

На правах рукописи



Мирошкина Анастасия Максимовна

Получение наноструктурированных частиц для управляемой доставки и высвобождения действующего вещества для фотодинамической терапии

14.04.01 – Технология получения лекарств

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2022 г.

Работа выполнена в федеральном государственном автономном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор

Краснюк Иван Иванович

Научный консультант:

кандидат медицинских наук

Кречетов Сергей Петрович

Официальные оппоненты:

Балабаньян Вадим Юрьевич, доктор фармацевтических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», факультет фундаментальной медицины, лаборатория трансляционной медицины, ведущий научный сотрудник

Мустафин Руслан Ибрагимович, кандидат фармацевтических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт Фармации, директор Института Фармации

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки Российской Федерации

Защита диссертации состоится « 22 » июня 2022 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.01 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1) и на сайте организации: <http://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан « » _____ 2022 г.

И.о. ученого секретаря
диссертационного совета ДСУ 208.002.01
доктор фармацевтических наук,
профессор

Селиванова Ирина Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В настоящее время, одновременно с широким использованием химиотерапии в качестве основного метода лечения и в качестве адъювантной терапии, интенсивно ведутся работы по созданию систем доставки на основе микро- и наночастиц (МЧ и НЧ), позволяющие повысить эффективность действия на опухоли как новых, так и уже используемых при лечении онкологических заболеваний химиотерапевтических агентов (ХТА). При накоплении в клетках опухоли МЧ или НЧ, содержащих ХТА, не только увеличивается местное воздействие ХТА на молекулярные мишени, но и уменьшается количество системных нежелательных побочных явлений. Основные требования к МЧ и НЧ установлены экспериментальным путем, из них главную роль играют стабильный материал микро- и нано-носителей, подвергающийся биодegradации под действием лизосомальных ферментов; минимальный показатель агрегации частиц в плазме крови; а также более высокая степень фагоцитоза целевыми клетками по отношению к клеткам ретикуло-эндотелиальной системы. Актуальность использования в качестве ХТА фотосенсибилизаторов (ФС) позволяет уменьшить системное побочное действие химиотерапии за счет получения сильного местного фотодинамического цитотоксического действия при облучении опухоли светом определённой длины волны. Местное применение описанной процедуры фотодинамической терапии (ФДТ) уменьшает побочные системные эффекты при введении ФС в кровоток: в частности, проявления нежелательного фотодинамического эффекта ФС на открытых участках кожи на свету. Включение ФС в состав МЧ и НЧ, в дополнение к описанным выше общим преимуществам использования МЧ и НЧ в качестве систем доставки, позволяет визуализировать частицы с этими веществами в тканях организма за счет наличия у ФС собственной флуоресценции. Одними из наиболее перспективных лекарственных средств (ЛС), рассматриваемых в качестве таких ФС, являются ЛС, синтезированные на основе природного хлорина е6 – Аласенс, Фотодитазин, Радахлорин (РХ). Инкапсулирование РХ в МЧ и НЧ в качестве действующего вещества (ДВ) рассматривается как возможное направление повышения эффективности его использования для ФДТ и флуоресцентной диагностики, в результате внутриклеточного накопления и депонирования РХ, а также пролонгирования его действия, что, в свою очередь, позволит ещё больше локализовать действие этого ФС и увеличить продолжительность терапевтического окна для ФДТ. Так же, стоит заметить, что до недавнего времени оставались открытыми вопросы о контролируемой доставке и пролонгированном высвобождении ДВ в опухолевые ткани. Включение в полимерную матрицу МЧ и НЧ дополнительных компонентов в виде магнитных наночастиц (МНЧ) и перфторуглеродов не только способствует увеличению эффективности терапии онкологий и снижению токсического действия ХТА относительно повреждений здоровых

органов и тканей, но и предоставляет возможности контролируемого высвобождения инкапсулированного ДВ через локальный нагрев высокочастотным магнитным полем и разрушения полимерной структуры МЧ и НЧ с помощью ультразвукового излучения. Присутствие МНЧ в матрице МЧ и НЧ также дает возможность визуализировать такие частицы методами магнитной резонансной томографии при диагностике онкологических заболеваний.

Степень разработанности темы исследования

Перспектива использования биоразлагаемых полимеров в качестве материала для микро- и нано- носителей доказана существующими публикациями по разработке и использования полимерных систем доставки для клинического применения (Ki-Taek Kim et al., 2019) в составах инъекционных лекарственных форм (ЛФ). Исследования по разработке наноэмульсий с инкапсулированием хлоринов в качестве ХТА хлоринов показали пролонгированное действие ФС и увеличение накопления таких частиц в опухоли до 60% по сравнению со свободным ФС при внутривенной инъекции мышам с моделью рака молочной железы 4T1 (Changhee Park et al., 2019). Оценка степени поглощения МЧ клетками опухоли показала увеличение поглощения МЧ с инкапсулированными хлориновыми ФС по сравнению с ФС другого ряда, а также определила возможность использования таких МЧ в качестве диагностирующих агентов (E Tugce Sarcan et al., 2018). Вместе с тем, остаются до конца не решенными аспекты фармацевтической разработки, связанные с увеличением процента включения ФС и оценки его степени включения в полимерную матрицу, а так же профиля высвобождения ФС у МЧ с дополнительно включенными компонентами, и установлением взаимосвязи этих параметров с эффективностью проявления такими МЧ фотодинамического и токсического действия по отношению к опухолевым клеткам.

Цель и задачи исследования

Целью диссертационной работы являлась разработка и анализ наноструктурированных биосовместимых микрочастиц для фотодинамической терапии опухолей с возможностью управляемого накопления и высвобождения фотосенсибилизатора.

Для ее достижения были поставлены и решены следующие задачи:

1. Провести сравнительный анализ современных и актуальных научных публикаций по разработке методов получения микрочастиц на основе биоразлагаемых сополимеров.
2. Разработать и обосновать метод получения наноструктурированных микрочастиц на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (СМГК) для ФДТ опухолей с включением фармацевтической субстанции фотосенсибилизатора и магнитных частиц.

3. Исследовать физико-химические и морфологические свойства получаемых наноструктурированных микрочастиц, оценить процент включения в них действующего вещества.
4. Оценить профиль высвобождения фотосенсибилизатора из наноструктурированных микрочастиц, способность таких микрочастиц к проявлению фотодинамических свойств.
5. Провести исследование на цитотоксичность получаемых наноструктурированных микрочастиц и исходя из вышеопределенных характеристик определить их пригодность для использования в качестве терапевтических агентов для ФДТ опухолей с предложением наиболее вероятной лекарственной формы.

Научная новизна

Новизна научного исследования заключается в разработке систем доставки на основе полимерных МЧ с включением дополнительных компонентов в виде перфторуглеродов и магнитной нано-суспензии. В результате исследования были разработаны три метода получения МЧ на основе биоразлагаемого СМГК через множественную эмульсию вода в масле в воде (В/М/В), вода в масле в масле (В/М/М) и через множественную дисперсию твердое в масле в воде (ТВ/М/В). С помощью оценки основных параметров, обеспечивающих достаточный процент включения ФС в полимерные МЧ для проявления ими фотодинамических и цитотоксических свойств был выбран в качестве основного метода получения метод получения через множественную дисперсию ТВ/М/В. Анализ профиля высвобождения ФС из МЧ доказал возможность использования таких МЧ в качестве ЛФ в виде депо с пролонгированным высвобождением ДВ. Доказано проявление фотодинамического и цитотоксического эффекта полученными МЧ, а также увеличение процента накопления таких частиц в опухолевых клетках по сравнению со свободным ФС.

Теоретическая и практическая значимость исследования

В результате проведенных исследований обоснована перспективность использования систем доставки на основе полимерных МЧ, с инкапсулированным в них РХ. Представленный в работе экспериментально-практический материал может служить теоретической базой для создания МЧ на основе биоразлагаемого СМГК с инкапсулированным ФС и магнитными наночастицами (МНЧ) для дальнейших доклинических исследований. С использованием экспериментальных методов был разработан оптимальный метод получения МЧ на основе множественной дисперсии с включением РХ, достаточным, для проявления ими фотодинамического эффекта. Проведен спектрофотометрический анализ полученных МЧ на содержание действующего вещества, оценен профиль высвобождения РХ и проявление частицами фотодинамического эффекта, а также оценена их цитотоксичность на культуре клеток трех клеточных линий.

