


На правах рукописи



ЗЮЗИН

Михаил Валерьевич

**СВЕТОЧУВСТВИТЕЛЬНЫЕ НЕОРГАНИЧЕСКИЕ НАНОМАТЕРИАЛЫ
ДЛЯ ТЕРАПИИ, ДИАГНОСТИКИ И ДОСТАВКИ БИОАКТИВНЫХ
ВЕЩЕСТВ, МЕХАНИЗМЫ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С
БИОЛОГИЧЕСКИМИ ОБЪЕКТАМИ**

1.5.2. Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора физико-математических наук

Санкт-Петербург

2023

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО» (Университет ИТМО)

Научный консультант:

Власова Ольга Леонардовна – доктор физико-математических наук, доцент.

Официальные оппоненты:

Генина Элина Алексеевна – доктор физико-математических наук, доцент, профессор кафедры оптики и биофотоники Саратовского национального исследовательского государственного университета имени Н.Г.Чернышевского;

Королев Дмитрий Владимирович – доктор химических наук, доцент, заведующий лабораторией нанотехнологий федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр имени В.А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Букреева Татьяна Владимировна – доктор химических наук, доцент, заведующий лабораторией биоорганических структур федерального научно-исследовательского центра «Кристаллография и фотоника» Российской академии наук.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (МГУ).

Защита диссертации состоится **4 марта 2024 г. в 11:00** на заседании диссертационного совета **У.1.5.2.22** федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого» (195251, г. Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29) по адресу: г. Санкт-Петербург, ул. Хлопина 11, корп. 1, Высшая школа биомедицинских систем и технологий, ауд. 209.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте <https://www.spbstu.ru/science/the-department-of-doctoral-studies/independent-award-academic-degrees/defences-calendar/> ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого».

Автореферат разослан « _____ » _____ 2024 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
кандидат физико-математических наук

Забродская Яна Александровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Светочувствительные неорганические наноматериалы – это новый класс материалов, которые могут быть использованы как активные элементы для разработки неинвазивных, точных и управляемых медицинских устройств в широком спектре биомедицинских применений, включая фототермическую терапию, фотодинамическую терапию, доставку лекарств и термометрию на наномасштабе [Lee et al., 2020]. В зависимости от их природы светочувствительные неорганические наноматериалы демонстрируют различный оптический отклик, что, в свою очередь может быть использовано для тех или иных задач медицины. В частности, плазмонные наночастицы могут эффективно конвертировать световую энергию в тепло, что находит свое применение в терапии социально значимых заболеваний [Fernandes et al., 2020]. Фотолюминесцентные наночастицы (квантовые точки, углеродные точки, наночастицы, содержащие редкоземельные элементы и проч.) используются в биовизуализации [Hong et al., 2017], а диэлектрические наночастицы с высоким показателем преломления имеют температурно-зависимые спектры комбинационного рассеяния света, что позволяет измерять температуру биологических объектов на наномасштабе [Bradac et al., 2020]. Все вышеперечисленные оптические особенности светочувствительных неорганических наноматериалов зависят от их физико-химических параметров, таких как размер, форма, химический состав и проч., которые в свою очередь определяют механизмы их взаимодействия с биологическими объектами, а также биологический отклик этих объектов [Li et al., 2019]. Таким образом, образованы активно развивающиеся направления - «Биофотоника» и «Наноинженерия», которые отвечают за создание наноматериалов с заданными параметрами. В частности, недавние успехи в области коллоидной химии и наноинженерии позволяют получить наноматериалы с нужным оптическим откликом. Несмотря на многообразие существующих типов светочувствительных наноматериалов, фокус в этой диссертационной работе направлен на изучение и применение (i) золотых наночастиц как эффективных

преобразователей света в тепло, (ii) кремниевых наночастиц и наночастиц из оксида железа, имеющих температурнозависимый спектр комбинационного рассеяния света, (iii) флуоресцентных наноалмазов, ОДМР спектр которых также является чувствительным к температуре.

Степень разработанности темы исследования

Несмотря на внушительные результаты, существует ряд ограничений, которые сдерживают применение светочувствительных неорганических наноматериалов в биомедицине. Например, до конца не решена проблема эндосомального/лизосомального высвобождения наноматериалов с загруженными биоактивными веществами в цитозоль клеток после их захвата путем эндоцитоза. Инициирование этих процессов внутри клеток требовали углубленного изучения, а также была необходима разработка стратегии дизайна и дополнительной модификации наноматериалов [He et al., 2020; Pei et al., 2019]. Более того, при наличии множества светочувствительных систем для направленной доставки биоактивных веществ в клетки, была слабо исследована совокупность факторов, влияющая на эффективность направленной доставки, а также параметры взаимодействия света с системами доставки для эффективного высвобождения доставляемых веществ в опухолевом окружении. В настоящий момент светочувствительные наноматериалы можно выделить в отдельное научное направление, что делает необходимым их изучение как функциональных материалов, которые обеспечивают решение различных наукоемких задач, в том числе в области биомедицины.

Целью данной работы является исследование биофизических и оптических характеристик новых светочувствительных неорганических наноматериалов (плазмонных наноматериалов, а также наноматериалов с высоким показателем преломления) для решения задач медицины и биофотоники, а также разработка новых методов диагностики, терапии и доставки биоактивных соединений с помощью таких светочувствительных наноматериалов. Для достижения намеченной цели было необходимо решить следующие ***задачи***:

1. Разработать методы получения некоторых типов светочувствительных

неорганических наноматериалов (плазмонных наноматериалов, а также наноматериалов с высоким показателем преломления), в том числе композитного состава. Исследовать корреляцию структурных и оптических свойств полученных светочувствительных наноматериалов. Разработать методы доставки биоактивных веществ с помощью полученных светочувствительных материалов. Определить оптимальные биофизические параметры доставки различных веществ в цитозоль клеток.

2. Изучить физические характеристики разработанных светочувствительных материалов (плазмонных, высокоиндексных, в том числе композитного состава), влияющие на доставку и фотоопосредованное высвобождение биоактивных веществ в клетках.

3. Разработать носители биоактивных веществ на основе клеток, модифицированные плазмонными светочувствительными наноматериалами, для направленной доставки и фотоопосредованного высвобождения лекарств в опухолевые сфероиды на основе меланомы. Изучить направленную и спонтанную миграцию разработанных светочувствительных средств доставки на основе клеток.

4. Разработать и исследовать разные методы оптической термометрии с помощью светочувствительных наноматериалов (флуоресцентные наноалмазы, наночастицы с высоким показателем преломления) и проанализировать фотофизические процессы в них.

5. Разработать метод температурного картирования клеток с помощью флуоресцентных красителей для изучения механизма гибели клеток при оптическом нагреве.

6. Разработать подходы по флуоресцентной визуализации *in vivo* с помощью светочувствительных неорганических наноматериалов.

7. Разработать подходы по терапии (в том числе комбинированной) опухолевых заболеваний с помощью светочувствительных наноматериалов на основе плазмонных наночастиц, оценить эффективность фототермического преобразования светочувствительных материалов, а также разработать методы по оценке эффективности комбинированной терапии меланомы.

Научная новизна работы состоит в том, что впервые разработано, исследовано и описано следующее:

- **Впервые** изучены биофизические характеристики разных типов светочувствительных носителей на основе полимеров/диоксида кремния для увеличения трансфекции модельных клеток HeLa плазмидной ДНК, кодирующей зеленый флуоресцентный белок. Эффективность трансфекции достигла 32% за счет (i) эндосомального/лизосомального высвобождения ДНК, индуцированного материалом (SiO_2) носителей, (ii) оптимально подобранных условий инкубации клеток с носителями, и (iii) добавления препарата Хлорохина для повышения значения pH в эндосомах/лизосомах.

- **Впервые** предложен метод по контролируемому фотоопосредованному окрашиванию живых клеток флуоресцентными метками, инкапсулированными в светочувствительные композитные частицы на основе полимеров, модифицированных золотыми наночастицами. Продемонстрировано селективное окрашивание разных структур клетки, таких как цитоскелет и ядро клетки. Разработанный метод был впоследствии применен для мониторинга высвобождения ионов кальция из внутриклеточных депо в цитоплазму.

- Созданы светочувствительные клеточные системы на основе мезенхимальных стволовых клеток (МСК) из костного мозга человека с загруженными композитными носителями из полимеров и золотых наночастиц для направленной доставки противоопухолевых лекарств в область опухоли. **Впервые** исследовано влияние светочувствительных композитных носителей на биофизические параметры МСК. Изучена эффективность направленной доставки и фотоопосредованного высвобождения противоопухолевого лекарства на модели 3D сфероидов меланомы, что так же является **новизной** работы.

- **Впервые** проведен сравнительный анализ оптического нагрева наночастиц из различных материалов с помощью численного моделирования. **Впервые** экспериментально определена температура фотоопосредованного высвобождения биоактивных веществ из светочувствительных композитных носителей вне и внутри клеток помощью резонансных диэлектрических частиц, таких как

флуоресцентные наноалмазы с азото-замещенными вакансиями и наночастицы оксида железа Fe_2O_3 , которые ранее являлись слабоизученными материалами в области нанотермометрии биологических объектов. Измерение температуры при помощи наноалмазов с азото-замещенными вакансиями было осуществлено по измерению сдвига оптически-детектируемого магнитного резонанса. Измерение температуры при оптическом нагреве резонансной диэлектрической частицы оксида железа Fe_2O_3 было реализовано с помощью анализа спектра комбинационного рассеяния. Изучено влияние повышения температуры при фотоопосредованном высвобождении веществ на жизнеспособность клеток.

- **Впервые** исследован механизм гибели клеток при оптической гипертермии с одновременной флуоресцентной термометрией методом температурного картирования клеток с помощью времени жизни флуоресценции красителя.

- Разработана **новая** методология по визуализации внутриклеточной деградации и изучению кинетики высвобождения флуоресцентных биоактивных веществ внутри клеток из различных композитных носителей на основе полимеров/диоксида кремния с помощью конфокальной микроскопии и обработки изображений с использованием программного обеспечения Matlab и CellProfiler. Исследованы биофизические параметры, влияющие на эффективность доставки и высвобождения веществ в клетках.

- **Впервые** показано, что светочувствительные носители на основе плазмонных наночастиц, меченные ^{188}Re , демонстрируют синергетический эффект в ингибировании роста опухоли меланомы с помощью радионуклидной, фототермической и химиотерапии.

Практическая значимость работы

Разработанные подходы дали толчок для развития новых методик в прикладных областях биофотоники и медицины, а также упростили и улучшили существующие.

- *Увеличена* эффективность трансфекции модельных клеток композитными субмикрометровыми носителями на основе диоксида кремния, загруженными плазмидной ДНК, до 32%, что примерно в 6 раз больше, чем эффективность

трансфекции с помощью аналогичных полимерных носителей.

- Предложенный метод по фотоопосредованному окрашиванию модельных клеток позволяет *селективно* и *поочередно* окрашивать определенные клетки, что делает возможным не только доставлять в нужные клетки необходимые биоактивные вещества, но и инициировать высвобождение всей дозы веществ в клетках под действием света.

- *Увеличена* эффективность направленной фотоопосредованной доставки противоопухолевого препарата Винкристин с помощью мезенхимальных стволовых клеток (МСК), которые были модифицированы светочувствительными композитными носителями, в опухолевые сфероиды из первичных клеток меланомы в 16 раз по сравнению со аналогичными светочувствительными носителями без МСК.

