

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

*На правах рукописи*



Мирошкина Анастасия Максимовна

**Получение наноструктурированных микрочастиц для управляемой доставки  
и высвобождения действующего вещества для фотодинамической терапии**

14.04.01 – Технология получения лекарств

Диссертация

на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

**Научный руководитель:**

доктор фармацевтических наук, профессор  
Краснюк Иван Иванович

**Научный консультант:**

кандидат медицинских наук, доцент  
Кречетов Сергей Петрович

Москва – 2021

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. Фотодинамическая терапия опухолей.....	16
1.1.1. История возникновения и сущность метода.....	16
1.1.2. Накопление фотосенсибилизаторов в клеточных структурах и механизмы гибели клеток.....	20
1.1.2.1. Апоптоз.....	21
1.1.2.2. Некроз.....	23
1.1.2.3. Аутофагия.....	24
1.2. Источники света для фотодинамической терапии.....	26
1.3. Преимущества и недостатки фотодинамической терапии.....	28
1.4. Фотосенсибилизаторы для фотодинамической терапии.....	29
1.4.1. Классификация фотосенсибилизаторов.....	31
1.4.1.1. Фотосенсибилизаторы первого поколения.....	31
1.4.1.2. Фотосенсибилизаторы второго поколения (порфирины и фталоцианы)....	34
1.4.1.3. Фотосенсибилизаторы второго поколения (хлорины).....	36
1.5. Радахлорин, как химиотерапевтический агент для фотодинамической терапии.....	38
1.6. Фотосенсибилизаторы третьего поколения.....	39
1.6.1. Микро-носители и нано-носители в качестве систем доставки.....	39
1.6.1.1. Липосомы.....	41

1.6.1.2. Микросферы и микрокапсулы .....	42
1.7. Типы и механизмы высвобождения действующего вещества.....	44
1.8. Методы получения микрочастиц.....	46
1.8.1. Основные компоненты.....	46
1.8.2. Процессы образования микрочастиц.....	49
Выводы к главе 1 .....	51
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	52
2.1. Материалы исследования.....	52
2.1.1. Фотосенсибилизатор.....	52
2.1.2. Вспомогательные вещества.....	53
2.1.3. Оборудование.....	57
2.2. Методы.....	59
2.2.1. Методы приготовления микрочастиц.....	59
2.2.1.1. Множественная эмульсия вода/в масле/в воде.....	59
2.2.1.2. Множественная эмульсия вода/в масле/в масле.....	60
2.2.1.3. Множественная дисперсия твердое/в масле/в воде.....	62
2.2.2. Измерение размеров и дзета-потенциала микрочастиц.....	63
2.2.3. Определение содержания радахлорина в микрочастицах.....	63
2.2.4. Высвобождение радахлорина из микрочастиц.....	64
2.2.5. Генерация микрочастицами синглетного кислорода.....	66
2.2.6. Исследование фотодинамического эффекта микрочастиц в культуре клеток.....	67

2.2.7. Микроскопия и цитометрический анализ.....	68
2.2.8. Оценка жизнеспособности клеток.....	68
2.3. Статистическая обработка.....	69
Глава 3. Характеристика морфологии и размеров микрочастиц.....	70
3.1. Сравнительная характеристика морфологии и размеров микрочастиц, полученных по методу множественной эмульсии вода/в масле/в воде и вода/в масле/ в масле.....	70
3.2. Характеристика морфологии и размеров микрочастиц, полученных по методу множественной дисперсии твердое/в масле/в воде.....	76
Выводы к главе 3 .....	82
Глава 4. Оценка фотодинамических свойств полученных микрочастиц.....	84
4.1. Оценка фотодинамических свойств микрочастиц, полученных по методу вода/в масле/ в масле.....	84
4.2. Оценка фотодинамических свойств микрочастиц, полученных по методу твердое/в масле/в воде.....	87
Выводы к главе 4 .....	90
Глава 5. Оценка цитотоксических свойств.....	92
5.1 Оценка цитотоксических свойств микрочастиц, полученных по методу вода/в масле/в масле.....	92
5.2 Оценка цитотоксических свойств микрочастиц, полученных по методу твердое/в масле/в воде.....	98
Выводы к главе 5 .....	101

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	103
Общие выводы.....	103
Перспективы разработки темы.....	105
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	108
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	110
ПРИЛОЖЕНИЕ А.....	128
ПРИЛОЖЕНИЕ Б.....	129

## ВВЕДЕНИЕ

### 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 биodeградации 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 кровотоки: 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 еб – 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 научной проблемы**

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 (Е

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 исследования** – разработка и анализ наноструктурированных биосовместимых микрочастиц для фотодинамической терапии опухолей с возможностью управляемого накопления и высвобождения фотосенсибилизатора.

**Задачи исследования:**

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 ФС и МНЧ.

3. Исследовать физико-химические и морфологические свойства получаемых наноструктурированных МЧ, оценить процент включения в них ДВ.

4. Оценить профиль высвобождения ФС из наноструктурированных МЧ, способность таких МЧ к проявлению фотодинамических свойств.

5. Провести исследование на цитотоксичность получаемых наноструктурированных МЧ и исходя из вышеопределенных характеристик определить их пригодность для использования в качестве терапевтических агентов для ФДТ опухолей с предложением наиболее вероятной ЛФ.

**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 работы**

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 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 спектрофлюориметрия, 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, спектрофлюориметрия, потенциометрия, лазерная спектроскопия рассеяния, световая, электронная и конфокальная микроскопия, метод динамического рассеяния света; оценка полученных МЧ 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.

### **Достоверность 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, 2019», 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). Акт внедрения научных результатов представлен в Приложении А.

#### **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.

### **Объем и структура 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.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Согласно данным Всемирной Организации Здравоохранения, онкологические заболевания являются одной из главных причин роста мировой смертности [1]. На 2018 г. статистика насчитывает около 9,6 миллионов заболеваний с летальным исходом по всему миру, из которых  $\frac{1}{4}$  случаев зафиксирована на территории Российской Федерации. Наибольшее число ежегодных летальных случаев от онкологических заболеваний происходит от онкологий легких (2,09 миллиона), молочных желез (2,09 миллиона), рака толстой кишки (1,80 миллиона), прямой кишки (1,28 миллиона), кожи (1,04 миллиона) и желудка (1,03 миллиона случаев). По приведенным Всемирной Организации Здравоохранения прогнозам, количество смертельных случаев от онкологических заболеваний может возрасти от 10 до 22 миллионов в ближайшие десятилетия [2].

Несмотря на определенные успехи в диагностике и лечении онкологических заболеваний, темпы прироста заболеваемости продолжают расти. В настоящее время в клинической практике применяются различные методы лечения онкологии, одним из которых является метод ФДТ. Преимуществом его использования по отношению к обычной химиотерапии является высокая эффективность и существенное снижение количества осложнений и побочных эффектов со стороны здоровых органов и тканей. ФДТ основан на селективном накоплении в тканях злокачественных опухолей группы лекарственных препаратов (ЛП) – ФС, которые, под воздействием энергии лазерного излучения, вырабатывают синглетный кислород и свободные радикалы, что, в свою очередь, приводит к гибели накопивших ФС опухолевых клеток без вреда для здоровых тканей [3].

На сегодняшний день разрабатываются новые способы внутриклеточной доставки ФС, которые позволили бы увеличить процент накопления ФС в клетках и повысить их эффективность действия на опухоли. Одним из таких способов внутриклеточной доставки является доставка ФС с применением коллоидных микротранспортных систем на основе СМГК, представляющих собой МЧ размером

до 1 мкм [4]. Таким образом можно предотвратить преждевременное выведение ДВ из организма и обеспечить изоляцию терапевтического агента до взаимодействия с целевыми мишенями, что, в свою очередь, позволит снизить частоту приема препарата.

Исходя из экспериментальных работ, были выработаны основные требования, предъявляемые к нано- и микроносителям:

1. В первую очередь, это больший процент инициации механизма фагоцитоза с помощью нано- и микроносителей в целевых клетках, в сравнении с клетками ретикуло-эндотелиальной системы;
2. Во-вторых, структурный материал нано- и микроносителей должен оставаться стабильным в процессе транспорта в кровяном русле и подвергаться биодegradации после попадания внутрь целевых клеток под действием лизосомальных ферментов с выделением неизмененного ДВ;
3. Стабильность суспензии нано- и микроносителя в плазме крови выносят отдельным пунктом в виде третьего немаловажного условия, так как агрегация МЧ может порождать такие особо токсические эффекты как тромбозы средних и мелких сосудов, что, в свою очередь, препятствует направленному транспорту.

До недавнего времени оставался открытым вопрос о контролируемой доставке микроносителя и ДВ в опухолевые ткани. Разработка таргетных методов доставки объяснена потребностью к увеличению эффективности терапии онкологических заболеваний и снижению системных побочных эффектов. Одним из способов таргетной доставки ДВ является управляемая доставка терапевтических агентов к мишени под воздействием внешнего магнитного поля, сфокусированного на опухоли [5]. Помимо таргетной доставки, важным свойством МНЧ является возможность осуществлять их локальный нагрев высокочастотным магнитным полем для инициации высвобождения ДВ или проведения магнитной гипертермии [6], а также возможность визуализировать их с помощью методов магнитной резонансной томографии [7].

В ноябре 2013 г. на базе лабораторий Первого Московского медицинского университета имени И.М. Сеченова были проведены исследования на получение

наноструктурированных ЛФ на основе СМГК, закончившиеся публикацией в журнале «Разработки и регистрации лекарственных средств». С 2016 г. и по настоящее время в мировой практике ведутся исследовательские работы по получению и включению МНЧ в ФДТ опухолей для улучшения эффективности доставки терапевтического агента к органу-мишени.

## 1.1. Фотодинамическая терапия опухолей

### 1.1.1. История возникновения и сущность метода

ФДТ описывается как разновидность химиотерапии, которая основана на фотохимической реакции возбуждения активных форм кислорода через активацию ФС посредством лазерного облучения. Классическое определение ФДТ было сформулировано Е.Ф. Странадко [8], который определял ФДТ как метод локальной активации накопившегося в опухоли ФС видимым красным светом, в присутствии кислорода тканей приводящий к развитию фотохимической реакции и гибели клеток.

Первое детальное описание «химической фотосенсибилизации» биологической ткани относится к началу XX в. В 1900 г. О. Рааб было установлено, что химически инертные в темноте акридиновый и другие красители в низкой концентрации при облучении солнечным светом приводят к быстрой гибели *Paramecium caudatum* (инфузория-туфелька) [9, 10]. Г. Таппинер инициировал дальнейшее развитие данное открытия, и выступил с предложением термина "фотодинамическое действие" для избежания возможной путаницы с аналогичными фотохимическими процессами, реализуемыми в фотографии. В 1903-1905 гг., Г. Таппинер и А. Джесионек были опубликованы результаты клинического применения эозина и флуоресцеина в качестве ФС при лечении герпеса, псориаза и рака кожи [11]. Последующее изучение фотодинамического эффекта привело к развитию нового направления в медицине – ФДТ злокачественных опухолей.

В начале двадцатого столетия экспериментальным путем выяснилось, что клетки опухоли могут селективно накапливать и некоторое время удерживать окрашенные вещества, как находящиеся в организме (эндогенные порфирины), так и вводимые в него извне (экзогенные порфирины). Одним из важных шагов на пути к созданию метода ФДТ опухолей явилось наблюдение А. Поликарда в 1924 г. о том, что накопившиеся в опухоли эндогенные порфирины обладают способностью к флуоресценции при облучении светом видимой части спектра [12].

Началом современного этапа применения ФДТ в онкологии можно определить период начала 60-х г. XX в., характеризующийся исследованием Р. Липсона о способности производных гематопорфирина к флуоресценции в красной области спектра при облучении синим светом, и их накоплении в опухоли в результате внутривенного введения [13, 14]. В 1978 г. американский профессор Т. Догерти сообщил об успешном лечении методом ФДТ 25 больных с первичными, рецидивными и метастатическими опухолями кожи [15], что послужило началом широкого клинического применения ФДТ. В дальнейшем метод ФДТ получил развитие в Великобритании, Франции, Германии, Италии, Японии, Китае, Южной Корее и ряде других стран.

Однако, несмотря на многолетние исследования в мировой практике, в России ФДТ получила развитие только с 1992 г., когда в Московском институте химической технологии им. М.В. Ломоносова под руководством профессора А.Ф. Миронова был создан первый отечественный ФС – фотогем, относящийся к группе порфиринов. В 1994 г. были начаты клинические испытания ФС второго поколения – фотосенса, являющегося сульфированным фталоцианином алюминия, а с 2000 г. – было инициировано активное применение препаратов на основе 5-аминолевулиновой кислоты и препаратов, синтезированных на природном хлорине Е6 (Аласенс, Радахлорин и Фотодитазин, соответственно).

Основной принцип метода ФДТ заключается в образовании активного кислорода в результате облучения клеток светом красного светодиода с определенной длиной волны в присутствии ФС. Процесс ФДТ можно разделить на четыре основных этапа (Рисунок 1). На первом этапе в организм больного

вводится ФС. На втором этапе, который имеет продолжительность от нескольких часов до нескольких суток, происходит распределение и накопление ФС в патологической ткани [16, 17].



Рисунок 1 – Четыре основных этапа проведения фотодинамической терапии

Механизм проникновения и селективного удерживания ФС в опухолевых клетках до конца не изучен, однако научным сообществом были выдвинуты несколько гипотез:

- накопление ФС в клетках опухоли по сравнению с клетками здоровой ткани может быть обусловлено аномальным строением кровеносных сосудов пораженной ткани, и их, вследствие аномального строения, повышенной проницаемостью;
- связыванию ФС с клетками опухоли так же может способствовать низкий рН внеклеточной жидкости, что, в свою очередь, способствует повышению липофильности порфиринов и хлоринов, и обеспечивает их проникновение в клетки.

Фармакокинетика ФС, процент их накопления в ткани, характер проникновения в клетку и их распределение в значительной степени зависит от физико-химических свойств самого ФС, а не только от свойств органов или тканей. Поглощение кванта света молекулой ФС инициирует переход молекулы в синглетное и в более долгоживущее – триплетное состояние, которое затем может претерпевать два типа реакции (Рисунок 2). Непосредственное прямое

взаимодействие с субстратом в виде клеточной мембраны или молекулы с образованием анион-радикала называют реакцией первого типа. Образовавшийся анион-радикал реагирует с кислородом, образуя его активные формы (АФК) в виде гидроксил-радикалов и супероксид-анионов [18], являющимися особо токсичными продуктами окисления для мембран клеточных органелл. Обладая высоким окислительным потенциалом, АФК взаимодействуют с липидами мембран органелл опухолевой клетки, вызывая их дестабилизацию и последующее разрушение. Главная характеристика реакций второго типа заключается в передаче энергии молекулярному кислороду и переводом его в возбужденное состояние. В таком случае кислород тканей поглощает энергию ФС, возбужденного квантом света, и образует высокотоксичный для клеток синглетный кислород ( $^1O_2$ ), провоцирующий дальнейшее окисление клеточных структур [19]. Реакции как 1-го, так и 2-го типа могут происходить одновременно, и соотношение между этими процессами зависит от типа используемого ФС, а также концентрации субстрата и кислорода [20, 21].

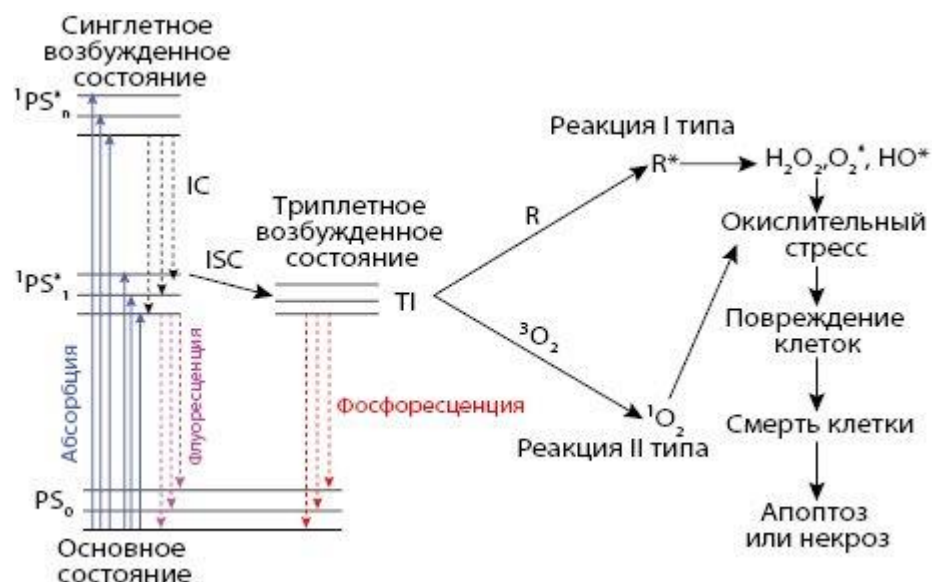


Рисунок 2 – Схема реакций фотосенсибилизатора 1-го и 2-го типа

Синглетный кислород, образованный в результате фотохимических реакций, разрывает атомарные связи между атомами одной молекулы, способствуя образованию свободных радикалов, и инициирует процесс разрушения клеточных мембран [22]. Образовавшиеся свободные радикалы индуцируют образование

новых биохимических реакций между другими веществами и вновь образованными радикалами, а остатки разрушенных клеточных структур удаляются с помощью фагоцитоза [23, 24] или через венозные и лимфатические капилляры [25].

### 1.1.2. Накопление фотосенсибилизаторов в клеточных структурах и механизмы гибели клеток

Основное определение эффективности ФДТ зависит от локализации ФС, степени его накопления в клетках и процентом его фотохимической активности. Флюоресцентные микроскопические исследования показали основное накопление ФС в мембранных структурах опухолевых клеток, однако стоит заметить, что механизм проникновения ФС в клетки опухоли и процесс его накопления в опухолевых тканях полностью до сих пор не изучен. Имеющиеся данные позволяют предположить, что проникновение ФС в клетку возможно с помощью механизма пассивной диффузии, рецепторно-опосредованного механизма с помощью липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) [26]. Некоторые исследования объясняют увеличение накопления ФС свойствами самой опухолевой ткани (Таблица 1, Рисунок 3).

Таблица 1 – Основные механизмы гибели клеток, инициированные ФДТ

	<b>Клеточные органеллы</b>	<b>Механизмы гибели клеток</b>
<b>Целевое повреждение клетки</b>	Митохондрии: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Высвобождение цитохрома С</li> <li>• Повреждение регулятора апоптоза Bcl-2</li> </ul>	Апоптоз
	Цитоплазм: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Повреждение транскрипционного фактора (NFκB)</li> </ul>	

## Продолжение Таблицы 1

	Повреждение клеточной мембраны	Аутофагия
<b>Отключение сосудов</b>	Местное истощение кислорода и питательных веществ	Апоптоз Некроз Аутофагия
<b>Активация иммунного ответа</b>	Цитотоксические Т-лимфоциты	Fas-опосредованный апоптоз

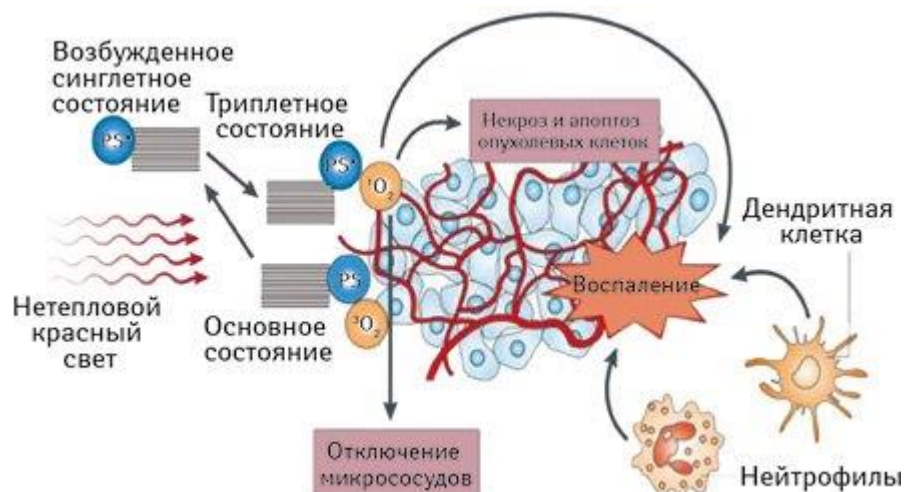


Рисунок 3 – Основные механизмы гибели клеток, инициированные ФДТ

## 1.1.2.1. Апоптоз

Апоптоз – это сложный, многоэтапный и многоуровневый механизм гибели клеток, обусловленный генетически и закодированный в каждой клетке [27]. Подобный механизм гибели клеток может быть инициирован активацией белковых рецепторов или митохондриальным выбросом цитохрома С [28]. В обоих случаях результат приводит к митохондриальной каспазной активности [29, 30], в результате которой происходит расщепление клеточных субстратов, что приводит к характерным биохимическим и морфологическим изменениям [31]: расщепление ядерных ламинов сопровождается конденсацией хроматина и сжатием ядра; расщепление ингибитора ДНКазы (каспаза-активированной дезоксирибонуклеазы) вызывает фрагментацию ДНК; расщепление белков цитоскелета приводит к фрагментации клеток и образование апоптотических телец [32].

Устойчивость опухолевых клеток к апоптозу является одним из основных признаков развития рака. Изменение ключевых элементов в цепи передачи сигналов апоптоза под действием ФС может напрямую влиять на гибель опухолевых клеток, вызванную ФДТ [33, 34].

Экспериментально доказано, что ФДТ вызывает фотоповреждение антиапоптотических и родственных к ним белков Bcl-2, и активирует проапоптотические белки [35]. Так, например, тексафирин индуцировал апоптоз в клетках эндотелия капилляров сетчатки крупного рогатого скота (BRCE) [36]. Апоптоз, вызванный 5-аминолевулиновой (5-ALA) кислотой, включал механизм подавления Bcl-2 белков на уровне мРНК, и стимулировал проапоптотические Bax белки мРНК в клеточной линии рака шейки матки и рака пищевода [37].

Высвобождение цитохрома С из митохондрий так же контролируется Bcl-2 белками. Цитохром С активирует каспазы – семейство протеаз-киллеров – через образование комплекса с Аraf-1, прокаспазой-9 и АТФ или дАТФ [39]. Высвобождение цитохрома С происходит из-за раскрытия пор и увеличения проницаемости митохондриальной мембраны, которое приводит к диссипации ее потенциала [40]. Исследования Varnes et al. подтвердили гипотезу о том, что цитохром С играет жизненно важную роль в апоптозе, индуцированном ФДТ [41]. Результаты показали, что доза ФС, в пределах 15 мин облучения, инициирует высвобождение цитохрома С из митохондрий клеток лимфомы мыши, благодаря чему происходит активация каспазы-3, в качестве протеолитической протеазы.

Нуклеарный фактор каппа В (NF- $\kappa$ B) является одним из главных транскрипционных факторов, который отвечает за адаптивные реакции клеток [42]. Это семейство цитоплазматических белков, при стимуляции переходящих в свободное состояние и перемещающихся в ядро, где они проявляют активность через связь с промоторными участками более чем 100 генов, ответственных за индуктивный гомеостаз.

NF- $\kappa$ B играет важную роль в клеточной пролиферации, апоптозе, воспалительной и аутоиммунной реакциях, поскольку он регулирует экспрессию генов, вовлеченных в эти процессы [43, 44]. Физические и химические факторы,

такие как радиация, ультрафиолетовый свет, повышенное давление, окислительный стресс, присутствие фтороловых эфиров и др., инфекционные агенты в виде бактерий, вирусов, паразитов и их продуктов, и некоторые сигнальные молекулы (гормоны, цитокины, ростовые факторы, цАМФ) вызывают активацию NF-κB.

В результате ФДТ происходит окислительный стресс, который, в свою очередь, приводит к активации и перемещению NF-κB в ядро, как было показано при лечении лейкемии мышей фотофрином [45]. Механизм, с помощью которого ФДТ индуцирует транслокацию NF-κB в ядро пока до конца не изучен, однако, исследование Granville et al. [46] подтвердило, что NF-κB обеспечивает антиапоптотический сигнал для опухолевых клеток, подвергшихся облучению.

#### 1.1.2.2. Некроз

Некротическая гибель клеток описывается как насильственная и быстрая форма дегенерации, которая затрагивает большие фракции клеточных популяций, и характеризуется набуханием цитоплазмы, разрушением органелл и нарушением плазматической мембраны, приводящим к высвобождению внутриклеточного содержимого и, как следствие, воспалению [47, 48]. При некрозе разрушение клетки в основном опосредовано протеолитической активностью, но выявить определенные протеазы, как и их субстраты, до сих пор не представляется возможным [48].

Точное определение факторов, вызывающих некроз клеток после проведения ФДТ осложнено схожими с апоптозом параметрами типа клеток, субклеточной локализацией ФС, дозой облучения при локальной активации ФС и парциальным давлением кислорода [49]. Однако, определено, что высокая интенсивность ФДТ (высокая концентрация ФС, высокая плотность энергии света и др.) чаще имеет тенденцию вызывать гибель клеток вследствие некроза, тогда как меньшая интенсивность ФДТ имеет тенденцию к предрасположенной апоптотической гибели клеток.