Методология и методы исследования

Методологическую основу исследований составили труды российских и иностранных ученых в области разработки множественных инкапсулированных форм хлорина еб для повышения его эффективности с помощью нано-носителей (В.Н. Прозоровский и др., 2018; Fei Ding et al., 2015; Po-Chun Peng et al., 2015; Liang Hong et al., 2020). Исследования по включению хлорина еб в хитозановые наночастицы указали на сохранение инкапсулированным ФС его фотодинамических свойств и антипролиферативного действия по отношению к клеткам опухоли (Anindita Bhatta et al., 2019). Труды российских ученых по разработке систем доставки на основе биоразлагаемых полимеров доказали возможность масштабирования технологии получения МЧ до промышленного масштаба (Кедик С.А. et al., 2018). В работе были использованы методы фармакопейного анализа, включенные в Государственную Фармакопею РФ XIV издания, USP 38/NF 33, Ph. Eur. 8.0., методы приготовления простых и множественных эмульсий с использованием механического и ультразвукового диспергирования, лиофильная (сублимационная) сушка, световая, электронная и конфокальная микроскопия, спектрофотометрия и спектрофлуориметрия, метод динамического рассеяния света, проточная цитофлуориметрия, колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток (МТТ-тест), а также базовая статистика, параметрические и непараметрические критерии. Основными методами исследования, которые использованы в работе, являются: методы сравнительного документированного анализа, патентно-информационный поиск; технологические методы приготовления множественных эмульсий (В/М/В и В/М/М) и множественных дисперсий (ТВ/М/В) с использованием механического и ультразвукового диспергирования, гомогенизация, УЗ обработка, сублимационная сушка и сушка под вакуумом; химико-фармацевтические и физические методы: спектрофотометрия, спектрофлуориметрия, потенциометрия, лазерная спектроскопия рассеяния, световая, электронная и конфокальная микроскопия, метод динамического рассеяния света; оценка полученных микрочастиц на проявление ими фотодинамических свойств и цитотоксичности проводилась с помощью методов проточного цитофлуориметрического анализа и МТТ-теста. Полученные в ходе экспериментальной работы результаты обрабатывали статистически с помощью математических методов анализа.

Основные положения, выносимые на защиту

- результаты исследований по обоснованию и разработке оптимальной методики получения наноструктурированных микрочастиц для фотодинамической терапии;
- результаты исследования физико-химических свойств наноструктурированных микрочастиц, полученных с помощью различных методик;

- результаты анализа и оценки наноструктурированных микрочастиц в качестве терапевтического агента для фотодинамической терапии с проявлением наноструктурированными микрочастицами фотодинамических свойств;
- результаты оценки наноструктурированных микрочастиц на длительность и характер высвобождения действующего вещества;
- результаты оценки цитотоксичности полученных наноструктурированных микрочастиц на культуре клеток.

Степень достоверности научных положений и выводов

Достоверность полученных результатов обусловлена достаточным объемом экспериментального материала, однородностью выборки объектов эксперимента, применением современных методов исследования и сертифицированного оборудования, валидацией разработанных методик, применением методов математической статистики, теоретическим обоснованием полученных экспериментальных данных. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертационной работе, обоснованы, достоверны и логично вытекают из полученных автором данных. При проведении экспериментальной работы использовано сертифицированное современное оборудование, методами статистической обработки установлена воспроизводимость и правильность результатов исследований, что позволяет считать их достоверными.

Апробация результатов исследования

Основные положения работы и результаты исследования доложены на конференциях: научная конференция молодых ученых молодых ученых и специалистов ФГБОУ ВО СОГМА (Северо-Осетинской государственной медицинской академии) Минздрава России с международным участием «Молодые ученые – медицине», V Петербургский международный онкологический форум «Белые ночи 2019», VIII международный молодежный медицинский конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения-2019», XV Международная Пироговская научная медицинская конференция студентов и молодых ученых (Москва, 2019), Международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2020).

Апробация результатов исследования состоялась на заседании кафедры фармацевтической технологии Института Фармации им А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол № 4 от 19.11.2021 года.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в постановке задач и их реализации в экспериментальной части. Автор самостоятельно выполнил весь объем экспериментальной работы, его вклад является основополагающим на каждом из этапов исследования: постановка

цели и задач, получение экспериментальных данных и их статистическая обработка, подготовка и написание статей и выступления с докладами на научно-практических конференциях.

Внедрение научных результатов

Результаты, полученные в ходе выполнения работы, внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической технологии Института Фармации им А.П. Нелюбина ФГБОУ ВО Первого Московского государственного медицинского университета им И.М. Сеченова (Сеченовский Университет).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.01 – Технология получения лекарств. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 1, 3 и 4 паспорта специальности Технология получения лекарств.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет) «Развитие научных и научно-методических основ, базовых и инновационных подходов при разработке, внедрении и применении ЛС». Номер государственной регистрации 01.2.012.61653.

Публикации

По результатам исследования автором опубликовано 8 работ, в том числе научных статей в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени кандидата наук – 2; статей в изданиях, индексируемых в международной базе Scopus – 1; публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций – 5.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, вывода и списка литературы. Работа изложена на 133 страницах, содержит 11 таблиц и 28 рисунков, 2 Приложения (А, Б). Список литературы включает 171 ссылку, из них 155 – на иностранном языке.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Для изготовления МЧ в качестве источника ФС использовали концентрат для приготовления раствора для инфузий «Радахлорин» от РАДА-ФАРМА (Россия), содержащий 3,5 мг/мл смеси натриевых солей хлорина еб, хлорина рб, пурпурина 5. В работе использовали блок-сополимер 65:35 молочной и гликолевой кислот (СМГК) RESOMER RG 653 Н от Evonik Industries AG (Германия); span 80, полисорбат 20, легкое минеральное (парафиновое) масло, 1,3-дифенилбензофуран (ДФБФ), диметилсульфоксид от Sigma (США); поливиниловый спирт 18-88 от Merck (Германия); метилцеллюлозу А4М от Ashland (США); среду DMEM 12, пенициллин, стрептомицин, L-глутамин, 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (МТТ) от ПанЭко (Россия); эмбриональную телячью сыворотку от Hyclone (США). Хлористый метилен, ацетонитрил, изопропиловый спирт, гексан, гептан, а также реактивы, использовавшиеся для приготовления буферных растворов, имели квалификацию химически чистый или чистый для анализа и были получены от Химмед (Россия). В работе использовали деионизованную воду, полученную на установке обратного осмоса УВОИ 1812С6 (МЕДИАНА ФИЛЬТР, Россия).

Приготовление МЧ по методу В/М/В. Для приготовления МЧ по технологии с получением множественной эмульсии В/М/В РХ осаждали из 200 мкл раствора для инфузий «Радахлорин» добавлением 400 мкл 0,1 М HCl с последующим центрифугированием 10 мин при 1500 g. Влажный осадок РХ диспергировали на ледяной бане в 2 мл раствора 2,5% СМГК и 0,5% Span 80 ультразвуковым гомогенизатором SONOPULS HD 2070 (Bandelin, Германия) с микроизлучателем MS 73 при мощности 15% в течение 1 мин с пульсацией 10%. Полученную первичную эмульсию «вода в масле» диспергировали, добавляя по каплям в 20 мл водного раствора 1% поливинилового спирта и 0,5% метилцеллюлозы при температуре 4°C с использованием Ultra Turrax 25 (IKA, Германия) с диспергатором S 25 N – 8 G при 20000 об/мин. Полученную вторичную эмульсию В/М/В смешивали с 500 мл воды, охлажденной 4°C, и выдерживали в течение 6 ч при комнатной температуре с перемешиванием при 200 об/мин верхнеприводной мешалкой Eurostar 20 digital (IKA, Германия) с пропеллерным перемешивающим элементом для удаления дихлорметана и затвердевания МЧ. Созревшие МЧ осаждали центрифугированием 20 мин при 150 g. Супернатант сливали, а осадок промывали ресуспензированием в 15 мл воды с последующим осаждением в указанных выше условиях. Описанную отмывку МЧ от компонентов вторичной дисперсионной среды выполняли трижды. Отмытые МЧ замораживали при минус 25°C и высушивали в течение 15 ч в лиофильной сушилке VaCo 2 (ZIRBUS, Германия).

Приготовление МЧ по методу В/М/М. Для приготовления МЧ по технологии с получением множественной эмульсии В/М/М РХ осаждали, как описано выше для метода В/М/В.

Осадок диспергировали в 0,5 мл ацетонитрила интенсивным встряхиванием до однородности, а затем смешивали с 1 мл 5% (масса/объем) раствора СМГК в ацетонитриле и получали слабоопалесцирующую дисперсию РХ «вода в масле». Полученную первичную дисперсию добавляли по каплям в 20 мл раствора 5% (масса/объем) Span 80 в минеральном масле и эмульгировали с использованием Ultra Turrax 25 при 22000 об/мин. К полученной вторичной эмульсии В/М/М приливали 10 мл н-гептана и дополнительно гомогенизировали 10 мин, а затем приливали ещё 10 мл н-гептана и гомогенизировали ещё 30 мин. Полученную эмульсию В/М/М выдерживали 6 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании на верхнеприводной мешалке с пропеллерным перемешивающим элементом при 500 об/мин. После этого эмульсию оставляли на ночь в вытяжном шкафу без перемешивания. Созревшие частицы отделяли центрифугированием 20 мин при 150 g. Для отмывки от минерального масла и эмульгатора к осажденным МЧ приливали 20 мл смеси изопропанола и н-гептан (1 : 3 по объему), перемешивали 5 мин при 700 об/мин и центрифугировали в указанных выше условиях. Описанную отмывку выполняли ещё три раза. Отмытые МЧ сушили 1 ч при вакууме 2 мбар (насос РС 3001 VARIO, Vacuubrand, Германия), а затем выдерживали для удаления растворителей 1 ч при вакууме 0,5 мбар (насос EVD 6, Eurovacuum, Германия).