- Предложен метод по доставке биоактивных веществ в клетки с помощью светочувствительных композитных носителей, при котором фотоопосредованное высвобождение достигается при *меньшей (в 2 раза)* интенсивности лазерного излучения, что позволяет снизить возможные пагубные эффекты излучения на здоровые клетки и ткани.

- Показано, что использование резонансных диэлектрических наночастиц *существенно ускоряет* измерение температуры при их оптическом нагреве за счет регистрации сдвига спектров комбинационного рассеяния или спектров оптически-детектируемого магнитного резонанса. У металлических наночастиц, которые использовались ранее для нагрева лазерным излучением, процесс термометрии затруднен, так как у таких частиц отсутствует термочувствительный оптический отклик.

- На основе эффекта оптического нагрева плазмонных наночастиц (золотые наностержни), выявлены *оптимальные* параметры (добавленное количество наночастиц к клеткам, приложенная плотность мощности лазерного излучения, время излучения) для гипертермии, необходимой для апоптоза и/или некроза модельных клеток.

- В предложенной методике по комбинированной терапии меланомы с

помощью плазмонных наночастиц найдены *оптимальные условия* для *повышения* эффективности терапии за счет синергетического эффекта ($CI = 0.79$) от трех терапий: фототермической, радионуклидной и химиотерапии.

Теоретическая значимость работы

В работе разработаны светочувствительные композитные носители, а также светочувствительные клеточные системы для доставки биоактивных веществ в клетки. Разработанные системы имеют большой потенциал в комбинированной терапии и могут обеспечить инновационный подход в лечении онкологических заболеваний. В качестве следующего шага работы можно рассматривать использование модели опухолевого ксенотрансплантата, полученного из первичной опухоли пациента, в качестве возможного инструмента для оценки терапевтической эффективности и токсичности клеточной терапии с дальнейшим тестированием разработанной клеточной системы доставки в доклинических исследованиях. В модели ксенотрансплантата опухолевые клетки, полученные из первичной опухоли пациента, будут имплантированы иммунодефицитным мышам подкожно или ортотопически. Модель ксенотрансплантата сохраняет молекулярно-генетические характеристики первичной опухоли пациента, ее гетерогенность, метастатический потенциал, и позволяет оценить терапевтические свойства разработанных систем доставки на основе светочувствительных композитных носителей и клеточных систем.

Методология и методы исследования

Синтез светочувствительных материалов выполнен с помощью химических методов. Например, синтез золотых наночастиц был выполнен методом Бруста и Шифрина, синтез кремниевых наночастиц был выполнен методом лазерной абляции, синтез наночастиц оксида железа был выполнен методом сольвотермального синтеза. Перевод светочувствительных наночастиц из органической в водную среду, а также их стабилизация была выполнена методом лигандного обмена. Композитные светочувствительные материалы были синтезированы методом «Слой-за-Слоем». Структурная и оптическая характеристика синтезированных наноструктурированных материалов была

осуществлена с помощью просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии, динамического рассеяния света, лазерной доплеровской анемометрии, флуоресцентной микроскопии. Визуализация взаимодействия светочувствительных материалов с клеточными культурами *in vitro* использовалась конфокальная лазерная сканирующая микроскопия. Цитотоксичность светочувствительных материалов была проверена методами AlamarBlue и МТТ. *In vitro* исследования по внутриклеточному захвату разрабатываемых носителей были проведены на 2D-клеточном монослое и/или в 3D системах опухолевых сфероидов. Для создания моделей опухолей использованы методы подкожного и внутрибрюшинного введения суспензии опухолевых клеток лабораторным животным. Оценка роста опухоли проводилась визуально, а также с использованием методов гистологического и морфометрического анализа образцов ткани экспериментальных животных. Анализ характера токсического воздействия светочувствительных материалов, а также выбор рекомендованных для введения доз препарата, был проведен на здоровых лабораторных животных путем определения индекса выживаемости методом Каплана-Мейера, а также стандартными методами гистологии и морфометрии. Исследование характера распределения и накопления светочувствительных материалов в сформированной опухоли, а также в остальных тканях и органах (легкие, печень, почки, сердце, селезенка), было проведено на модельных опухолях *in vivo* и *ex vivo* с использованием флуоресцентной визуализации.

Положения, выносимые на защиту

1. Композитные субмикронные и микронные носители на основе диоксида кремния инициируют доставку загруженных в них веществ в цитозоль модельных клеток (HeLa) за счет эндосомального/лизосомального высвобождения этих веществ, которое вызвано набуханием и последующим разрушением эндосомальных/лизосомальных компартментов клетки вследствие повышения осмотического давления, обусловленного продуктами распада носителей из диоксида кремния.

2. Применение светочувствительных композитных носителей на

основе полимеров и плазмонных наноструктур делает возможным фотоопосредованное контролируемое поочередное окрашивание модельных клеток (HeLa) селективными красителями (к цитоскелету и к ядру клетки) за счет фототермической дезинтеграции носителей.

3. Модификация мезенхимальных стволовых клеток (МСК) светочувствительными композитными носителями на основе полимеров и плазмонных наноструктур субмикронного размера в количестве не более 10 носителей на клетку не влияет на миграционные способности МСК, а также обеспечивает направленную доставку по сигнальному пути CXCR4-SDF1 и фотоопосредованное высвобождение противоопухолевого лекарства в сфероиды меланомы, которые экспрессируют хемоаттрактант (SDF-1).

4. Температурное картирование окрашенных клеток с помощью измерения времени жизни флуоресценции красителя (Родамин Б) позволяет определить механизмы гибели клеток при реализации оптической гипертермии, используя плазмонные наночастицы (золотые наностержни). Достигаемая при этом температура (43-45 °С) приводит к гибели не менее 70% модельных В16-F10 клеток через апоптоз.

5. Диэлектрические наночастицы с высоким показателем преломления, включенные в композитные носители, обеспечивают локальный оптический нагрев импульсным фемтосекундным лазером (790 нм, 80 МГц) и последующее разрушение носителей вне и внутри клеток, а также термометрию на наномасштабе за счет анализа температурнозависимого спектра комбинационного рассеяния света. Средняя локальная температура разрушения композитных носителей составляет 170 °С, что не является цитотоксичным для модельных клеток (мезенхимальные стволовые клетки и клетки почечно-клеточной карциномы) за счет мгновенного остывания высокоиндексной диэлектрической наночастицы.

6. Применение светочувствительных носителей на основе плазмонных наночастиц с эффективностью фототермического

преобразования 15,7%, меченных терапевтическим радиоизотопом ^{188}Re , позволяет добиться синергетического эффекта в ингибировании роста опухоли (комбинированный индекс = 0,79) при локальном лечении меланомы у мышей линии C57BL/6 с помощью радионуклидной, фототермической и химиотерапии.

Степень достоверности полученных результатов обеспечивается:

- строгостью применяемых экспериментальных методик и анализов данных;
- использованием оборудования, обеспечивающего необходимую чувствительность и точность эксперимента, а также согласием полученных экспериментальных данных с выводами теоретических моделей;
- воспроизводимостью полученных результатов;
- критическими рецензиями в ведущих научных журналах.

Личный вклад автора

Диссертационная работа является результатом многолетней работы автора в области биофотоники и взаимодействия наноматериалов с биологическими объектами. Автор является инициатором и непосредственным участником всех описанных в диссертации экспериментов, а также сформулированных идей и задач, подготовленных экспериментальных образцов, сделанных заключительных выводов, а также автором диссертации сделан ключевой вклад в написание статей.

Апробация работы

Результаты работы неоднократно были представлены соискателем в виде устных докладов на российских и международных конференциях и школах: NANAX-16 (2016 г., Марбург, Германия), METANANO-18, (2018г., Сочи, Россия); METANANO-19, (2019 г., Санкт-Петербург, Россия); Topical Problems of Biophotonics, (2019 г., Нижний Новгород, Россия); NANAX-2019 (2019 г., Гамбург, Германия); METANANO-20 (2020 г., Тбилиси, Грузия), SPIE Photonics (2022 г., Страсбург, Франция), SLALOM (2021 г., Владивосток, Россия); School on High-Q Nanophotonics Structures for Biosensing (2021 г., Санкт-Петербург, России); Winter School on Photonics (2022 г., Санкт-Петербург, Россия), VII Съезд биофизиков России (2023 г., Краснодар, Россия), NanoBio2023 (2023 г., Ираклион, Греция).

Результаты, представленные в работе, также докладывались на локальных научных семинарах Университета ИТМО, Северо-Осетинского Государственного Университета имени К. Л. Хетагурова, Приволжского исследовательского медицинского университета, Национального исследовательского Нижегородского государственного университета имени Н. И. Лобачевского, Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. акад. И.П. Павлова, Российского научного центра радиологии и хирургических технологий имени академика А.М. Гранова, University of Nottingham (Ноттингем, Соединенное Королевство), Nazarbaev University (Астана, Казахстан), Huazhong University of Science and Technology (Ухань, Китай), Tel Aviv University (Тель-Авив, Израиль).

Финансовая поддержка

Диссертационная работа была частично выполнена при поддержке Российского Научного Фонда, номера грантов: 19-75-00039 (рук. М.В. Зюзин), 21-75-10044 (рук. М.В. Зюзин), 21-72-30018 (рук. Д.А. Зуев).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 25 статей в рецензируемых отечественных и зарубежных научных журналах, а также более 10 тезисов докладов на конференциях. Всего соискатель является автором более 72 работ в международных рецензируемых научных изданиях согласно базе Scopus.

Объем и структура работы

Диссертация включает введение, пять глав, заключение, списки авторской и цитированной литературы. Диссертация состоит из 228 страниц и 64 рисунка. Список литературы включает 331 наименование.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В главе 1 представлен обзор литературы, в котором проанализированы виды неорганических светочувствительных наноматериалов и их применение в клинической практике: методы получения светочувствительных плазмонных, резонансных диэлектрических и композитных наноматериалов; методы функционализации светочувствительных наноматериалов; а также рассмотрены существующие примеры применения светочувствительных наноматериалов в качестве терапевтических или контрастных агентов в клинической практике.

В главе 2 рассмотрены работы по изучению механизмов взаимодействия наноматериалов с клетками, которые включают пути захвата наноматериалов клетками и механизмы эндосомального/лизосомального высвобождения; а также представлены работы, посвященные доставке и фотоопосредованному высвобождению веществ внутри клеток с помощью светочувствительных композитных носителей и клеточных систем.

2.1 Особенности взаимодействия наноматериалов с биологическими объектами

Захват наночастиц клетками включает строго регулируемые механизмы со сложными биомолекулярными взаимодействиями для преодоления наночастицами клеточной плазматической мембраны. Эта биологическая мембрана действует как барьер и отделяет внутреннюю часть клетки от внешней среды [Panariti et al., 2012]. Существует множество различных путей захвата наночастиц клетками. Эти пути можно разделить на две основные группы: (i) пути захвата, основанные на эндоцитозе; и (ii) прямое проникновение наночастиц в клетку [Clift et al., 2011]. Эндоцитоз — это общий термин, используемый для описания множества различных путей и механизмов проникновения наночастиц в клетки. При эндоцитозе наночастицы обычно локализуются в везикулярных структурах, таких как, например, эндосомы. Они могут подвергаться множеству процессов, таких как старение везикул, которое может быть вкратце охарактеризовано трансформацией везикул от ранней до поздней стадии. Эти разные стадии развития

внутриклеточных везикул обычно сопровождаются изменениями pH внутри них. В конце концов, подкисленная эндосома может сливаться с лизосомными компартментами для ферментативного переваривания и деградации содержимого везикул [Chen et al., 2011]. Физико-химические свойства наночастиц, такие как поверхностный заряд и присутствие лиганда на поверхности наночастиц, могут инициировать выход наночастиц из эндосом с повышенной эффективностью [Panariti et al., 2012]. В конце **раздела 2.1.** изучается влияние материала наночастиц на эндо/лизосомальное высвобождение доставляемых веществ в цитозоль клеток. Для этого композитные носители субмикрометрового размера из различных материалов были ко-загружены плазмидными ДНК, кодирующими зеленый флуоресцентный белок (GFP) и флуоресцентным красителем (DEX-blue). Для реализации трансфекции клеток доставляемой ДНК с помощью композитных носителей были использованы различные условия инкубации носителей с клетками. В результате носители из диоксида кремния показали более высокую эффективность трансфекции (до 32%) по сравнению с аналогичными биоразлагаемыми полимерными носителями (около 5%) за счет эндо/лизосомального высвобождения ДНК в цитозоль клеток (**Рисунок 1**) [Zyuzin et al., 2020].

