Witte P.* Epidermal growth factor-mediated targeting of chlorin e_6 selectively potentiates its photodynamic activity // *Cancer Res*. V. 60. PP. 2197-2202.
- [36] *Крот А.* Межмолекулярное взаимодействие глобулярных белков с комплексами порфиразинов и фталоцианинов. *Дипломная работа. МГУ им. Ломоносова. Москва. 2017.*
- [37] *Balashova I.O., Pushkarev V. E., Shestov V. I., Tomilova L.G., Koifman O. I., Ponomarev G.V.* Synthesis and spectral properties of phthalocyanine–methylpheophorbide a covalently linked dyad // *Macroheterocycles*. 2015. V. 8, №3. P. 233.
- [38] *Stuzhin P.A., Tarakanov P., Shiryayeva S., Zimenkova A., Koifman O. I., Viola E., Pia Donzello M., Ercolani C. J.* Porphyrazines with annulated diazepine rings. 4. Synthesis and properties of Mg(II) tetradiazepinoporphyrazine carrying exocyclic styryl fragments // *J. Porphyrins Phthalocyanines*. 2012. 16. PP. 968-976.
- [39] *Tarakanov P.A., Tarakanova E.N., Dorovatovskii P.V., Zubavichus Ya. V., Khrustalev V.N., Trashin S.A., De Wael K., Neganova M. E., Mischenko D.V.,*

- Sessler J. L., Stuzhin P.A., Pushkarev V. E., Tomilova L. G.* Optical readout of controlled monomer–dimerself-assembly // *Dalton Trans.* 2018. V. 47. PP. 14169 – 14173.
- [40] <http://www.photocor.ru/>
- [41] *Кириченко М.Н., Саноева А.Т., Чайков Л.Л.* Появление артефактного пика в распределении частиц по размерам, измеряемым методом ДРС при малых концентрациях // *Краткие сообщения по физике ФИАН.* 2016. № 8. СС. 32 – 38.
- [42] *Chaikov L.L., Kirichenko M.N., Krivokhizha S.V., Zaritskiy A.R.* Dynamics of statistically confident particle sizes and concentrations in blood plasma obtained by the dynamic light scattering method // *J. Biomed. Opt.* 2015. V. 20, № 5.
- [43] *Крот А.Р., Строганова Ю.Д., Сергеева И.А., Федорова К.В., Коростей Ю.С., Балашова И.О., Пушкарев В.Е., Тараканов П.А.* Исследование устойчивости фотосенсибилизаторов на основе тетрапиррольных комплексов алюминия, магния и цинка при различных факторах // *УЗФФ.* 2018. № 3. С. 7.
- [44] *Jucai G., Yu T., Yonggang L., Fang H., Wenbo W.* Design strategies for aggregation-induced emission photosensitizers with enhanced safety in photodynamic therapy // *Coordination Chemistry Reviews.* 2024. V. 507, № 215756.
- [45] *Dr. Nahyun K., Hanyi W., Dr. Maneesha A., Dr. Gang Z.* Activatable Photosensitizers: From Fundamental Principles to Advanced Designs // *Angewandte Chemie International Edition.* 2025. V. 15, I. 15.
- [46] *Xiong X., Liu J., Wu L., et al.* Self-assembly strategies of organic small-molecule photosensitizers for photodynamic therapy // *Coordination Chemistry Reviews.* 2024. V. 510. Art. 215863.
- [47] *Zhao J., Gao Y., Huang R., et al.* Design of Near-Infrared-Triggered Metallo-Photosensitizers via a Self-Assembly-Induced Vibronic Decoupling Strategy // *J. Am. Chem. Soc.* 2023. V. 145, №21. PP. 11633–11642.