Приготовление МЧ по методу ТВ/М/В. Для приготовления МЧ по методу множественной дисперсии Т/М/В, лиофильно высушивали 30 мкл раствора для инфузий «Радахлорин». Лيوфилизат диспергировали в растворе 2,5% СМГК и 0,1% лецитина в хлористом метиле. Полученную первичную дисперсию «твердое в масле» эмульгировали по каплям в 20 мл водного раствора 1% поливинилового спирта и 0,5% метилцеллюлозы при температуре 4°C с использованием Ultra Turrax 25 (IKA, Германия). Готовую вторичную эмульсию Т/М/В смешивали с охлажденной до 4°C 500 мл воды, и выдерживали в течение 6 ч при комнатной температуре с перемешиванием при 300 об/мин верхнеприводной мешалкой Eurostar 20 digital (IKA, Германия) с пропеллерным перемешивающим элементом до удаления дихлорметана и затвердевания МЧ. Созревшие МЧ осаждали центрифугированием при 2000 g. Супернатант сливали, а осадок промывали ресуспензированием в 50 мл воды с последующим осаждением в указанных выше условиях. Отмытые МЧ замораживали при минус 25°C и высушивали в течение 15 ч в лиофильной сушилке VaCo 2 (ZIRBUS, Германия). При включении в МЧ стабилизированных олеиновой кислотой МНЧ и перфтордекалина (ПФД), на стадии получения первичной дисперсии «твердое в масле», в раствор СМГК и лецитина в хлористом метиле добавляли 55 мкл суспензии МНЧ и 20 мкл ПФД, перед диспергированием лиофилизата РХ.

Измерение размеров и дзета-потенциала МЧ. Морфологию и размеры частиц оценивали по изображениям растровой электронной микроскопии (РЭМ), полученным с использованием микроскопа MAIA3 (TESCAN, Чехия): измерения проводили при ускоряющем

напряжении 1-2 кВ. Распределение РХ в МЧ оценивали по изображениям МЧ в водной суспензии, полученным с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 (Carl Zeiss, Германия). Заряд поверхности МЧ характеризовали их дзета-потенциалом в водной суспензии, который измеряли с использовали прибора динамического рассеяния света (ДРС) Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, США) при температуре 25°C.

Определение содержания РХ в МЧ. Для определения содержания РХ навеску МЧ (около 5 мг) растворяли в 5 мл ацетонитрила и измеряли оптическую плотность при 664 нм против раствора в ацетонитриле такой же навески СМГК. В качестве калибровки использовали 0,005% раствор РХ в ацетонитриле, полученный разведением раствора для инфузий «Радахлорин». Содержание воды в калибровочных растворах было менее 0,05% по объему. Измерения оптической плотности и снятие оптических спектров поглощения образцов проводили на спектрофотометре UV 3600 (Shimadzu, Япония).

Высвобождение РХ из МЧ. Высвобождение РХ из МЧ В/М/М и ТВ/М/В исследовали в 50 мМ калий-фосфатном буфере с рН 7,4. В 5 мл буфера в центрифужной пробирке суспензировали до однородности на встряхивателе типа Vortex 8-10 мг МЧ и инкубировали в термостате при температуре 37°C. Перед отбором проб для определения высвободившегося РХ, суспензию перемешивали до однородности встряхиванием, а затем осаждали МЧ центрифугированием при 10000 g, 10 мин. На каждый срок отбирали по 0,3 мл супернатанта. Отобранные пробы супернатанта хранили в замороженном состоянии при минус 20°C. По завершении эксперимента все отобранные пробы размораживали с последующим определением концентрации РХ по его флуоресценции с использованием планшетного считывателя CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия) в 96 луночных планшетах. Флуоресценция возбуждалась на длине волны 401 нм, регистрировалась на длине волны от 660 нм. Для калибровки использовали растворы РХ в описанном калий-фосфатном буфере, получаемые разведением раствора для инфузий «Радахлорин». Высвобождение РХ из МЧ сравнивали с его разрушением при инкубации в тех же условиях.

Генерация синглетного кислорода МЧ. Способность РХ в составе МЧ к образованию синглетного кислорода оценивали при облучении светом светоизлучающего диода (СИД) LZ1 00R202 (OSRAM SYLVANIA LED Engin, США) с максимумом излучения 660 нм. 0,5 мг/мл МЧ в 50 мМ калий-фосфатном буфере с рН 7,4 помещали в стандартную кювету спектрофотометра при температуре 25°C. К полученной суспензии добавляли 20 мкл 1 мМ раствора дифенилбензофурана (ДФБФ) в этаноле, и кювету в заданное время облучали сверху светом СИД с облученностью на поверхности (поверхностной плотностью мощности излучения) суспензии 15 мВт·см⁻². До и после облучения измеряли оптическую плотность при 415 нм в полосе поглощения ДФБФ, превращающегося при взаимодействии с синглетным кислородом в

эндоперекись, не поглощающую при этой длине волны. Убыль оптической плотности использовали в качестве характеристики интенсивности образования синглетного кислорода. Образование синглетного кислорода МЧ, содержащими РХ, сравнивали с образованием синглетного кислорода в растворе РХ с концентрацией 8,75 мкг/мл.

Исследование фотодинамического эффекта и цитотоксичность МЧ в культуре клеток. Клеточные культуры СНО (клетки яичников сирийского хомячка), МФС-7 (клетки аденокарциномы молочной железы человека) и В16 (клетки меланомы мыши) были получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). При изучении влияния МЧ на клетки использовали 6 луночные планшеты. Высеивали по 105 клеток в лунку в 2 мл среды DMEM 12, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 МЕ/мл пенициллина, 0,1 мкг/мл стрептомицина, 2 мМ L-глутамин. Клетки культивировали в темноте при температуре 37°C в увлажненной атмосфере с 5% содержанием CO₂. После 24 ч культивирования и формирования монослоя, для каждой линии клеток в одной трети лунок культуральную среду заменяли на свежую, в другой трети лунок на суспензию 0,5 мг/мл МЧ в культуральной среде и в последней трети лунок на раствор 1,75 мкг/мл РХ в культуральной среде. Через 24 ч во всех лунках культуральную среду заменяли свежей и половину лунок из каждого вида облучали по 10 мин светом СИД LZ1 00R202 с облученностью на поверхности культуральной среды 100 мВт·см⁻². Цитотоксичность МЧ и проявление фотодинамического действия на клетки оценивали через 24 ч с помощью МТТ-теста и электронной микроскопии. Микрофотографирование клеток осуществляли на световом микроскопе Axio Observer.A1 (Carl Zeiss, Германия), оборудованном осветителями HAL 100, HBO 100 и цифровой монохромной камерой AxioCam 503 mono, работающей под управлением программного обеспечения ZEN 2. При микроскопии устанавливали блок светофильтров 45 HQ TexasRed (EX BP 560/40, BS FT 585, EM BP 630/75). Цитометрический анализ проводили на визуализирующем проточном цитометре Amnis ImageStream X Mark II (Luminex Corporation, США) с использованием 40× объектива. Для измерения бокового рассеяния применяли лазер 785 нм (0,05 мВт), для возбуждения флуоресценции 488 нм и 642 нм (200 и 150 мВт, соответственно). Для каждого образца собиралось 6000 событий. Полученные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения IDEAS.

Статистическая обработка. Статистическую обработку экспериментальных данных делали с использованием программы Microsoft Office Excel. Приводимые экспериментальные данные представляют собой среднее по результатам трех параллельных измерений или приводятся в виде среднее ± стандартное отклонение. Для оценки различий средних и значимости коэффициента корреляции использовали критерии на основе t-статистики

Стьюдента. Данные на рисунках представлены в виде средних значений и стандартных отклонений по трем измерениям, если не оговорено другое количество измерений.

Результаты исследований

Согласно изображениям РЭМ, МЧ, полученные по методам множественной эмульсии В/М/В и В/М/М и множественной дисперсии ТВ/М/В, имеют сферическую форму и склонны к образованию аггломератов (рис. 1, 2). Измерение размеров частиц было проведено по полученным с помощью электронной микроскопии изображениям, поскольку при измерении с использованием ДРС, аггломераты выступают как целые частицы и их присутствие существенно искажает оценку размеров. Основное количество МЧ, полученных через множественную эмульсию, имеет размер (рис. 1а, 1б) до 10 микрон ($D_{90} < 10 \text{ мкм}$), в то время как МЧ, полученные по методу множественной дисперсии ТВ/М/В, характеризуются субмикронным размером (рис. 2).