2.2 Особенности взаимодействия света со светочувствительных наноматериалами

Ранее было показано, что резонансные фотонные наноструктуры являются эффективным инструментом для прецизионного оптического нагрева на наномасштабе. Такой нагрев может быть достигнут за счет взаимодействия света с плазмонными (Au, Ag), резонансными диэлектрическими (Si, Ge), а также кристаллическими магнитными (Fe_3O_4) наночастицами [Jauffred et al., 2019; Zograf et al., 2017; Govorov et al., 2007; Bafou et al., 2013; Danesi et al., 2018]. Действительно, разные оптические резонансы (плазмонный резонанс, резонанс Ми типа) этих наночастиц позволяют локализовать электромагнитное поле с последующим преобразованием его в тепловую энергию разными способами и

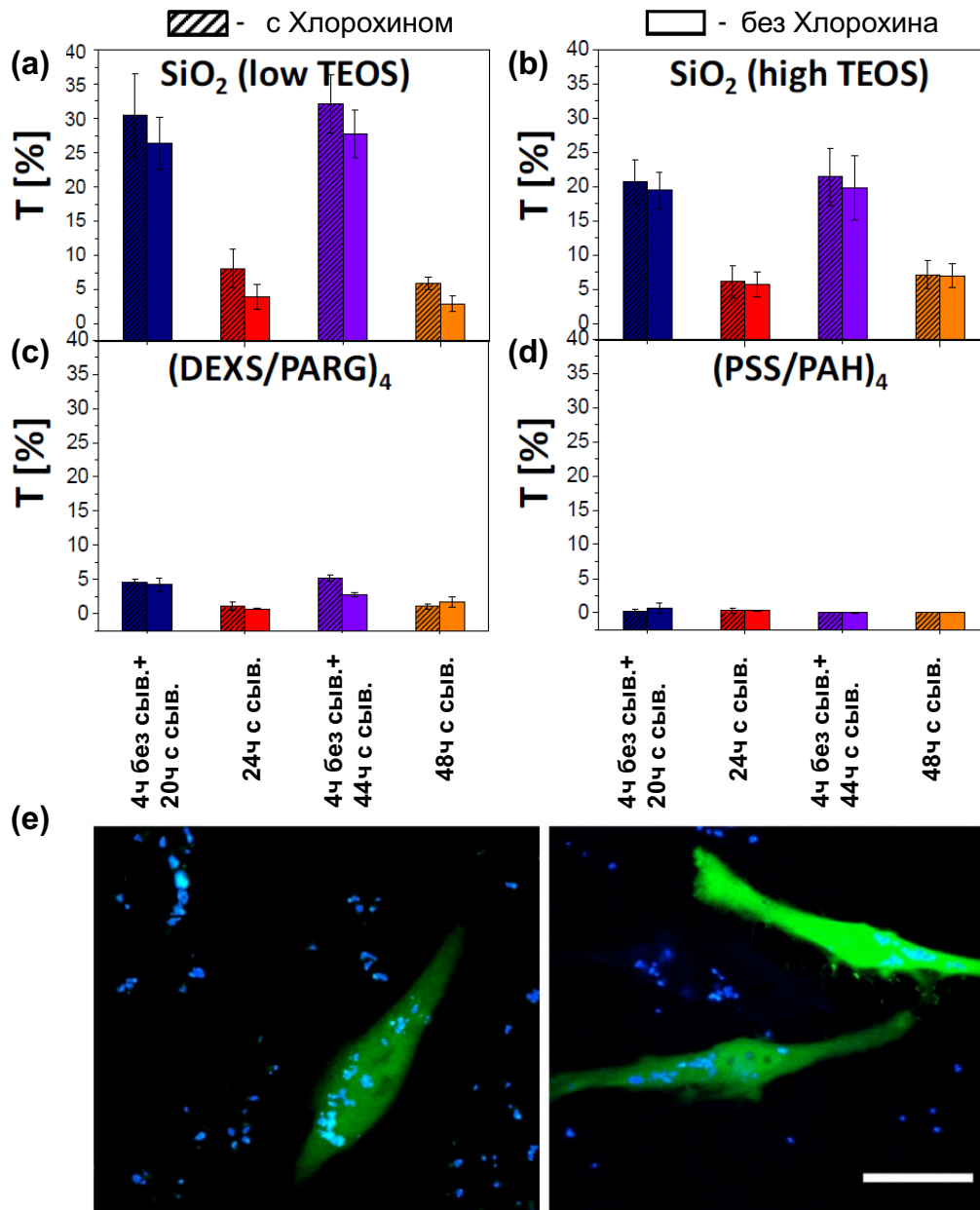


Рисунок 1 - Эффективность трансфекции Т клеток HeLa композитными носителями (a) SiO₂ (низкое содержание TEOS), (b) SiO₂ (высокое содержание TEOS), (c) (DEXS/PARG)₄, (d) (PSS/PAH)₄ при различных условиях инкубации и добавлении 25 пикограмм (ДНК)/клетку в присутствии (заштрихованные прямоугольники) или в отсутствии (пустые прямоугольники) Хлорохина. (e) Пример трансфицированных клеток при большем увеличении с использованием композитных носителей SiO₂ (низкое содержание TEOS). Зеленый флуоресцентный сигнал исходил от экспрессированного GFP, а синий флуоресцентный сигнал исходил от ко-загруженного красителя DEX-blue. Шкала соответствует 20 мкм.

эффективностью. Более того, эти резонансы можно просто настроить на область биологической прозрачности в ближнем ИК-диапазоне, изменяя их физико-химические параметры, такие как размер, форма и состав. Это позволяет точно контролировать процесс нагрева на глубине нескольких сантиметров внутри ткани. Как отмечалось выше, среди биомедицинских применений оптического нагрева наночастиц можно выделить фотоопосредованное высвобождение биоактивных веществ в клетке.

2.3 Композитные носители для селективного фотоопосредованного окрашивания клеток

Для реализации доставки селективных красителей были разработаны светочувствительные композитные носители микрометрового размера, в оболочку которых были иммобилизованы плазмонные наночастицы. Именно плазмонные наночастицы делают композитные носители на основе полимеров чувствительными к свету: при облучении носителей плазмонные наночастицы нагреваются, что приводит к разрушению носителей и последующему высвобождению селективных красителей. В качестве селективных красителей в этом исследовании использовались флуоресцентно-меченый фаллоидин, 4,6-диамидино-2-фенилиндо́л (DAPI), и йодид пропидия (PI). Внутриклеточное высвобождение селективных красителей инициировалось при облучении лазером композитного носителя внутри клетки. После облучения носителей высвобождение красителей инициировало быстрое (менее чем за 1 мин) окрашивание актиновых нитей. Показано, что в один момент времени облучался один композитный носитель внутри клетки, что позволило селективно окрашивать нужную клетку (**Рисунок 2**) [Kantner et al., 2018].

Разработанный метод был впоследствии применен для мониторинга высвобождения внутриклеточных ионов кальция (Ca^{2+}). После облучения отдельного носителя фотоиндуцированное тепло инициировало выброс ионов кальция и его пространственно-временное распространение в клетке. «Волна» сигнала флуоресценции начиналась с облученной области и распространялась в

другие части клетки. Это может быть связано с диффузией высвобождаемого свободного Ca^{2+} [Zhu et al., 2021].

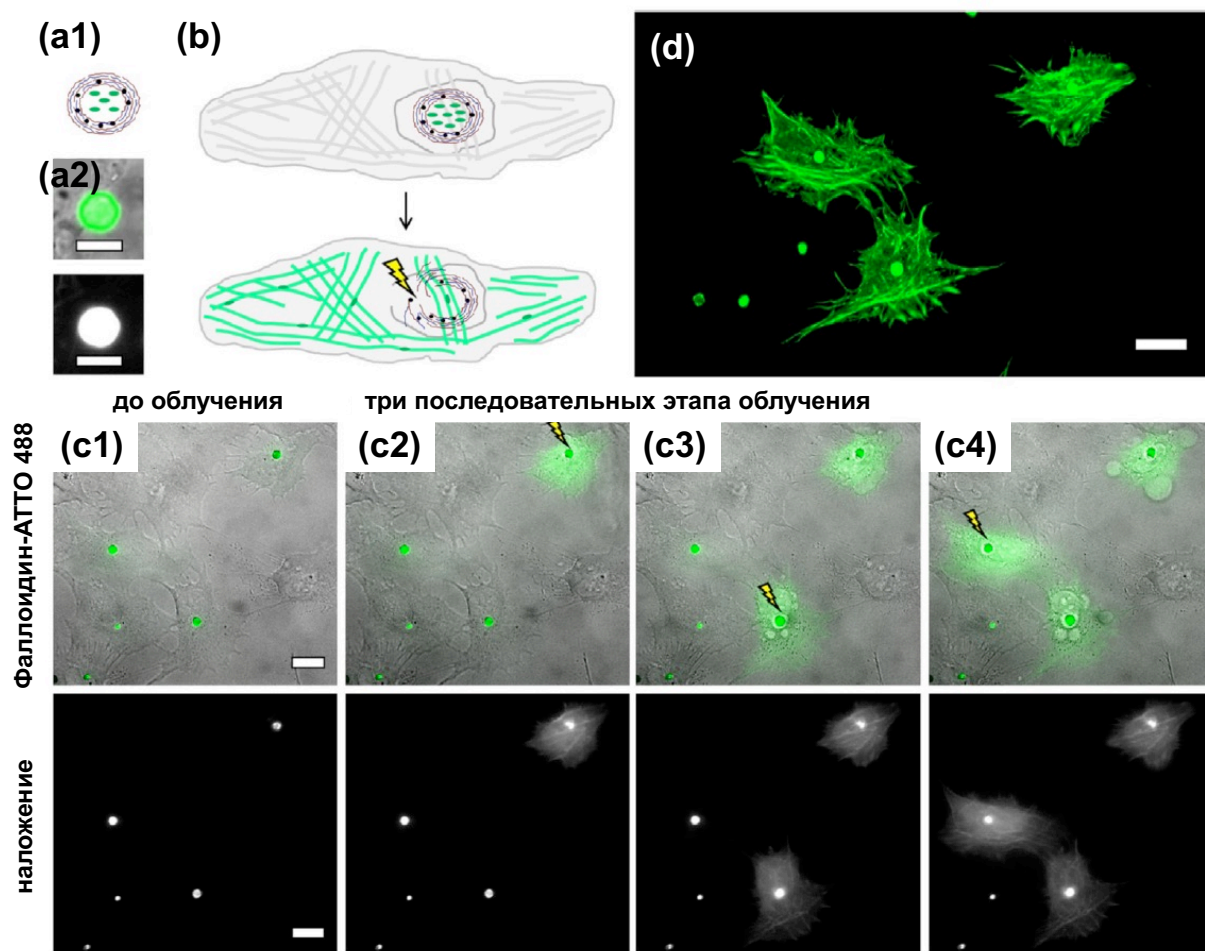


Рисунок 2 – a1) схема светочувствительного композитного носителя, модифицированного селективным красителем фаллоидином-АТТО-488 (зеленый). Черные точки на схеме обозначают иммобилизованные в носителе золотые нанозвезды. a2) Флуоресцентное изображение и совмещенное изображение (флуоресценция + канал светлого поля) светочувствительного композитного носителя. Масштаб соответствует 5 мкм. b) Схема клетки с захваченным носителем, и последующее высвобождение фаллоидина-АТТО-488 при облучении, приводящего к окрашиванию актиновых нитей. c) Флуоресцентное изображение и совмещенное изображение (флуоресценция + канал светлого поля) клеток, инкубированных с носителями, что привело к их захвату клетками. На изображениях c2)–c4) показано поэтапное облучение (длина волны 830 нм, интенсивность $<70 \text{ мВт/см}^2$ в фокусе пятна) с интервалом в две минуты разных клеток. Масштаб соответствует 20 мкм. d) Флуоресцентное изображение клеток, которые были поочередно окрашены селективным красителем. Масштаб соответствует 20 мкм.