Результаты исследований амфифильного ФС (АТХ-S10) с клетками меланомы [50] показали, что небольшие дозы ФС, приводящие к проценту цитотоксичности менее 70%, в основном вызывают апоптоз, в то время как некроз клеток происходит при дозах ФС, определяющих около 99% цитотоксичности.

Быстрое высвобождение митохондриального цитохрома С в цитозоль с последующей активацией прокаспазы-3 – это общая черта спровоцированного ФДТ апоптотического механизма. Некроз клетки может быть инициирован ФС, локализованным в плазматической мембране, процесс фотосенсибилизации которого приводит к потере целостности плазматической мембраны и быстрого истощения внутриклеточной АТФ [51]. Ученые предполагают, что высокая интенсивность ФДТ может приводить к фотохимической инактивации основных ферментов и других компонентов апоптотического каскада [52].

### 1.1.2.3. Аутофагия

Аутофагия — это катаболический клеточный механизм, в результате которого клетка поддерживает баланс между синтезом, деградацией и переработкой клеточных продуктов [53]. Аутофагические процессы довольно разнообразны, и все они связаны с лизосомальной деградацией клеточных органелл и белков. Механизм аутофагического процесса заключается в отделении целевого участка клетки двойной мембранной структурой, называемой аутофагосомой, от цитоплазмы, создавая при этом везикулу с полностью изолированным содержимым. Этот пузырек транспортируется и сливается с лизосомой, образуя в результате структуру, называемую аутофаголизосомой, содержимое которой впоследствии расщепляется лизосомальными гидролазами [54].

Процесс аутофагии не только используется клеткой в качестве очищающего механизма от нежелательных белков, органелл и чужеродных микроорганизмов, но также способствует перераспределению питательных веществ от ненужных процессов к жизненно важным, во время голода или стресса.

Термин «аутофагия» появился в 1963 г. на симпозиуме Ciba Foundation по лизосомам, где он использовался для описания присутствия мембранных везикул, содержащих распадающиеся органеллы и компоненты цитоплазмы. Последующие исследования в этой области подтвердили, что аутофагия – это адаптивный, генерирующий энергию процесс.

До сих пор остается открытым вопрос влияния ФДТ на течение аутофагии [55, 56]. Основное использование механизма аутофагии клетками заключается в защитной функции от опосредованного АФК повреждения и очищения клетки от поврежденных органелл [57]. В зависимости от типа АФК и степени окислительного повреждения, ФДТ может стимулировать аутофагические процессы в виде цитопротекторных механизмов [58], либо индуцировать аутофагическую смерть [59]. Аутофагия так же играет роль в апоптозе, индуцированном ФДТ, но эти два процесса могут происходить и независимо друг от друга [60].

В результате исследования, проведенного на клеточной линии мышинового лейкоза, было показано, что процесс аутофагии возникает непосредственно перед апоптозом [61]. Также было обнаружено, что попытка выключения процессов аутофагии посредством заглушения гена, отвечающего за процесс, способствовала увеличению цитотоксичности ФДТ при более низких дозах света. Данное наблюдение согласуется с теорией, что аутофагия является защитным механизмом против АФК, индуцированном ФДТ [62].

Иначе обстоит дело с опухолевыми клетками, не способными подвергаться апоптозу в результате дефицита проапоптических Вах белков. В таких клетках, индуцированные ФДТ аутофагические процессы стимулируют некротическую, независимую от каспаз, гибель клеток. Подавление процессов аутофагии в клетках приводило к подавлению их гибели во время ФДТ.

Можно отметить, что стимулирование аутофагических процессов в клетках, обработанных ФДТ, происходит независимо от исхода апоптоза. Несмотря на цитопротекторную роль аутофагии в выживании опухолевых клеток, способных к

апоптозу, было показано, что она так же способствует гибели клеток с дефицитом Вах белков.

Чтобы понять, как ФДТ влияет на аутофагию, необходимо отметить, что, в первую очередь, АФК повреждает белки, некоторые из которых непосредственно участвуют в аутофагических механизмах. Например, некоторые ФС вызывают повреждение Bcl-2 белков, с которыми связываются проаутофагические белки, а производные фталоцианинов поражают регулирующий аутофагический процесс белок IP3 [63]. Другие ФС нацелены на органеллы, непосредственно связанные с аутофагией, такие как лизосомы и эндосомы [64]. В таком случае, при ФДТ лизосомальные ферменты инактивируются до того, как разрушается клеточная мембрана, что позволяет целенаправленно воздействовать на органеллу, не вызывая повреждения остальной части клетки [65].

На основании исследований различных клеточных культур и ФС можно сделать вывод, что ФДТ непосредственно вызывает аутофагию вне зависимости от мишени и локализации ФС, а также способствует апоптозу подвергшихся ранее аутофагии клеток. Скорость аутофагических процессов и апоптоза зависит от типа опухолевой клетки, ФС и длительности облучения. В зависимости от типа опухолевой клетки аутофагия может как способствовать апоптозу, так и замедлить гибель клетки, уменьшив проявление цитотоксичного эффекта ФДТ за счет утилизации поврежденных органелл [66].

## 1.2. Источники света для фотодинамической терапии

Эффективность ФДТ напрямую зависит от распределения света, что включает механизмы его прохождения через различные ткани, прогнозирование эффектов поглощения и рассеивания в зависимости от типа ткани и используемой длины волны. Тканевая оптика включает измерение пространственного и временного распределения и распределения по размерам тканевых структур, а также их свойств поглощения и рассеяния.

Биологическая ткань неоднородна, и наличие микроскопических неоднородностей (макромолекул, клеточных органелл, организованных клеточная структур) приводит к образованию мутной среды, многократное рассеяние светового луча в которой приводит к его растеканию и потере направленности при облучении. Поглощение света в значительной степени происходит за счет эндогенных флюорохромов, таких как гемоглобин и цитохромы в крови [67], меланин в коже. Содержание ФС и дозы облучения должно быть достаточным для инициирования фотохимических реакций, необходимых для образования цитотоксических агентов, что, соответственно, приводит к увеличению доз вводимого препарата, временной продолжительности и мощности облучения.

В качестве различных источников света для ФДТ используются как широкополосный свет от лампы накаливания, так и дуговые лампы, или монохроматический свет от перестраиваемых на красителях с аргоновой накачкой лазеров, диодные лазеры. Большинство из ФС имеют вторичные пики абсорбции, и используемая в таких случаях широкополосная связь увеличивает их фотодинамический эффект [68]. Однако, световая дозиметрия не может быть точно рассчитана с помощью широкополосного света, так как его проникновение и спектральная интенсивность варьируется в зависимости от полосы пропускания. Например, для дерматологического применения, нелазерные источники предпочтительнее лазерных из-за большего поля освещения, низкой стоимости и простоты использования.

Трудно обеспечить необходимую мощность светового облучения с видимым и ближним инфракрасным светом к месту опухоли из-за высокого рассеяния и низкого процента проникновения света в ткани. Лазеры, производящие высокоинтенсивный когерентный монохроматический свет, возможно соединить в один или несколько оптоволоконных устройств для доступа к таким недоступным участкам, как легкие, мочевой пузырь и т.д., и уменьшить потерю света из-за рассеяния [69]. Облучение лазерами с определенной длиной волны облегчает точный расчет дозиметрии.

Длины волн от 600 до 850 нм считаются оптимальным терапевтическим окном для ФДТ. Меньшие и более высокие длины волн не имеют достаточной энергии для возбуждения молекулярного кислорода до синглетного состояния.

Источник света для ФДТ должен иметь подходящие спектральные характеристики, совпадающие с длиной волны максимального поглощения. Диапазон применяемых ФС должен быть достаточным для генерации синглетного кислорода и выработки свободных радикалов для производства цитотоксического эффекта [70].

Таким образом, опосредованная терапия в сочетании с флуоресцирующей ФДТ часто применяется к пораженным тканям с более длинным световым диапазоном, что позволяет увеличить глубину проникновения света с минимизацией светорассеяния и максимальной активацией ФС.

### 1.3. Преимущества и недостатки фотодинамической терапии

В настоящее время ФДТ применяется не только для неинвазивного лечения поверхностных подкожных опухолей. В сочетании с эндоскопией ФДТ используется для лечения опухолей желудочно-кишечного тракта, легких, мочеполовых путей, перинеальной и плевральной полостей [71]. Местное применение описанной процедуры уменьшает побочные системные эффекты при введении ФС в системный кровоток, однако, не исключает их полностью [72]. В частности, на свету возможны проявления нежелательного фотодинамического эффекта ФС на открытых участках кожи, поэтому обязательным требованием к ведению пациента после ФДТ является исключение его пребывания при ярком освещении.

Стоит отметить выраженный антибактериальный и противовоспалительный эффекты ФДТ при использовании данной терапии для лечения гнойных ран. У патогенных микроорганизмов не развивается резистентность к ФДТ, что, определенно, является основным преимуществом при лечении хронических инфекционных процессов по сравнению с терапией антибиотиками. Избежать

системных побочных эффектов, наблюдаемых при применении терапии антибиотиками и антисептическими средствами, позволяет определение бактерицидного действия ФДТ зоной лазерного облучения сенсibilизированных тканей при местном применении.

Использование ФС хлоринового ряда при ФДТ гнойных ран характеризуется выраженным антибактериальным действием, ускорением очищения ран от гнойно-некротического детрита и сокращением сроков заживления раневых дефектов [73], что положительно воздействует на течение раневого процесса. Обеспечение сокращение сроков гранулирования и полного заживления гнойных ран при ФДТ с применением ФС хлоринового ряда позволяет оценивать такую терапию в качестве высокоэффективного и патогенетически обоснованного метода. Подобные характеристики особенно важны при лечении ослабленных больных пожилого возраста, у которых значительно снижены скорость репаративных процессов и возможности иммунного ответа.

Научно доказан положительный эффект при использовании российского лекарственного препарата Фотодитазин в качестве ФС при ФДТ трофических язв, являющихся осложнением сахарного диабета. Главным фактором лечебного воздействия ФДТ в данном случае остается ее выраженное бактерицидное и бактериостатическое действие.

ФДТ так же возможно использовать в качестве терапии артритов и артрозов, так как она позволяет добиться повышения местного и общего кровотока при воспалительных процессах в крупных суставах, и способствует снятию отечного, воспалительного и болевого синдромов.

#### 1.4. Фотосенсибилизаторы для фотодинамической терапии

ФС – макроциклические соединения, такие как порфирины, хлорины, фталоцианины, корролы и т.д., способные вызывать окислительное повреждение и, в свою очередь, гибель клеток при возбуждении светом определенной длины волны за счет генерации АФК.

Первое использование ФС в терапевтических целях произошло в Индии, Китае, Египте, где в качестве терапевтического агента для лечения рака кожи применяли эозин [74]. В начале 1950-х г. было экспериментально установлено, что гематопорфирин локализуется в опухолевых тканях, что привело к исследованию и применению в лечении рака новых ФС на основе порфирина. Одобренный FDA фотофрин, очищенный от смеси геметопорфиринов, был одобрен для лечения рака легких, мочевого пузыря, пищевода и рака шейки матки на ранних стадиях.

За последнее время выработали основные критерии, предъявляемые к разрабатываемым ФС, такие как минимальная токсичность продуктов распада, отсутствие мута- и канцерогенности, определенный период полураспада и быстрое выведение ФС из организма.

Избирательное накопление ФС в тканях так же является одним из важнейших критериев при его выборе. Накопление ФС во внутриклеточных мишенях, таких как митохондриальные мембраны, приводит к внутриклеточной запрограммированной смерти от апоптоза, в то время как коллапс сосуда или накопление ФС в клеточной мембране – приводит к некрозу. Для повышения специфичности и разрушительной способности ФС используют их конъюгацию с моноклональными антителами и радиоактивными источниками, однако, в этих «достижениях» есть свои «новые» побочные эффекты.

Отсутствие системных побочных эффектов и аллергических реакций, активация светом соответствующей длины волны, безболезненное и простое введение препарата так же являются ценными характеристиками при выборе ФС для терапии.

Другими важными критериями является гидрофильность ФС и его действие в диапазоне волн от 400 до 630 нм. Активация ФС на длине волны 400 нм характеризуется проникновением света на миллиметровую глубину; в то время как 630 нм дает глубину около 10 мм.

Немаловажным фактором является и возможность использования ФС в сочетании с другими формами лечения, такими как хирургическое вмешательство, лучевая и химиотерапия.

Применение ФС в качестве терапевтических агентов для ФДТ – это концептуально важная составляющая терапии. ФС преимущественно используют в качестве источника флуоресценции и стимула для инициирования фотодинамических реакций. Благодаря флуоресценции ФС, можно определить и регулировать поля обработки опухолевой ткани, путем визуализации злокачественных клеток [75]. Кроме того, различие в флуоресцентных спектрах доброкачественных и злокачественных областей опухолевой ткани способствуют минимизации повреждения нормальных тканей.

Флуоресценция также может использоваться как оптическая биопсия для определения доброкачественного или злокачественного развития опухоли, без хирургического вмешательства для гистологической оценки [76]. Наконец, различие флуоресцентных спектров до, во время и после ФДТ можно использовать для оценки потенциального успеха или неудачи лечения, а изменение флуоресценции во время терапии может быть источником для дозиметрической модификации освещения [77].

#### 1.4.1. Классификация фотосенсибилизаторов

##### 1.4.1.1. Фотосенсибилизаторы первого поколения

В 1984 г. T.J. Dougherty et al. [15] через выделение активной фракции производных гематопорфирина был получен ФС с коммерческим названием Фотофрин, представляющий из себя запатентованную смесь мономеров, очищенную путем частичного удаления мономеров, димеров и олигомеров гематопорфирина (Рисунок 4). Данный лекарственный препарат был одобрен FDA для лечения рака мочевого пузыря, обструктивных опухолей пищевода и легких, рака желудка и шейки матки, и стал первым и наиболее широко применяемым ФС для ФДТ злокачественных опухолей.

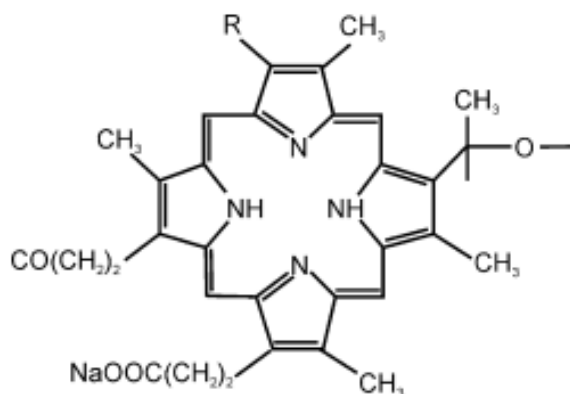


Рисунок 4 – Структурная формула лекарственного препарата Фотофрин

Как правило, Фотофрин вводят амбулаторно в дозе 2 мг/кг. Облучают примерно через 48 ч за счет рассеивающего волокна (которое светится по окружности) или, в редких случаях, однонаправленной микролинзой. В зависимости от клинической ситуации световая доза составляет 150 Дж/см<sup>2</sup> (линза) или 200-300 Дж/см (рассеиватель). Клинические результаты показали положительные тенденции при лечении различных кожных поражений, включая плоскоклеточную и базальную карциному, саркому Капоши, а также рецидивы рака груди [78]. Кроме того, высокие показатели отклика получают ранние и поздние эндобронхиальные заболевания, например, был выявлен положительный ответ на терапию слизистой оболочки пищевода Барретта [79, 80]. Многообещающие результаты наблюдались у локально рецидивирующих опухолей прямой кишки и ануса, при опухолях головного мозга, а также новообразованиях головы и шеи [81].

Применение Фотофрина в амбулаторных условиях способствует терапии больших количеств разнообразных новообразований, а также предраковых и даже «доброкачественных» поражений. Широкое клиническое применение препарата объясняется его относительной безопасностью, нетоксичностью, а также относительно безболезненным введением. Однако препарат не обладает высокой селективностью при дозе 2 мг/кг, и его значительная пролонгированная светочувствительность в связи с низкой селективностью является существенным недостатком. Несмотря на то, что препарат, в основном, концентрируется в

обрабатываемой ткани, соседние ткани также реагируют на свет, но чуть менее интенсивно, что может проявляться отеком кожи, а также некротическим поражением здоровых тканей и шелушением кожных покровов. Подобные реакции нормальной ткани на солнечный свет могут быть опасными для жизни.

Российским аналогом Фотофрина является препарат Фотогем, разработанный в РХТУ им. Менделеева в 1992 г. Данный ЛП показал высокую эффективность в ходе его клинических испытаний [82].

Для ФДТ с препаратами на основе производных гематопорфирина применяют лазерное излучение с длиной волны 628-632 нм, при этом глубина фотоиндуцированных некрозов не превышает 1 см. Доза световой энергии существенно варьируется и зависит от размеров и локализации опухолевого поражения, и обычно составляет от 50 до 500 Дж/см<sup>2</sup>.

Препараты производных гематопорфирина, несмотря на их высокую терапевтическую активность, все же обладают рядом серьезных недостатков, к которым относят, прежде всего, выраженный фототоксический эффект – изменение цвета кожных покровов. В результате клинических испытаний Фотофрина было выявлено приобретение зеленовато-желто-коричневого или красно-коричневого оттенка кожных покровов у испытуемых, определяющее гиперпигментацию обработанных препаратом областей при взаимодействии с солнечным светом, которая сохранялась до нескольких месяцев. У пациентов, незадолго до ФДТ с Фотофрином проходивших курс химиотерапии с доксорубицином, кожа приобретала серо-голубой оттенок.

По имеющимся данным, помимо опухолевой ткани, в высоких концентрациях препарат задерживается в клетках ретикулоэндотелиальной системы, печени, почках, селезенке и воспалительных тканях [83, 84].

Производные гематопорфирина относятся к ФС первого поколения, и имеют множество недостатков, такие как отсутствие специфичности, кожная фототоксичность, гидрофобность и слабая абсорбция в терапевтическом окне. ФС первого поколения возбуждаются только в видимой области, поэтому их использование ограничено лишь поверхностными опухолями.

#### 1.4.1.2. Фотосенсибилизаторы второго поколения (порфирины и фталоцианы)

ФС II поколения (структурно модифицированные или замещенные порфирины, фталоцианы, хлорины) – макроциклические соединения с поглощением в ближнем инфракрасном диапазоне, с высоким квантовым выходом синглетного кислорода. Перспектива их использования обусловлена меньшей фототоксичностью по отношению к ФС I поколения и более глубоким проникновением в ткани, в результате чего снимаются ограничения использования ФС только на поверхностных опухолях. Так же, применение ФС II поколения характеризуется меньшим сроком соблюдения больным светового режима после введения препарата.

5-Аминолевулиновая кислота (АЛК) является пролекарством [85]. Эта встречающаяся в природе аминокислота ферментативно превращается в протопорфирин (Рисунок 5) [86]. АЛК активна при 630 нм, что способствует адекватной глубине проникновения. Тем не менее, при местном применении, препарат не проникает на большую глубину, в результате чего препарат необходимо применять с осторожностью при лечении глубоких очагов поражений. Природное вещество АЛК само по себе не очень активно, поэтому на сегодняшний день в клинической практике распространены ее модификации с изменением боковых цепей для увеличения абсорбции и фотоактивности. В противном случае, необходимы относительно высокая световая энергия или более длительное лечение по сравнению с синтетическими аналогами.

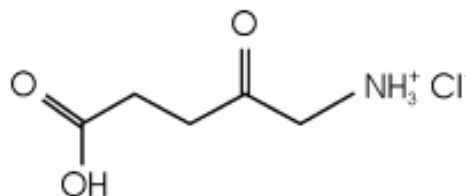


Рисунок 5 – Структурная формула 5-аминолевулиновой кислоты

Несмотря на широкое распространение использования АЛК в сочетании с местными анестетиками, такой тип ФДТ может быть болезненной. Обычно АЛК вводится местно за 4 ч перед облучением, которое осуществляется при 150 Дж/см<sup>2</sup>.

ФДТ на основе АЛК эффективна против базальноклеточного и плоскоклеточного рака кожи [87, 88]. Терапия с помощью АЛК имела успех при лечении опухоли головы и шеи, несмотря на то что в случае инвазивных поражений полного ответа добиться не удалось [89]. Учитывая ограниченное проникновение препарата в ткани, АЛК используют для лечения диспластических и местных поражений полости рта [90, 91], а также вводят внутривенно пациентам с рецидивирующим раком мочевого пузыря.

Норвежская фармацевтическая компания PhotoCure ASA применила метилированную АЛК (Metvix®) для лечения широкого спектра поражений, путем местного введения препарата и облучения красным светом через 3 ч после введения. Подобная медикаментозная/световая терапия одобрена во многих Европейских странах для лечения актинического кератоза и поражений базальных клеток с выдающимися результатами [92]. Эта же компания производит гексаминолевулинат (Hexvix®) для фотодиагностики и ФДТ. В настоящее время этот препарат вводят в мочевой пузырь и через 30-60 мин облучают синим светом для флуоресценции патологической ткани. Это позволяет простым и удобным способом определить пораженную ткань и удалить ее хирургическим путем.

Вертепорфин – это производное бензопорфирина, который клинически активен в составе липосом. ФС активен при 690 нм и обеспечивает более глубокое проникновение и ускоренную активацию. Вертепорфин быстро накапливается в пораженной ткани и выводится из организма, так что фотосенсибилизация кожи в его случае минимальна [93].

Как правило, облучение происходит через 15-30 мин после инъекции. В клинической практике вертепорфин используют для терапии сосудистых нарушений, хориоидальнеоваскуляризации, вызванной серозной хориоретинопатией [94]. Серьезных осложнений от проведенной терапии ни у одного пациента не наблюдалось. Наиболее частый побочный эффект был вызван болью при введении ФС.

Тексафрины, как синтетические аналоги порфиринов, использовались много лет как средство для улучшения изображения для магнитно-резонансной

томографии (МРТ) [95]. Большинство из этих структур содержит парамагнитный ион металла, гадолиний, чья полезность в качестве агента для МРТ не подлежит сомнениям. Недавние исследования тексафринов в качестве противоопухолевых агентов показали, что данные соединения могут быть как фото-, так и радиационным сенсбилизатором [96], в качестве конъюгента с другими соединениями.

Тексафрины коммерчески доступны. Их активация происходит на длине волны 730 нм, что обеспечивает потенциально глубокое проникновение света. Препарат накапливается в тканях новообразований и сосудистой сети, хорошо связывается с ЛПНП, что характеризует его в качестве терапевтического агента при лечении атеросклероза.

#### 1.4.1.3. Фотосенсибилизаторы второго поколения (хлорины)

Темопорфин, известный как Фоскан®, является членом семейства хлоринов с рядом интересных клинических характеристик, которые выдвинули его на передний план среди ФС II поколения (Рисунок 6) [97, 98]. Однако, многие из предполагаемых преимуществ этого ФС также являются потенциально значительными недостатками. Данный лекарственный препарат широко используется в клинической практике для лечения различных кожных поражений, легочных [99], пищеводных, желудочно-кишечных опухолей [100], а также опухолей головы и шеи [97, 98].

Препарат дозируется в 0,15 мг/кг и вводится внутривенно. Облучение проводят в течение 4 сут после первой инъекции при длине волны в 660 нм [101], что дает несколько большую глубину проникновения в сравнении с Фотофрином. Основным недостатком данного препарата является значительная светочувствительность кожных покровов после введения, эффект которого сохраняется в течение одной недели после проведённой терапии, что заметно ограничивает широту использования препарата в клинической практике, несмотря

на его эффективность, быстрый метаболизм и высокий уровень светопроницаемости.

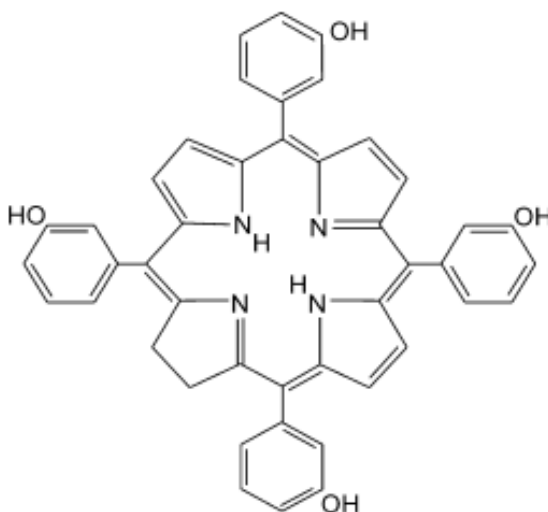


Рисунок 6 – Структурная формула лекарственного препарата Фоскан

Пурлитин (олово-этил-этиопурпурин) – это пурпурин, который представляет собой продукт распада хлорофилла. Препарат активируется при 660 нм, что обеспечивает хорошую глубину терапии, и относительно эффективен при коротком времени лечения. Общая доза вводимого препарата составляет 1,2 мг/кг, облучение проводят через 24 ч после введения. Пурлитин эффективен при лечении метастаз рака груди и саркомы Капоши [102]. В 1998 г. при проведении 3-ей фазы клинических исследований в течении 6-ти месяцев был зафиксирован полный ответ у 90% пациентов, причем побочных эффектов в виде системной токсичности зафиксировано не было.