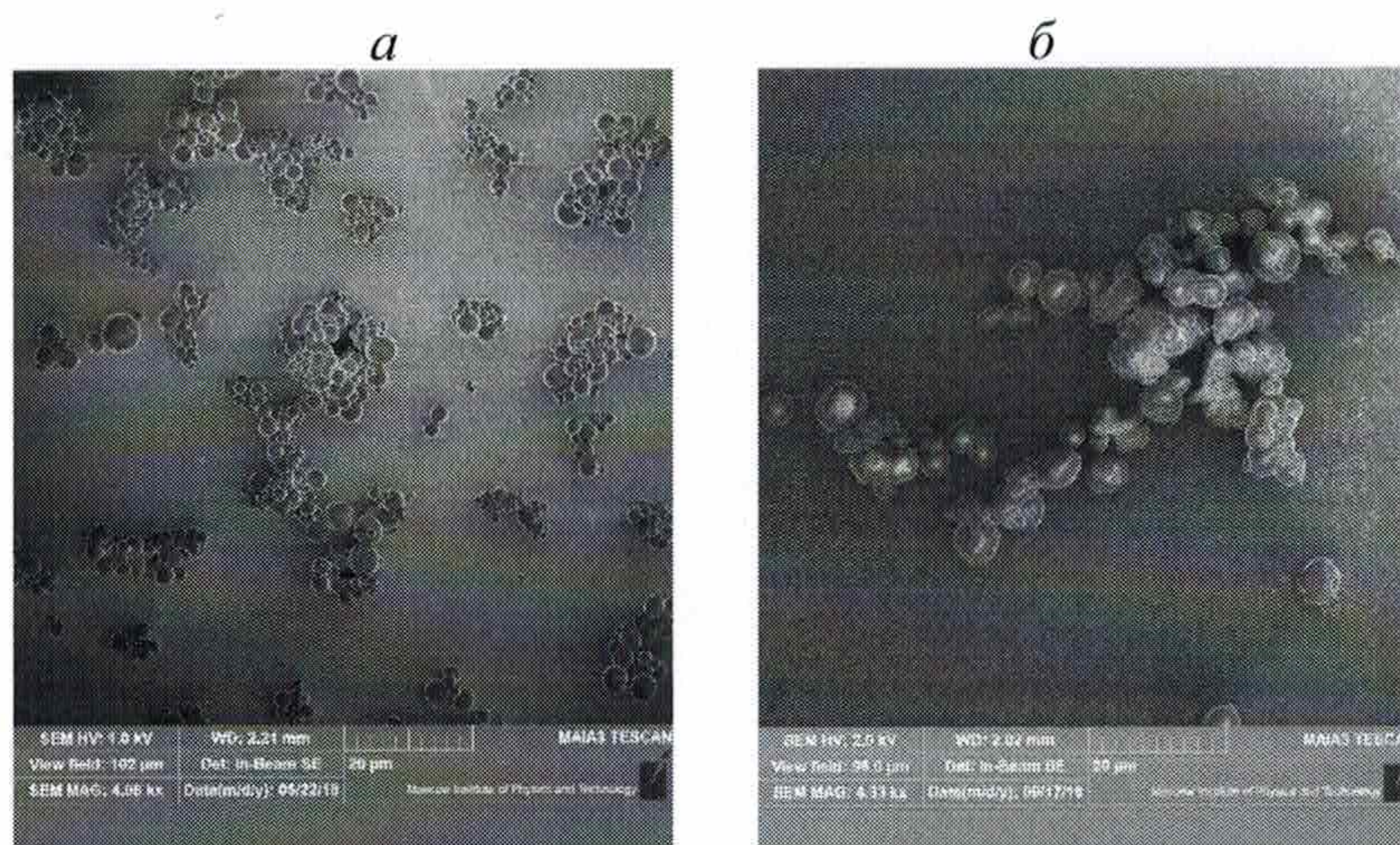


Рис. 1 – РЭМ МЧ, изготовленных а) по методу множественной эмульсии В/М/В; б) по методу множественной эмульсии В/М/М

При наличии МНЧ в полимерной матрице, МЧ имеют неправильную форму с выраженными складками, что может быть результатом образования двух фаз на поверхности МЧ и в её ядре в начале созревания. Отсутствие растворимости СМГК в углеводородах предполагает низкое сродство этого полимера к олеиновой кислоте, покрывающей МНЧ, что является предпосылкой для образования внутри созревающей МЧ гидрофобной фазы с низким содержанием СМГК по отношению к окружающему её раствору. В результате диффузии и испарения хлористого метилена в начале созревания МЧ происходит концентрирование этого раствора с формированием достаточно плотной оболочки, которая, по мере диффузии через неё растворителя и уменьшения объема внутренней фазы, сморщивается и формирует видимые на изображениях РЭМ складки (рис. 2).

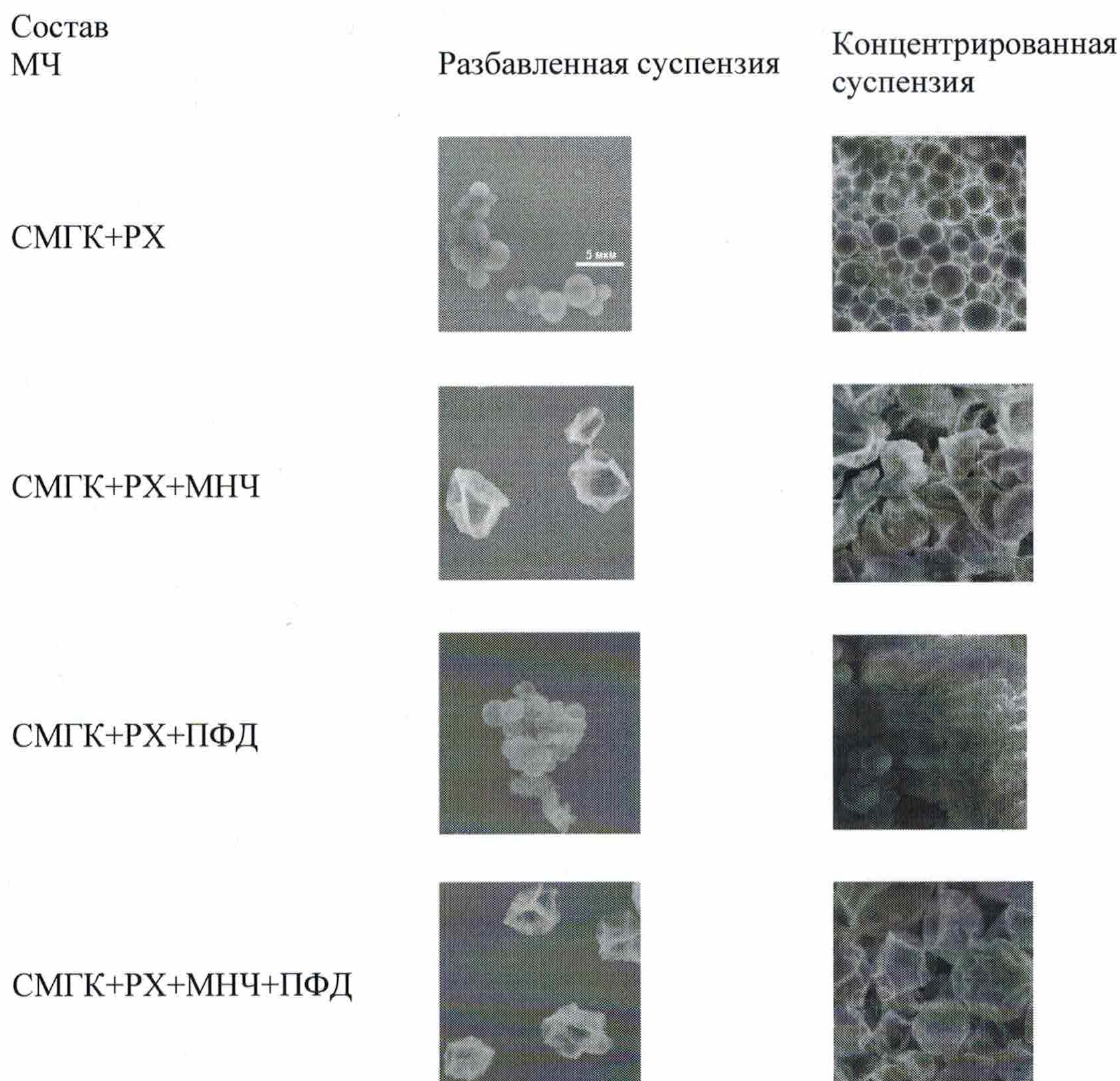


Рис. 2 – РЭМ МЧ разного состава, полученных по методу множественной эмульсии ТВ/М/В. Масштабная метка общая для всех изображений

МЧ, полученные по методу В/М/М, крупнее частиц, полученных по методу В/М/В и ТВ/М/В, и имеют большую полидисперсность (табл. 1). Отрицательный заряд частиц обуславливают наличие концевых карбоксильных групп у используемой для получения МЧ СМГК. Полученная величина дзета-потенциала МЧ находится на уровне значений известных из литературы для немодифицированных частиц, что указывает на отсутствие заметного влияния РХ в составе МЧ на их заряд.