2.4 Направленная доставка биоактивных веществ с помощью клеточных систем, модифицированных светочувствительными материалами

Для направленной фотоопосредованной доставки, реализованной в разделе 2.4., были разработаны клеточные системы доставки, состоящие из человеческих мезенхимальных стволовых клеток (чМСК) с загруженными композитными носителями лекарственных средств (SubCaps), чувствительными к ближнему ИК-излучению. Композитные носители, в свою очередь, были загружены противоопухолевым препаратом Винкристин (VCR). Важно отметить, что МСК проявляют свойства направленной миграции в опухоль, которая экспрессирует сигнальные молекулы хемокинов, в частности, по пути CXCR4/SDF-1 [Stuermer et al., 2008]. В ходе исследования спонтанной и направленной миграции чМСК с загруженными композитными носителями лекарственных средств в количестве 10 штук на клетку не оказано существенного влияния на миграционную активность чМСК. Более того, разработанная клеточная система доставки на основе чМСК (hMSCs/VCR@SubCaps), функционализированная субмикрометровыми светочувствительными носителями с противоопухолевым препаратом VCR, продемонстрировала адресную доставку лекарств с их активным накоплением в месте опухоли и возможность дистанционного фотоопосредованного высвобождения VCR (**Рисунок 3**). Важно отметить, что миграция и инвазия разработанных светочувствительных клеточных систем была реализована на моделях сфероидов из клеток меланомы, полученных из образцов биопсии пациентов, которые экспрессировали хемокин SDF-1 [Muslimov et al., 2020].

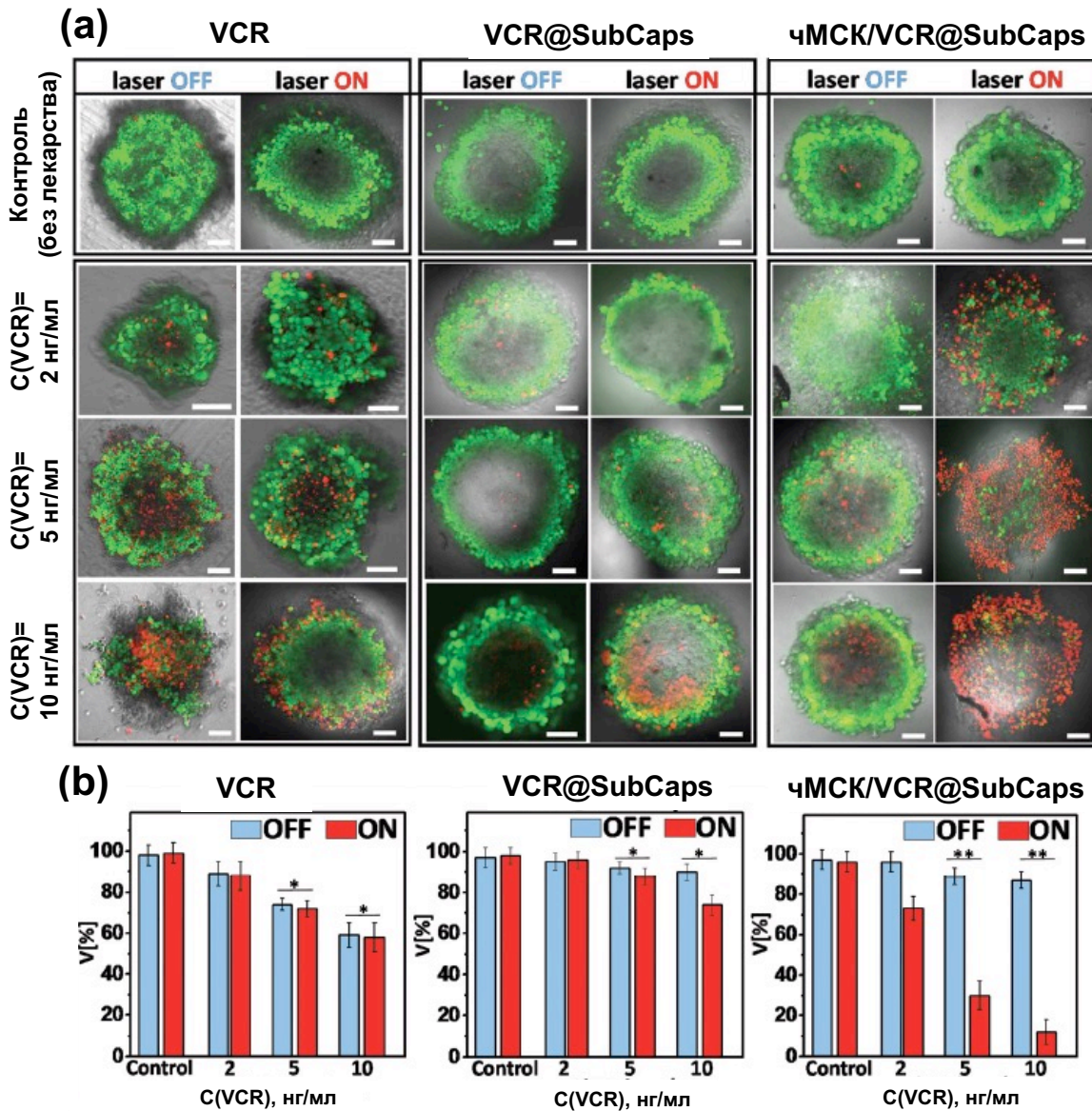


Рисунок 3 – (a) Изображения конфокальной микроскопии опухолевых сфероидов, которые были и не были облучены ИК-лазером, инкубированные со свободным VCR, добавленным при 0, 2, 5 и 10 нг/мл (слева), с SubCaps, загруженными VCR, добавленным при 0, 2, 5 и 10 нг/мл (в центре), 4MCK, модифицированные SubCaps, загруженными VCR, добавленными в количестве 0, 2, 5 и 10 нг/мл (справа). Живые клетки окрашивали Кальцеином АМ (зеленый), ядра мертвых клеток окрашивали йодидом пропидия (красный). Масштаб соответствует 100 мкм. (b) Жизнеспособность опухолевых сфероидов, полученных в результате анализа LIVE/DEAD. Погрешности соответствуют 3 независимым экспериментам, (* соответствует $p < 0,05$ и ** соответствует $p < 0,001$).

Третья глава посвящена оптической термометрии с помощью светочувствительных наноматериалов в биологических объектах.

3.1 Термометрия на наномасштабе с помощью резонансных диэлектрических наночастиц в клетке

Резонансные наночастицы из кремния, германия, и многокомпонентных материалов, обладают выдающимися свойствами в оптике благодаря резонансам Ми, которые возбуждаются лазерным излучением [Liu et al., 2016; Cambiasso et al., 2017]. Более того, из-за усиления сильного поля внутри неплазмонных (например, кремниевых) наночастиц можно как эффективно нагревать их лазерным излучением, так и измерить локальную температуру с помощью термочувствительного спектра комбинационного рассеяния [Zograf et al., 2017].

Согласно теории Ми одиночная сферическая наночастица находится в однородной среде, что дает общее понимание того, какие оптические моды могут быть возбуждены и каков их оптический отклик. Например, сечение рассеяния (σ_{sca}), экстинкции (σ_{ext}) и поглощения (σ_{abs}) можно получить из следующих уравнений:

$$\sigma_{sca} = \frac{W_{sca}}{I_i} = \frac{2\pi}{k^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1)(|a_n|^2 + |b_n|^2) \quad (1)$$

$$\sigma_{ext} = \frac{W_{ext}}{I_i} = \frac{2\pi}{k^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1) \operatorname{Re}(a_n + b_n) \quad (2)$$

$$\sigma_{abs} = \sigma_{ext} - \sigma_{sca} \quad (3)$$

где a_n и b_n — коэффициенты Ми для электрического и магнитного типов мод соответственно. Результат решения уравнения термодиффузии в стационарном режиме с источником тепла, который определяется интенсивностью света (I) и сечением поглощения наночастицы (σ_{abs}), дает следующее уравнение для повышения температуры внутри наночастицы [Baffou et al., 2010]:

$$\delta T_{NP} = \frac{I \sigma_{abs}}{4\pi \kappa_2 R} \quad (4)$$

где κ_2 — теплопроводность окружающей среды, которая значительно ниже, чем у наночастицы; R — радиус наночастицы. Стоит отметить, что это приближение

подходит только для наноматериалов с теплопроводностью на несколько порядков выше, чем у окружающих однородных сред.

Теоретические расчеты оптического нагрева различных наночастиц в воде представлены на **Рисунке 4**. Исходя из уравнений (1)—(4) проведен сравнительный анализ оптического нагрева в видимом и ближнем ИК диапазонах для трех типов сферических наночастиц из золота [Johnson et al., 1972], кремния [Aspnes et al., 1983] и оксида железа ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), [Querry et al., 1985]. Из **Рисунка 4а** видно, что золотые наносферы любого размера являются эффективными преобразователями света в тепло на длине волны локализованного поверхностного плазмонного резонанса (около $\lambda \sim 500\text{--}600$ нм), что соответствует литературным данным [Baffou et al., 2013]. С другой стороны, кремниевая наносфера, как показано на **Рисунке 4б**, поддерживает различные моды Ми (электрические и магнитные) [Kuznetsov et al., 2016], что позволяет использовать кремниевые наночастицы в качестве преобразователей света в тепло даже в красной области спектра [Stauder et al., 2017]. Однако оптический нагрев кремниевых наночастиц ухудшается на длинах волн больше $\lambda \approx 800$ нм. В свою очередь $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ наночастицы сочетают в себе преимущества как золота, так и кремния, обеспечивая широкую полосу поглощения в видимом диапазоне на длинах волн $\lambda < 600$ нм, а также поддерживают моды Ми в ближнем ИК диапазоне (**Рисунок 4с**). Кроме того, сравнение характеристик между наносферами $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$, Si и Au представлено на **Рисунке 4е,ф**, где видно, что наночастицы $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ превосходят наночастицы Au в нагреве даже на длине волны плазмонного резонанса в воде $\lambda \approx 530$ нм. Более того, наночастицы $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ поглощают свет лучше, чем наночастицы Si, на всех представленных длинах волн ($\lambda = 400\text{--}1000$ нм). Причиной лучшего поглощения и нагрева наночастиц $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ является оптимизированное сочетание реальной и мнимой частей его диэлектрической функции. Действительно, радиационные и безызлучательные потери любых резонаторов должны быть уравновешены для достижения максимального оптического нагрева [Zograf et al., 2017].