- [48] *Yang L., Liu Y., Ren X., et al.* Microemulsion-Assisted Self-Assembly of Indium Porphyrin Photosensitizers with Enhanced Photodynamic Therapy // *ACS Nano*. 2024. V. 18, №4. PP. 3161–3172.
- [49] *Wen X., Zeng W., Zhang J., et al.* Cascade In Situ Self-Assembly and Bioorthogonal Reaction Enable the Enrichment of Photosensitizers and Carbonic Anhydrase Inhibitors for Pretargeted Cancer Theranostics // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2023.
- [50] *Campagna S., Nastasi F., La Ganga G., et al.* Self-assembled systems for artificial photosynthesis // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2023. V. 25. PP. 1504–1512.
- [51] *Su W., Luo X., Li P. etc.* Phthalocyanine self-assembled nanoparticles for type I photodynamic antibacterial therapy // *Chinese Chemical Letters*. 2024. V. 35, №12. Art. 109522.
- [52] *Rybkin A.Y., Kurmaz S.V., Urakova E.A., et al.* Nanoparticles of N-Vinylpyrrolidone Amphiphilic Copolymers and Pheophorbide a as Promising Photosensitizers for Photodynamic Therapy: Design, Properties and In Vitro Phototoxic Activity // *Pharmaceutics*. 2023. V. 15. PP. 273.
- [53] *Xin J., Deng C., Zheng M., et al.* Amphiphilic photosensitizer polymer as a nanocarrier of cytotoxic molecule for carrier-free combination therapy // *MedComm – Biomater Appl.* 2022. V. 2.
- [54] *Lee M.M.S., Yu E.Y., Yan D., et al.* The Role of Structural Hydrophobicity on Cationic Amphiphilic Aggregation-Induced Emission Photosensitizer-Bacterial Interaction and Photodynamic Efficiency // *ACS Nano*. 2023. V. 17, №17. PP. 17004–17020.
- [55] *Aksenova N.A., Shershnev I.V., Kardumyan V.V., et al.* Effect of diphenylalanine on the functional activity of porphyrin and non-porphyrin photosensitizers solubilized by Pluronic F127 // *Laser Phys.* 2024. V. 34, №5. Art. 055601.

- [56] *Altinbasak I., Alp Y., Sanyal R., et al.* Theranostic nanogels: multifunctional agents for simultaneous therapeutic delivery and diagnostic imaging // *Nanoscale*. 2024. V. 16. PP. 14033–14056.
- [57] *Carnicero A., Miretti M., Rosso A.P., et al.* Design of smart nanodevices based on N-vinyl caprolactam nanogels for photosensitizers // *Polym. Adv. Technol.* 2022. V. 34, №1.
- [58] *Pillarisetti S., Vijayan V., Rangasamy J., et al.* A multi-stimuli responsive alginate nanogel for anticancer chemo-photodynamic therapy // *J. Ind. Eng. Chem.* 2023. V. 123. PP. 361–370.
- [59] *Bernal-Martínez A.M., Bedrina B., Angulo-Pachón C.A., et al.* pH-Induced conversion of bolaamphiphilic vesicles to reduction-responsive nanogels for enhanced Nile Red and Rose Bengal delivery // *Colloids Surf. B Biointerfaces*. 2024. V. 242. Art. 114072.
- [60] *Gan S., Wu Y., Zhang X., et al.* Recent Advances in Hydrogel-Based Phototherapy for Tumor Treatment // *Gels*. 2023. V. 9, № 4. Art. 286.
- [61] *Pinelli F., Saadati M., Zare E.N., et al.* A perspective on the applications of functionalized nanogels: promises and challenges // *Int. Mater. Rev.* 2023. V. 68, № 1. PP. 1–25.
- [62] *Oncu S., Yeniterzi D., Karakurt O., et al.* Synthesis and nanoparticle formation of pyrazine, benzodithiophene (BDT) and fluorene containing conjugated polymer (P-PBF) and its biosensing performance toward catechol // *Microchem. J.* 2024. V. 207. Art. 112158.
- [63] *Davodabadi F., Mirinejad S., Fathi-Karkan S., et al.* Aptamer-functionalized quantum dots as theranostic nanotools against cancer and bacterial infections: A comprehensive overview of recent trends // *Biotechnol. Prog.* 2023. V. 39, № 5.
- [64] *Vasileva L., Gaynanova G., Valeeva F., et al.* Synthesis, Properties, and Biomedical Application of Dicationic Gemini Surfactants with Dodecane Spacer and Carbamate Fragments // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. Art. 12312. DOI: 10.3390/ijms241512312.