Таблица 1 – Характеристики МЧ с РХ, изготовленных по методам В/М/В, В/М/М и ТВ/М/В

Состав МЧ	Диаметр МЧ, мкм ($\bar{D} \pm \sigma$)*	Коэффициент полидисперсности (σ^2 / \bar{D}^2)*	Дзета-потенциал МЧ, мВ	Содержание РХ в МЧ, мкг/мг	Степень включения РХ в МЧ**, %
В/М/В					
СМГК+РХ	1,74 ± 0,91	0,27	-38,6 ± 6,3 <i>n</i> = 9	0,089 ± 0,007	0,8 ± 0,1

В/М/М					
СМГК+РХ	$3,28 \pm 2,00$	0,37	$-33,8 \pm 3,7$ $n = 15$	$1,74 \pm 0,21$	$12,6 \pm 1,5$
ТВ/М/В					
СМКГ+РХ	$0,112 \pm 0,018$	0,027	$-19,5 \pm 4,5$	$0,27 \pm 0,11$	$6,6 \pm 2,7$
СМГК+РХ+ МНЧ	$0,240 \pm 0,045$	0,035	$-23,6 \pm 6,8$	$2,34 \pm 0,78$	$60,6 \pm 20,1$
СМГК+РХ+ ПФД	$0,138 \pm 0,054$	0,150	$-18,7 \pm 0,4$	$0,27 \pm 0,20$	$16,9 \pm 12,3$
СМКГ+РХ+ МНЧ+ПФД	$0,318 \pm 0,150$	0,224	$-19,6 \pm 1,8$	$1,16 \pm 0,59$	$72,3 \pm 36,8$

Примечание. * – рассчитан по результатам измерения размеров частиц на изображениях РЭМ,

** – доля от теоретического содержания РХ в МЧ при условии его полного включения.

Конфокальная микроскопия показала наличие нефлуоресцирующих зон, занимающих заметную часть внутри МЧ, полученных по методу В/М/В (рис. 3а), тогда как внутренняя структура МЧ, полученных по методу В/М/М, характеризовалась равномерным распределением флуоресцирующих и нефлуоресцирующих маленьких участков (рис. 3б). Описанная картина отражает особенности первичной дисперсной системы В/М, имеющей разную дисперсионную среду в используемых методах получения. В случае метода В/М/В в результате незначительной взаимной растворимости хлористого метилена с водой, первичная дисперсная система представляет собой эмульсию с капельками водного концентрата РХ в хлористом метилена, которые вымываются в процессе отмывки через отверстия, возникающие на поверхности МЧ. В методе В/М/М первичной дисперсной средой является свободно смешивающийся с водой раствор СМГК в ацетонитриле, в результате чего первичная дисперсная система вода в масле характеризуется высокой дисперсностью осадка РХ. Переход ацетонитрила во вторичную дисперсионную среду после получения вторичной эмульсии В/М/М приводит к дополнительной агрегации частиц осадка и их фиксации в слабо флуоресцирующей полимерной матрице в виде равномерно распределенных интенсивно флуоресцирующих участков.



Рис. 3 – Изображения оптических срезов конфокальной микроскопии МЧ с РХ, полученных по методикам В/М/В (а) и В/М/М (б). Флуоресценция возбуждалась лазером с длиной волны 405 нм и регистрировалось суммарное излучение флуоресценции в интервале длин волн от 597 нм до 695 нм. Шаг оптических z срезов равен 1 мкм

Предложенное описание формирования структуры при созревании МЧ согласуется с результатами оценки включения в них РХ (табл. 1): в случае МЧ, полученных по методу В/М/В, степень включения РХ составляет менее процента от максимально возможного, в то время как включение РХ в МЧ, полученные по методу В/М/М, выше более чем на порядок. При этом необходимо отметить, что включение РХ в МЧ и в последнем случае имеет небольшую величину, немного превышающую 10%, что можно объяснить отмечаемой амфифильностью хлоринов, которая может приводить к выходу части РХ из созревающих МЧ с последующим растворением во вторичной масляной дисперсионной среде и встраиванием в обратные мицеллы, образуемые Span 80. Добавление лецитина при образовании первичной дисперсии по методу получения МЧ ТВ/М/В, значительной степени способствует включению РХ в полимерную матрицу МЧ за счет увеличения его частичного растворения в хлористом метиле. В противном случае, при его отсутствии, включение РХ в МЧ по методу множественной дисперсии ТВ/М/В, согласно экспериментальным данным, не превышало 1%.

В результате спектрофотометрической оценки водной суспензии МЧ и раствора этих частиц в ацетонитриле были выявлены характерные для РХ пики (рис. 4а,б): длинноволновый в районе 660 нм и коротковолновый в районе 400 нм. Это указывает на то, что инкапсулированный в МЧ РХ сохраняет исходные оптические свойства, важные для ФТД.

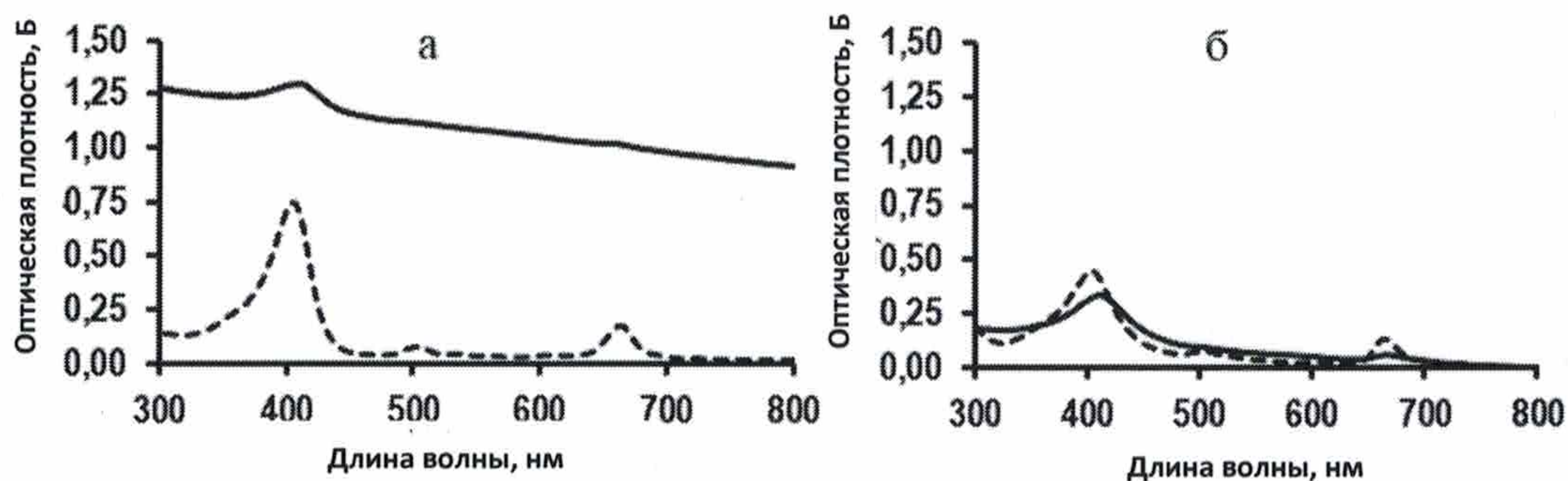


Рис. 4 – Спектры поглощения РХ, (—) (8,75 мкг/мл) и МЧ (В/М/М), (- - -) (2,5 мг/мл)
(а) – в 50 мМ калий-фосфатном буфере с рН 7.4; (б) – в ацетонитриле

Выявляемое достоверное ($p < 0,05$) повышение образования синглетного кислорода при облучении водной суспензии МЧ красным СИД с излучением в области длинноволновой полосы (около 660 нм) поглощения РХ (рис.5а,б) указывает на возможность использования таких МЧ в качестве терапевтического агента для ФДТ.