Лазерфин® (Талапорфин) представляет собой моно-L-аспартилхлорин, который был одобрен в Японии в 2004 г. в качестве терапевтического агента для ФДТ для лечения рака легких. Лазерфин® также применялся для лечения ранних пациентов с раком головы и шеи. Лазерфин® вводят внутривенно и облучают поверхностно лазером с длиной волны 664 нм. Интенсивность флуоресценции и МРТ показали границу между контрастной опухолью и неконтрастной нормальной тканью. Область с усиленным контрастом демонстрирует более сильную интенсивность флуоресценции, чем области без усиленного контраста, что подтверждает тенденцию к увеличению интенсивности флуоресценции внутри



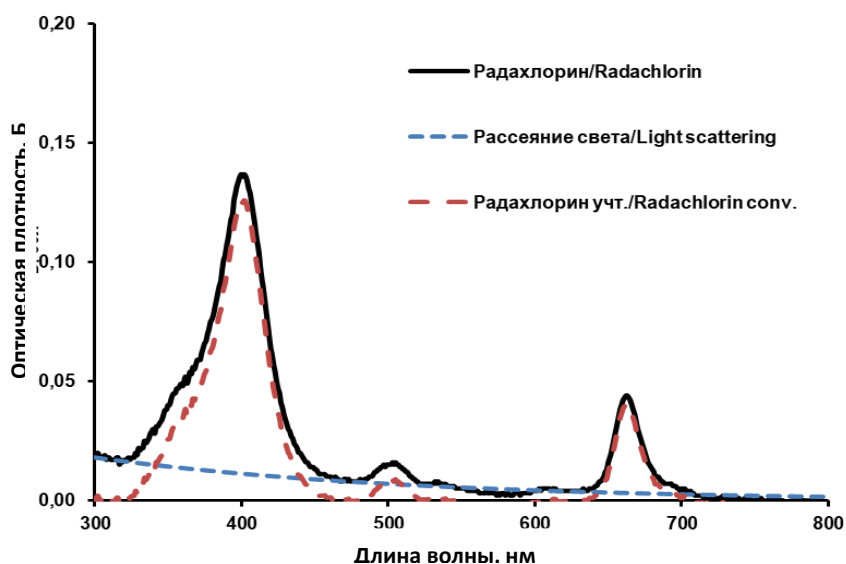


Рисунок 8 – спектр поглощения Радахлорина (характерные пики: коротковолновый в районе 400 нм и длинноволновый в районе 660 нм)

Широкое терапевтическое использование РХ объясняется хорошей избирательностью его накопления в опухоли и выведением препарата из организма в течение 24 ч, что обуславливает отсутствие гиперчувствительности кожных покровов пациента к дневному свету и малое количество системных побочных эффектов после ФДТ [104]. РХ успешно применяется в качестве терапевтического агента для ФДТ злокачественных новообразований кожи, легких, желудочно-кишечного тракта, мочеполовых путей [105, 106]. Наличие у РХ собственной флуоресценции при облучении светом с длиной волны, характерной для использования при ФДТ, позволяет применять этот ФС не только в качестве терапевтического агента для ФДТ, но и для флуоресцентной диагностики [106].

## 1.6. Фотосенсибилизаторы третьего поколения

### 1.6.1. Микро-носители и нано-носители в качестве систем доставки

Побочные эффекты, вызванные ФС второго поколения из-за неспецифической локализации, плохой растворимости в воде, низкой скорости выведения из организма, фотообесцвечивания и низкой селективности, приводят к увеличению исследований, сосредоточенных на ФС III поколения, которые, в

отличие от второго, демонстрируют более высокую опухолевую специфичность с активацией длинноволновым светом. Подобные свойства могут быть достигнуты путем конъюгации или инкапсуляции существующих ФС в различные носители, которые могут быть доставлены в ткани-мишени [107, 108]. Стратегия дизайна включает конъюгацию ФС с биомолекулами носителя или нацеливающими агентами. Для повышения специфичности и эффективности возможно использование пролекарств, которые активируются непосредственно в месте опухоли. Основная цель создания ФС III поколения, это – снижение нецелевых эффектов и повышение фармакокинетики.

Одновременно с разработкой ФС с носителями интенсивно ведутся работы по созданию систем доставки на основе МЧ и НЧ, которые позволили бы повысить эффективность действия на опухоли как новых химиотерапевтических агентов, так и уже используемых при лечении рака [109, 110]. При накоплении в опухоли МЧ или НЧ, содержащих химиотерапевтический агент, не только увеличивается местное воздействие агента на молекулярные мишени, но и уменьшается нежелательное отрицательное системное действие химиотерапии [110, 111]. Кроме того, при поступлении химиотерапевтического агента в опухолевую клетку в составе МЧ и НЧ, может быть преодолена лекарственная устойчивость опухолей [111].

ФДТ открыла широкий спектр агентов, некоторые из которых эффективны при высоком уровне кислорода и нацелены в большей степени на опухолевые клетки, и в меньшей степени – на здоровые. ФС III поколения находятся в стадии разработки, и до сих пор не имеет полностью законченных исследований.

Недостатки более ранних препаратов ФС заключались в больших количествах побочных эффектов, таких как аллергические реакции, тошнота, воспаление и т.д. Отсутствие у таких препаратов селективности по отношению к опухолевым клеткам представляло опасность для здоровых тканей вблизи пораженной области. Наиболее перспективными ФС в качестве агентов для конъюгирования или инкапсулирования представляются ФС, полученные из природных компонентов, таких как соединения хлорофилла, которые позволяют

проникать на более глубокие уровни в организме, благодаря своей схожей структуре с гемоглобином [112]. Таким образом, подобные препараты могут циркулировать в кровотоке практически в любом месте. Им не нужно более глубокое проникновение света: опухолевые клетки одновременно поражаются по всему телу, в результате чего, с помощью целевой доставки, возможно воздействие как на первичную опухоль, так и на все вторичные типы рака.

#### 1.6.1.1. Липосомы

Липосомы представляют собой липидные везикулы с одним или несколькими фосфолипидными бислоями, и их классифицируют в зависимости от структуры на: мелкие однослойные везикулы (20-100 нм), большие однослойные везикулы (>100 нм), многослойные везикулы (>500 нм), олиголамеллярные (0,1-1 мкм), гигантские однослойные липосомы (>1 мкм), и мультивезикулярные везикулы (>1 мкм). Особенная структура липосом придает им уникальные свойства, например самоуплотнение в водной среде, что способствует распространению их использования в качестве систем доставки в различных областях медицины, иммунологии, диагностики, косметики, экологии, очистке и пищевой промышленности [113].

Липосомы представляют собой идеальные системы доставки как гидрофильных, так и гидрофобных ДВ. Отрицательный или положительный заряд способствует биодоступности: например, катионные липосомы показали лучшую эффективность на поверхности роговицы глаза по сравнению с отрицательным зарядом.

Липосомы могут взаимодействовать с клетками через несколько механизмов: взаимодействие с поверхностью клетки, с ее компонентами, слияние с клеточной мембраной или эндоцитоз через фагоцитарные клетки. Разнообразны и методы их приготовления: выпаривание растворителя, двойное испарение эмульсии или испарение с обращенной фазой [114].

*Олиголамеллярная везикула* – это липосома, состоящая из нескольких концентрических липидных бислоев размером 0,1-0,5 мкм. Такие липосомы имеют структуру луковицы. Их главное преимущество в быстром формировании и устойчивой форме. Главным недостатком этих липосом является ограниченное пространство для вводимого ДВ. Основная часть внутреннего пространства окружена большим количеством концентрических липидных бислоев, из-за чего доступный объем для загрузки материала ограничен, а большой размер этих липосом ограничивает их инъекционное использование [115, 116].

*Однослойные липосомы* имеют единственный фосфолипидный бислой. Они имеют форму сферы, в которой находится водный раствор. Однослойные липосомы могут делиться на мелкие однослойные везикулы, диапазон размеров которых варьируется в пределах 0,02-0,05 мкм. Эти пузырьки из-за их небольшого размера не выводятся из кровотока, поэтому они имеют больше шансов проникнуть в ткани, в то время как большая однослойная везикула, диапазон размеров которой варьируется от 0,06 мкм и более, имеет больше места для загрузки в липосому ДВ.

*Мультивезикулярная везикула* состоит из нескольких неконцентрических везикул, инкапсулированных в один бислой. Это многофункциональные липосомы, размером от 2 мкм до 40 мкм.

*Олиголамеллярная липосома* содержит меньше фосфолипидных слоев по сравнению с многослойной липосомой. Диапазон их размеров варьируется от 0,1 до 10 мкм.

*Гигантские однослойные липосомы* – это липосомы самого большого размера: от 10 до 1000 мкм. Они могут быть использованы для различных диагностических и медицинских целей [116].

#### 1.6.1.2. Микросферы и микрокапсулы

МЧ, микросферы и микрокапсулы являются общими составляющими ЛС, состоящего из множества частиц. Их применение в качестве систем доставки основано на многочисленных преимуществах в результате их структурных и

функциональных особенностей [117]. В зависимости от их состава МЧ могут быть включены в различные ЛФ, такие как твердые вещества (капсулы, таблетки, саше), полутвердые вещества (гели, кремы, пасты) или жидкости (растворы, суспензии и даже парентеральные препараты).

Преимущество микроносителей перед НЧ заключается в том, что, имея размер более 100 нм, они транспортируются лимфой и, таким образом, действует локально [118]. Возможность инкапсулировать в микроносители токсичные вещества позволяет локализовать их действие в нужной области, а распределение дозы вещества по множеству мелких отдельных частиц исключает возможность нарушения дозировки в случае неисправности отдельной субъединицы.

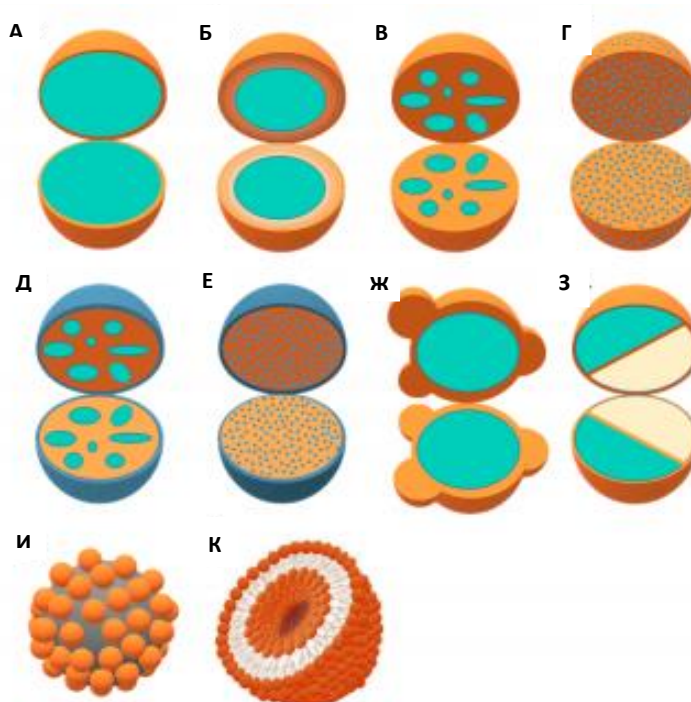
С технологической точки зрения микрокапсулирование ДВ определяется такими преимуществами как защита ядра МЧ от окружающей среды, сохранение инкапсулированных летучих веществ или жизнеспособности клеток, предотвращение системных побочных эффектов вещества на организм, и оптимизация, продление или нацеливание действия ЛС. Однако ограничения в виде более высокой стоимости продукта, дорогих вспомогательных веществ (ВВ), более сложном оборудовании и процессах, а также строгий контроль качества заметно влияют на рентабельность производства.

Размер МЧ колеблется от 1 до 1000 мкм, и их структура довольно разнообразна (Рисунок 9). Структура и форма МЧ отображает используемые ВВ, а также определяет их функцию. Системы доставки лекарств из множества частиц (микропеллеты, микрогранулы, микросферы, микрокапсулы, микрогубки, липосомальные препараты) привлекают все большее внимание благодаря широкому спектру благоприятных технологических свойств.

МЧ можно охарактеризовать как гомогенную или гетерогенную структуру (в зависимости от их состава) обычно сферической формы для более легкой обработки поверхности (например, нанесения покрытия).

Микросферы можно охарактеризовать как матричные системы, в которых лекарство однородно диспергировано, растворено или находится в гомогенно взвешенном состоянии [119], в то время как микрокапсулы – это гетерогенные

частицы, где мембранная оболочка окружает ядро, образуя подобие резервуара [120].



(А) одноядерные МЧ, (Б) многослойные МЧ, (В) многоядерные МЧ, (Г) МЧ матричного типа, (Д) полядерное ядро с покрытием, (Е) покрытая матричная частица, (Ж) пятнистая МЧ, (З) двухкамерная микрокапсула, (И) коллоидосома, (К) гигантская липосома

Рисунок 9 – Схематическое изображение различных структур микрокапсул

Поверхностный заряд играет ключевую роль в агрегации частиц. Агрегация мешает оптимальному введению и доставке ДВ (например, нарушает однородность содержания доз, препятствует нормальному кровотоку). Пористость также имеет значение для эффективности трансплантации клеток *in vivo*. Пористые материалы могут облегчить васкуляризацию по сравнению с непористыми биоматериалами. Пористость 30-40 мкм приводит к поляризации макрофагов, вызывая усиленное восстановление тканей [121].

### 1.7. Типы и механизмы высвобождения действующего вещества

Процесс высвобождения ДВ из МЧ, изготовленных по специальной технологии производства, и/или, возможно, содержащих специальные ВВ,

является результатом различных явлений и механизмов (растворение/диффузия, высвобождение под действием осмотического давления, эрозия). Обычно эти механизмы протекают бок о бок, и тот или иной механизм играет большую роль во время высвобождения ДВ.

В МЧ, когда ДВ заключено в полимерную матрицу, поведение полимерной системы имеет решающее значение во время растворения, и зависит от многих факторов (свойства препарата, состав, среда высвобождения и т.д.)

В случае полимерной матрицы диффузия ДВ может происходить через неповрежденную полимерную сетку или через поры, заполненные водой. Поглощение воды вызывает набухание полимерных цепей, что инициирует образование новых пор и/или осмотического давления.

В случае МЧ, покрытых полимером, пленкообразующий полимер может растворяться в среде или функционировать как водонерастворимая, проницаемая или полупроницаемая мембрана. В первом случае диффузия происходит преимущественно за счет высвобождения ДВ. В случае полупроницаемого покрытия высвобождение ДВ происходит за счет осмотического давления. Также возможно использование водорастворимых порообразователей, которые ускоряют профиль растворения, за счет инициирования новых пор [122].

Еще один способ высвобождения активного компонента из микроносителя заключается в воздействии одного, двух или множественных стимулов. Такие стимулы могут быть внутренними или внешними и классифицироваться как физический (например, воздействие с помощью температуры или магнитным полем), химический или даже микробиологический фактор.

Магнитные микросферы – это надмолекулярные частицы, которые циркулируют по капиллярам без провоцирования окклюзии в виде эмболии сосудов (<4 мкм), с проявлением ферромагнитных свойств, так что они могут быть втянуты в ткань-мишень магнитным полем. Такие МЧ могут быть использованы как агенты для МРТ, и как системы доставки ЛП при терапии опухолей, сопровождающейся гипертермией. Высвобождение ДВ можно контролировать силой магнитного нагрева: с мягким магнитным эффектом частицы сжимаются с

медленным высвобождением ДВ, а при интенсивном нагревании разрушается структура МЧ, что приводит к взрывному высвобождению [123].

Основное преимущество магнитных МЧ заключается в эффективном методе нацеливания на желаемый обрабатываемый участок опухоли с более высокой терапевтической эффективностью и меньшей токсичностью. Уменьшение частоты дозирования препарата увеличивает приверженность пациентов к терапии.

Производство МЧ осуществляется эмульсионными методами (многократная и фазовая полимеризация, экстракция растворителем, микрокапсулирование в горячем расплаве, дисперсионная сополимеризация).

## 1.8. Методы получения микрочастиц

### 1.8.1. Основные компоненты

Для производства МЧ часто используют биополимеры растительного, животного или микробного происхождения, производные целлюлозы, полусинтетические и биоразлагаемые или небiorазлагаемые синтетические полимеры. Неполимерные наполнители играют роль в сшивании полимерных цепей, таким образом формируя и укрепляя полимерную сеть. Наиболее часто используемые полимеры и ВВ, связанные с микрокапсулированием, приведены в таблице 2.

Распространенный метод улучшения характеристик и производительности МЧ – это комбинация полимеров с разными свойствами. Например, из-за противоположных зарядов альгината и хитозана, при низком рН, образуется полиэлектролитный комплекс [124], тем самым уменьшая пористость полимерной сетки и пролонгируя высвобождение инкапсулированного ДВ.

Таблица 2 – Наиболее часто используемые полимеры

<b>Полимеры</b>	<b>Физико-химические свойства</b>	<b>Характеристики и примеры использования</b>
Поли-молочная кислота (ПМК)	Не растворим в воде, разлагается до CO <sub>2</sub> и H <sub>2</sub> O в течение 12 мес.	В качестве имплантатов, оральных твердых дисперсий.
Сополимер поли-молочной и гликолевой кислот (СМГК)	Не растворим в воде. Соотношение молочной кислоты к гликолевой влияет на способность к формированию термопластического геля при деградации.	Инъекционные или имплантируемые системы (МЧ, гели, инженерия костной ткани).
Полиакриловая кислота	Переход в гелеобразное состояние при нейтрализации щелочью.	Целевая доставка, интраназальное введение с микрокапсулированием.
Полиэтиленгликоль	В зависимости от молекулярной массы находится в жидком либо твердом состоянии. Температура замерзания 37-41°С	В качестве пластификатора при микрокапсулировании, пероральная доставка инсулина.
Полиметакрилат	Растворим в органических растворителях, смешивается с водой.	Растворимость в зависимости от рН, возможна целевая доставка через желудочный, кишечный тракт.
Метилцеллюлоза	Растворима в холодной воде, амфифильные свойства при 80°С	В качестве эмульгатора псевдопластичного раствора.
Хитозан	Растворим в слабых кислотах, мукоадгезивный с отрицательно заряженными поверхностями.	Обладает противогрибковыми и антибактериальными свойствами, снижает уровень ЛПНП в крови.
Гиалуронат натрия	Анионного характера, растворим в воде. Обладает высокой вязкостью при низких концентрациях.	При получении микросфер в качестве назальных, вагинальных и офтальмологических систем доставки.

Farris et al. [125] разработали пероральную систему доставки генов, в которой ДНК инкапсулировалась в НЧ хитозана, и частицы были защищены от желудочной среды путем встраивания НЧ в МЧ матрицы зеина с помощью метода эмульгирования вода в масле, благодаря образованию зеином относительно хрупкой пленки [126].

Несколько исследований показывают, что сополимеризация синтетических и природных полимеров помогает повысить биосовместимость и жизнеспособность клеток (агароза-Карбопол®, гиалуроновая кислота, кислота-полиэтиленгликоль) [127]. Гидрофобные ВВ, такие как поли-ε-капролактон, могут увеличивать высвобождение ЛС с низкой растворимостью за счет образования гидрофобных взаимодействий с молекулой ДВ, и таким образом может быть достигнуто пролонгированное высвобождение [128].

Пористые плавающие МЧ с контролируемым высвобождением были получены путем комбинирования полипропилена-Eudragit® RS и полимеров этилцеллюлозы [129].

Maheu et al. успешно изучили добавление полиэтиленгликоля с концевыми группами винилсульфона к альгинату, и, таким образом, исключили использование поликатионов для инкапсуляции клеток фибробластов из среды для культивирования [130].

Wells et al. достигли пролонгированного высвобождения ДВ и доставки светочувствительного вещества путем химической модификации ПЭГ и химическим сшиванием альгината.

Dalpiatz et al. изучили назальную абсорбцию зидовудина хитозаном, конъюгированным с дезоксихолевой кислотой МЧ и обнаружили, что частицы могут проходить через гематоэнцефалический барьер [131].

### 1.8.2. Процессы образования микрочастиц

С точки зрения производственных показателей наиболее важными методами получения микрокапсул являются методы множественной эмульсии и воздушной суспензии, а также распылительная сушка и коацервация.

*Коацервацию*, связанную с образованием альгината кальция, можно считать классическим методом для приготовления микросфер и микрокапсул. Ионы кальция образуют поперечные связи между единицей альгината  $\alpha$ -L-гулуруновой кислоты и  $\beta$ -D-маннуруновой кислоты, таким образом организуя полимерные цепи в «структуру ящика для яиц». Это химическое связывание дает возможность формировать стабильные микросферы или структурированные микрокапсулы со структурой ядро-оболочка.

Коацервация определяется как разделение жидких фаз в коллоидных растворах. В течение коацервации ДВ может быть диспергирован в растворе полимерного покрытия и при определенном влиянии окружающей среды (ионное, рН, термическое изменение), происходит разделение фаз, в то время как основной материал инкапсулирован стенкообразующим полимером.

Простая коацервация основана на несовместимости между полимерами. В большинстве случаев это вызвано высаливанием (двух- или трехвалентным катионом, как это происходит с альгинатом и  $\text{Ca}^{2+}$  или  $\text{Ba}^{2+}$ , пектином и  $\text{Ca}^{2+}$ ). Размер частиц в основном зависит от свойств наполнителей (вязкость, поверхностное натяжение) и правильной установки мешалки.

При комплексной коацервации полиэлектролитные полимеры с противоположными зарядами образуют нерастворимый комплекс и одновременно инкапсулируют активный ингредиент. Одним из важных факторов при комплексной коацервации является рН, поскольку необходимо учитывать изоэлектрическую точку полимеров.

При коацервации часто инкапсулируют гидрофобные компоненты, а в случае гидрофильных компонентов, в практике успешно используют механизм двойной эмульсии с последующей коацервацией и образованием микрокапсулы со

структурой ядро – оболочка [132]. В результате коацервации полученная микрокапсула содержит высокое количество растворителя, которое затем выпаривают с помощью высушивания МЧ.

Для сушки, помимо обычных вакуумных процессов, используют лиофилизацию (сублимационную сушку). Это дорогостоящий, но эффективный для термочувствительных веществ метод.

*Распылительная сушка* широко используется в промышленности при микрокапсулировании летучих веществ, пробиотиков и жизнеспособных клеток. Несмотря на очевидные недостатки такой технологии (высокие убытки, низкая доходность), ее многочисленные преимущества (однородный размер частиц, все операции выполняются в одном аппарате, использование органических растворителей, способность инкапсулировать термолабильные материалы) способствовали широкому распространению использования данной технологии на практике.

В случае данного метода эмульсия распыляется в камеру под давлением, где образовавшиеся в процессе МЧ высушивают под потоком теплого воздуха, и, как следствие, на выходе получают однородные частицы правильной формы, микронного размера.

*Сублимационная сушка* успешно используется для микрокапсулирования протеиновых фармацевтических субстанций. Процесс состоит из замораживания, сублимации, первичной и вторичной сушки. Лиопротекторы или криопротекторы (трегалоза, декстран) может стабилизировать молекулы активной фармацевтической субстанции (АФС) во время процесса, заменяя воду, формируя стекловидную матрицу, уменьшая молекулярную подвижность за счет установления водородных или ван-дер-ваальсовых связей между молекулами [133].

Несмотря на свою высокую стоимость, это выгодный процесс для термочувствительных молекул. Сублимационная сушка обеспечивает отверждение, которое затем позволяет восстановить частицы в водной среде.

## Выводы к главе 1

Разработка систем доставки инкапсулированных ДВ с помощью микро- и нано- носителей на сегодняшний день является одной из перспективных и важных задач современной фармацевтической технологии. Проведенный анализ литературных данных показывает, что использование МЧ и микрокапсул в качестве систем доставки ФС определяется такими преимуществами как сохранение свойств инкапсулированного ДВ, защита ядра МЧ от окружающей среды, предотвращение системных побочных эффектов и оптимизация или пролонгирование действия ЛС. Включение в матрицу МЧ дополнительных компонентов определяет возможное контролируемое высвобождение ФС или нацеливание его действия.

При разработке метода получения МЧ необходимо уделять тщательное внимание выбору матрицы и образующих ее веществ. При использовании биоразлагаемых полимеров для инкапсулирования ДВ, полимерная система играет одно из решающих значений во время растворения и высвобождения ДВ, но многое зависит и от физико-химических свойств инкапсулированного ДВ, его растворения в воде и светочувствительности. Помимо профиля высвобождения, свойства матрицы и инкапсулированного в ней вещества определяют и другие свойства МЧ, важные для повышения эффективности их накапливания в опухоли, такие как рН и заряд поверхности.

Ограниченные данные об инкапсулировании ФС в полимерные МЧ требуют проведения дополнительных исследований по разработке и обоснованию методов получения и изучения свойств получаемых МЧ в рамках диссертационной работы по получению МЧ с пролонгированным высвобождением ДВ для ФДТ.