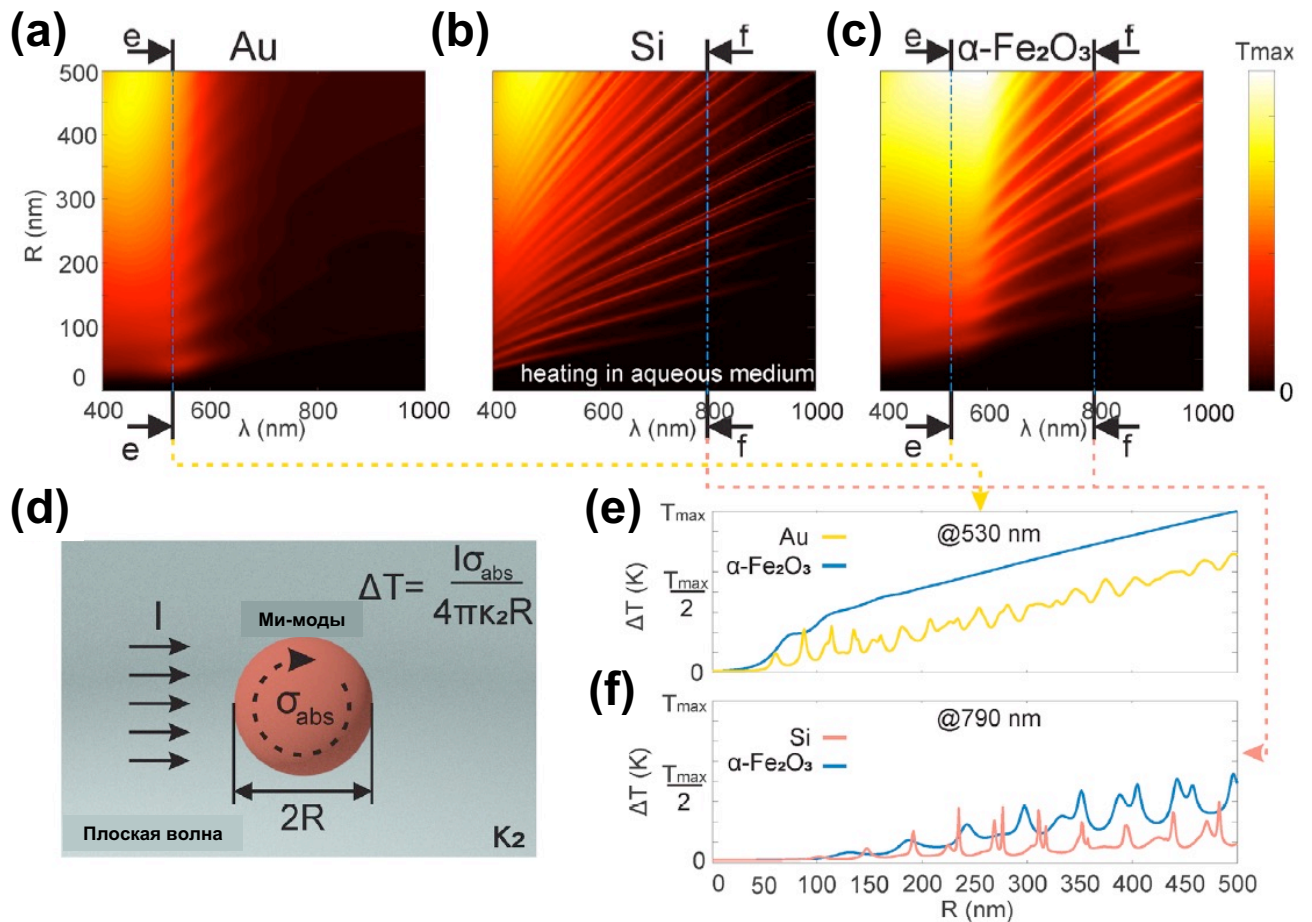


Рисунок 4 - Рассчитанные карты оптического нагрева сферических (а) Au, (б) Si и (в) $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ наночастиц в воде с использованием уравнений (1)–(4). (д) Схема теоретической модели оптического нагрева. Падающая плоская волна возбуждает резонансные оптические моды сферы (теория Ми) в однородной среде с теплопроводностью k_2 . д, (е, ф) Одномерные графики зависимости ΔT от радиуса наночастицы, полученные из (а) и (б) для фиксированных длин волн возбуждения: (е) $\lambda = 530$ нм для Au наночастицы и (ф) $\lambda = 790$ нм для Si наночастицы, в сравнении с нагревом $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ наночастицы из (с).

В этой части показано создание светочувствительной многофункциональной платформы микрометрового размера, состоящей из полимерных носителей с инкорпорированными резонансными диэлектрическими наночастицами ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) для фотоопосредованного высвобождения лекарств в клетке с одновременной термометрией. В частности, $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ имеет очень интенсивный спектр комбинационного рассеяния с четко различимыми линиями Стокса. Облучение наночастиц лазером приводит к усилению локального поля и нагреву наночастиц, что подтверждается спектральным сдвигом характерных рамановских активных

мод. Как уже упоминалось, по спектральному сдвигу характерных линий комбинационного рассеяния при нагреве, может быть тогда определена локальная температура (**Рисунок 5**). Фотоопосредованная доставка противоопухолевого лекарства (Винкристин, VCR) с помощью светочувствительных композитных носителей проводилась на двух клеточных моделях: i) клетках почечно-клеточной карциномы (CCs) и ii) мезенхимальных стволовых клетках человека (чМСК). Экспериментально измеренная средняя температура разрушения носителей путем фотоопосредованного нагрева составила 170 °С [Zorgaf et al., 2020].

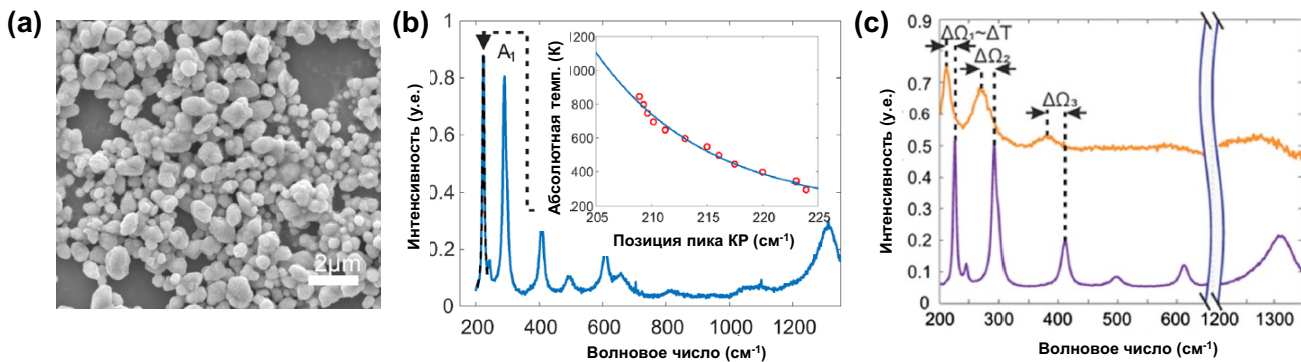


Рисунок 5 – (а) Изображение СЭМ синтезированных $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ наночастиц. (b) Спектр комбинационного рассеяния наночастиц $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Вставка иллюстрирует изменение положения полосы A1 с повышением температуры [Rout et al., 2009]. (c) Сдвиг комбинационного рассеяния света от одиночной наночастицы $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ при приложенных двух интенсивностях 0,6 мВт/мкм² (отсутствие нагрева, фиолетовая линия) и 2,4 мВт/мкм² (нагрев, оранжевая линия).

3.2 Мониторинг изменения температуры в реальном времени фотоопосредованной доставки биоактивных веществ в клетки с помощью композитных носителей, модифицированных флуоресцентными наноалмазами и золотыми наночастицами

Существует класс таких фотолюминесцирующих материалов, с помощью которых можно измерять температуру локально за счет их чувствительности к внешней среде на микро- и наномасштабе. Например, флуоресцентные наноалмазы с азотно-вакансионными (nitrogen-vacancy, NV) центрами являются одними из наиболее перспективных материалов для нанотермометрии биологических

объектов благодаря оптической стабильности, биосовместимости и отсутствию фотообесцвечивания, позволяющих осуществлять непрерывный мониторинг температуры в течение длительных периодов времени не зависимо от среды, где нанодиамазы диспергированы [Kucsko et al., 2013]. Их основное электронное состояние характеризуется системой со спином -1 , которым можно манипулировать с помощью микроволнового поля и эффективно обнаруживать оптическими методами. Если микроволновая частота достигает частоты электронного парамагнитного резонансного перехода NV-центров, то происходит возбуждение спина от $m_s = 0$ до $m_s = \pm 1$, что приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции нанодиамазов. Этот эффект называется оптически детектируемым магнитным резонансом (ОДМР). Частота ОДМР зависит от температуры, поэтому ее обнаружение обеспечивает измерение температуры с высокой чувствительностью. Таким образом, использование NV-центров позволяет осуществлять точный мониторинг температуры на наномасштабе [Sasaki et al., 2016].

В работе продемонстрирована разработка микрометровых светочувствительных композитных материалов на основе полимерных капсул, модифицированных флуоресцентными нанодиамазами и золотыми наночастицами (образцы CORE и образцы WALL). Нанодиамазы использовались в качестве нанотермометров, а золотые наночастицы – в качестве наноагрегаторов. Для осуществления внутриклеточной фотоиндуцированной доставки с одновременной термометрией с помощью разработанных светочувствительных композитных носителей, в капсулы был загружен селективный краситель DAPI (4', 6-диамидино-2-фенилиндолин, дигидрохлорид), который обычно используется для окрашивания ядер клеток. Внутриклеточную фотоиндуцированную доставку DAPI во время измерения температуры контролировали с помощью флуоресцентного микроскопа. Локальное фотоиндуцированное разрушение носителей приводило к диффузии DAPI из разрушенных композитных носителей внутри клетки и быстрому окрашиванию ядер клеток. Благодаря небольшому размеру лазерного пятна микрометровые носители облучались индивидуально без нагрева клетки целиком.

Стоит отметить, что средняя температура разрушения композитных носителей составила $128 \pm 1.12^\circ\text{C}$ (**Рисунок 6**) [Gerasimova et al., 2021].