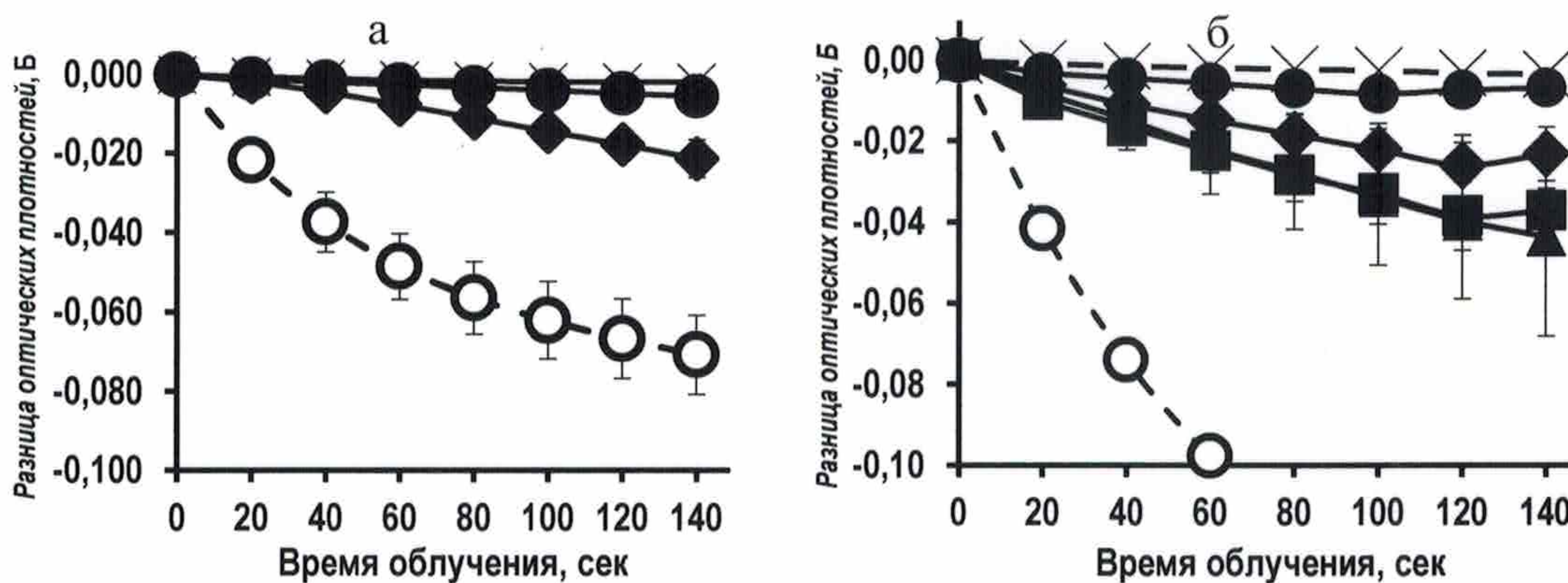


Рис. 5 – Образование синглетного кислорода МЧ и РХ в 50 мМ калий-фосфатном буфере с рН 7,4 при облучении СИД с $\lambda_{\text{max}}=660$ нм. Показано уменьшение поглощения при 415 нм в зависимости от продолжительности облучения при наличии в среде: а) \times - ДФБФ; \bullet - РХ (8.75мкг/мл); $-\circ-$ - ДФБФ и РХ; \blacklozenge - ДФБФ и МЧ (СМГК+РХ) (2.5 мг/мл), полученных по методике В/М/М; б) $-\circ-$ - РХ и ДФБФ, \times - МЧ (СМГК) и ДФБФ, \bullet - МЧ (СМГК+РХ) и ДФБФ, \blacklozenge - МЧ (СМГК+РХ+ПФД) и ДФБФ, \blacksquare - МЧ (СМГК+РХ+МНЧ) и ДФБФ, \blacktriangle - МЧ (СМГК+РХ+ПФД+МНЧ) и ДФБФ, полученных по методике ТВ/М/В

Согласно полученным данным, в водной дисперсии МЧ, полученных как по методу множественной эмульсии В/М/М, так и по методу множественной дисперсии ТВ/М/В, в течение первого часа достигается близкая к максимальной концентрация РХ, которая затем медленно снижается в течение периода более двух недель (рис. 6 а,б,в). В растворе РХ без частиц с исходной концентрацией РХ, практически равной максимальной концентрации высвободившегося из МЧ РХ, его содержание убывает существенно быстрее и уже через сутки оказывается достоверно ниже, чем в суспензии МЧ. При этом в суспензии МЧ без МНЧ концентрация РХ убывает лишь до половины от максимальной только через две недели, а в случае присутствия в полимерной матрице МНЧ, концентрация РХ остается практически неизменной в течение 30 сут. Описанная кинетика высвобождения характеризует МЧ как депо с пролонгированным высвобождением РХ, пригодное для поведения нескольких последовательных сеансов ФДТ без повторных инъекций ФС.

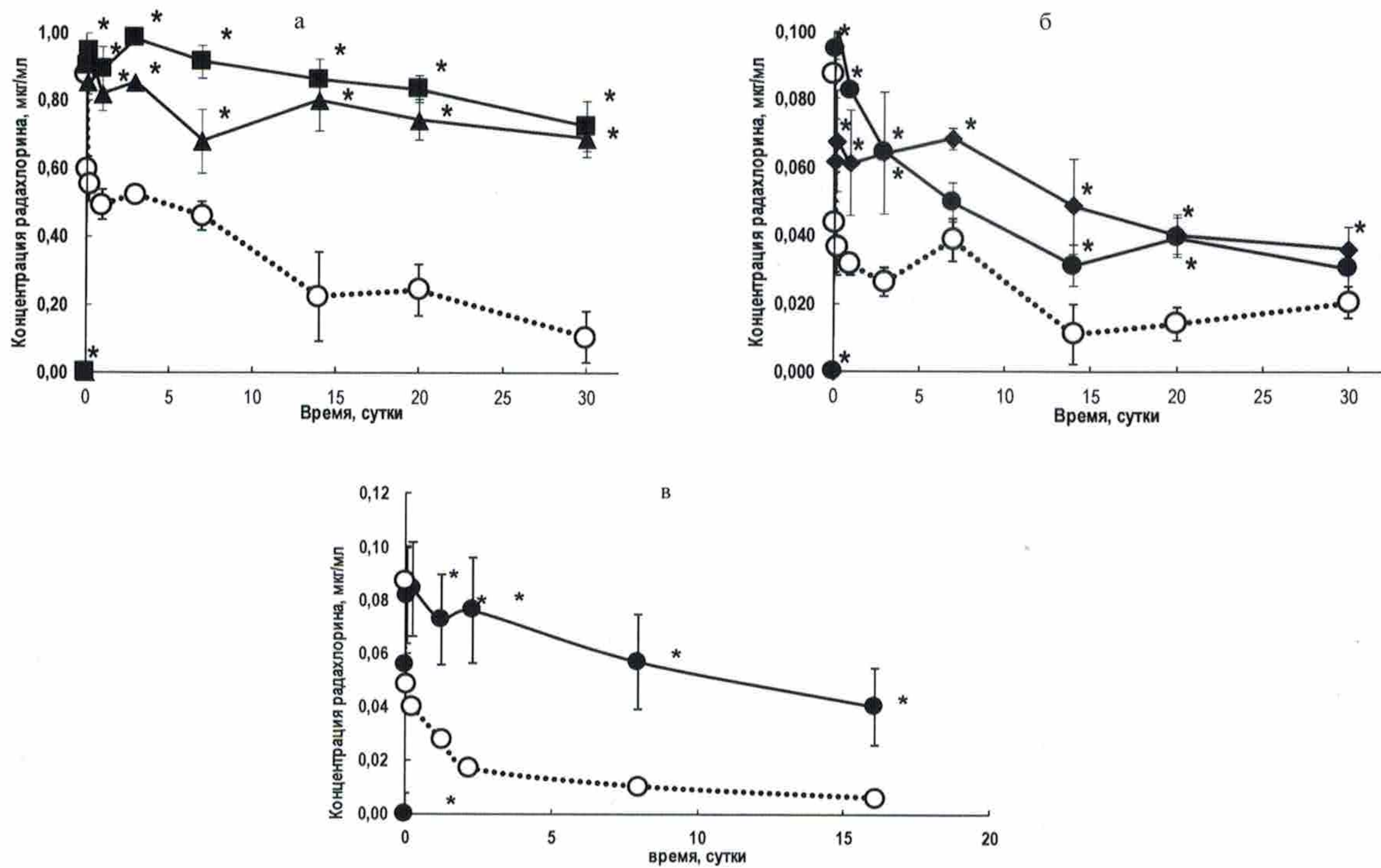



Рис. 6 – Высвобождение РХ из МЧ, а) полученных по методу ТВ/М/В, где \circ - РХ (0,875 мкг/мл), \blacktriangle - МЧ (СМГК+РХ+ПФД+МНЧ), \blacksquare - МЧ (СМГК+РХ+МНЧ) б) полученных по методу ТВ/М/В, где \circ - РХ (0,0875 мкг/мл), \bullet - МЧ (СМГК+РХ), \blacklozenge - МЧ (СМГК+РХ+ПФД) в) полученных по методу В/М/М, где \circ - РХ (0,0875 мкг/мл), \bullet - МЧ (СМГК+РХ). * - $p < 0,05$ для отличий от пробы только с РХ

Согласно результатам проведенных исследований с использованием световой микроскопии, МЧ с РХ, полученные методами В/М/М и ТВ/М/В, поглощаются клетками линии СНО и накапливаются в цитоплазме, при этом не вызывая существенных изменений в плотности монослоя (рис. 7). Хорошо различимая флуоресценция МЧ на изображениях флуоресцентной микроскопии указывает на возможность использования таких частиц в качестве агентов для диагностики, посредством визуализации поглотивших их клеток.