## Глава 2. Материалы и методы исследования

### 2.1. Материалы исследования

#### 2.1.1. Фотосенсибилизатор

Объектом настоящего исследования по разработке наноструктурированных МЧ с пролонгированным высвобождением ДВ является концентрат для приготовления раствора для инфузий «Радахлорин», содержащий 3,5 мг/мл смеси натриевых солей хлорина Е6, хлорина Р6, пурпурина 5, полученный от «РАДА-ФАРМА» (Россия), а также изготовленные в результате исследования МЧ, содержащие указанный ЛП.

*Радахлорин* (смесь натриевых солей: хлорин Е6, хлорин Р6, пурпурин 5) – это ФС II поколения из класса хлоринов, который имеет натуральную природу происхождения [134] и обладает интенсивной полосой поглощения в длинноволновой части спектра с выраженным максимумом в 662 нм в красной области. РХ характеризуется высоким квантовым выходом образования синглетного кислорода при поглощении света в области 660 нм [135], что обеспечивает высокую фототоксичность препарата *in vivo* и *in vitro* [104], и объясняет его широкое применение в клинической практике фотодинамических онкотерапий.

Концентрат для приготовления раствора для инфузий «Радахлорин» представляет собой раствор темно-зеленого цвета с желтоватым оттенком, со слабым характерным запахом [136]. Содержит композицию из трех циклических тетрапирролов хлориновой природы (с гидрированным кольцом D), основным из которых является хлорин Е6 (70-80%) (Рисунок 7). Стандартизация производства РХ вызывает сложности по причине трехкомпонентного состава ЛФ, в результате чего РХ имеет нестабильный состав, невозпроизводимый от партии к партии [137].

РХ хорошо растворим в воде и устойчив при хранении. Препарат можно хранить разведенным при температуре от 2°C до 8°C не более 24 ч до начала

введения. При этом приготовленный раствор устойчив в условиях комнатной освещенности или при дневном свете, однако следует избегать прямого светового воздействия [136].

### 2.1.2. Вспомогательные вещества

Для получения МЧ с пролонгированным высвобождением ДВ, на основании проведенных исследований, в качестве основного матрицеобразователя использовали СМГК в соотношении 65:35, с подбором необходимых стабилизаторов и эмульсификаторов, в зависимости от применяемого метода (Таблица 3).

Таблица 3 – Используемые в работе матрицеобразователи и вспомогательные вещества

<b>Название</b>	<b>Производитель</b>	<b>Физико-химические свойства</b>	<b>Применение</b>
Блок-сополимер 65:35 молочной и гликолевой кислот (СМГК)	RESOMER RG 653 H, Evonik Industries AG, Essen, Германия	Представляет собой порошок от белого до светло-желтого цвета, растворимый в органических растворителях (дихлорметане, этилацетате).	Используется в челюстно-лицевой хирургии для производства биоразлагаемых хирургических нитей, костных имплантатов, оболочек лекарств пролонгированного действия.
Span 80 (сорбитан моноолеат)	a.c.s., Sigma Aldrich, США	Вязкая жидкость янтарного цвета без запаха, растворимая в минеральных и растительных маслах.	Используется в качестве эмульсификатора и стабилизатора.

Продолжение Таблицы 3

Полисорбат 20	a.c.s., Sigma Aldrich, США	Маслянистая жидкость от лимонного до янтарного цвета со слабым характерным запахом.	Производное поли (окси-1,2-этандил) моно-9-октадеканоата сорбитана; используется в качестве эмульгатора (диспергатора).
Поливиниловый спирт (ПВС) 18-88	Merck KGaA, Darmstadt, Германия	Гранулы или порошок от белого до кремового цвета без запаха. Водный раствор нейтрален или слабокислый (рН 5-8 (4% водный раствор)), подвержены росту плесени.	Используется в качестве агента, повышающего вязкость.
Метилцеллюлоза (МЦ) А4М	Ashland™, США	Твердое аморфное бесцветное вещество в виде порошка белого цвета без запаха с плотн.=1,290-1,310 г/см <sup>3</sup> (при 25°С) и насыпной массой 0,3-0,5 г/см <sup>3</sup> .	Используется в качестве загустителя и стабилизатора эмульсий вода в масле.

## Продолжение Таблицы 3

		Растворима в холодной воде (не выше 50°C), концентрированной муравьиной и уксусной кислотах, молочной кислоте, горячих гликоле и глицерине.	
Лецитин LIPOID S 100	LIPOID GMBH, Ludwigshafen am Rhein, Германия	Представляет собой воскообразную массу или желтые почти маслянистые хлопья, либо желтый порошок.	Фосфолипид с молекулярной массой 762,1 г/моль, используется в качестве эмульгатора.

В полимерную матрицу МЧ по мере продвижения исследовательской работы были включены дополнительные компоненты (Таблица 4), придающие МЧ дополнительные свойства и в перспективе способствующие увеличению их терапевтической эффективности.

Таблица 4 – Дополнительные компоненты

<b>Название</b>	<b>Производитель</b>	<b>Физико-химические свойства и примеры использования</b>
Суспензия стабилизированных олеиновой кислотой гидрофобных магнитных наночастиц	Колчин Е.Л., лаборатория нанобиотехнологий МФТИ, Россия	Технология изготовления МНЧ основана на получении металл-олеатного комплекса в результате

## Продолжение Таблицы 4

(МНЧ) в хлороформе (18,5 мг/мл)		реакции хлоридов металлов с олеатом натрия, и дальнейшем формировании нанокристаллов при нагревании до 320°C. [138]
Перфтордекалин (ПФД)	a.c.s., Sigma Aldrich, США	Фторуглерод в виде бесцветной жидкости без запаха. Благодаря высокому растворению в нем кислорода, используется в качестве газотранспортного компонента кровезаменителей.

Используемые при проведении исследований растворители и реактивы указаны в таблице 5.

Таблица 5 – Растворители и реактивы

Наименование	Нормативная документация	Классификация, производитель
Реактивы		
1,3 дифенилбензофуран (ДФБФ)	ACS	a.c.s., Sigma Aldrich, США
диметилсульфоксид	USP, BP, Ph. Eur.	a.c.s., Sigma Aldrich, США
Среда DMEM 12	ФСП 42-0343-3544-02	ПанЭко (Россия)
пенициллин	ГОСТ 34533-2019	ПанЭко (Россия)
Стрептомицин	ФС.2.1.0037.15	ПанЭко (Россия)
L глутамин	-	ПанЭко (Россия)
3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид	-	ПанЭко (Россия)
Эмбриональная телячья сыворотка	ОФС.1.8.1.0004.15	Hyclone (США)
Растворители		

## Продолжение Таблицы 5

Хлористый метилен	ГОСТ 9968-86	Химмед (Россия)
Ацетонитрил	ТУ 2634-002-5426086; паспорт № 1279/24.12.13; ОФС.1.3.0001.15	Химмед (Россия)
Изопропиловый спирт	ГОСТ 9805-84	Химмед (Россия)
Гексан	ТУ 2631-158-44493179- 13	Химмед (Россия)
Гептан	ГОСТ 25828-83	Химмед (Россия)
Легкое минеральное (парафиновое) масло	USP-NF, BP, Ph. Eur.	a.c.s., Sigma Aldrich, США

В работе использовали деионизованную воду, полученную на установке обратного осмоса УВОИ 1812С6 (МЕДИАНА ФИЛЬТР, Россия) в соответствии с ФС.2.2.020.15.

## 2.1.3. Оборудование

Для приготовления и оценки полученных МЧ было использовано следующее оборудование (Таблица 6).

Таблица 6 – Используемое оборудование

Название	Производитель	Характеристики
Ультразвуковой гомогенизатор SONOPULS HD 2070	Bandelin, Германия	С микроизлучателем MS 73 при мощности 15% с пульсацией 10%
Ultra Turrax 25	(IKA, Германия)	С диспергатором S 25 N – 8 G при 20000 мин <sup>-1</sup>
Лиофильная сушилка VaCo 2	(ZIRBUS, Германия).	-
Центрифуга LMC-3000	-	при 1500g
Верхнеприводная мешалка IKA Eurostar 20 digital с пропеллерным перемешивающим элементом	-	при 300 мин <sup>-1</sup>

Продолжение Таблицы 6

Ультразвуковая баня SONOREX DIGITEC DT 52 H	-	3-5 сек
Вакуумный насос PC 3001 Vario select	-	с поддержанием вакуума 5 мбар при мощности насоса 5% с увеличением мощности до 30%
Вакуумный насос Eurovacuum EVD-6	-	-
Микроскоп MAIA3	(TESCAN, Чехия)	-
Конфокальный лазерный сканирующий микроскоп LSM 780	Carl Zeiss, Германия)	-
Прибор динамического рассеяния света (ДРС) Zetasizer Nano ZS	(Malvern Instruments, США)	-
Спектрофотометр UV 3600	(Shimadzu, Япония)	-
Планшетного считывателя CLARIOstar	(BMG LABTECH, Германия)	-
Светоизлучающий диод (СИД) LZ1	(OSRAM SYLVANIA LED Engin, США)	00R202 с максимумом излучения 660 нм.
Axio Observer.A1	(Carl Zeiss, Германия)	Оборудован осветителями HAL 100, HBO 100 и цифровой монохромной камерой Ахиосат 503 моно, работающей под управлением программного обеспечения ZEN 2
Цитометр Amnis ImageStream X Mark II	(Luminex Corporation, США)	с использованием 40× объектива

## 2.2. Методы

### 2.2.1. Методы приготовления микрочастиц

#### 2.2.1.1. Множественная эмульсия вода/в масле/в воде

Для приготовления МЧ по методу множественной эмульсии В/М/В, первоначально готовили среду для созревания частиц. Для этого 500 мл воды охлаждали до 0-4°C с допустимым образованием небольшого количества льда.

*Первичную дисперсную среду* готовили путем добавления в сосуд для приготовления первичной эмульсии 10 мг Span 80 и 50 мг СМГК в соотношении 65:35. Затем, полученную дисперсию диспергировали в 2 мл дихлорметана.

Для приготовления *вторичной дисперсной среды* растворяли 200 мг поливинилового спирта 18-88 (ПВС) в 20 мл воды при температуре 80°C. В горячий раствор добавляли 100 мг метилцеллюлозы (МЦ) и перемешивали до однородности. Затем, полученную дисперсию охлаждали до 4°C и перемешивали, поддерживая пониженную температуру до полного растворения МЦ.

Для получения *первичной эмульсии «вода в масле»*, в центрифужной пробирке к водному раствору для инфузий «Радахлорин» объемом 200 мкл добавляли 400 мкл 0,1М соляной кислоты, перемешивали и центрифугировали 10 мин при 1500g, с дальнейшим тщательным удалением супернатанта. Влажный осадок РХ диспергировали на ледяной бане в первичной дисперсной среде с помощью ультразвукового гомогенизатора в течение 1 мин при мощности 15% с пульсацией 10%.

Первичную эмульсию готовили только при наличии приготовленной вторичной дисперсной среды и охлажденной воды для созревания.

*Вторичную эмульсию «в/м/в»* получали диспергированием первичной эмульсии, добавляя по каплям, в 20 мл вторичной дисперсной среды при температуре 4°C с использованием Ultra Turrax 25 при 20000 мин<sup>-1</sup> и дополнительно гомогенизировали в течение 1 мин до однородности.

Полученную множественную эмульсию смешивали с 500 мл охлажденной до 0-4°C воды на лопастной мешалке при 500 мин<sup>-1</sup>. После получения однородной дисперсии её выдерживали при постоянном перемешивании при 200 мин<sup>-1</sup> на лопастной мешалке с повышением температуры от 4°C до комнатной для удаления дихлорметана и затвердевания частиц в течение 5 ч.

Созревшие МЧ ресуспензировали в 15 мл воды и осаждали центрифугированием 20 мин при 150 g. Супернатант сливали, а осадок дважды промывали в 15 мл воды с последующим осаждением в указанных выше условиях. Отмытые МЧ замораживали при минус 25°C и лиофильно высушивали в течение 15 ч.

#### 2.2.1.2. Множественная эмульсия вода/в масле/в масле

В случае метода множественной эмульсии в/м/м, *вторичную дисперсную среду* готовили путем добавления 300 мг Span-80 (1,5% масса/объем) к 20 мл (17,5 г) легкого парафинового масла при комнатной температуре с дальнейшим перемешиванием в течение 30 сек на Ultra Turrax 25 при 20000 мин<sup>-1</sup>.

Для приготовления *первичной дисперсной среды* 50 мг СМГК в соотношении 65:35 растворяли в центрифужной пробирке в 1 мл ацетонитрила.

*Первичную эмульсию «вода в масле»* получали путем добавления к 200 мкл водного раствора для инфузий «Радахлорин», 200 мкл 0,1М соляной кислоты, с дальнейшим перемешиванием, центрифугированием в течение 10 мин при 1500g и полным удалением супернатанта. Влажный осадок РХ диспергировали на ледяной бане в первичной дисперсной среде с помощью ультразвукового гомогенизатора в течение 1 мин при мощности 15% с пульсацией 10%.

Первичную эмульсию готовили только при наличии приготовленной вторичной дисперсной среды.

*Множественную эмульсию «в/м/м»* готовили при комнатной температуре, диспергируя первичную эмульсию, добавляя по каплям, в 20 мл вторичной дисперсной среды с использованием Ultra Turrax 25 при 20000 мин<sup>-1</sup>, и

дополнительно гомогенизировали в течение 1 мин до однородности. Приливали 10 мл (6,65 г) н-гептана и гомогенизировали 10 мин с использованием Ultra Turrax 25 при 15000 мин<sup>-1</sup>, затем приливали ещё 10 мл (6,65 г) н-гептана и гомогенизировали 30 мин при тех же условиях.

Полученную множественную эмульсию выдерживали не менее 5 ч при комнатной температуре до полного созревания частиц при постоянном перемешивании на верхнеприводной мешалке ИКА Eurostar 20 digital с пропеллерным перемешивающим элементом при 300 мин<sup>-1</sup>. После чего эмульсию оставляли на ночь в вытяжном шкафу без перемешивания.

Созревшие частицы отделяли декантацией. При комнатной температуре к осадку приливали 1 мл изопропанола и обрабатывали на ультразвуковой бане 10 сек. Затем добавляли 20 мл (13,3 г) н-гептана и перемешивали 5 мин при 300 мин<sup>-1</sup>. По завершению оставляли над в вытяжном шкафу без перемешивания на 0,5 ч.

Созревшие частицы ресуспензировали, и из суспензии осаждали центрифугированием 10 мин при 150 g. К осадку приливали смесь 5 мл изопропанола и 15 мл н-гептана (в соотношении 1:3), обрабатывали на ультразвуковой бане SONOREX DIGITEC DT 52 H 3-5 сек (такая обработка на ультразвуковой бане далее используется при ресуспензировании всех осадков) и перемешивали до однородности.

Указанную выше отмывку выполняли трижды.

Для окончательной отмывки МЧ из суспензии осаждали частицы центрифугированием 10 мин при 150 g. К осадку приливали смесь 5 мл изопропанола и 15 мл н-гексана, обрабатывали на ультразвуковой бане и перемешивали до однородности.

Для сушки МЧ из суспензии осаждали частицы центрифугированием 10 мин при 150 g. Непосредственно перед сушкой тщательно сливали супернатант из пробирки. Осадок частиц сразу, не давая высохнуть гексану, помещали на 1 ч в вакуум от насоса PC 3001 Vario select с поддержанием вакуума 5 мбар при мощности насоса 5% с увеличением мощности до 30% при признаках высыхания

осадка. После этого частицы помещали на 1 ч в вакуум от насоса Eurovacuum EVD-6 для удаления остаточных растворителей.

### 2.2.1.3. Множественная дисперсия твердое/в масле/в воде

Для приготовления МЧ по методу множественной эмульсии ТВ/М/В, первоначально готовили среду для созревания частиц. Для этого 500 мл воды охлаждали до 0-4°C, с допущением образования небольшого количества льда.

*Первичную дисперсную среду* готовили путем растворения 25 мг СМГК в соотношении 65:35 и 1 мг лецитина в 1 мл хлористого метилена.

Для приготовления *вторичной дисперсной среды* 200 мг ПВС 18-88 растворяли в 20 мл воды при температуре 80°C. В горячий раствор добавляли 100 мг МЦ и перемешивали до однородности. Затем дисперсию охлаждали до 4°C и перемешивали, поддерживая пониженную температуру до полного растворения МЦ.

*Первичную дисперсию «твердое в масле»* получали путем лиофильного высушивания с дальнейшим диспергированием в первичной дисперсной среде 30 мкл раствора для инфузий «Радахлорин».

Для получения *множественной дисперсии «твердое в масле в воде»* полученную первичную дисперсию эмульгировали по каплям во вторичной водной дисперсной среде при температуре 4°C с использованием Ultra Turrax 25 при 20000 мин<sup>-1</sup> и дополнительно гомогенизировали в течение 1 мин до однородности.

Полученную множественную дисперсию смешивали с 500 мл охлажденной до 0-4°C воды на верхнеприводной мешалке с пропеллерным перемешивающим элементом при 500 мин<sup>-1</sup>. После получения однородной дисперсии её выдерживали при постоянном перемешивании при 300 мин<sup>-1</sup> с повышением температуры от 4°C до комнатной для удаления дихлорметана и затвердевания частиц в течение 6 ч.

Созревшие МЧ осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 2000 g. Супернатант сливали, а осадок промывали ресуспензированием в 50 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 лиофильно высушивали в течение 15 ч.

При включении в МЧ стабилизированных олеиновой кислотой МНЧ и ПФД, на стадии получения первичной дисперсии «твердое в масле», в 2,5% раствор СМГК и лецитина в хлористом метиле добавляли 55 мкл концентрированной суспензии МНЧ и 20 мкл ПФД, с последующим диспергированием лиофилизата РХ.

### 2.2.2. Измерение размеров и дзета-потенциала микрочастиц

Морфологию и размеры частиц оценивали по изображениям растровой электронной микроскопии (РЭМ). Образцы частиц для электронной микроскопии наносили на кремниевые подложки в виде суспензии в воде и высушивали на воздухе при комнатной температуре.

Измерения проводили при ускоряющем напряжении 1-2 кВ. Для определения размеров частиц цифровые микрофотографии обрабатывали с использованием программы ImageJ 1.52a. Распределение РХ в МЧ оценивали по изображениям МЧ в водной суспензии, полученным с использованием конфокального лазерного сканирующего микроскопа.

Заряд поверхности МЧ характеризовали их дзета-потенциалом в водной суспензии, который измеряли с использовали прибора динамического рассеяния света (ДРС) при температуре 25°C.

### 2.2.3. Определение содержания радахлорина в микрочастицах

Для определения содержания РХ в МЧ навеску МЧ массой около 5 мг растворяли в 5 мл ацетонитрила и измеряли оптическую плотность полученного раствора в диапазоне от 800 до 300 нм при  $\lambda=664$  нм против раствора в ацетонитриле такой же навески СМГК.

В качестве калибровки использовали 0,005% раствор РХ в ацетонитриле, полученный разведением 5 мкл 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 спектрофотометрически.

#### 2.2.4. Высвобождение радахлорина из микрочастиц

Высвобождение РХ из МЧ 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. Полученную суспензию разливали по 0,4 мл в пробирки Eppendorf на 1,5 мл, и инкубировали в термостате в положении, близком к горизонтальному при температуре 37°C.

Для исследования разрушения РХ к 15 мкл раствора для инфузий «Радахлорин» приливали 5,985 мл буфера и перемешивали до однородности. Концентрация полученного раствора составила 8,75 мкг/мл хлоринов.

Таблица 7 – Параметры приготовления проб

<b>Параметры приготовления проб</b>	<b>Значения параметров приготовления проб</b>				
Обозначение проб	P1	P2	P3	P4	P5
Разведение раствора P1	-	1:9	1:99	1:999	1:9999
Разводимый раствор	Препарат «Радахлорин»	P1	P2	P3	P4
Объем разводимого раствора	0,015 мл	0,5 мл	0,5 мл	0,5 мл	0,5 мл
Добавляемый раствор буфера	5,985 мл	5,5 мл	5,5 мл	5,5 мл	5,5 мл

Из части приготовленного раствора готовили разведения в 10, 100, 1000 и 10000 раз в соответствии с таблицей 7. Все четыре разведения РХ разливали по 0,4 мл в пробирки Ерпендорф на 1,5 мл, и помещали в термостат с температурой 37°C без освещения.

Пробирки Ерпендорф в положении, близком к горизонтальному инкубировали в термостате при 37°C с перемешиванием содержимого на встряхивателе типа Vortex раз в сутки.

На каждый срок (3, 6 ч; 1, 3, 7, 14, 21 и 30 сут) пробирки извлекали из термостата, и пробы с МЧ ресуспензировали с дальнейшим осаждением с помощью центрифугирования в течение 10 мин при 10000 g. Из каждой пробирки отбирали по 0,3 мл супернатанта в пробирки Ерпендорф на 1,5 мл, а остаток супернатанта тщательно удаляли.

Извлеченные растворы РХ, супернатанты и осадки замораживали при температуре минус 20°C.

Для приготовления калибровочных проб 10 мкл препарата «Радахлорин» в мерной колбе на 5 мл доводили до метки описанным выше калий-фосфатным буфером. Маточный калибровочный раствор разводили буфером для исследования высвобождения в соответствии с таблицей 8.

Осадки МЧ размораживали и высушивали под глубоким вакуумом (<1 мбар) в течение 1 ч. В пробирки с осадками МЧ добавляли по 1 мл диметилсульфоксида (ДМСО), герметично закрывали и инкубировали на водяной бане до полного растворения. После инкубации пробирки центрифугировали в течение 10 мин при 10000 g и отбирали по 0,2 мл супернатанта в 3 лунки 96-ти луночных планшетов.

Калибровочные пробы РХ готовили разведением в ДМСО по указанной выше методике в соответствии с таблицей 8.

По завершению эксперимента, все отобранные пробы супернатантов и РХ размораживали и определяли концентрацию РХ по его флуоресценции с использованием планшетного считывателя в 96 луночных планшетах. Флуоресценция возбуждалась на длине волны  $\lambda_{\text{возб}}=401$  нм и регистрировалась на длине волны  $\lambda_{\text{изл}}=660$  нм.

Таблица 8 – Параметры приготовления калибровочных проб

Параметры приготовления калибровочных проб	Значение параметров приготовления калибровочных проб								
	К1	К2	К3	К4	К5	К6	К7	К8	К9
Обозначение калибровочной пробы									
Разведение маточного калибровочного раствора	-	1:2	1:9	1:2	1:9	1:2	1:9	1:2	1:9
Разводимый раствор	Препарат «Радахлорин»	К1	К1	К3	К3	К5	К5	К7	К7
Объем разводимого раствора	0,001 мл	0,1 мл	0,1 мл	0,1 мл	0,1 мл	0,1 мл	0,1 мл	0,1 мл	0,1 мл
Добавляемый объем буфера или ДМСО	4,990 мл	0,2 мл	0,9 мл	0,2 мл	0,9 мл	0,2 мл	0,9 мл	0,2 мл	0,9 мл

### 2.2.5. Генерация микрочастицами синглетного кислорода

Способность РХ в составе МЧ к интенсификации образования синглетного кислорода в условиях ФДТ оценивали при облучении светом светоизлучающего диода (СИД) с максимумом излучения в 660 нм.

Навески МЧ массой около 5 мг суспензировали в 2,5 мл 50 мМ калий-фосфатного буфера с рН=7,4 с добавлением 0,5% полисорбата 20. В стандартную 1 см × 1 см × 4 см кювету спектрофотометра при температуре 25°C помещали 500 мкл полученной суспензии и доводили до 2 мл буфером в соотношении 1:3.

К суспензии добавляли 20 мкл 1 мМ раствора дифенилбензофурана (ДФБФ) в этаноле и затем кювету заданное время облучали сверху светом СИД с облученностью на поверхности (поверхностной плотностью мощности излучения) суспензии 15 мВт·см<sup>-2</sup>.

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 [139].

Убыль оптической плотности использовали в качестве характеристики интенсивности образования синглетного кислорода. В качестве калибровочного раствора использовали 2 мл 8,7 мкг/мл раствора РХ в указанном калий-фосфатном буфере. Сравнивали образование синглетного кислорода МЧ, содержащими РХ, с образованием синглетного кислорода в калибровочном растворе.

#### 2.2.6. Исследование фотодинамического эффекта микрочастиц в культуре клеток

Клеточные культуры СНО (клетки яичников сирийского хомячка), MFC-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-ти 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 и 2 мМ L-глутамин. Клетки культивировали в темноте при температуре 37°C в увлажненной атмосфере с 5% содержанием CO<sub>2</sub>.

После культивирования в течение 24 ч 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, а в последней трети лунок культуральную среду заменяли 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 с облученностью на поверхности культуральной среды 100 мВт·см<sup>-2</sup>.

Влияние МЧ и фотодинамического облучения на клетки оценивали через сутки с помощью МТТ-теста и электронной микроскопии.

### 2.2.7. Микроскопия и цитометрический анализ

Микрофотографирование клеток осуществляли на световом микроскопе Axio Observer.A1, 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 с использованием 40× объектива. Для измерения бокового рассеяния применяли лазер 785 нм (0,05 мВт), для возбуждения флуоресценции в районе 488 нм и 642 нм (200 и 150 мВт, соответственно).

Для каждого образца собиралось 6000 событий.

Полученные данные обрабатывали с использованием программного обеспечения IDEAS.