- [65] *Tomah N.A., Mohsin M.J., Yousif T.H.* Wavelength-dependent cytotoxicity of platinum nanoparticles in photodynamic therapy against hepatocellular carcinoma // *J. Optics*. 2025. Published 22 April.
- [66] *Bodkhe M., Chalke T., Kulkarni S.J., Goswami A.K.* *Micelles: Synthesis, Characterization Methods, and Applications*. University Institute of Chemical Technology, Kavayitri Bahinabai Chaudhari North Maharashtra University; Gharda Institute of Technology, Lavel, India, 2024. PP. 44.
- [67] *Kharchenko O., Shapovalova N., Yakubovskiy V., et al.* Heavy-atom-free photosensitizer-loaded lipid nanocapsules for photodynamic therapy // *ACS Appl. Bio Mater.* 2025. V. 8, №4. PP. 3086–3095.
- [68] *Pinto A., Racu A.-M., Maierhofer C., et al.* Ligand and Gold(I) Fluorescein–AIEgens as Photosensitizers in Solution and Doped Polymers // *Inorg. Chem.* 2023. V. 62, №19. PP. 7131–7140.
- [69] *Hendi A.A., Alshammari A.A., Alenzi S.M., et al.* Dye-sensitized solar cells constructed using titanium oxide nanoparticles and green dyes as photosensitizers // *J. King Saud Univ. Sci.* 2023. V. 35, №3. P. 102555.
- [70] *Mani A., Reddy M.P., Anand R.S., et al.* Structurally simple osmium (II) polypyridyl complexes as photosensitizers for photodynamic therapy in the near infrared // *Angew. Chem.* 2023. V. 135, №20. P. e202218347.
- [71] *Wang Z., Yang Y., Wang Y., et al.* Self-assembled nanoparticles based on cationic mono-/AIE tetra-nuclear Ir(III) complexes: long wavelength absorption/near-infrared emission photosensitizers for photodynamic therapy // *Dalton Trans.* 2023. V. 52, №6. PP. 1595–1601.
- [72] *Morshnev P.K., Demidova T.B., Kuzmin A.V., et al.* The interaction of chlorin photosensitizers for photodynamic therapy with blood transport proteins // *J. Mol. Liq.* 2023. V. 390. P. 123116.
- [73] *Chizenga E.P., Abrahamse H.* Design and assembly of a nanoparticle, antibody, phthalocyanine scaffold for intracellular delivery of photosensitizer to human

- papillomavirus-transformed cancer cells // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2023. V. 51, №1. PP. 205–216.
- [74] *Pontremoli C., Brioschi E., Damiano M., et al.* Photosensitizers for photodynamic therapy: Structure-activity analysis of cyanine dyes through design of experiments // *Dyes Pigments.* 2023. V. 210. P. 111047.
- [75] *Costa-Tuna A., Smith J., Lee M., et al.* Interaction between a water-soluble anionic porphyrin and human serum albumin unexpectedly stimulates the aggregation of the photosensitizer at the surface of the albumin // *Int. J. Biol. Macromol.* 2024. V. 255. P. 128210.
- [76] *Szafraniec M.J.* Interactions of chlorophyll-derived photosensitizers with human serum albumin are determined by the central metal ion // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2023. V. 41, № 2. PP. 479–492.
- [77] *Fang B., Bai H., Zhang J., et al.* Albumins constraining the conformation of mitochondria-targeted photosensitizers for tumor-specific photodynamic therapy // *Biomaterials.* 2025. V. 315. P. 122914.
- [78] *Li X., Li X., Park S., et al.* Photodynamic and Photothermal therapy via human serum albumin delivery // *Coord. Chem. Rev.* 2024. V. 520. P. 216142.
- [79] *Chen W., Wang Z., Tian M., et al.* Integration of TADF photosensitizer as «electron pump» and BSA as «electron reservoir» for boosting Type I photodynamic therapy // *J. Am. Chem. Soc.* 2023. V. 145, № 14. PP. 8130–8140.
- [80] Официальный сайт ООО "Фарммедхим" // [Электронный ресурс]: – <http://www.fmchem.ru/catalog/115>
- [81] *Bithika Mandal, Satya P. Moulik, Soumen Ghosh.* Influence of aquo-organic solvent media on the self-aggregation of sodium dodecyl sulfate (SDS) and its interaction with polyvinylpyrrolidone (PVP) // *Colloid Polym Sci* 2014, № 292, P. 2485–2495.