Добавка в культуральную среду (состав МЧ)	Микроскопия в проходящем свете	Флуоресцентная микроскопия
Без добавок		
МЧ (В/М/М)		

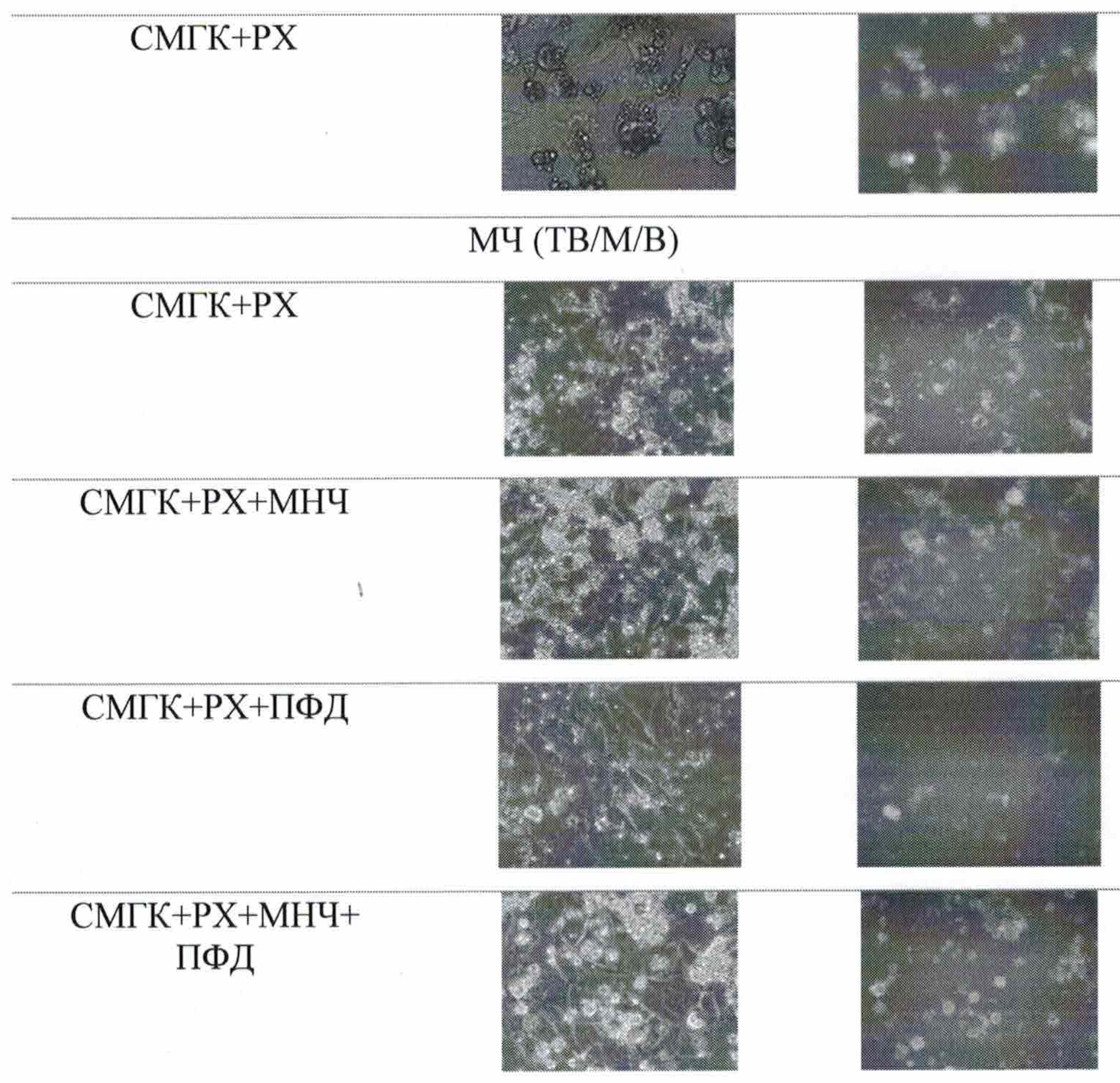


Рис. 7 – Световая микроскопия монослоя клеток СНО (клетки яичников сирийского хомячка) через 1 сут после инкубации с МЧ, полученными методом В/М/М и ТВ/М/В, разного состава.

Масштабная метка общая для всех изображений

На микрофотографиях визуализирующей проточной цитометрии также видно расположение МЧ внутри контура клетки после перевода клеток в суспензию и их отмывки. Определение показателя поглощения МЧ клетками в виде количества объектов с флуоресценцией РХ показывает, что после инкубации с МЧ у не менее 90% клеток СНО обнаруживается до нескольких пятен, флуоресцирующих как МЧ. Существенный сдвиг вправо распределения интенсивности флуоресценции РХ у клеток, инкубированных с МЧ, по сравнению с интактными клетками и пропорциональный приросту флуоресценции РХ прирост бокового светорассеяния клеток после инкубации с МЧ в сочетании с несущественным изменением размера клеток указывает на внутриклеточное нахождение МЧ. Прирост бокового светорассеяния отражает увеличение содержания рассеивающих МЧ внутри клетки, а несущественное изменение размера клетки указывает на то, что размер поглощенных МЧ существенно меньше её размера.

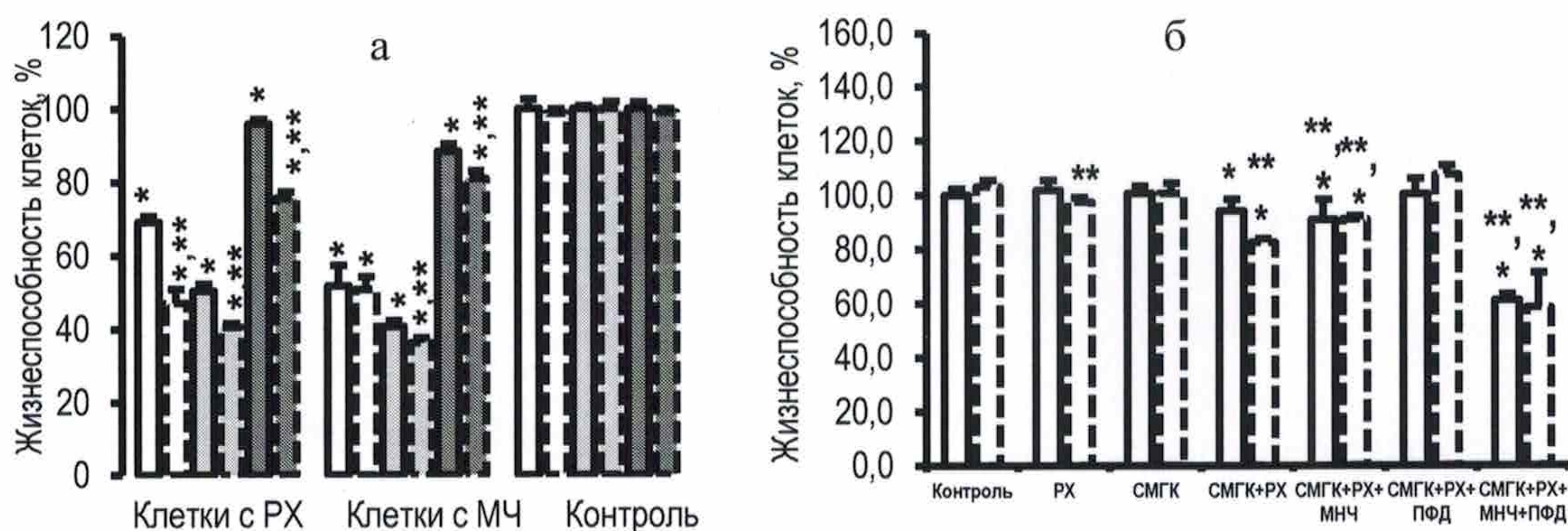







Рис. 8 – Влияние РХ и содержащих РХ МЧ, полученных методом В/М/М (а) и ТВ/М/В (б), на жизнеспособность клеток и фотодинамическое действие на эти клетки светового облучения по результатам МТТ теста.  -клетки CHO,  -клетки MCF-7.  -клетки V16.  - клетки без облучения,  - клетки после облучения СИД. * - $p < 0.05$ для отличий от клеток той же линии без добавок и облучения, ** - $p < 0.05$ для отличий от клеток той же линии и в таких же условиях, но без облучения СИД.

По результатам МТТ-теста, поглощение МЧ, содержащих РХ, клетками в культуре сопровождается снижением их жизнеспособности (рис. 8). Наблюдаемое угнетение метаболизма может быть связано как с цитотоксическим действием высвобождающегося внутри клеток РХ, так и с нарушением их структуры поглощенными МЧ. Сходные межлинейные соотношения выраженности изменений жизнеспособности клеток, вызванных МЧ с РХ, с таковыми, вызываемыми чистым РХ, указывает на сходную природу повреждающего фактора в обоих случаях. Это означает, что ведущую роль в имеющем место угнетении жизнеспособности клеток играет высвобождение РХ из МЧ.