### 2.2.8. Оценка жизнеспособности клеток

Для оценки жизнеспособности клеток в МТТ тесте [140] во всех лунках культуральную среду заменяли на свежую, содержащую 0,5 мг/мл МТТ, и инкубировали 0,5 ч в темноте при температуре 37°C в атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>.

После этого среду удаляли и содержимое лунок растворяли в 1 мл ДМСО.

Количество образовавшегося формазана характеризовали оптической плотностью полученных растворов в лунках при 550 нм, измеренной с использованием планшетного считывателя.

Жизнеспособность клеток после воздействия МЧ и фотодинамического облучения характеризовали отношением оптических плотностей в лунках с клетками, подвергшимися воздействию, и лунках с контрольными клетками той же линии к клеткам без каких-либо воздействий (100% жизнеспособность).

### 2.3. 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  $\text{среднее} \pm \text{стандартное отклонение}$ .

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.

### Глава 3. Характеристика морфологии и размеров микрочастиц

#### 3.1. Сравнительная характеристика морфологии и размеров микрочастиц, полученных по методу множественной эмульсии вода/в масле/в воде и вода/в масле/ в масле

Морфология и размеры частиц напрямую зависят от методики их получения. В случае метода получения МЧ через множественную эмульсию, дисперсная фаза представляет собой эмульсию с диспергированной в ней внутренней эмульсией, отделенной от внешней жидкой фазы слоем другой фазы.

Процесс инкапсулирования методом двойного эмульгирования В/М/В основан на методах осаждения и эмульсионной диффузии для инкапсулирования гидрофильных ДВ. В составе первичной эмульсии вода в масле липофильная основа отсутствует, а органическая фаза содержит хлористый метилен, способный частично смешивается с водой, с капельками водного концентрата-радахлорина, и пленкообразующий СМГК. Во второй фазе к системе добавляется вода, содержащая стабилизирующие агенты в виде ПВС и МЦ для получения эмульсии «вода в органической фазе в воде».

В процессе получения МЧ методом двойного эмульгирования В/М/М органическая фаза первичной эмульсии содержит хорошо смешивающийся с водой ацетонитрил с частично растворенным в нем РХ, и пленкообразующий СМГК. Вторая фаза эмульгирования состоит из минерального масла, содержащего стабилизирующий агент в виде Span-80 для образования множественной эмульсии. Во время проведения этой стадии происходит затвердевание частиц за счет осаждения полимера и диффузии растворителя, который затем удаляют упариванием под вакуумом, оставляя затвердевшие МЧ.

Согласно полученным результатам по изображениям РЭМ МЧ, полученные обоими методами, имеют сферическую форму и склонны к образованию агломератов (Рисунок 10).

Исходя из большого количества агломератов, измерение размеров частиц было проведено по изображениям, полученным с помощью электронной микроскопии, поскольку при измерении с использованием ДРС, агломераты выступали как целые частицы, существенно искажая при этом оценку размеров.

Таким образом, основное количество МЧ, полученных обоими методами, имеет размер до 10 микрон ( $D_{90} < 10 \text{ мкм}$ ) (Рисунок 10 А, В).

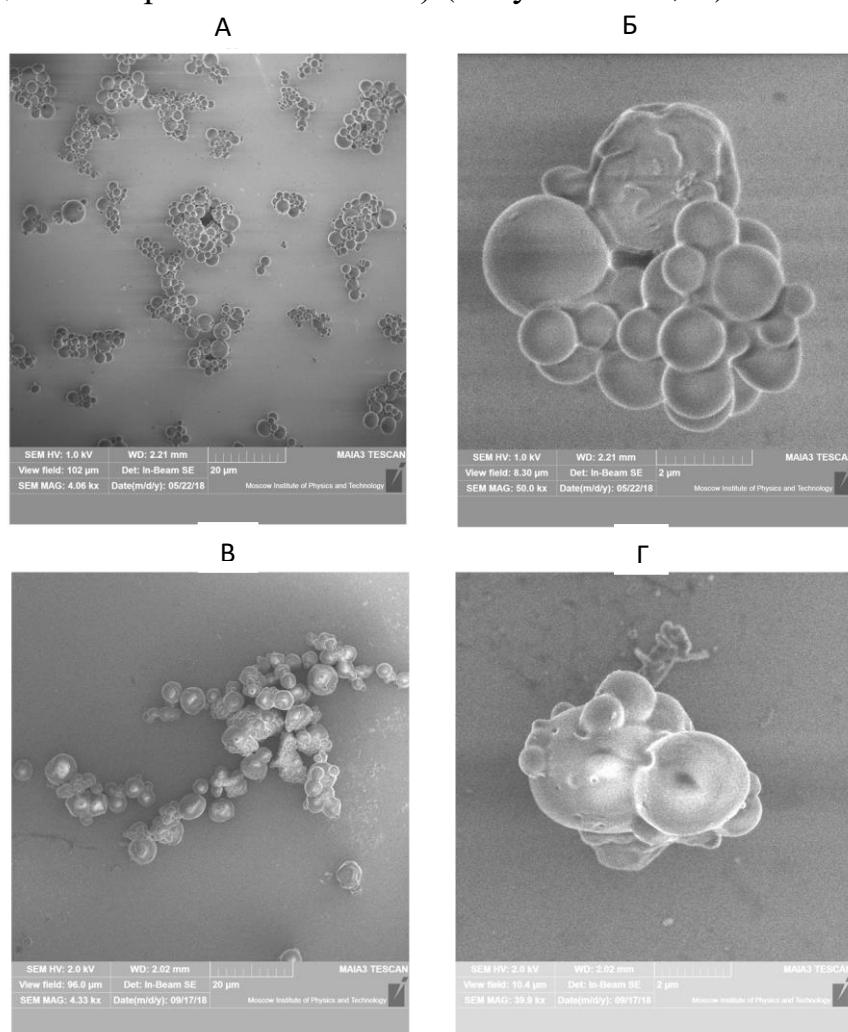
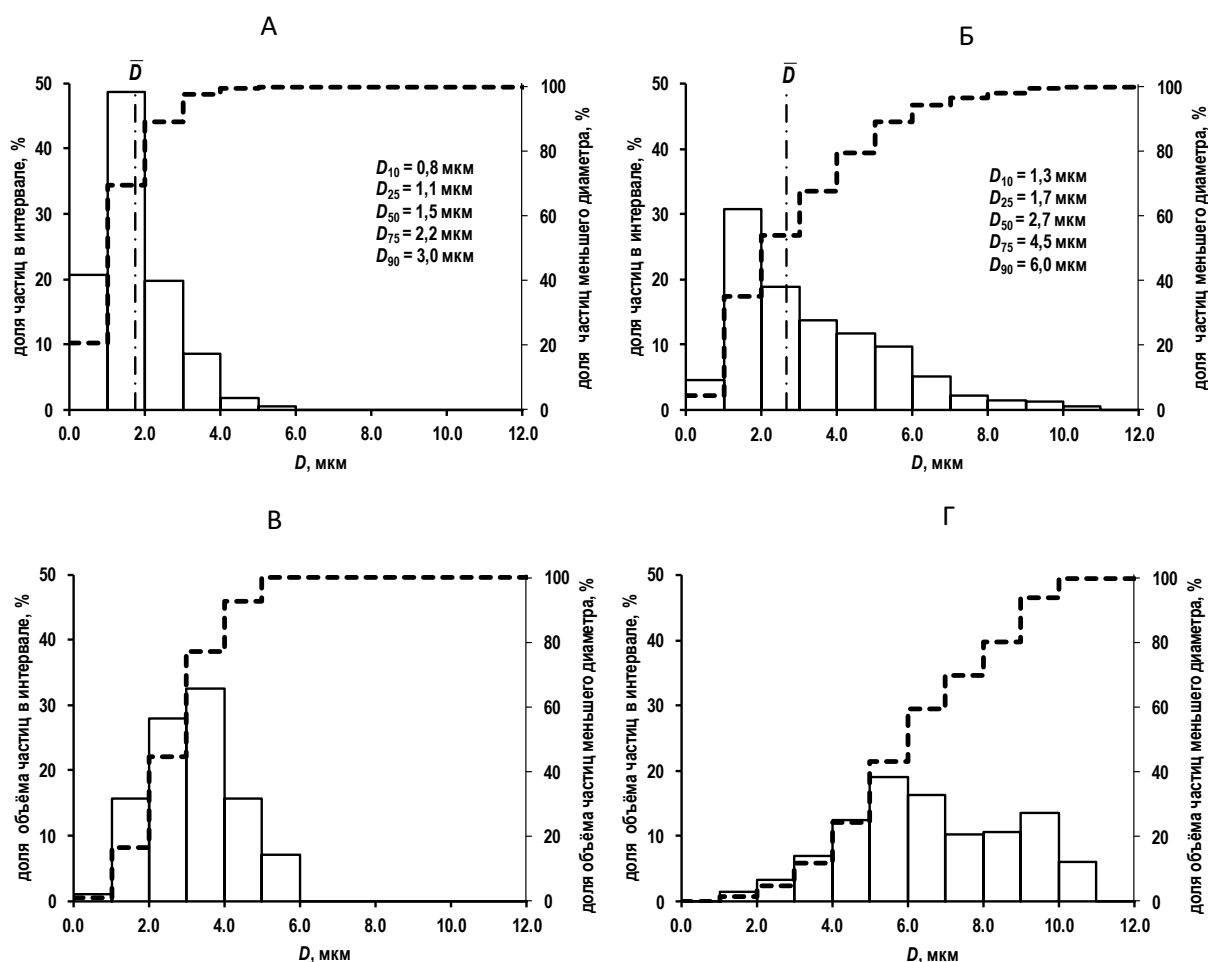


Рисунок 10 – Изображения РЭМ, А, Б – МЧ, полученные по методу множественной эмульсии В/М/В, В, Г – МЧ, полученные по методу множественной эмульсии В/М/М

Однако, МЧ, полученные по методу множественной эмульсии В/М/М, крупнее, чем МЧ, полученные по методу множественной эмульсии В/М/В, и имеют большую полидисперсность (Рисунок 11).



— — дифференциальная зависимость (основная ось ординат);  
 - - - интегральная зависимость (вспомогательная ось ординат); А, В – МЧ, полученные по методу В/М/В ( $n=1274$ ); Б, Г – МЧ, полученные по методу В/М/М ( $n=661$ ).

Рисунок 11 – Распределение МЧ с РХ по диаметру (А, Б) и зависимость доли объема МЧ от их диаметра (В, Г).

Отрицательный заряд полученных МЧ в воде обуславливает наличие в используемой для получения МЧ СМГК карбоксильных концевых групп (Таблица 9). Полученная величина дзета-потенциала от минус 30 мВ до минус 40 мВ находится на нижнем уровне значений известных из литературы для немодифицированных частиц [141], что указывает на отсутствие заметного влияния РХ в составе МЧ на их заряд.

Результаты конфокальной микроскопии показали наличие нефлуоресцирующих зон, занимающих заметную часть внутри МЧ, полученных по методу множественной эмульсии В/М/В (Рисунок 12 А, Б), в то время как у МЧ,

полученных по методу множественной эмульсии В/М/М, внутренняя структура характеризовалась равномерным распределением флуоресцирующих и нефлуоресцирующих маленьких участков (Рисунок 12 В, Г).

Таблица 9 – Характеристики микрочастиц с Радахлорином

Метод получения МЧ	Диаметр МЧ, мкм ( $\bar{D} \pm \sigma$ )*	Коэффициент полидисперсности ( $\sigma^2 / \bar{D}^2$ )*	Дзета-потенциал МЧ, мВ	Содержание РХ в МЧ, мкг/мг	Степень включения РХ в МЧ**, %
В/М/В	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	3,28±2,00	0,37	-33,8 ± 3,7 <i>n</i> = 15	1,74 ± 0,21	12,6 ± 1,5

Примечание – \*–рассчитан по результатам измерения размеров частиц на изображениях РЭМ, \*\*–доля от теоретического содержания РХ в МЧ при условии его полного включения.

Описанная картина в полной мере отражает особенности первичной дисперсной системы вода в масле, имеющей разную дисперсионную среду в используемых методах получения.

В случае метода множественной эмульсии В/М/В, первичной дисперсионной средой является раствор СМГК в хлористом метилена. Взаимная растворимость хлористого метилена с водой незначительна, в результате чего получаемая дисперсная система представляет собой эмульсию с капельками водного концентрата РХ, лишь частично растворенного в хлористом метилена, благодаря выраженным амфифильным свойствам хлоринов [142]. В ходе созревания МЧ, после приготовления вторичной эмульсии В/М/В, часть молекул РХ, растворенного в хлористом метилена, фиксируется в полимерной матрице МЧ. Однако, РХ, в виде водного концентрата оставшийся в каплях, в процессе отмывки вымывается через отверстия, возникающие на поверхности МЧ.

В таком случае наличие нефлуоресцирующих зон, обнаруживаемых конфокальной микроскопией в МЧ, полученных по методу множественной

эмульсии В/М/В, объясняется незначительной растворимостью хлористого метилена в воде и частичным вымыванием не зафиксированного в полимерной матрице РХ в виде водных капель через пористую поверхность МЧ.

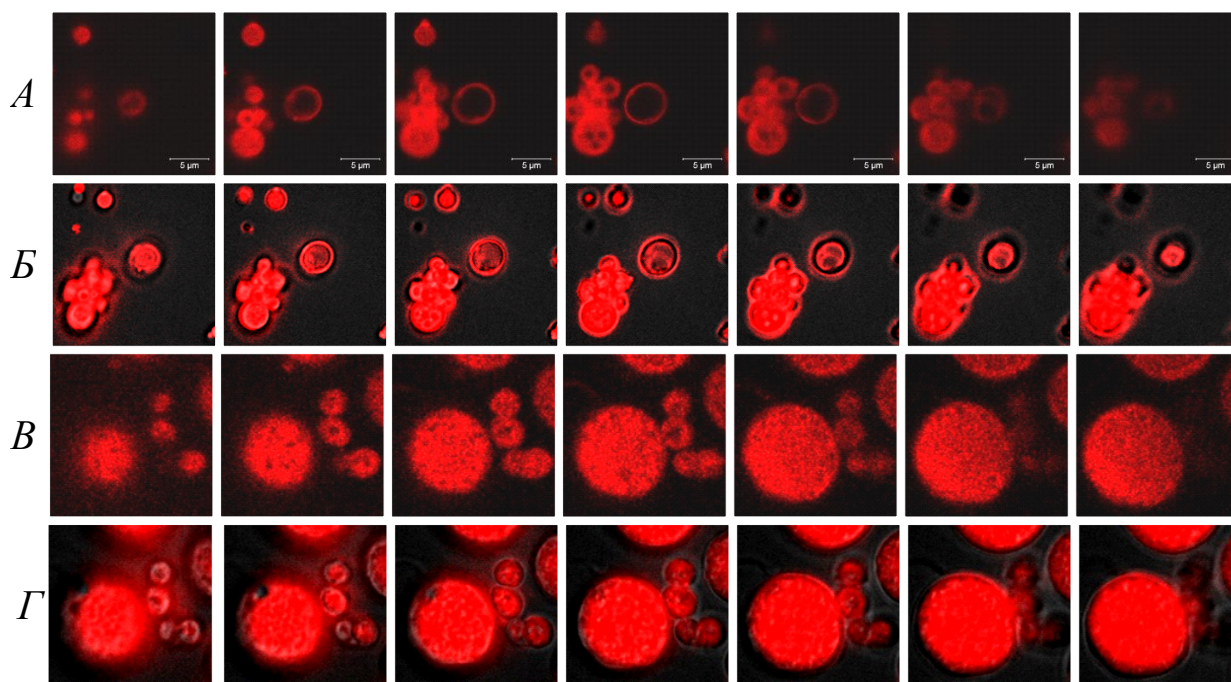


Рисунок 12 – Флуоресцентная микроскопия микрочастиц с Радахлорином, полученных по методикам В/М/В (А, Б) и В/М/М (В, Г). А, В – конфокальная микроскопия, Б, Г – широкопольная флуоресцентная микроскопия. Масштабная метка одинакова всех микрофотографий, шаг оптических z срезов равен 1 мкм

В методе множественной эмульсии В/М/М, первичной дисперсной средой является раствор СМГК в ацетонитриле. В отличие от хлористого метилена, ацетонитрил свободно смешивается с водой, поэтому первичная дисперсная система В/М характеризуется высокой дисперсностью осадка РХ (без видимой опалесценции и без образования осадка после центрифугирования в течение 10 мин при 1500 g), или даже возможным растворением хлоринов в получаемой первичной дисперсионной среде.

Переход ацетонитрила во вторичную дисперсионную среду после получения вторичной эмульсии В/М/М и его испарение при дальнейшем созревании МЧ, приводит к дополнительной агрегации частиц осадка РХ и их фиксации в слабо флуоресцирующей полимерной матрице в виде равномерно распределенных интенсивно флуоресцирующих участков.

Предложенное описание формирования структуры при созревании МЧ согласуется с результатами оценки включения в них РХ (Таблица 9).

Включение РХ в МЧ, полученные по методу множественной эмульсии В/М/В, очень низкое, и составляет менее одного процента от теоретически максимально возможного. В случае же МЧ, полученных по методу множественной эмульсии В/М/М, включение РХ выше более чем на порядок.

Для расчета количества инкапсулированного ДВ в экспериментальной практике применяются различные методы, выбор которых основан на свойствах инкапсулированного вещества. Например, количественное определение может быть выполнено с помощью спектральных методов, ВЭЖХ, флуориметрического анализа, гель-проникающей хроматографии и т.д. Оценка инкапсулирующей способности также может быть сделана косвенно путем измерения содержания ЛС в супернатанте, извлеченном после промывки композиций МЧ.

Определение содержания РХ в МЧ проводили с помощью УФ-спектрофотометрии при разрушении МЧ в ацетонитриле посредством растворения в нем сополимера по характерным для РХ пикам: длинноволновым в районе 660 нм и коротковолновым в районе 400 нм по отношению к стандартному раствору.

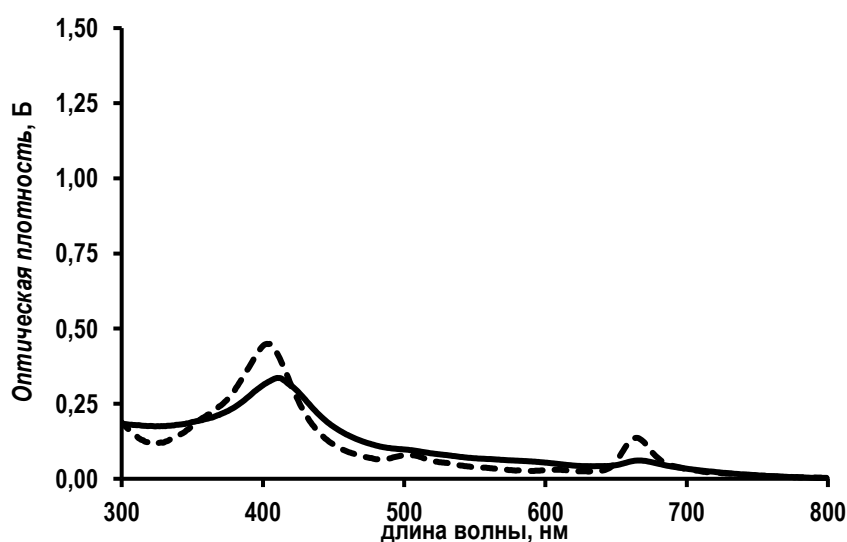


Рисунок 13 – Спектры поглощения — — РХ, — МЧ полученных по методу множественной эмульсии В/М/М в ацетонитриле.

Примечание – Измерения спектра поглощения образцов с МЧ в ацетонитриле проводилось после полного растворения МЧ

Полученный результат хорошо объясняется вымыванием РХ из полостей, обнаруживаемых в МЧ, изготовленных по методу множественной эмульсии В/М/В и отсутствующих в МЧ, изготовленных по методу множественной эмульсии В/М/М. Однако, необходимо отметить, что включение РХ в МЧ и в случае получения МЧ по методу В/М/М имеет небольшую величину, немногим превышающую 10% (Рисунок 13). Причиной этого может быть отмечаемая выраженная амфифильность хлоринов [142], которая может приводить к выходу части диспергированного в первичной органической фазе РХ из созревающих МЧ с последующим растворением во вторичной масляной дисперсионной среде и дальнейшим встраиванием в обратные мицеллы, образуемые с помощью Span 80 [143].

### 3.2. Характеристика морфологии и размеров микрочастиц, полученных по методу множественной дисперсии твердое/в масле/в воде

Метод получения МЧ через множественную дисперсию, как и в случае метода множественной эмульсии В/М/В и В/М/М характеризуется дисперсной фазой, представляющей собой эмульсию с диспергированной в ней внутренней дисперсией, отделенной от внешней жидкой фазы слоем другой фазы.

Процесс получения множественной дисперсии ТВ/М/В происходит в два этапа с использованием двух ПАВ: гидрофобного, предназначенного для стабилизации поверхности внутренней дисперсии твердое в масле, и гидрофильного, стабилизирующего поверхность внешней масляных глобул эмульсии ТВ/М/В.

В основе метода множественной дисперсии лежит диспергирование лиофильно высушенного ДВ в органической дисперсной среде с последующим эмульгированием получившейся первичной дисперсии твердое в масле в водной фазе для получения множественной дисперсии ТВ/М/В. Основное отличие данного метода заключается в использовании липофильного компонента – лецитина в составе первичной дисперсии для лучшего растворения РХ в органическом

растворителе за счет повышения его липофильности, в результате чего первичная дисперсия характеризуется высокой дисперсностью лиофилизата РХ в растворе хлористого метилена и пленкообразующего СМГК. Также на стадии образования первичной дисперсии в состав МЧ включали суспензию МНЧ, диспергируя их в растворе сополимера в хлористом метилене, и ПФД с точечной обработкой ультразвуком до однородности и дальнейшем диспергированием в полученной смеси лиофилизата РХ. Во второй фазе к системе добавляется вода, содержащая стабилизирующие агенты в виде ПВС и МЦ для получения дисперсии «твердое в органической фазе в воде». Для достижения полной диффузии растворителя к множественной дисперсии добавляли избыточный объем воды до процесса окончательного созревания МЧ, которые в последствии отмывали и высушивали лиофильно или под вакуумом, в зависимости от состава.

По результатам экспериментов было показано, что присутствие в системе ПВС в качестве солюбилизатора при приготовлении вторичной дисперсной среды способствовало значительному уменьшению размеров МЧ до субмикронного (Рисунок 10, Рисунок 12), как в случае получения МЧ по методу множественной дисперсии ТВ/М/В, так и в случае получения МЧ по методу множественной эмульсии В/М/В, по сравнению с МЧ, полученными с помощью методов множественной эмульсии В/М/М [Hernández-Giottonini et al. al.2020], однако форма полученных по методу множественной дисперсии ТВ/М/В частиц различалась в зависимости от их состава. Полученные МЧ без МНЧ, вне зависимости от присутствия ПФД – сферической формы. Однако, при наличии МНЧ в полимерной матрице, МЧ имеют неправильную форму с выраженными складками. Данные изменения формы могут быть связаны с образованием 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, обогащенной МНЧ, но характеризующейся низким содержанием СМГК. Эта фаза более гидрофобна, чем окружающий её раствор с высоким содержанием СМГК в

хлористом метиле, что, в свою очередь, инициирует диффузию и испарение растворителя. Диффузия и испарение хлористого метилена из системы приводит в начале созревания МЧ к концентрированию этого раствора внутри частицы 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 (Рисунок 14). Сходным образом происходит образование складок на поверхности частиц, получаемых из полимеров распылительной сушкой с высокой скоростью.

По фотографиям РЭМ видно, что МЧ, с присутствующими в полимерной матрице МНЧ, менее склонны к образованию агломератов, в отличие от МЧ, полученных по тому же методу множественной дисперсии ТВ/М/В, но без МНЧ в составе.

Данное явление можно объяснить как нестандартной формой МЧ из-за образования складок на поверхности в результате диффузии растворителя, так и присутствием олеиновой кислоты на поверхности МНЧ, которая, исходя из недавних исследований, может быть использована в качестве смазывающего агента для снижения агрегационной активности полимерных МЧ [144].

Как и в случае получения МЧ методами множественных эмульсий В/М/В и В/М/М, наличие концевых карбоксильных групп у используемого для получения частиц сополимера обуславливает их отрицательный заряд, однако, полученная величина дзета-потенциала у МЧ, полученных по методу множественной дисперсии ТВ/М/В выше, чем у МЧ, полученных по методу множественных эмульсий В/М/В и В/М/М, но тоже находится на уровне значений известных из литературы для немодифицированных частиц в верхних значениях диапазона, что исключает влияние инкапсулированного РХ на заряд полученных МЧ (Таблица 10).