- [82] *Toshiyuki Matsudo, Kazuyoshi Ogawa, and Etsuo Kokufuta.* Complex Formation of Protein with Different Water-Soluble Synthetic Polymers. *Biomacromolecules* 2003, №4, P. 1794-1799.
- [83] *Hak A., Ali M.S., Sankaranarayanan S.A. et al.* Chlorin e6: A promising photosensitizer in photo-based cancer nanomedicine // *ACS Appl. Bio Mater.* 2023. V. 6, №2. PP. 349–364.
- [84] *Paul M., Ghosh B., Biswas S.* F127/chlorin e6-nanomicelles to enhance Ce6 solubility and PDT-efficacy mitigating lung metastasis in melanoma // *Drug Deliv. Transl. Res.* 2025. V. 15. PP. 621–637.
- [85] *J. K. Armstrong, R. B. Wenby, H. J. Meiselman, and T. C. Fisher.* The hydrodynamic radii of macromolecules and their effect on red blood cell aggregation. // *Biophysical Journal* Volume 87, December 2004, P. 4259–4270
- [86] *Zhang X., Ma Y., Shi Y. et al.* Advances in liposomes loaded with photoresponse materials for cancer therapy // *Biomed. Pharmacother.* 2024. V. 174. P. 116586.
- [87] *Ji Q., Zhu H., Qin Y. et al.* GP60 and SPARC as albumin receptors: key targeted sites for the delivery of antitumor drugs // *Front. Pharmacol.* 2024. V. 15. DOI: 10.3389/fphar.2024.1329636.
- [88] *Wang Y., Huo F., Yin C.* Development of human serum albumin fluorescent probes in detection, imaging, and disease therapy // *J. Phys. Chem. B.* 2024. V. 128, №5.
- [89] *Bunin D.A., Akasov R.A., Martynov A.G. et al.* Pivotal role of the intracellular microenvironment in the high photodynamic activity of cationic phthalocyanines // *J. Med. Chem.* 2024. V. 68, №1.
- [90] *Камминс Г., Пайк Э.* Спектроскопия оптического смешения и корреляция фотонов // М., Книжный дом «Университет». 2002.
- [91] *Приезжев А.В., Тучин В.В., Шубочкин Л.П.* Лазерная диагностика в биологии и медицине. — М.: Наука, 1989.
- [92] *Лакович Д.* Основы флуоресцентной спектроскопии. — М.: Мир, 1986.
- [93] *Волькенштейн М.* Биофизика. — М.: Наука, 1988.

- [94] Официальный сайт производителя оптического оборудования Hitachi: <https://www.hitachi-hightech.com/global/en/products/analytical-systems/spectrophotometers/uv-vis-nir/u2900.html>
- [95] *Komilian S.* Investigation into device optimisation of organic solar cells using narrow bandgap polymer and the role of acceptor material // *Nanotechnology. Devices* .2019.
- [96] *Sheng Y., et al.* Long-circulating polymeric nanoparticles bearing a combinatorial coating of PEG and water-soluble chitosan // *Biomaterials*. 2009. V. 30. PP. 2340–2348.
- [97] *Matsudo T., Ogawa K., Kokufuta E.* Complex formation of protein with different water-soluble synthetic polymers // *Biomacromolecules*. 2003. № 4. PP. 1794–1799.
- [98] *Левшин Л.В., Салецкий А.М.* Оптические методы исследования молекулярных систем. — М.: изд-во Московского Университета, 1994.
- [99] *Burastero O., Draper-Barr G., Raynal B. et al.* Raynals, an online tool for the analysis of dynamic light scattering // *Acta Crystallogr. D Struct. Biol*. 2023.
- [100] *Castellanos J.L., Castellanos J.L., Gómez S., Guerra V.* Numerical experiments in optimization of neural network training // *Appl. Numer. Math*. 2002. V. 43. PP. 359–373.
- [101] *Bose B., Dube A.* Interaction of chlorin p6 with bovine serum albumin and photodynamic oxidation of protein // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol*. 2006. V. 85, №1. PP. 49–55.
- [102] *Idowu M., Nyokong T.* Photosensitizing properties of octacarboxy metallophthalocyanines in aqueous medium and their interaction with bovine serum albumin // *J. Photochem. Photobiol. A: Chem*. 2008. V. 200, №2–3. PP. 396–401.