Таким образом, в ходе настоящего исследования были разработаны три методики получения МЧ на основе биоразлагаемых полимеров через множественную эмульсию В/М/В, В/М/М и через множественную дисперсию ТВ/М/В. В ходе эксперимента были обоснованы преимущества использования методики получения МЧ через множественную дисперсию ТВ/М/В, такие как упрощенная технология и меньшее количество используемых органических растворителей. Были оценены физико-химические свойства полученных МЧ: структура, размер, дзета-потенциал и процент включения в полимерную матрицу ДВ в соответствии с примененной методикой получения. Анализ профиля высвобождения действующего вещества из МЧ указал на возможность использования полученных МЧ в качестве депо с пролонгированным высвобождением РХ, которое в течение не менее двух недель может поддерживать в своём микроокружении концентрации ФС. Способность инкапсулированного РХ к генерации

синглетного кислорода и проявлению цитотоксического действия позволяет рассматривать МЧ в качестве терапевтических агентов для ФДТ.

ВЫВОДЫ

1. Проведенный сравнительный анализ литературных данных показал, что использование МЧ и НЧ в качестве систем доставки ФС определяется такими преимуществами как сохранение свойств инкапсулированного вещества, защита ядра МЧ от окружающей среды, предотвращение системных побочных эффектов и оптимизация или пролонгирование действия ЛС. При использовании биоразлагаемых полимеров в качестве матрицеобразующих компонентов, полимерная система играет одно из решающих значений во время растворения и высвобождения действующего вещества, но много зависит и от физико-химических свойств инкапсулированного ДВ, его растворения в воде и светочувствительности.

2. На основании анализа данных научных публикаций и проведенных исследований были разработаны методики получения МЧ методами множественных эмульсий В/М/В и В/М/М и множественной дисперсии ТВ/М/В, проведен выбор в качестве матрицеобразователя биodeградируемого СМГК. В полимерную матрицу микрочастиц, изготовленных методом множественной дисперсии ТВ/М/В, были включены такие дополнительные компоненты, как покрытые олеиновой кислотой гидрофобные МНЧ и ПФД. Обосновано использование в качестве основного метода получения –получение микрочастиц через множественную дисперсию ТВ/М/В, в виду упрощенной технологии и меньшего количества органических растворителей.

3. Оценены морфологические и физико-химические свойства полученных наноструктурированных МЧ: субмикронный размер, сферическая форма, отрицательный дзета-потенциал, процент включения ДВ по отношению к полному теоретическому включению. Выявлена измененная структура поверхности МЧ в присутствии МНЧ в виде неправильной формы с выраженными складками в результате образования двух фаз на поверхности МЧ и в ее ядре в начале созревания. Содержание инкапсулированного РХ варьирует в МЧ разного типа от 10% до 60% в зависимости от состава. Показана зависимость увеличения процента включения ДВ от методики получения МЧ и присутствия в полимерной матрице дополнительных компонентов.

4. Изучен профиль высвобождения инкапсулированного ФС из МЧ разного типа. Определено, что в первый час в окружающем МЧ растворе достигается близкая к максимальному концентрация РХ, которая затем постепенно снижается в течение двух недель по отношению к свободному РХ, концентрация которого оказывается значительно ниже уже через сутки, что позволяет рассматривать МЧ в качестве перспективной ЛФ с пролонгированным высвобождением ДВ. Присутствие в МЧ дополнительных компонентов (МНЧ и ПФД) увеличивает время высвобождения инкапсулированного ФС до одного месяца. Показана

способность РХ, включённого в полимерную матрицу МЧ разных типов В/М/М и ТВ/М/В, генерировать синглетный кислород, что определяет применимость таких МЧ в качестве терапевтических агентов для ФДТ.

5. Показано, что полученные полимерные МЧ с РХ поглощаются клетками опухолевых линий и обладают фотоактивируемой цитотоксичностью. Показано, что включение в состав МЧ в качестве дополнительных компонентов МНЧ и ПФД сопровождается сохранением фотодинамических и фотоактивируемых цитотоксических свойств МЧ, что делает включение этих компонентов перспективным направлением создания наноструктурированных МЧ с управляемой доставкой и высвобождением РХ. Исходя из полученных научных результатов в качестве наиболее вероятной ЛФ можно предложить инъекционный ЛП для парентерального введения и аппликационный ЛП, наносимый на слизистые и в раны в качестве перспективы дальнейшей разработки темы.

Практические рекомендации

Выполненные исследования позволили разработать метод получения МЧ через множественную дисперсию ТВ/М/В, а также обосновать преимущества данного метода по сравнению с методами получения МЧ через множественные эмульсии В/М/В и В/М/М. Была доказана способность полученных в результате исследования МЧ к проявлению фотодинамических свойств, их цитотоксичность и возможность пролонгированного высвобождения из них ДВ, что позволяет рассматривать такие МЧ в качестве ЛП типа депо с пролонгированным высвобождением.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Приведенные выводы позволяют рассматривать полученные МЧ в качестве депо с пролонгированным высвобождением ДВ. Перспективой дальнейшей разработки темы является выбор ЛФ и создание лекарственного препарата на основе полученных МЧ. Возможными направлениями разработки являются инъекционный ЛП для парентерального введения в полости и аппликационный ЛП, наносимый на слизистые и в раны. Включение МНЧ и ПФД в качестве дополнительных компонент МЧ является направлением создания ЛП с управляемым высвобождением РХ для усиления фотодинамического эффекта.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Мирошкина А.М.** Разработка микрочастиц с высвобождением действующего вещества для фотодинамической терапии //Материалы XVIII Научной конференции молодых ученых молодых ученых и специалистов ФГБОУ ВО СОГМА Минздрава России с международным участием «Молодые ученые – медицине». – Владикавказ, 2019. – С. 123-124

2. **Мирошкина А.М., Кречетов С.П.** Разработка частиц с радахлорином для фотодинамической терапии // Материалы V Петербургского международного онкологического форума «Белые ночи 2019». – Санкт-Петербург, 2019. – С. 40

3. **Мирошкина А.М.** // Разработка наноструктурированных микрочастиц с радахлорином для фотодинамической терапии опухолей и определение цитотоксичности действующего вещества / Сборник материалов VIII международного молодежного медицинского конгресса «Санкт-Петербургские научные чтения-2019». – Санкт-Петербург, 2019. – С. 335

4. S.P. Krechetov, **A.M. Miroshkina**, M.N. Yakovtseva, E.N. Mochalova, A.V. Babenyshev, I.V. Maslov, A.A. Loshkarev, I.I. Krasnyuk // Radachlorin-containing Microparticles for Photodynamic Therapy / **Advanced Pharmaceutical Bulletin**. – V. 11, № 3. –P. 458–468

DOI: 10.34172/apb.2021.053 [**Scopus**]

5. **Мирошкина А.М., Яковцева М.Н., Мочалова Е.Н., Бабёнышев А.В.** // Биосовместимые полимерные микрочастицы с радахлорином для фотодинамической терапии / Сборник тезисов XV Международной Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. – Москва, 2020. – С. 124-125

6. **Мирошкина А.М., Кречетов С.П., Яковцева М.Н., Бабёнышев А.В., Краснюк И.И.** // Разработка наноструктурированных полимерных микрочастиц с радахлорином в качестве комплексной системы доставки для фотодинамической терапии / Материалы Международного форума «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – Москва, 2020. – С. 160-161

7. **Мирошкина А.М., Кречетов С.П., Соловьева Н.Л., Краснюк И.И.** // Включение фотосенсибилизатора радахлорина в полимерные микрочастицы как перспективное направление улучшения его эффективности при фотодинамической терапии опухолей» / **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2021. – Т. 24, № 2. – С. 9–14

DOI: <https://doi.org/10.29296/25877313-2021-02-02> [**ВАК**]

8. **Мирошкина А.М., Кречетов С.П., Соловьева Н.Л., Краснюк И.И.** // Разработка полимерных микрочастиц с радахлорином и оценка перспектив их использования в фотодинамической терапии /**Российский биотерапевтический журнал**. – 2021. – Т.20. – С. 47–55 **DOI:** 10.17650/1726-9784-2021-20-3-47-56 [**ВАК**]

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

МЧ – микрочастицы	ТВ/М/В – множественная дисперсия твердое в масле в воде
НЧ – наночастицы	ПФД – перфтордекалин
ХТА – химиотерапевтические агенты	РЭМ – растровая электронная микроскопия
ФС – фотосенсибилизаторы	ДСР – прибор динамического рассеяния света
ФДТ – фотодинамическая терапия	СИД – светопоглощающий светодиод
ЛС – лекарственное средство	ДФБФ – дифенилбензофуран
ДВ – действующее вещество	СНО – клетки яичников сирийского хомячка
РХ – радахлорин	МФС 7 – клетки аденокарциномы молочной железы человека
МНЧ – магнитные наночастицы	В16 – клетки меланомы мыши
СМГК – сополимер молочной и гликолевой кислот	ЛП – лекарственный препарат
В/М/В – множественная эмульсия вода в масле в воде	ЛФ – лекарственная форма
В/М/М – множественная эмульсия вода в масле в масле	