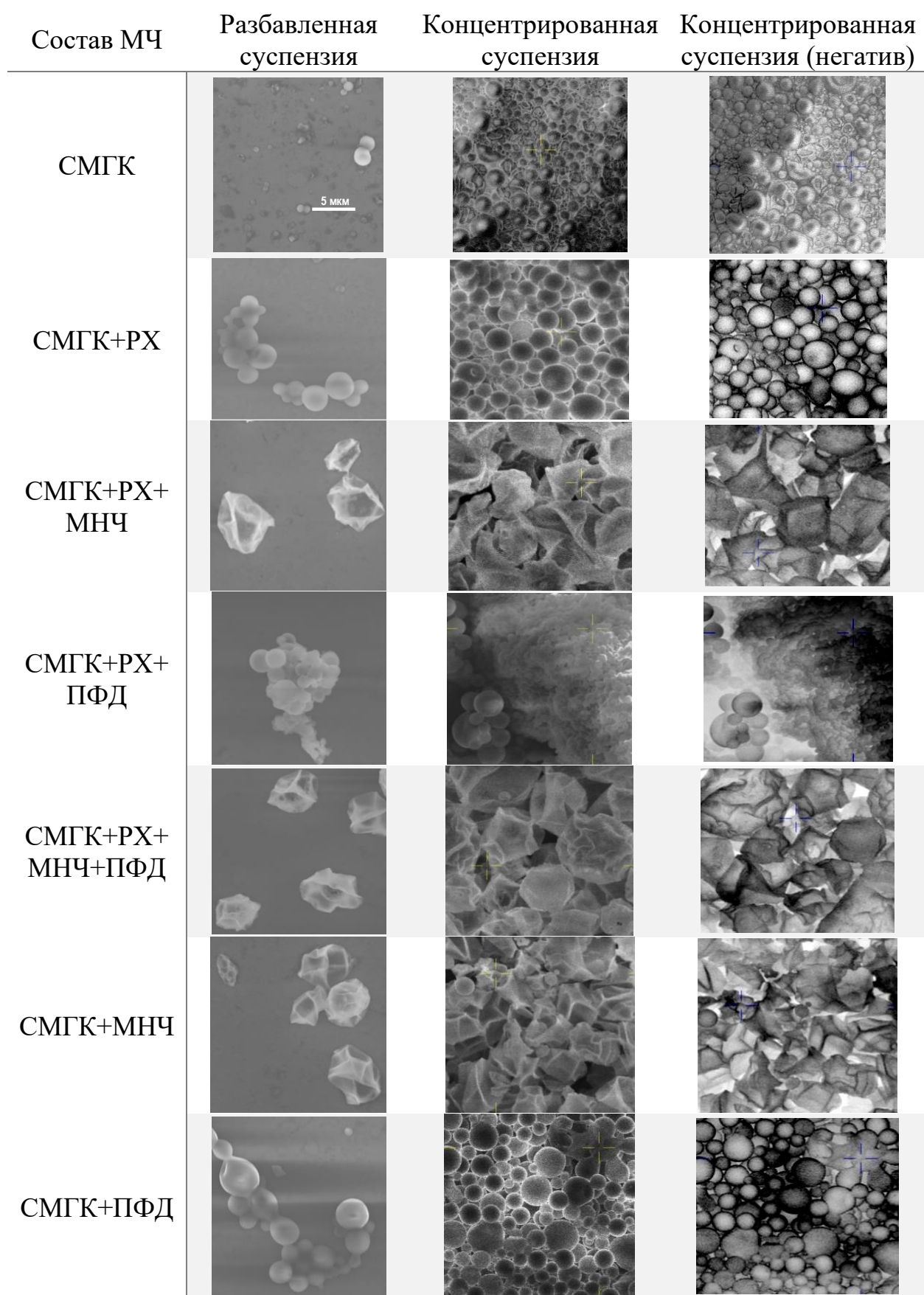


Рисунок 14 – РЭМ микрочастиц разного состава, полученных по методу множественной эмульсии ТВ/М/В. Масштабная метка общая для всех изображений

Включение РХ в МЧ, полученных по методу ТВ/М/В, составило около 10% от расчётного, на что в значительной степени повлияло добавление лецитина при образовании первичной дисперсии по методу получения МЧ ТВ/М/В для увеличения липофильности инкапсулированного вещества и его большему диспергированию в хлористом метиле. В противном случае, без добавления лецитина при получении первичной дисперсии ТВ/М, включение РХ в МЧ, согласно экспериментальным данным, не превышало 1%.

Таблица 10 – Характеристики микрочастиц с Радахлорином, изготовленных по методу твердое/в масле/в воде

Состав МЧ	Гидродинамический радиус МЧ, мкм ( $\bar{R} \pm \sigma_R$ )	Коэффициент полидисперсности МЧ ( $\sigma_R^2/\bar{R}^2$ )*	Дзета потенциал МЧ, мВ	Содержание РХ в МЧ, мкг/мг	Включение РХ в МЧ**, %
СМГК	0,270 ± 0,143	0,280	-16,6 ± 2,0	-	-
СМГК+РХ	0,112 ± 0,018	0,027	-19,5 ± 4,5	0,27 ± 0,11	6,6 ± 2,7
СМГК+РХ+МНЧ	0,240 ± 0,045	0,035	-23,6 ± 6,8	2,34 ± 0,78	60,6 ± 20,1
СМГК+РХ+ПФД	0,138 ± 0,054	0,150	-18,7 ± 0,4	0,27 ± 0,20	16,9 ± 12,3
СМГК+РХ+МНЧ+ПФД	0,318 ± 0,150	0,224	-19,6 ± 1,8	1,16 ± 0,59	72,3 ± 36,8
СМГК+МНЧ	0,315 ± 0,092	0,086	-17,6 ± 2,0	-	-
СМГК+ПФД	0,378 ± 0,129	0,116	-16,0 ± 1,1	-	-

Примечание – \* – рассчитан по приведенным результатам измерения размеров частиц. \*\* – доля от теоретического содержания РХ в МЧ при условии его полного включения.

Стоит так же отметить, что в случае добавления лецитина в большем соотношении, чем в выбранном соотношении к полимеру 1:25, содержание РХ в МЧ значительно уменьшается (Рисунок 15).

Невыраженность пиков по отношению к стандартному раствору указывает на низкое содержание РХ в МЧ с включением лецитина при приготовлении первичной дисперсии более, чем 4%. Это может быть связано со свойствами лецитина к иницированию образования обратных мицелл масло в воде, и дальнейшим их вымыванием через поры на поверхности МЧ в результате отмывки, в то время как такое количество лецитина, как менее 1% не является достаточным для полного растворения РХ и образования обратных мицелл, но в значительной мере способствует диспергированию лиофилизата РХ в хлористом метиле и, соответственно, более плотной фиксации его в полимерной матрице по мере диффузии растворителя.

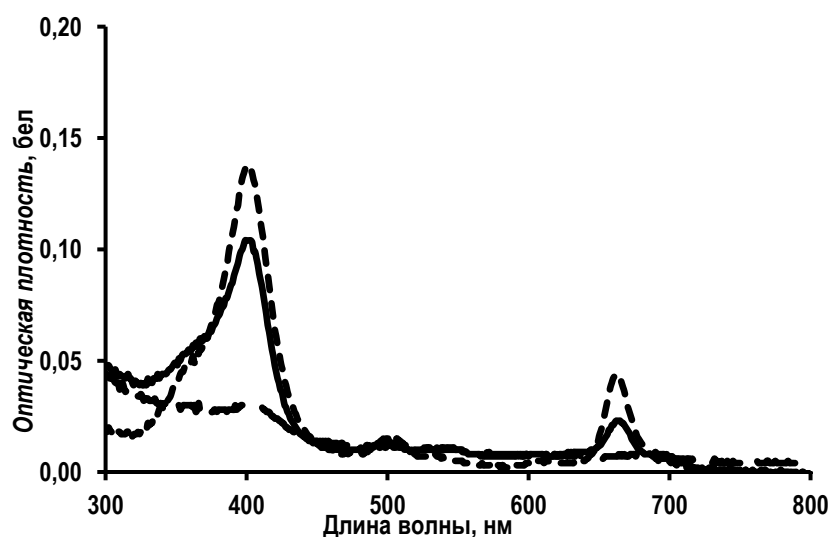


Рисунок 15 – Спектры поглощения ----- РХ, ——— МЧ с РХ с включением лецитина до 1%, — — — МЧ с РХ с включением лецитина до 4% в ацетонитриле.

Примечание – Измерения спектра поглощения образцов с МЧ в ацетонитриле проводилось после полного растворения МЧ

Присутствие в полимерной матрице МЧ МНЧ в значительной степени увеличивает включение РХ (Рисунок 16), что может быть связано как с изменением структуры поверхности МЧ, так и концентрированием внутреннего раствора, более интенсивной диффузией и испарением растворителя, в результате чего фиксация РХ в полимерной матрице происходит более плотным слоем.

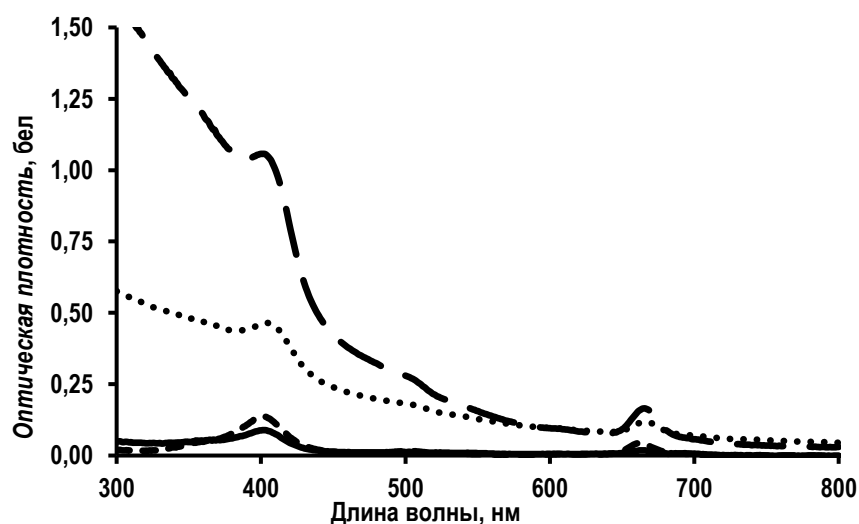


Рисунок 16 – Спектры поглощения ----- РХ, — МЧ с РХ и ПФД, — — МЧ с МНЧ, ..... МЧ с ПФД и МНЧ в ацетонитриле.

Примечание – Измерения спектра поглощения образцов с МЧ в ацетонитриле проводилось после полного растворения МЧ

### Выводы к главе 3

В результате проведенных исследований определена прямая зависимость между разницей в морфологии и структуре полученных МЧ и используемых методах для их получения.

Выбор метода получения множественной эмульсии В/М/В, ввиду низкого содержания инкапсулированного ДВ в результате незначительной растворимости хлористого метилена в воде и частичным вымыванием не зафиксированного в полимерной матрице РХ в виде водных капель через пористую поверхность МЧ, не рационален [145], однако привлекательность его использования заключается в возможности включения в полимерную матрицу МЧ дополнительных компонентов в виде суспензии гидрофобных МНЧ, стабилизированных олеиновой кислотой в хлороформе, и ПФД, что не является возможным при использовании метода получения МЧ через множественную эмульсию В/М/М [146].

МЧ, полученные через метод множественной эмульсии В/М/М, как и в случае метода множественной эмульсии В/М/В, имеют сферическую форму и размер до 10 мкм. Содержание РХ в таких МЧ составляет не менее 10% от теоретически возможного за счет свободно смешивающегося с водой ацетонитрила, высокой

дисперсностью осадка РХ в первичной дисперсной системе, и дополнительной агрегации частиц осадка РХ в момент испарения растворителя при дальнейшем созревании МЧ, что характеризует такие частицы как возможные терапевтические агенты для ФДТ [145].

Разработка метода получения МЧ через множественную дисперсию ТВ/М/В позволила получить МЧ субмикронного размера с включением в полимерную матрицу дополнительных компонентов. Изменения структурной формы МЧ напрямую связано с добавлением МНЧ, в результате чего на поверхности МЧ появляются складки ввиду разницы концентраций растворов двух фаз и интенсивной диффузии растворителя через мембрану. Подобное явление так же способствует увеличению включения РХ за счет более плотной его фиксации в полимерной матрице [146]. Однако, содержание РХ в МЧ без МНЧ, полученных по методу множественной дисперсии ТВ/М/В, оставалось на уровне менее 1%, как и в случае метода множественной эмульсии В/М/В. Добавление лецитина как дополнительного липофильного компонента при получении первичной дисперсии позволило увеличить содержание инкапсулированного вещества до 10% за счет лучшего диспергирования лиофилизата РХ в хлористом метиле и дополнительной агрегации частиц РХ при испарении растворителя.

Таким образом, результаты исследования морфологии и структуры МЧ показали, что дальнейшие эксперименты сравнения рационально проводить между МЧ, полученными по методам множественной эмульсии В/М/М и множественной дисперсии ТВ/М/В, с содержанием инкапсулированного ФС не менее 10%.

## Глава 4. Оценка фотодинамических свойств полученных микрочастиц

### 4.1. Оценка фотодинамических свойств микрочастиц, полученных по методу вода/в масле/в масле

Спектрофотометрический анализ содержания инкапсулированного РХ в водной суспензии МЧ и раствора этих частиц в ацетонитриле показал наличие характерных для РХ длинноволнового и коротковолнового пиков, что указывает на сохранение инкапсулированным ФС исходных оптических свойств, важных для ФДТ [147].

Невыраженность пиков отражает низкое содержание РХ в МЧ, однако такое содержание оказывается достаточным для генерации синглетного кислорода (Рисунок 18). Способность МЧ к образованию синглетного кислорода оценивали с помощью спектрофотометрических методов при облучении водной суспензии МЧ красным СИД с излучением в области длинноволновой полосы (660 нм) поглощения РХ в присутствии ДФБФ в качестве индикатора.

Кислород в синглетном состоянии обладает на порядок большей окислительной способностью и является более сильным электрофилом, чем триплетный. Возбуждённый кислород быстро реагирует с ненасыщенными углерод-углеродными связями, нуклеофилами (сульфиды и амины), а также с анионами.

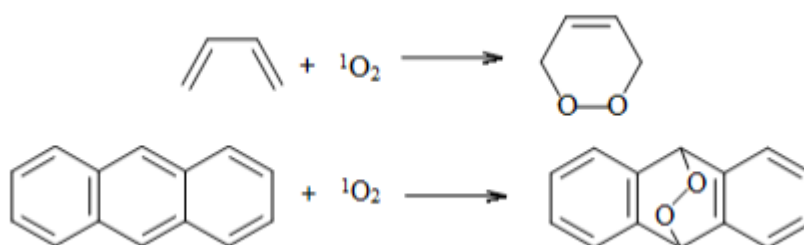
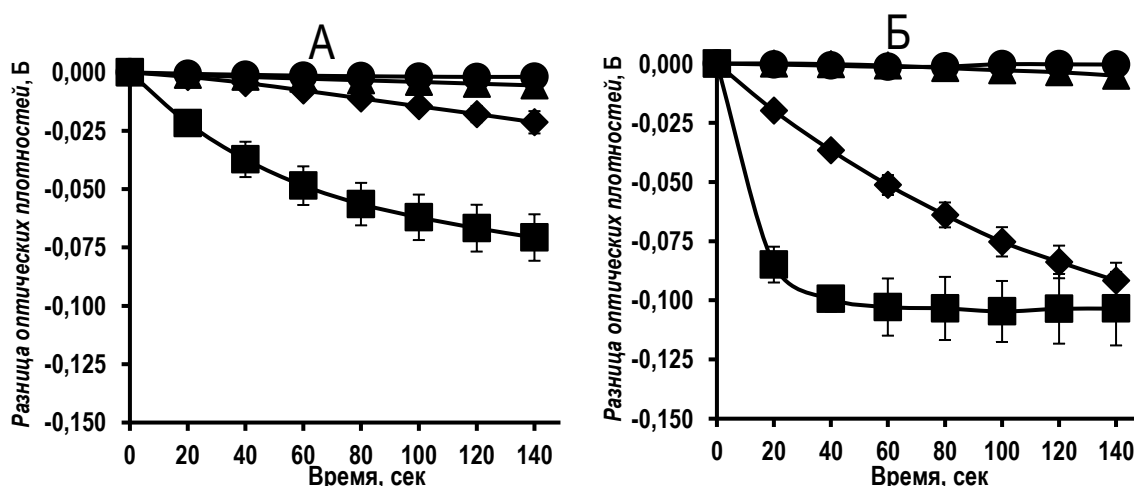


Рисунок 17 – Схема взаимодействия синглетного кислорода с цис-1,3-диеновыми системами

Одна из реакций синглетного кислорода с системами, содержащими ненасыщенные связи углерод-углерод, это 1,4-присоединение ([4+2] циклоприсоединение) к цис-диенам или ароматическим углеводородам с образованием циклических пероксидов (эндопероксидов) (Рисунок 17).

Таким образом, ДФБФ при взаимодействии с синглетным кислородом превращается в эндоперекись, не поглощающую при длине волны 415 нм. Оптическую плотность суспензии МЧ измеряли до и после облучения в полосе поглощения ДФБФ, и разницу в плотностях оценивали в виде графика кинетической зависимости оптической плотности ко времени облучения суспензии. Убыль оптической плотности использовали в качестве характеристики интенсивности образования синглетного кислорода.



По оси ординат отложено изменение оптической плотности при 415 нм в зависимости от продолжительности облучения при наличии в среде:

ДФБФ без добавок (●), ДФБФ и РХ (■),

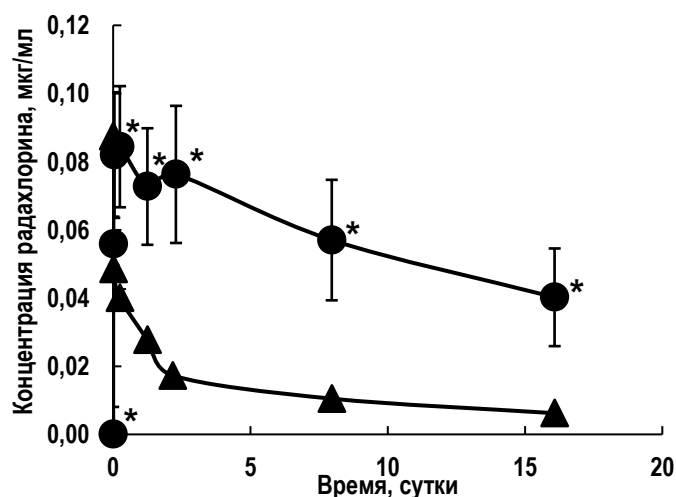
ДФБФ и МЧ с РХ, полученных по методике В/М/М (▲)

Рисунок 18 – Образование синглетного кислорода в водной среде (А) и ацетонитриле (Б) при облучении светом красного светодиода с  $\lambda_{\text{max}}=660$  нм

По приведенным графикам можно отметить, что наблюдаемая скорость образования синглетного кислорода в присутствии МЧ в водной среде существенно ниже, чем при разрушении МЧ в ацетонитриле, что указывает на прямую зависимость образования синглетного кислорода от постепенного выхода РХ в окружающую среду.

Известно, что такой фармацевтический фактор как технология получения, оказывает влияние на скорость высвобождения ДВ, что определяет интенсивность абсорбции ФС и, как следствие, терапевтическую активность ЛП. В связи с этим был изучен профиль высвобождения инкапсулированного ДВ из полимерной матрицы МЧ.

Профиль высвобождения РХ оценивался с помощью метода флуориметрического анализа с использованием планшетного считывателя в 96 луночных планшетах. Пробы были взяты в первый, 3, 6 ч; на первые, 3, 7, 14, 21 и 30 сут. Флуоресценция возбуждалась на длине волны  $\lambda_{\text{возб}}=401$  нм и регистрировалась на длине волны  $\lambda_{\text{изл}}=660$  нм.



Исходная концентрация радахлорина в растворе без частиц 0,0875 мкг/мл.

\*—  $p < 0,05$  для отличий от пробы только с радахлорином

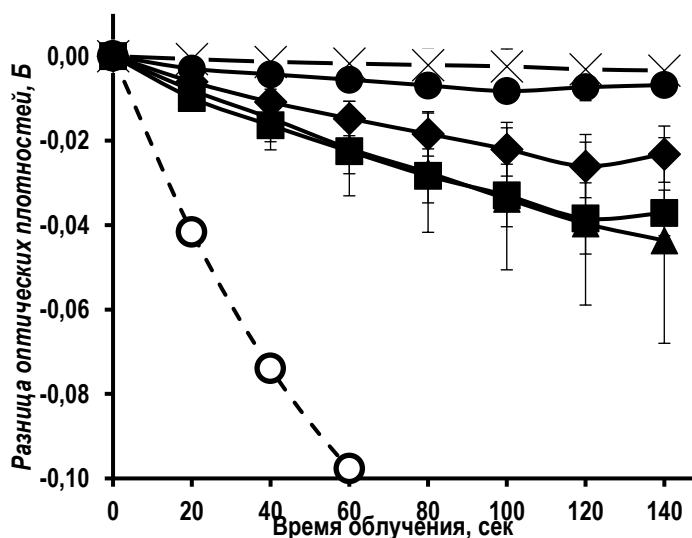
Рисунок 19 – Высвобождение РХ из МЧ, полученных методом множественной эмульсии В/М/М (●), в сравнении с изменением концентрации свободного РХ (▲) в 50 мМ калий фосфатном буфере с рН 7,4

Согласно полученным данным (Рисунок 19), в водной суспензии МЧ в течение первого часа достигается достаточно близкая к максимальной концентрация РХ, которая затем медленно снижается в течение периода более двух недель. В тех же условиях концентрация РХ в калибровочном растворе без частиц убывает существенно быстрее и уже через сутки оказывается достоверно ниже, чем в суспензии, а через несколько суток и вовсе становится ниже 10% от исходной. При этом в суспензии МЧ концентрация РХ убывает до половины от максимальной только через две недели.

Описанная кинетика высвобождения позволяет охарактеризовать такие МЧ как депо с пролонгированным высвобождением РХ, пригодное для поведения нескольких последовательных сеансов ФДТ без повторной инъекции ФС.

#### 4.2. Оценка фотодинамических свойств микрочастиц, полученных по технологии твердое/в масле/в воде

Способность МЧ, полученных с помощью метода множественной дисперсии ТВ/М/В, к генерации синглетного кислорода так же оценивали спектрофотометрически при облучении водной суспензии МЧ красным СИД с излучением в области длинноволновой полосы поглощения РХ. Результаты показали, что кинетика убывания оптической плотности в водной суспензии МЧ с РХ без прочих добавок относительно равная с кинетикой у МЧ, полученных по методу множественной эмульсии В/М/М (Рисунок 20).



--○-- – РХ, × – МЧ (СМГК), ● – МЧ (СМКГ+РХ), ◆ – МЧ (СМГК+РХ+ПФД), ■ – МЧ (СМГК+РХ+МНЧ), ▲ – МЧ (СМГК+РХ+ПФД+МНЧ)

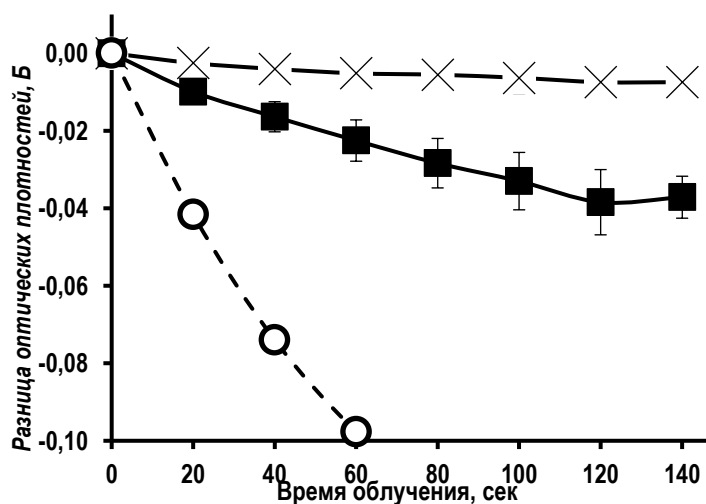
Рисунок 20 – Образование синглетного кислорода МЧ, полученными по методу множественной дисперсии ТВ/М/В и РХ в 50 мМ калий-фосфатном буфере с рН 7,4 при облучении СИД с  $\lambda_{\text{max}}=660$  нм

Однако, присутствие в полимерной матрице МЧ, полученных по методу множественной дисперсии ТВ/М/В, дополнительных компонентов в виде ПФД и

покрытых олеиновой кислотой МНЧ в значительной степени увеличивает генерацию синглетного кислорода такими МЧ по отношению к МЧ без добавок.

Результат интенсификации образования синглетного кислорода у МЧ с включением ПФД может быть связан с повышенным общим содержанием кислорода в дисперсии, из-за его большей растворимости в перфторуглеродах.

Перфторуглероды химически инертны в биологических системах и имеют коэффициент растворимости кислорода приблизительно 40-56 мл кислорода на 100 мл, то есть растворение в них кислорода примерно в 20 раз больше по отношению к воде или плазме. Многие перфторуглероды относительно нетоксичны и, благодаря их высокой кислородопереносимости, их используют в качестве искусственного кровезаменителя, а также в качестве кислородоносителя для улучшения тканевой оксигенации и повышения эффективности ФС при ФДТ [148].