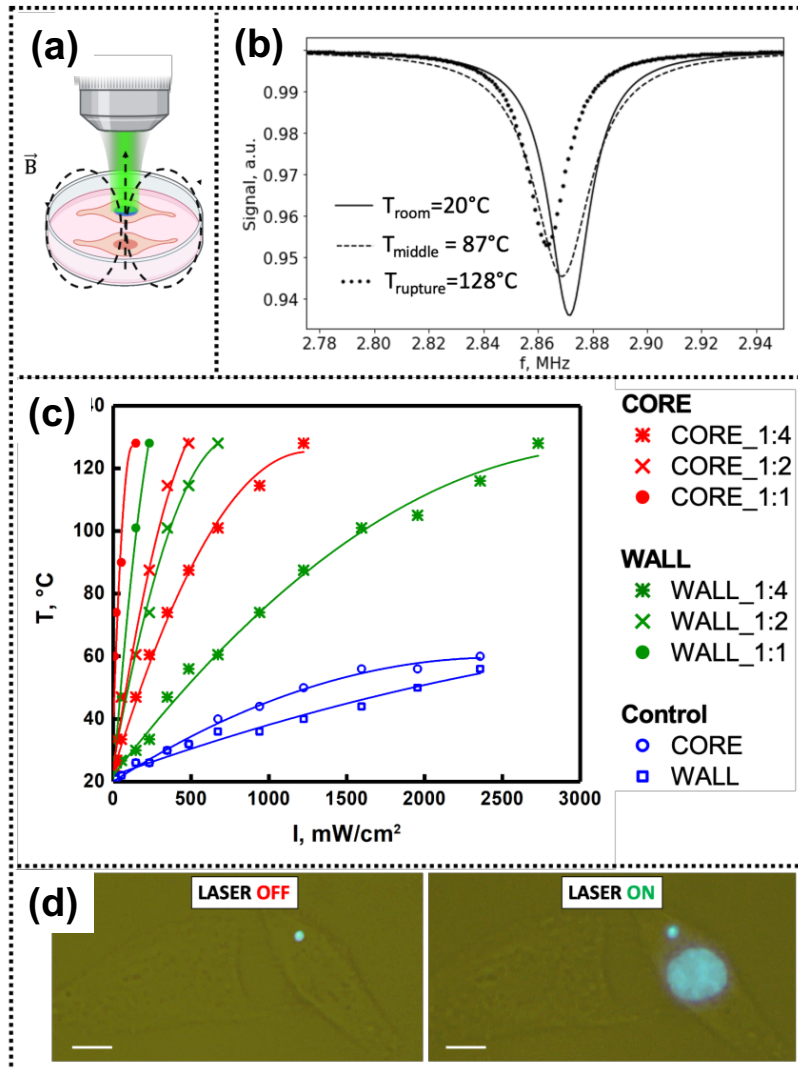


Рисунок 6 – (a) Схема эксперимента для термометрии и фотоиндуцированной доставки красителя в клетке. (b) Спектры ОДМР NV@SiO₂ в носителях внутри живой клетки (CORE_1:1). (c) Измеренная температура в живых клетках для различных образцов носителей. (d) Клетки, инкубированные с носителями, загруженными DAPI (CORE_1:1), до и после облучения лазером ($\lambda = 532$ нм, 145 мВт/см²). До лазерного облучения ядро клетки не было окрашено DAPI. После лазерного облучения ядро клетки окрашивалось (синий), что подтверждало высвобождение DAPI. Шкала соответствует 10 мкм.

3.3 Флуоресцентная термометрия для точного измерения лазерного нагрева наночастиц в клетках на наномасштабе

Помимо светочувствительных наночастиц, способных измерять температуру

на наномасштабе, в качестве нанотермометров могут выступать флуоресцентные красители [Zhou et al., 2020]. Это свойство в основном проявляется у молекулярных роторов (например, Родамин В, RhB). Флуоресцентные свойства RhB зависят от вязкости окружающей среды, которая, в свою очередь, зависит от температуры. В случае RhB повороты диэтиламинных групп на ксантеновом кольце ответственны за зависимость от температуры времени жизни флуоресценции и квантового выхода [Casey et al., 1988].

В разделе 3.3 были изучены механизмы гибели клеток с захваченными плазмонными наночастицами (золотыми наностержнями, длина: 115.5 ± 14.8 нм, ширина: 20.1 ± 1.9 нм) при оптической гипертермии с помощью разработанного метода температурного картирования клеток. Для этого клетки с захваченными частицами окрашивались флуоресцентным красителем RhB и облучались инфракрасным лазером для измерения времен жизни флуоресценции красителя. После каждого успешного сканирования плотность мощности лазера увеличивалась и выполнялось новое измерение времени жизни флуоресценции. Каждое измерение давало распределение времени жизни флуоресценции в пределах одной выбранной клетки для определенной плотности мощности лазера. Измеренное среднее время жизни флуоресценции было пересчитано в значения внутриклеточной температуры с использованием ранее полученной калибровочной кривой (Рисунок 7). Далее для оценки влияния внутриклеточных температур, достигаемых при лазерном облучении захваченных клеткой золотых наночастиц, на тип клеточной гибели была проведена проточная цитометрия с окрашиванием клеток красителями аннексином V и 7AAD. Это было сделано для определения параметров (концентрация наночастиц, плотность мощности лазерного излучения), необходимых для индукции апоптоза клеток. Анализируя данные проточной цитометрии, можно сделать вывод о том, что значительный апоптоз клеток происходит при достижении температуры более 42 °C. При дальнейшем повышении температуры процент вторичных некротических клеток увеличивается до 50% (60 мкг/мл золотых наночастиц при $43,2$ кВт/см²). Тем не менее, следует отметить, что температуры, достигаемые при фототермической терапии во всех

образцах, были недостаточно высокими, чтобы первичный некроз превышал более 5,5% клеток [Peltek et al., 2022].

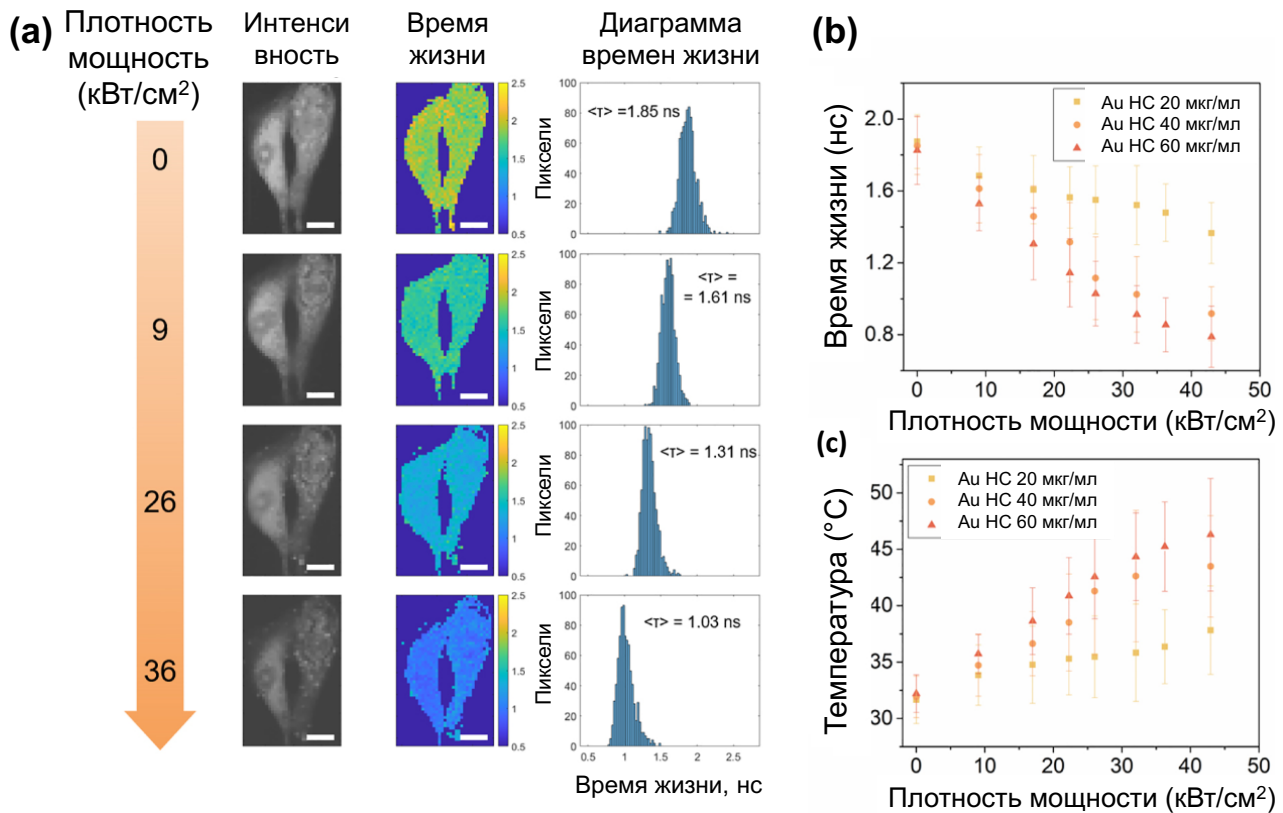


Рисунок 7 - (a) Изображения времени жизни флуоресценции клеток V16-F10, инкубированных с золотыми наностержнями (40 мкг/мл) и окрашенных RhB. Изображения были получены при облучении клеток ИК-лазером с определенной плотностью мощности. Изображение содержит карту интенсивности флуоресценции, карту времени жизни флуоресценции и время жизни флуоресценции, представленное в виде гистограмм. Масштаб соответствует 5 мкм. (b) среднее время жизни внутриклеточной флуоресценции RhB в зависимости от плотности мощности лазера в клетках, инкубированных с различными концентрациями золотых наностержней (20, 40 и 60 мкг/мл). (c) средние рассчитанные внутриклеточные температуры в зависимости от плотности мощности лазера в клетках, которые были инкубированы с различными концентрациями золотых наностержней. Данные представляют собой среднее значение и стандартное отклонение трех независимых измерений.

В главе 4 (раздел 4.1.) рассмотрены методы биовизуализации светочувствительных материалов *in vitro* и *in vivo*, а именно механизмы, отвечающие за биораспределение *in vivo* и факторы, влияющие на

биораспределение и клиренс наноматериалов.

4.2 Мониторинг внутриклеточного распределения флуоресцентных носителей биологически активных соединений

Для реализации эффективной терапии необходима надлежащая кинетика высвобождения лекарственного средства из носителей, которые доставляют эти лекарства в клетку. В зависимости от размера, формы и свойств поверхности, нано- и микрочастицы могут систематически циркулировать в крови в течение длительного периода, накапливаться в опухолевых областях и локально высвобождать лекарства. В зависимости от природы носителя высвобождение лекарственных препаратов может происходить либо моментально, либо пролонгировано, что можно использовать для максимизации эффективности терапии [Zograf et al., 2020; Muslimov et al., 2020].

Раздел 4.2 посвящен изучению кинетики высвобождения флуоресцентных биоактивных веществ из различных биоразлагаемых композитных носителей на основе диоксида кремния, а также полимеров. Композитные носители, использованные в этом исследовании, были загружены флуоресцентно-мечеными белками для оценки степени загрузки на основе флуоресценции, а также изучалась кинетика высвобождения белка *in vitro*. Для визуализации и количественной оценки кинетики высвобождения белков была разработана методология на основе конфокальной лазерной сканирующей микроскопии и обработки изображений с использованием программного обеспечения Matlab и CellProfiler с открытым исходным кодом. В работе показано, что биоразлагаемые носители продемонстрировали разную эффективность высвобождения флуоресцентного белка внутри клеток с течением времени, что можно объяснить разной морфологией носителей. Полученные данные свидетельствуют о том, что высвобождение флуоресцентного белка из композитных носителей на основе SiO₂ было более эффективным в течение 2500 мин по сравнению с их аналогами на основе полиэлектролитов. Эти результаты указывают на более эффективную деградацию SiO₂ носителей *in vitro*, что в литературе связывают с низкой

плотностью диоксида кремний и гидролизом таких оболочек. Более того, носители из диоксида кремния инициируют эндосомальное высвобождение белков в цитозоль клетки, как доказывалось в предыдущих главах, что так же может влиять на кинетику высвобождения [Zyuzin et al., 2022].