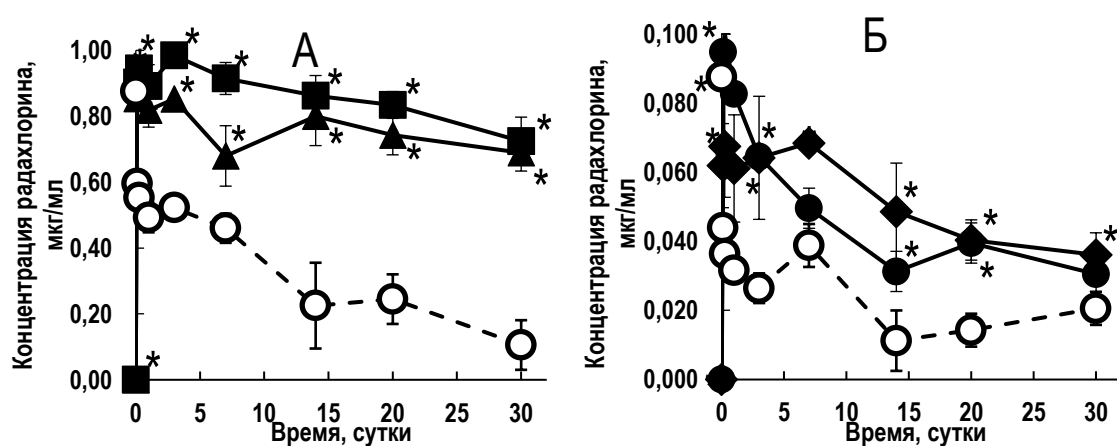
—○— — РХ, × — МЧ (СМГК+МНЧ), ■ — МЧ (СМГК+РХ+МНЧ)

Рисунок 21 – Образование синглетного кислорода МЧ, полученными по методу множественной дисперсии ТВ/М/В и РХ в 50 мМ калий-фосфатном буфере с рН 7,4 при облучении СИД с  $\lambda_{\max}=660$  нм

Также, стоит обратить внимание на значительное увеличение образования синглетного кислорода у МЧ с включенными в их состав МНЧ по отношению к МЧ без добавок. Проведенный дополнительный эксперимент исключил возможное влияние МНЧ на генерацию синглетного кислорода (Рисунок 21), в результате чего можно утверждать, что интенсификация образования синглетного кислорода в присутствии МНЧ может быть объяснена выявленным ранее увеличением

содержания инкапсулированного РХ в результате измененной морфологической структуры МЧ и интенсивной диффузии растворителя через мембрану при получении вторичной дисперсии.

Эффективность включения МНЧ в полимерную матрицу МЧ оценивалась с помощью измерителя магнитной восприимчивости [149], предназначенного для измерения магнитных свойств различных физических и биологических объектов, а также регистрации различных магнитных маркеров. «Измеряемый образец находится в зоне действия магнитного поля, создаваемого индуктивным блоком. Индуктивный блок подключен к выходам генераторов возбуждающего и модулирующего сигналов. С выходом индуктивного блока соединен фильтр, настроенный на пропускание частоты, которая представляет собой линейную комбинацию частот возбуждающего и модулирующего сигналов. Технический результат состоит в повышении отношения сигнал/шум, увеличении чувствительности устройства, повышении функциональной гибкости устройства и расширении диапазона его применения». У МЧ, полученных по методу множественной дисперсии ТВ/М/В, эффективность включения МНЧ составила около 10% и 23% в присутствии ПФД и без него, соответственно.



А) --○-- - РХ (0,875 мкг/мл), ▲ - МЧ (СМГК+РХ+ПФД+МНЧ), ■ - МЧ (СМГК+РХ+МНЧ); Б) --○-- - РХ (0,0875 мкг/мл), ● - МЧ (СМГК+РХ), ◆ - МЧ (СМГК+РХ+ПФД)

\*- $p < 0,05$  для отличий от пробы только с радахлорином

Рисунок 22 – Высвобождение РХ из МЧ, полученных по методу множественной дисперсии ТВ/М/В

Результаты эксперимента по высвобождению РХ из МЧ, полученных по методу множественной дисперсии ТВ/М/В согласуются с результатами эксперимента по высвобождению РХ из МЧ, полученных по методу множественной эмульсии В/М/М с достижением близкой к максимальной концентрации РХ в течение первого часа в водной суспензии с постепенным ее снижением в течение периода более двух недель (Рисунок 22 А, Б).

В растворе РХ без частиц, содержание РХ убывает значительно быстрее по отношению с суспензией МЧ, и через сутки оказывается на уровне концентрации высвободившегося РХ из МЧ в течение двух недель. Такое постепенное высвобождение РХ из МЧ можно оценивать в качестве положительного фактора для создания ЛФ с пролонгированным высвобождением инкапсулированного ДВ. Стоит так же отметить, что концентрация РХ в суспензии МЧ без МНЧ 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. Подобную тенденцию можно расценивать как положительную как в вопросе пролонгированного высвобождения, так и в случае контролируемого высвобождения. Присутствие МНЧ в полимерной матрице МЧ может спровоцировать резкий выброс инкапсулированного ДВ при условии местного воздействия (нагрева) на очаг поражения с помощью магнитного поля [6].

#### Выводы к главе 4

Результаты проведенных исследований показали, что МЧ, полученные по методу множественной эмульсии В/М/М [145] и МЧ, полученные по методу множественной дисперсии ТВ/М/В [146], способны к генерации синглетного кислорода, что дает возможность их оценке в качестве терапевтического агента для ФДТ.

Также стоит отметить, что в случае МЧ, полученных по методу множественной дисперсии ТВ/М/В, присутствие в полимерной матрице ПФД и МНЧ в значительной степени увеличивает образование синглетного кислорода [146], что

может быть связано с увеличением общего количества растворенного кислорода в суспензии МЧ с ПФД из-за его большей растворимости в перфторуглеродах, и увеличением содержания инкапсулированного РХ в результате измененной морфологической структуры МЧ в присутствии МНЧ.

Постепенное равномерное высвобождение РХ из МЧ в течение двух недель по отношению к свободному РХ, чья концентрация в значительной степени убывает в течение 24 ч, позволяет рассматривать МЧ, полученные обоими методами в качестве систем доставки ДВ с пролонгированным высвобождением, а присутствие дополнительных компонентов в виде ПФД и МНЧ в составе МЧ увеличивает вариативные возможности их использования.

## Глава 5. Оценка цитотоксических свойств

### 5.1. Оценка цитотоксических свойств микрочастиц, полученных по методу вода/в масле/в масле

Одним из главных факторов, определяющих полученные МЧ как терапевтические агенты для ФДТ, является их способность к цитотоксичности. Согласно полученным данным по приведенным выше экспериментам, размер МЧ, полученных по методу множественной эмульсии В/М/М, составил от 1 до 10 мкм. Такой размер МЧ, вместе с их отрицательным зарядом, располагает к поглощению частиц клетками, в основном, по типу фагоцитоза. Созревание эндосом в таком случае включает их слияние с лизосомами и сопровождается закислением внутренней среды до рН 4,5. При таком рН несущественно ускоряется разрушение МЧ из СМКГ [150], но значительно снижается растворимость РХ в воде и повышается его липофильность [151]. Этот фактор, в сочетании с ограниченным экзоцитозом содержимого эндосом после слияния с лизосомами, является предпосылкой для надёжного удержания высвобождающегося РХ в клетках опухоли.

Внутриклеточное расположение МЧ, полученных по методу множественной эмульсии В/М/М, наблюдалось по результатам проведенных исследований с использованием световой (Рисунок 23) и конфокальной (Рисунок 24) микроскопии трех линий клеток В16 (клетки меланомы), СНО (клетки яичника китайского хомячка) и MCF-7 (клетки аденокарциномы молочной железы).

На изображениях световой микроскопии (Рисунок 23), полученных через сутки после добавления МЧ, видно, что МЧ, полученные по методу множественной эмульсии В/М/М, поглощаются в культуре трансформированными клетками линий СНО, MCF-7 и В16 и накапливаются в центральной части клеток. При этом существенных изменений в плотности монослоя не происходит.

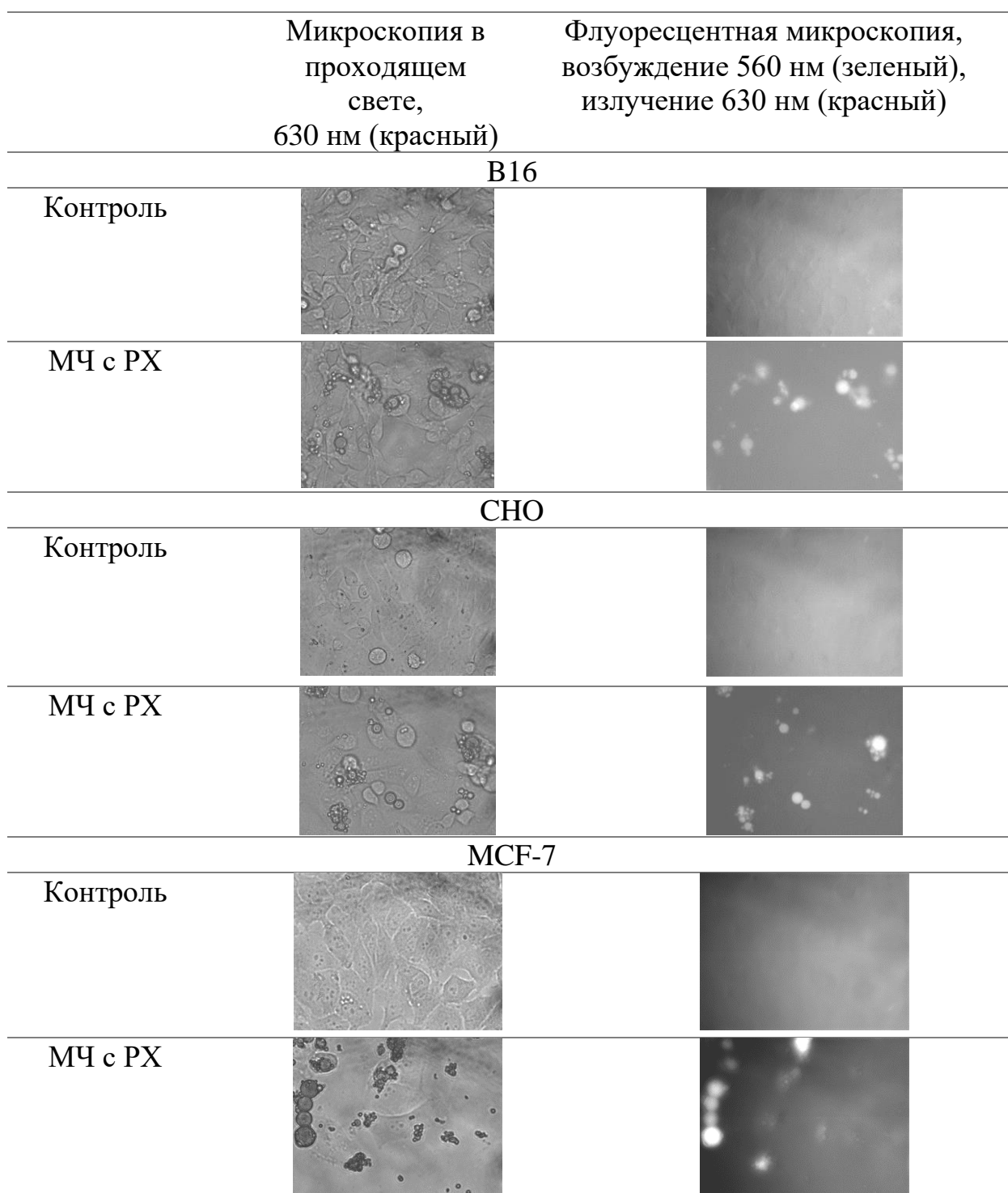


Рисунок 23 – Световая микроскопия монослоев клеток через 1 сутки после инкубации с содержащими РХ МЧ, приготовленными по методу множественной эмульсии В/М/М

Результаты конфокальной микроскопии (Рисунок 24) также показали внутриклеточное положение МЧ в каждой из трех линий клеток.

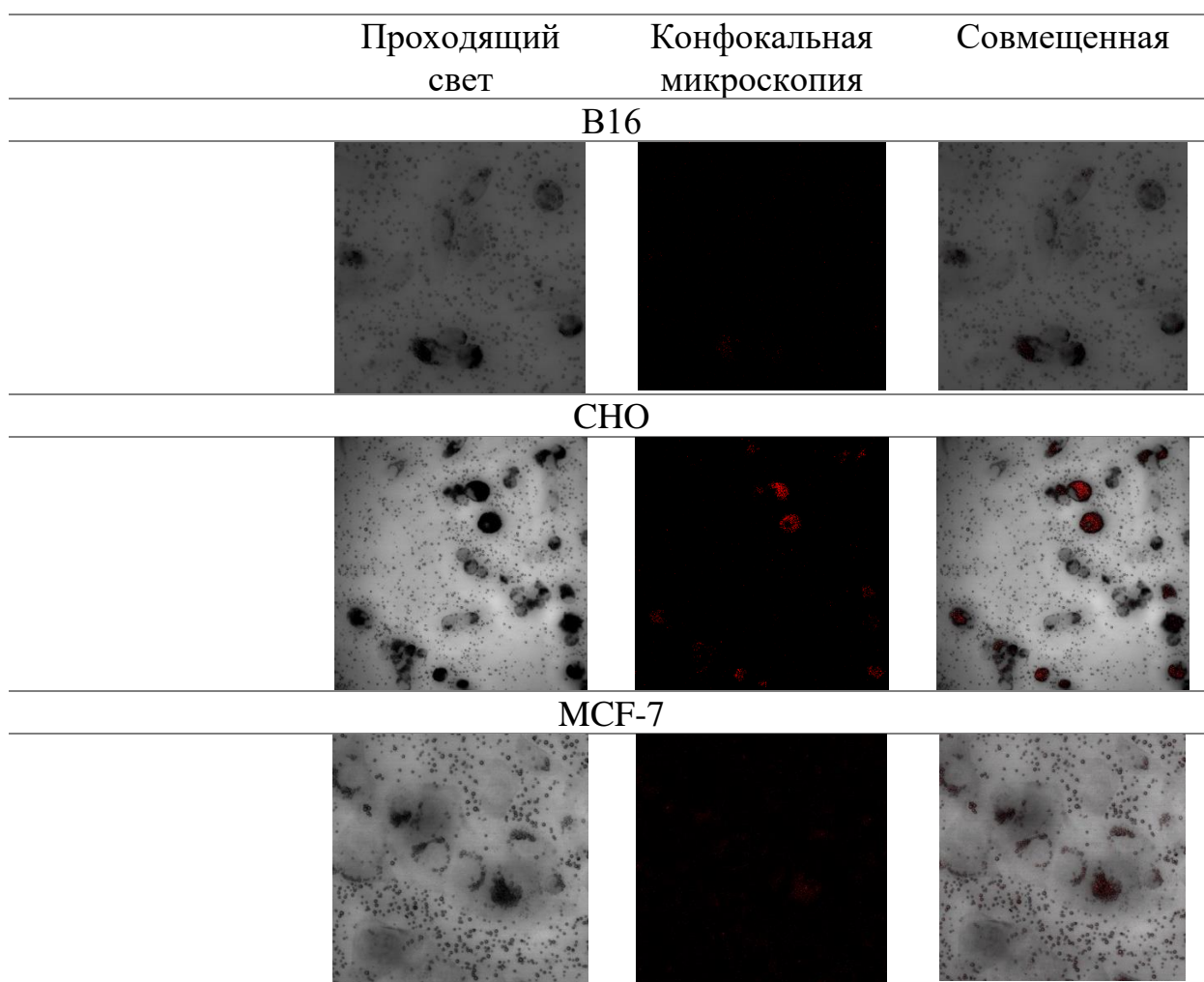


Рисунок 24 – Конфокальная микроскопия монослоев клеток через 1 сут после инкубации с содержащими РХ МЧ, приготовленными по методу множественной эмульсии В/М/М

Однако, стоит отметить, что у клеточной линии яичников китайского хомячка (СНО) поглотительная способность по отношению к МЧ несколько выше, чем у клеток меланомы мыши и аденокарциномы молочных желез человека, в результате разницы в скорости и способности захвата МЧ, динамике внутриклеточного движения. Недавние исследования показали, что основное поглощение полимерных МЧ клетками СНО происходит в течение 12 ч, и к 24 ч достигает уровня плато, в то время как у клеток V16 линейное увеличение внутриклеточной концентрации МЧ продолжается до 48 ч [152].

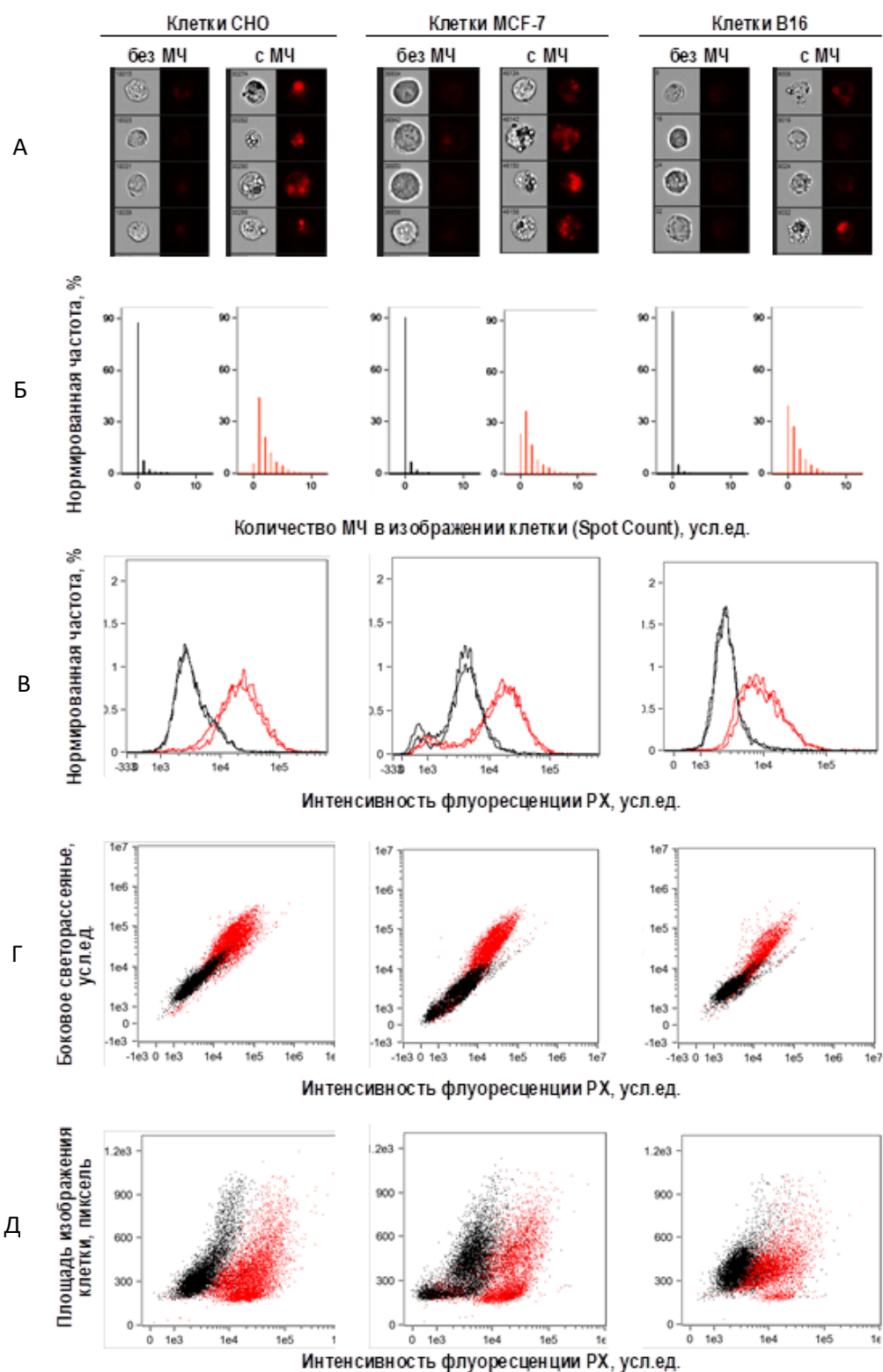
Проточная цитометрия, после перевода клеток в суспензию и их отмывки, также охарактеризовала положение МЧ как внутриклеточное (Рисунок 25). На

микрофотографиях визуализирующей проточной цитометрии (Рисунок 25 А) видно расположение МЧ внутри контура клетки.

Определение показателя поглощения МЧ в результате поглощения клетками количества объектов с флуоресценцией РХ (spot count) на изображениях клеток [153] показывает, что после инкубации с МЧ на изображениях не менее 90% клеток СНО, 80% клеток МСF-7 и 60% клеток В16 обнаруживается до нескольких пятен, флуоресцирующих как МЧ (Рисунок 25 Б).

Результаты проточной цитофлуориметрии показали существенный сдвиг вправо распределения интенсивности флуоресценции РХ у клеток, инкубированных с МЧ, по сравнению с интактными клетками (Рисунок 25 В), что, в свою очередь, подтверждает связь МЧ с клетками. При этом на внутриклеточное нахождение МЧ указывает пропорциональный приросту флуоресценции РХ прирост бокового светорассеяния клеток после инкубации с МЧ (Рисунок 25 Г) в сочетании с несущественным изменением размера клеток (Рисунок 25 Д). Прирост бокового светорассеяния отражает увеличение содержания рассеивающих МЧ внутри клетки, а несущественное изменение размера клетки указывает на то, что размер поглощенных МЧ существенно меньше по отношению к ней.

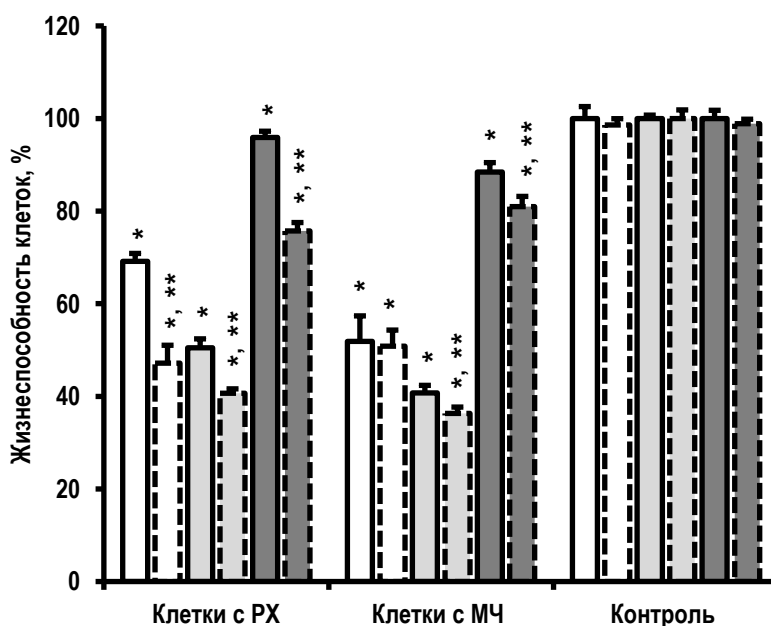
По результатам МТТ-теста, поглощение клетками в культуре МЧ, содержащих РХ, сопровождается снижением жизнеспособности таких клеток (Рисунок 26). Наблюдаемое угнетение метаболизма может быть связано как с цитотоксическим действием высвобождающегося внутри клеток РХ, так и с нарушением их структуры в результате поглощения МЧ [154]. Однако, стоит отметить, что сходные межлинейные соотношения выраженности изменений жизнеспособности клеток, вызванных МЧ с РХ, по отношению с чистым РХ, указывает на сходную природу повреждающего фактора в обоих случаях. Подобная схожесть указывает на ведущую роль высвобождения РХ из МЧ в имеющем место угнетении жизнеспособности клеток.



А – микроскопия проходящего света (слева) и флуоресцентная (справа); Б – Д – результаты проточной цитофлуориметрии (на диаграммах данные клеток после инкубации с МЧ красного цвета, а данные контрольных клеток черного цвета).

Рисунок 25 – Данные визуализирующей проточной цитометрии клеток через 1 сут после инкубации с содержащими РХ МЧ, полученными по методу множественной эмульсии В/М/М

Более того, воздействие на клетки красным светом в полосе поглощения РХ сопровождается дополнительным снижением жизнеспособности клеток, инкубированных с МЧ, и содержащими РХ (Рисунок 26).



□ – 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  
Рисунок 26 – Влияние РХ и содержащих РХ МЧ, полученных методом В/М/М, на жизнеспособность клеток и фотодинамическое действие на эти клетки светового облучения по результатам МТТ теста

Исходя из результатов МТТ-теста видно, что наблюдаемый фотодинамический эффект в присутствии МЧ носит достоверный характер у клеток линий MCF-7 и V16, но недостоверен у клеток линии CHO. Несмотря на то, что фотодинамический эффект чистого РХ выражен сильнее, его наличие в образцах с МЧ, содержащих РХ, указывает на возможность применения таких частиц в ФДТ.