В разделе 4.3. исследуются подходы по флуоресцентной биовизуализации лабораторных животных при системном и локальном введении светочувствительных наноматериалов

Глава 5 посвящена фотоиндуцированной терапии злокачественных новообразований с помощью светочувствительных наноматериалов.

5.1 Терапия злокачественных новообразований с помощью светочувствительных наноматериалов

Обычно, поглощение света различными соединениями приводит к различным сценариям: (i) фотохимическим реакциям самих молекул (например, фотолиз пролекарств до лекарств и фотоизомеризация) или с другими молекулами (например, взаимодействие фотосенсибилизаторов с кислородом с образованием синглетного кислорода), (ii) испускание света из-за радиационной релаксации молекул (например, флуоресценция), и (iii) конвертация световой энергии в другие формы из-за безызлучательной релаксации молекул (такие как тепловая энергия для фототермической терапии (ФТТ) и акустическая энергия для фотоакустической визуализации) [Zou et al., 2022; Dai et al., 2021]. Как отмечалось, свет также можно использовать для высвобождения химиотерапевтических препаратов или возбуждения светочувствительных материалов для терапии злокачественных новообразований. Часто для увеличения эффективности терапии используют комбинированный подход, что в итоге приводит к синергетическому эффекту лечения злокачественных новообразований [Zhao et al., 2021]. Например, светочувствительные наноматериалы для ФТТ могут быть загружены химиотерапевтическими агентами для комбинированной фототермической и химиотерапии. Поскольку ФТТ может индуцировать противоопухолевый иммунитет организма, его также целесообразно сочетать с иммунотерапией путем

дополнительной загрузки носителей иммуностимуляторами (например, ингибитором иммунных контрольных точек (PD-1) [Huang et al., 2021].

5.2 Применение светочувствительных материалов в терапии злокачественных новообразований

В этой части был изучен синергетический эффект лечения опухоли меланомы с помощью радио- и фототермической терапии с использованием светочувствительных наночастиц (золотые наностержни, Au NRs, длина: 114.8 ± 13.9 нм, ширина: 20.3 ± 2.0 нм) в сочетании с химиотерапией. Для этого Au NRs с пиком поглощения 1160 нм с эффективным нагревом при облучении их светом в ближнем инфракрасном диапазоне были радиомечены терапевтическим изотопом рения-188 (^{188}Re). Для максимизации эффективности лечения меланомы была использована третья терапия – химиотерапия путем введения клинически релевантного цитостатического препарата (Паклитаксел, РТХ). После облучения лазером (1064 нм; 1,7 Вт/см²; 10 мин) опухолей меланомы с инжектированными золотыми наностержнями (400 мкг/мл), модифицированными терапевтическим радионуклидом ^{188}Re (2 МБк), и одновременным введением Паклитаксела (3 мг/кг) было показано, что сочетание всех трех терапий одновременно дает наиболее значимые результаты в ингибировании опухолей в сравнении с терапиями в монорежиме. Был продемонстрирован синергетический эффект (комбинированный индекс, CI=0.79) в ингибировании роста опухоли меланомы при локальном введении от трех терапий одновременно (**Рисунок 8**) [Peltek et al., 2023].

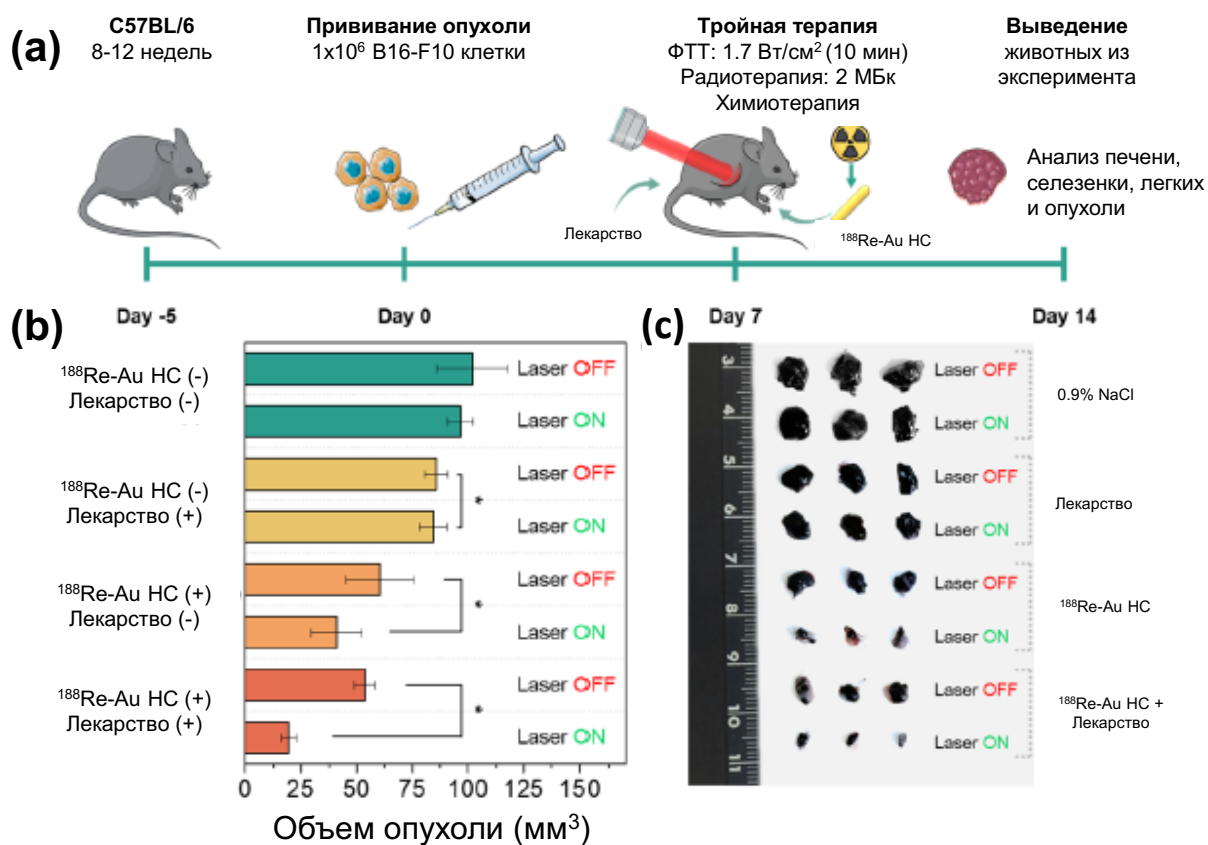


Рисунок 8 – (a) Схема терапии и оценка роста опухоли. (b) Размер опухоли после трех видов терапии. (c) Цифровые изображения опухолей, выделенных после различных комбинаций терапий. Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение ($n = 6$, * соответствует $p < 0,05$).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа направлена исследование биофизических характеристик светочувствительных материалов, применяемых для решения задач медицины и биофотоники, а также разработки новых методов диагностики, терапии и доставки биоактивных соединений с помощью светочувствительных материалов. Разработаны новые методы получения светочувствительных материалов, в том числе композитного состава, а также найдено влияние физико-химических параметров разработанных наноматериалов на их оптический отклик. Разработаны светочувствительные материалы на основе клеточных систем для направленной доставки и фотоопосредованного высвобождения биоактивных веществ в клетках. Получены многофункциональные наноконструкции, востребованные для задач термометрии биологических объектов. Созданы композитные светочувствительные системы визуализации. Экспериментально продемонстрированы функциональные возможности светочувствительных материалов в комбинированной терапии злокачественных новообразований. В результате работы были сделаны следующие **выводы**:

1. Исследование биофизических характеристик светочувствительных носителей биоактивных веществ различного состава позволяют сделать **вывод** о том, что эффективность доставки веществ в клетку (в том числе в цитозоль клетки) может быть комплексно улучшена не только за счет подбора оптимальных условий инкубации носителей с клетками, но и за счет дизайна носителей, а также путем добавления специальных препаратов, влияющих на внутрилизосомальную активность. Показано, что светочувствительные носители из диоксида кремния при их инкубировании с модельными клетками (HeLa) сначала 4 часа в среде без сыворотки, а затем 44 часа в среде с сывороткой при добавлении Хлорохина увеличивают эффективность трансфекции (32%) по сравнению с аналогичными полимерными носителями (5%).

2. Анализируя фотофизические свойства плазмонных наноматериалов, предложен альтернативный подход по окрашиванию модельных клеток (HeLa) селективными красителями (фаллоидин, DAPI, йодид пропидия) с помощью

светового воздействия (инфракрасный диапазон) на светочувствительные композитные носители на основе полимеров и плазмонных наноструктур. Разработанный метод обеспечил поочередное фотоопосредованное окрашивание модельных клеток, что позволило сделать **вывод** о кинетике окрашивания клетки селективными красителями.

3. Разработаны светочувствительные клеточные системы для направленной доставки противоопухолевых лекарств и их фотоопосредованного высвобождения в области опухоли на основе мезенхимальных стволовых клеток человека (чМСК). При модификации чМСК субмикрометровыми светочувствительными композитными носителями с загруженным противоопухолевым лекарством (Винкристин) в количестве не более 10 носителей на клетку, их миграционная активность (спонтанная и направленная миграция) остается прежней. Полученные результаты позволили сделать **вывод** о том, что направленная доставка и фотоопосредованное высвобождение противоопухолевого препарата Винкристин (10 нг/мл) в опухолевые сфероиды меланомы с помощью разработанных клеточных систем в 6 раз эффективнее по сравнению со свободным Винкристином и в 7 раз эффективнее по сравнению с инкапсулированным Винкристином.

4. Теоретически исследован оптический нагрев различных светочувствительных наноматериалов. Предложено использование диэлектрических резонансных наночастиц, включенных в композитные носители для локального оптического нагрева импульсным фемтосекундным лазером с последующим разрушением носителей вне и внутри клеток, а также одновременное измерение температуры разрушения композитных носителей за счет температурнозависимого рамановского спектра этих наночастиц. Полученный рамановский сдвиг при оптическом нагреве разработанных композитных носителей позволил сделать **вывод**, что температура разрушения таких носителей составляет 170 °С.

5. Исследуя фототермические параметры плазмонных наночастиц, предложен альтернативный подход для изучения механизмов гибели клеток с захваченными плазмонными наночастицами при реализации оптической

гипертермии. Разработанный метод, основанный на температурном картировании окрашенных клеток путем измерения времени жизни флуоресцентного красителя, позволил сделать **вывод**, что при облучении клеток с захваченными золотыми наностержнями (60 мкг/мл) инфракрасным лазерным излучением плотностью мощности около 26,7-43,2 кВт/см² в течение 5 минут (42-47 °С) приводит к не менее 75% апоптотических клеток.

6. Проведен ряд исследований для задач визуализации распределения и удержания светочувствительных носителей в лабораторном животном. Локальное введение разработанных флуоресцентных композитных носителей в опухоль и последующая флуоресцентная визуализация лабораторного животного в течение 10 дней **подтвердила**, что флуоресцентный сигнал исходил в основном из области опухоли (более 95% в течение всего времени наблюдения).

7. Проведено сравнение различных подходов фототермической, радионуклидной, химиотерапии (а также их комбинации) при локальном лечении меланомы у мышей линии C57BL/6. После облучения лазером (1064 нм; 1,7 Вт/см²; 10 мин) опухолей меланомы с инжесктированными золотыми наностержнями (400 мкг/мл), модифицированными терапевтическим радионуклидом ¹⁸⁸Re (2 МБк), и одновременным введением Паклитаксела (3 мг/кг) было показано, что сочетание всех трех терапий одновременно дает наиболее значимые результаты в ингибировании опухолей в сравнении с терапиями в монорежиме. **Доказан** синергетических эффект от комбинации фототермической, радионуклидной и химиотерапии с помощью рассчитанного комбинированного индекса, который равнялся 0,79.

В целом, комплексное исследование использования светочувствительных неорганических наноматериалов для доставки веществ, нанотермометрии, биовизуализации и терапии позволило по-новому взглянуть на подходы в тераностике и определить новые перспективы в области терапии и диагностики социально значимых заболеваний. Проведенное исследование важно для дальнейшего внедрения наноразмерных неорганических материалов в клиническую практику в качестве терапевтических и/или диагностических агентов,

что на сегодняшний день является не простой задачей. Действительно, несмотря на рост доклинических исследований, связанных с использованием светочувствительных неорганических наночастиц, далеко не все разрабатываемые структуры доходят до клинических испытаний. Несмотря на это, нужно отметить, уже существуют коммерчески доступные светочувствительные наночастицы (Aurolase и Auroshell), которые могут быть успешно применены для оптической гипертермии злокачественных новообразований, расположенных в области головы, шеи (NCT00848042) и предстательной железы (NCT04240639, NCT02680535 и NCT04656678). В связи с этим, есть основания предполагать, что количество клинических исследований с использованием светочувствительных наноматериалов, а, следовательно, количество выведенных в клиническую практику медицинских разработок будет расти. Таким образом, можно заключить, что в диссертационной работе разработаны и исследованы платформы на основе светочувствительных неорганических материалов, которые способны эффективно решать современные вызовы в области биофотоники и медицины.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи (в хронологическом порядке, сначала недавно вышедшие)

⁺ - одинаковый вклад в публикацию

* - автор для корреспонденции

[A1] Dual Nanozyme-Driven PtSn Bimetallic Nanoclusters for Metal-Enhanced Tumor Photothermal and Catalytic Therapy/ Y. Zhu, R. Zhao, L. Feng, C. Wang, S. Dong, **M. V. Zyuzin**, A. Timin, N. Hu, B. Liu, P. Yang // ACS Nano. -2023. -Т. 17. – С.6833-6848.

[A2] Single-Step Fabrication of Resonant Silicon-Gold Hybrid Nanoparticles for Efficient Optical Heating and Nanothermometry in Living Cells/ E. N. Gerasimova, E. Uvarov, V. Yaroshenko, O. S. Epifanovskaya, A. Shakirova, L. Logunov, O. L. Vlasova, A. Parodi, A. A. Zamyatnin, A. S. Timin, S. V. Makarov, **M. V. Zyuzin***// ACS Applied Nano Materials. – 2023. 10.1021/acsnm.3c03189.

[A3] Development of Nanocarrier-Based Radionuclide and Photothermal Therapy in Combination with Chemotherapy in Melanoma Cancer Treatment/ O. O. Peltek, T. E. Karpov, A. Rogova, A. Postovalova, E. Ageev, A. Petrov, D. Antuganov, A. A. Stanzhevsky, D. N. Maistrenko, D. Zuev, A. R. Muslimov, A. S. Timin, **M. V. Zyuzin*** // ACS Applied Materials and Interfaces. – 2023. -Т.15. – С.13460-13471.

[A4] Fluorescence-based thermometry for precise estimation of nanoparticle laser-induced heating in cancerous cells at nanoscale/ O. O. Peltek, E. I. Ageev, P. M. Talianov, A. D. Mikushina, O. S. Epifanovskaya, A. Dubavik, V. P. Veiko, K. Lepik, D. A. Zuev, A. S. Timin, **M. V. Zyuzin*** // Nanophotonics. -2022. -Т.11. -С.4323-4335.

[A5] Biodegradable particles for protein delivery: Estimation of the release kinetics inside cells/ **M. V. Zyuzin*** R. Hartmann, A. S. Timin, S. Carregal-Romero, W. J. Parak, A. Escudero // Biomaterials Advances. -2022. -Т.139. -С.1-9.

[A6] Real-Time Temperature Monitoring of Photoinduced Cargo Release inside Living Cells Using Hybrid Capsules Decorated with Gold Nanoparticles and Fluorescent Nanodiamonds/ E. N. Gerasimova, V. V. Yaroshenko, P. M. Talianov, O. O. Peltek, M. A. Baranov, P. V. Kapitanova, D. A. Zuev, A. S. Timin, **M. V. Zyuzin***// ACS Applied

Materials and Interfaces. -2021. -T.13. -C.36737-36746.

[A7] Development of Silica-Based Biodegradable Submicrometric Carriers and Investigating Their Characteristics as In Vitro Delivery Vehicles/ **M. V. Zyuzin**, D. Zhu, W. J. Parak, N. Feliu, A. Escudero // International Journal of Molecular Sciences. -2020. -T.21. -C.1-17.

[A8] Biomimetic drug delivery platforms based on mesenchymal stem cells impregnated with light-responsive submicron sized carriers/ A. R. Muslimov, A. S. Timin, V. R. Bichaykina, O. O. Peltek, T. E. Karpov, A. Dubavik, A. Nominé, J. Ghanbaja, G. B. Sukhorukov, **M. V. Zyuzin*** // Biomaterials Science. -2020. -T.8. -C.1137-1147.

[A9] All-Optical Nanoscale Heating and Thermometry with Resonant Dielectric Nanoparticles for Controllable Drug Release in Living Cells/ G. P. Zograf, A. S. Timin, A. R. Muslimov, I. I. Shishkin, A. Nominé, J. Ghanbaja, P. Ghosh, Q. Li, **M. V. Zyuzin***, S. V. Makarov // Laser and Photonics Review. -2020. -T.190082. -C.1-11.

[A10] Biological Kerker Effect Boosts Light Collection Efficiency in Plants/ H. Barhom, A. A. Machnev, R. E. Noskov, A. Goncharenko, E. A. Gurvitz, A. S. Timin, V. A. Shkoldin, S. V. Koniakhin, O. Yu. Koval, **M. V. Zyuzin**, A. S. Shalin, I. I. Shishkin, Pavel Ginzburg // Nano Letters. -2019. -T.19. -C.7062-7071.

[A11] Multifunctional Scaffolds with Improved Antimicrobial Properties and Osteogenicity Based on Piezoelectric Electrospun Fibers Decorated with Bioactive Composite Microcapsules/A. S. Timin, A. R. Muslimov, **M. V. Zyuzin**, O. O. Peltek, T. E. Karpov, I. S. Sergeev, A. I. Dotsenko, A. A. Goncharenko, N. D. Yolshin, A. Sinelnik, B. Krause, T. Baumbach, M. A. Surmeneva, R. V. Chernozem, G. B. Sukhorukov, R. A. Surmenev // ACS Applied Material and Interfaces. -2018. -T.10. -C. 34849–34868.

[A12] Dynamic Extracellular Imaging of Biochemical Cell Activity Using InGaN/GaN Nanowire Arrays as Nanophotonic Probes/ S. Hölzel, **M. V. Zyuzin**, J. Wallys, E. Pouokam, J. Müßener, P. Hille, M. Diener, W. J. Parak, M. Eickhoff // Advanced Functional Materials. -2018. -T. 1802503. -C. 1-12.

[A13] Photoluminescence quenching of dye molecules near a resonant silicon nanoparticle/ **M. V. Zyuzin**, D. G. Baranov, A. Escudero, I. Chakraborty, A. Tsyppkin, E.

V. Ushakova, F. Kraus, W. J. Parak, Sergey V. Makarov// Scientific Reports. -2018. -T. 8. -C. 1-7.

[A14] Laterally and Temporally Controlled Intracellular Staining by Light-Triggered Release of Encapsulated Fluorescent Markers/ K. Kantner, J. Rejman, K. V. L. Kraft, M. G. Soliman, **M. V. Zyuzin**, A. Escudero, P. del Pino, W. J. Parak// Chemistry – a European Journal. -2018. -T. 24. -C. 2098 – 2102.

[A15] Synthesis and functionalization of monodisperse near-ultraviolet and visible excitable multifunctional Eu^{3+} , Bi^{3+} :REVO₄ nanophosphors for bioimaging and biosensing applications/ A. Escudero, C. Carrillo-Carrión, **M. V. Zyuzin**, S. Ashraf, R. Hartmann, N. O. Núñez, M. Ocaña, W. J. Parak// Nanoscale. 2016. -T. 8. -C. 12221–12236.

[A16] Influence of Temperature on the Colloidal Stability of Polymer-Coated Gold Nanoparticles in Cell Culture Media/ **M. V. Zyuzin**, T. Honold, S. Carregal-Romero, K. Kantner, M. Karg, W. J. Parak// Small. -2016. -T.12. -C. 1723–1731.

Обзорные статьи

[A17] Overcoming the blood–brain barrier for the therapy of malignant brain tumor: current status and prospects of drug delivery approaches/ K. Mitusova, O. O. Peltek, T. E. Karpov, A. R. Muslimov, **M. V. Zyuzin**, Alexander S. Timin// Journal of Nanobiotechnology. -2022. -T.20. -C.1-40.

[A18] Adaptive Nanoparticle-Polymer Complexes as Optical Elements: Design and Application in Nanophotonics and Nanomedicine/ P. Talianov, L. I. Fatkhutdinova, A. S. Timin, V. A. Milichko, **M. V. Zyuzin*** // Laser and Photonics Reviews. -2021. -T. 2000421. -C. 1-28.

[A19] Overcoming the delivery problem for therapeutic genome editing: Current status and perspective of non-viral methods/ T. V. Mashel, Y. V. Tarakanchikova, A. R. Muslimov, **M. V. Zyuzin**, A. S. Timin, K. V. Lepik, B. Fehse // Biomaterials. -2020. -T.258. -C. 1-25.

[A20] Optically responsive delivery platforms: from the design considerations to biomedical applications/ I. Koryakina, D. S. Kuznetsova, D. A. Zuev, V. A. Milichko, A. S. Timin, **M. V. Zyuzin*** // Nanophotonics. -2020. -T.9. -C. 39-74.

[A21] Current outlook on radionuclide delivery systems: from design consideration to translation into clinics/ O. O. Peltek, A. R. Muslimov, **M. V. Zyuzin**, A. S. Timin // Journal of Nanobiotechnology. -2019. T.17. -C. 1-34.

[A22] Multilayer Capsules Inside Biological Systems: State-of-the-Art and Open Challenges/ **M. V. Zyuzin**, A. S. Timin, G. B. Sukhorukov // Langmuir. -2019. T. 35. -C. 4747–4762.

[A23] Rare earth based nanostructured materials: synthesis, functionalization, properties and bioimaging and biosensing applications/ A. Escudero, A. I. Becerro, C. Carrillo-Carrión, N. O. Núñez, **M. V. Zyuzin**, M. Laguna, D. González-Mancebo, M. Ocaña, W. J. Parak // Nanophotonics. 2017. T.6. -C. 881–921.

Главы в коллективной монографии.

[A24] Encapsulation of Enzymes in Porous Capsules via Particle Templating/ **M. V. Zyuzin**, P. Ramos-Cabrer, S. Carregal-Romero // Jose M. Guisan et al. (eds.), Immobilization of Enzymes and Cells: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology. Springer Nature. 2020. -T. 2100, -C. 227-241.

[A25] Luminescent Rare-earth-based Nanoparticles: A Summarized Overview of their Synthesis, Functionalization, and Applications/ A. Escudero, C. Carrillo-Carrion, **M. V. Zyuzin**, W. J. Parak // Topics in Current Chemistry. Springer. 2016. T.374. C. 1-15.