## 5.2 Оценка цитотоксических свойств микрочастиц, полученных по методу твердое/в масле/в воде

Результаты проведенных исследований с использованием световой микроскопии так же, как и в случае с МЧ, полученными по технологии множественной эмульсии В/М/М, показали внутриклеточное расположение МЧ, изготовленных по технологии множественной дисперсии ТВ/М/В (Рисунок 27). Хорошо различимая флуоресценция таких МЧ на изображениях флуоресцентной микроскопии указывает на возможность использования частиц в качестве агентов для диагностики, посредством визуализации поглотивших их клеток.

Цитотоксичность МЧ, полученных по методу множественной дисперсии ТВ/М/В, как и в случае с МЧ, полученными по методу множественной эмульсии В/М/М, исследовали на клетках трех линий СНО (клетки яичников китайского хомячка), В16 (клетки меланомы мыши) и MCF-7 (клетки аденокарциномы человека). Однако, клеточная линия СНО по результатам прошедших испытаний показалась наиболее привлекательна для дальнейшей работы в результате высокого коэффициента поглощения МЧ по отношению к другим двум клеточным линиям.

Жизнеспособность клеток оценивали по клеточной линии СНО после воздействия МЧ и фотодинамического облучения светом СИД в течение 10 мин, и характеризовали отношением оптических плотностей в лунках с клетками, подвергшимися воздействию, и лунках с контрольными клетками той же линии к клеткам без каких-либо воздействий (100% жизнеспособность).

Наиболее значительное угнетение жизнедеятельности клеток из варианта МЧ, полученных по методу множественной дисперсии ТВ/М/В, заметно у МЧ, содержащих в полимерной матрице РХ и МНЧ (Рисунок 28).

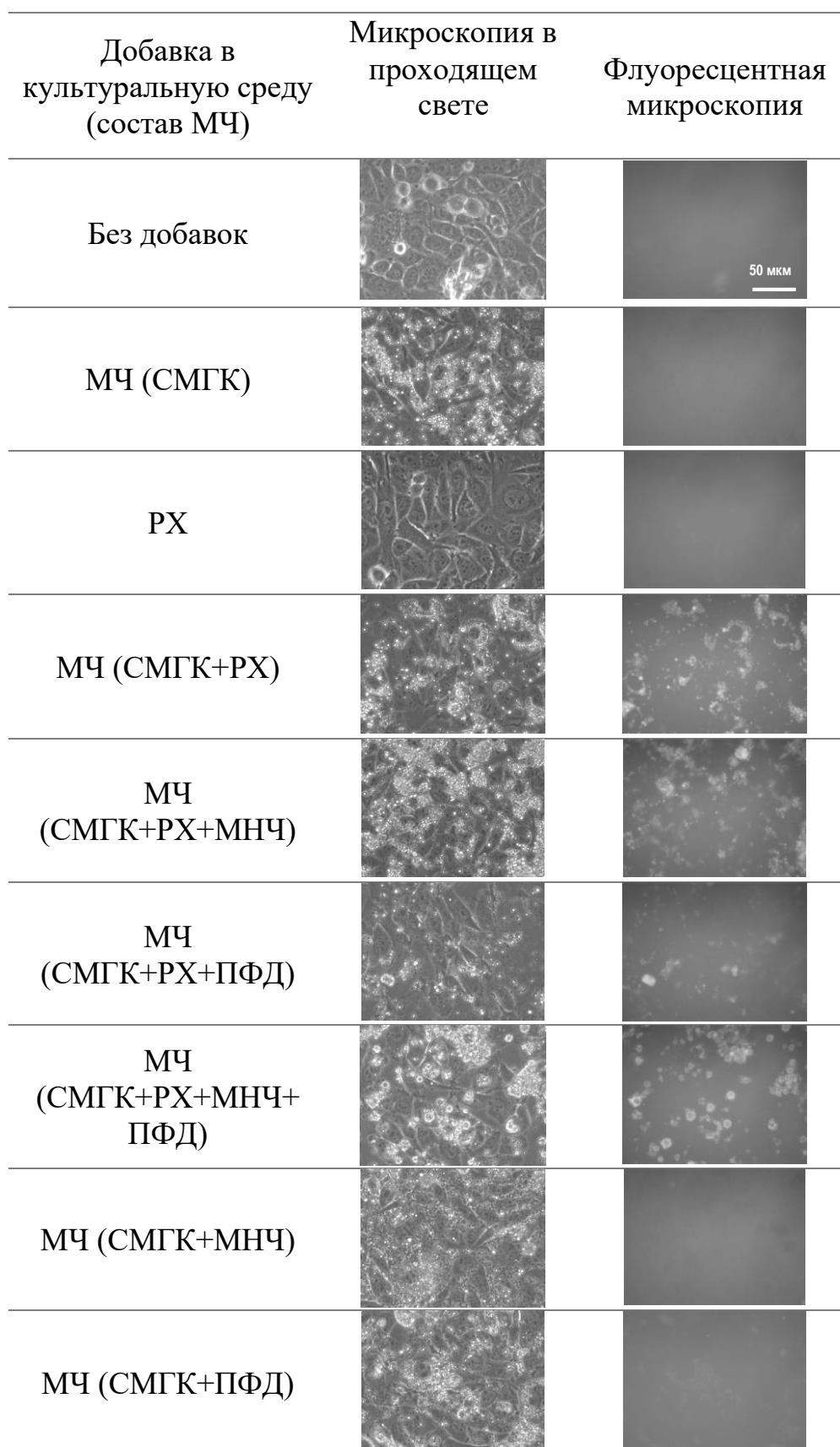
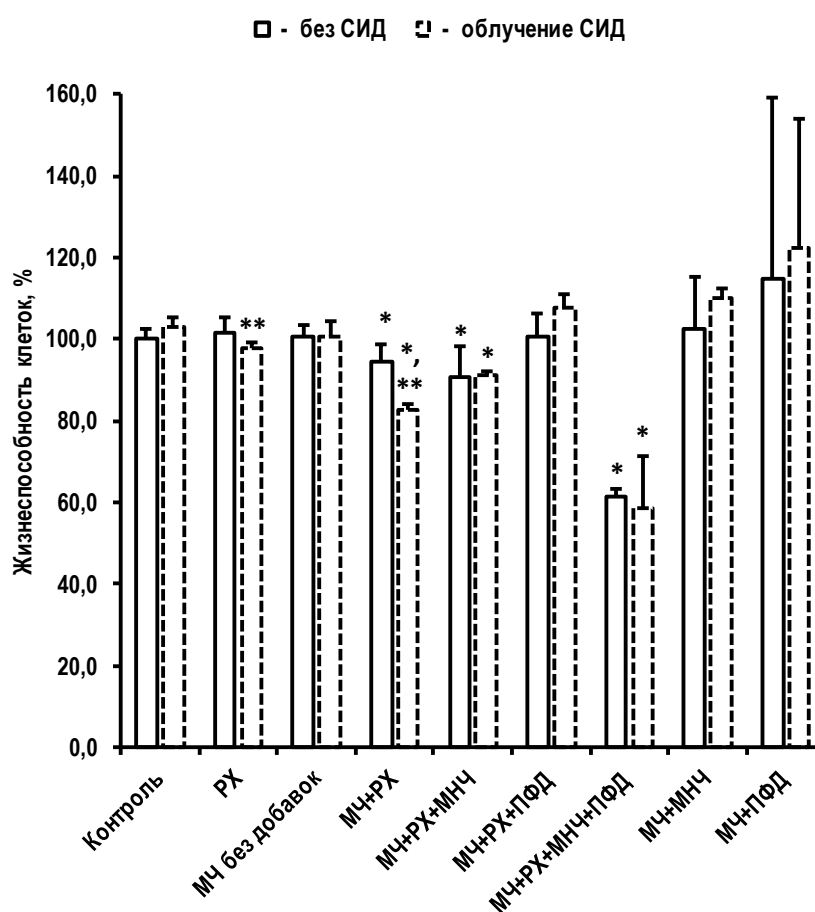


Рисунок 27 – Световая микроскопия монослая клеток СНО (клетки яичников сирийского хомячка) через 1 сут после инкубации с МЧ, полученными методом ТВ/М/В, разного состава. Масштабная метка общая для всех изображений

Однако, поскольку в отсутствие РХ, у МЧ, содержащих МНЧ, угнетающего действия не наблюдается, подобное угнетение жизнедеятельности клеток МЧ не может быть связано с особенностями морфологической структуры таких МЧ. Кроме того, предыдущие эксперименты по оценке способности МЧ к генерации активного кислорода так же не подтвердили теории о возможном влиянии МНЧ на его выработку в отсутствие ФС. Таким образом, подобное угнетение жизнедеятельности клеток МЧ, содержащими в полимерной матрице РХ и МНЧ, объясняется увеличением содержания РХ по отношению к частицам без добавок.



\* -  $p < 0,05$  для отличий от контроля без СИД и воздействия МЧ и РХ. \*\* -  $p < 0,05$  для отличий между облученными СИД клетками по отношению к клеткам без СИД после инкубации с определенным видом МЧ или РХ.

Рисунок 28 – Влияние РХ и содержащих РХ МЧ, полученные методом ТВ/М/В, на жизнеспособность клеток и фотодинамическое действие на эти клетки светового облучения СИД по результатам МТТ теста

В то же время, свободный РХ и МЧ, содержащие только РХ, обладают заметным фотодинамическим повреждающим действием по отношению к контрольной группе. Наличие ПФД в составе МЧ не сопровождается заметным

влиянием на особенности реакции поглотивших МЧ клеток и на фотодинамический эффект. Можно лишь отметить более сильное повреждающее действие МЧ, в которых одновременно присутствуют РХ, МНЧ и ПФД, вне зависимости от облучения клеток, что указывает на определяющий повреждающий фактор, связанный, в первую очередь, со структурными особенностями МЧ и присутствием в них дополнительных компонентов (Рисунок 28).

### Выводы к главе 5

Результаты испытания МЧ на цитотоксичность показали, что как МЧ, полученные как по методу множественной эмульсии В/М/М, так и МЧ, полученные по методу множественной дисперсии ТВ/М/В обладают выраженной цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам [145, 155].

Размер МЧ, полученных обоими методами, гарантирует внутриклеточное нахождение МЧ у всех трех исследованных клеточных линий СНО (клетки яичников китайского хомячка), В16 (клетки меланомы мыши) и MCF-7 (клетки аденокарциномы молочных желез человека), а структура поверхности МЧ не влияет на цитотоксичность, при этом существенных изменений в плотности монослоя у каждой из трех клеточных линий не происходит. Результаты световой и конфокальной микроскопии согласуются с результатами проточной цитофлуориметрии и более ранних исследований – поглотительная способность клеток СНО по отношению к полученным МЧ выше, чем у двух оставшихся линий [145].

Результаты МТТ-теста показывают цитотоксичность по отношению к клеткам всех трех линий у МЧ, полученных обоими методами [145, 155], более того, схожесть повреждающего фактора с подобным в случае свободного РХ указывает на связь угнетения жизнедеятельности клеток МЧ с высвобождающимся из них РХ, что позволяет рекомендовать такие МЧ в качестве терапевтических агентов для ФДТ.

У МЧ, полученных по методу множественной дисперсии ТВ/М/В, значительное угнетение клеточного метаболизма показано у МЧ с РХ, а также в присутствии МНЧ и МНЧ с ПФД [155], что указывает на перспективу направления модернизации МЧ с РХ, посредством добавления в полимерную матрицу дополнительных компонентов.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Общие 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 ДВ, 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 ДВ, но много зависит и от физико-химических свойств инкапсулированного ДВ, его растворения в воде и светочувствительности. Помимо профиля высвобождения, свойства матрицы и инкапсулированного в ней ДВ определяют и другие свойства МЧ, важные для повышения эффективности их накопления в опухоли, такие как рН и заряд поверхности.

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 МЧ, изготовленных методом множественной дисперсии ТВ/М/В, были включены такие дополнительные компоненты, как покрытые олеиновой кислотой гидрофобные МНЧ и ПФД. Приведено обоснование использованию метода получения МЧ через множественную дисперсию ТВ/М/В в качестве основного, в виду упрощенной технологии по отношению к методу получения МЧ через множественную эмульсию В/М/М и меньшего количества используемых в методе органических растворителей.

3. Изучены морфологические и физико-химические свойства 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 варьируется в МЧ разного типа от 10% до 60% в зависимости от состава. Показана зависимость увеличения процента включения действующего вещества 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. Оценена 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. Спецификация на полученные МЧ приведена в Приложении Б. Исходя из полученных научных результатов 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.

### Перспективы разработки темы исследования

Как один из потенциально возможных путей введения исследуемых МЧ в организм можно рассматривать парентеральный путь. Доказано, что основным механизмом поглощения клетками МЧ субмикронного размера с отрицательным зарядом является фагоцитоз. В таком случае созревание эндосом и их слияние с лизосомами сопровождается закислением внутренней среды до рН 4,5 что, в результате, приводит к значительному снижению растворимости РХ в воде и увеличению его липофильности. Подобный фактор, в сочетании с ограниченным экзоцитозом содержимого эндосом после слияния с лизосомами, является предпосылкой для надёжного удержания высвобождающегося РХ в клетках опухоли.

В таком случае, при введении суспензии лиофилизата в кровоток, накоплению МЧ в опухолях способствует наличие в стенках прилегающих сосудов особенностей, приводящих к более высокому удержанию в этих сосудах субмикронных частиц и их повышенным выходом в опухоль [156, 157, 158]. Однако, стоит отметить, что при внутрисосудистом введении, накопление полученных МЧ, вероятнее всего, будет главным образом происходить в печени, селезенке, легких и других органах с высоким содержанием клеток системы мононуклеарных фагоцитов [159, 160]. В таком случае процент выхода полученных МЧ из кровеносного русла в других местах будет невысоким. На практике недостаточная избирательность накопления в опухоли МЧ при их введении в кровеносное русло, преодолевается местным введением в опухоль таких МЧ [161, 162], либо с помощью артериальной эмболизации проблемной области [163]. В то же время, учитывая диаметр концевых артериол 1050 мкм и капилляров 810 мкм, для артериальной эмболизации считается целесообразным использовать МЧ диаметром не менее 40 мкм [164, 165], что не является возможным в случае МЧ субмикронного размера без дополнительных компонентов. Присутствие в полимерной матрице таких МЧ МНЧ позволит накапливать полученные МЧ в интересующих местах кровеносного русла за счет воздействия на них внешнего физического фактора в виде магнитного поля.

Более того, актуальность ЛФ пролонгированного действия в случае местного введения РХ в опухоль, подтверждается различными исследованиями положительного ответа на повторные сеансы ФДТ в случае частичной регрессии при кожных новообразованиях [166], где возможность повторного сеанса ФДТ без нового введения дозы ФС позволит избежать крайне болезненного и дискомфортного для пациента введения ФС.

Как видно из результатов исследования, присутствие восприимчивых к данному фактору МНЧ в полимерной матрице МЧ, также увеличивает включение в них ДВ до 60% и продолжительность его постепенного выхода в среду по отношению к простым МЧ с РХ, что позволяет рассматривать такие частицы в качестве фотодинамического средства пролонгированного действия. Использование подобных МЧ в качестве ЛС с контролируемым высвобождением можно встретить в различного рода исследованиях [167]. Одним из таких исследований является контролируемое высвобождение инкапсулированного в МЧ действующего вещества при условии местного воздействия (нагрева) на очаг поражения с помощью магнитного поля [168] в присутствии восприимчивых к нему НЧ.

Успешное применение ФТД с РХ для антибактериальной терапии в клинической практике и экспериментальные данные об эффективности антибактериальной ФДТ с использованием МЧ и НЧ позволяют также рассматривать возможность применения полученных в настоящей работе МЧ с включением РХ в составе местных антибактериальных фотодинамических средств пролонгированного действия. При длительном лечении хронических инфекционных процессов применение таких средств будет способствовать уменьшению частоты обработок инфицированных мест и практическому отсутствию системных побочных эффектов и, в отличие от антибиотиков, не будет сопровождаться угнетением «собственной» микрофлоры организма за пределами обрабатываемой области. При этом механизм антибактериального действия РХ, как и других ФС, при ФДТ не специфичен к виду патогенных микроорганизмов и

не предполагает появление у них устойчивости к данному виду антибактериальной терапии.

Основные работы в сфере разработки МЧ в качестве антибактериальных средств пролонгированного действия основываются на фотофизических свойствах таких МЧ и селективности по отношению к тканям-мишеням [169], а также целевую доставку МЧ, путем конъюгации с антителами, инженерного синтеза молекул с определенной структурой и даже путем присоединения к МНЧ [170]. Существует много примеров работ перспективных разработок полимерных МЧ с ФС в качестве антимикробных средств местного действия при нанесении на слизистую, к примеру, в стоматологии, при лечении периодонтита [171].

Исходя из проведенного литературного обзора и полученных экспериментальных данных можно утверждать, что перспективой дальнейшей разработки темы является выбор ЛФ и создание ЛП на основе полученных МЧ. Возможными направлениями разработки являются инъекционный ЛП для парентерального введения в полости в виде готового лиофилизата для приготовления раствора для инъекций 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 пред ФДТ для усиления фотодинамического эффекта.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

МЧ	-	микрочастицы
НЧ	-	наночастицы
ХТА	-	химико-терапевтический агент
ФС	-	фотосенсибилизатор
ФДТ	-	фотодинамическая терапия
ЛС	-	лекарственное средство
РХ	-	радахлорин
МНЧ	-	магнитные наночастицы
СМГК	-	сополимер молочной и гликолевой кислоты
В/М/В	-	метод множественной эмульсии вода/в масле/в воде
В/М/М	-	метод множественной эмульсии вода/в масле/в масле
ТВ/М/В	-	метод множественной дисперсии твердое/в масле/в воде
ДВ	-	действующее вещество
ЛФ	-	лекарственная форма
АФК	-	активная форма кислорода
АТФ	-	аденозинтрифосфат
АЛК	-	аминовуленовая кислота
МРТ	-	магнитно-резонансная томография
ПМК	-	поли-молочная кислота
АФС	-	активная фармацевтическая субстанция
ЛПНП	-	липопротеины низкой плотности
ЛП	-	лекарственный препарат
ПФД	-	перфтордекалин
ПВС	-	поливиниловый спирт
МЦ	-	метилцеллюлоза
РЭМ	-	растовая электронная микроскопия
ДРС	-	метод динамического рассеивания света

DMCO	- диметилсульфоксид
СИД	- свет излучающий диод
ДФБФ	- 1,3 – дифенилбензофуран
4T1	- модель раковой опухоли молочной железы
USP	- USA Pharmacopeia (Фармакопея Соединенных Штатов Америки)
Ph. Eur.	- Pharmacopeia of Europe (Европейская Фармакопея)
NF- $\kappa$ B	- нуклеарный фактор каппа В
5-ALA	- 5-аминовуленовая кислота
FDA	- US Food and Drug Administration (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов)
ДНК	- дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	- рибонуклеиновая кислота
ПЭГ	- полиэтиленгликоль
ACS	- American Chemical Society
BP	- British Pharmacopeia (Фармакопея Великобритании)
$\lambda$	- длина волны
СНО	- клетки яичников китайского хомячка
MCF-7	- клетки аденокарциномы молочной железы человека
B16	- клетки меланомы мыши

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. World Health Organization, Fact Sheets, Cancer: сайт. – URL: <https://www.who.int> (дата обращения: 01.09.2020). – Текст: электронный
2. McGuire S. World Cancer Report 2014. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, WHO Press, 2015 // *Advances in nutrition* (Bethesda, Md.) – 2016. – Vol. 7, № 2. – P. 418–419.
3. Филоненко Е.В, Серова Л.Г. Фотодинамическая терапия в клинической практике // *Biomedical Photonics*. – 2016. – Т. 5, № 2. – С. 26–37.
4. Кузнецова И.Г., Северин С.Е. Использование сополимера молочной и гликолевой кислот для получения наноразмерных лекарственных форм // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2013. – Т. 5, № 5. – С. 30–36.
5. В.Н. Никифоров. Биомедицинские применения магнитных наночастиц // *Наука и технологии в промышленности*. – 2011. – № 1. – С. 91–93.
6. Zheng Wang, Fan Zhang, Dan Shao. Janus Nanobullets Combine Photodynamic Therapy and Magnetic Hyperthermia to Potentiate Synergetic Anti-Metastatic Immunotherapy // *Advanced Science*. – 2019. – Vol. 6, № 22. – P. 1–10.
7. Singh R. Nanotechnology based therapeutic application in cancer diagnosis and therapy // *Biotech*. – 2019. – Vol. 9, № 11. – P. 415.
8. Странадко Е.Ф. Исторический очерк развития фотодинамической терапии // *Лазерная медицина*. – 2002. – Т.6, № 1. – С. 4–8.
9. Raab O. Ueber die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusoria // *Zeitschrift fuer Biologie*. – 1900. – Vol. 39. – P. 524–526.
10. Tappeiner H. Ueber die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von Raab // *Münchener Medizinische Wochenschrift*. – 1900. – Vol. 1. – P. 5–7.
11. Tappeiner H., Jesionek A. Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen // *H. Ibid*. – 1903. – Vol. 50. – P. 2042–2044.
12. Policard A. Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de Wood // *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales*. – 1924. – Vol. 91. – P. 1423–1424.

13. Lipson R.L., Baldes E.J., Olsen A.M. A further evaluation of the use of hematoporphyrin derivate as a new aid for endoscopic detection of malignant disease // *British Journal of Diseases of the Chest*. – 1964. – Vol. 46. – P. 676–679.
14. Lipson R.L., Pratt J.H., Baldes E.J. Dockerty M.B. Hematoporphyrin derivate for detection of cervical cancer // *Obstetrics & Gynecology*. – 1964. – Vol. 24. – P. 78–84.
15. Dougherty T.J., Kaufman J.E., Goldfarb A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors // *Cancer Research*. – 1978. – Vol. 38. – P. 2628–2635.
16. Agostinis P., Buytaert E., Breysens H., Hendrickx N. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2004. – Vol. 3. – P. 721–729.
17. Casas A., Di Venosa G., Hasan T., Al Batlle. Mechanisms of resistance to photodynamic therapy // *Current Medicinal Chemistry*. – 2011. – Vol. 18. – P. 2486–2515.
18. Abder-Kader, M. H. *Photodynamic Therapy* / Mahmoud H. Abdel-Kader. – Berlin, Heidelberg: Springer, 2014. – P. 3–22.
19. Gomer, C. J. *Photodynamic therapy. Methods and protocols* / Charles J. Gomer. – New York: Humana Press, 2010 – P. 299.
20. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2005. – Vol. 2, № 1. – P. 1–23.
21. Plaetzer K., Krammer B., Berlanda J., Berr F., Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects // *Lasers in Medical Science*. – 2008. – Vol. 24, № 2. – P. 259–268.
22. Толстых П.И., Клебанов Г.И., Шехтер А.Б., Толстых М.П., Тепляшин А.С. Антиоксиданты и лазерное излучение в терапии ран и трофических язв. – Москва: Издательский дом «Эко», 2002. – С. 238.
23. Gough M.J., Melcher A. A., Ahmed A. et al. Macrophages orchestrate the immune response to tumor cell death // *Cancer Research*. – 2001. – Vol. 61. – P. 7240–7247.

24. Reiter I., Krammer B., Schwamberger G. Gutting edge: differential effect of apoptotic versus necrotic tumor cell on macrophage antitumor activities // *Journal of Immunology*. – 1999. – Vol. 163. – P. 1730–1732.
25. Taylor A. E., Gibson W., Granger H.J., Guyton A.C. Review in lymphology. The interaction between intracapillary and tissue forces in the overall regulation of interstitial fluid volume // *Lymphology*. – 1973. – Vol. 6. – P. 192–208.
26. Siegel K.A., Fingar V.M., Wieman T.J. Mechanisms of tumor destruction using photofrin, HPPH and N. Peb. // *Photochemistry and Photobiology*. – 1993. – Vol. 57. – P. 20.
27. Pettigrew, C.A., Cotter, T.G. Deregulation of cell death (apoptosis): Implications for tumor development // *Discovery Medicine*. – 2009. – Vol. 8, № 41. – P. 61–63.
28. Rustin, P. Mitochondria, from cell death to proliferation // *Nature Genetics*. – 2002. – Vol. 30, № 4. – P. 352–353.
29. Perfettini, J.L., Kroemer, G. Caspase activation is not death // *Nature Immunology*. – 2003. – Vol. 4, № 4. – P. 308–310.
30. Gougeon, M.L., Kroemer, G. Charming to death: Caspase-dependent or independent? // *Cell Death & Differentiation*. – 2003. – Vol. 10, № 3. – P. 390–392.
31. Rathmell, J.C., Thompson, C.B. The central effectors of cell death in the immune system // *Annual Review of Immunology*. – 1999. – Vol. 17. – P. 781–828.
32. Savill, J., Fadok, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death // *Nature*. – 2000. – Vol. 407, № 6805. – P. 784–788.
33. Igney, F.H., Krammer, P.H. Immune escape of tumors: Apoptosis resistance and tumor counterattack // *Journal of Leukocyte Biology*. – 2002. – Vol. 71, № 6. – P. 907–920.
34. Igney, F.H., Krammer, P.H. Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis // *Nature Reviews Cancer*. – 2002. – Vol. 2, № 4. – P. 277–288.
35. Oleinick, N.L.; Morris, R.L.; Belichenko, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: What, where, why, and how // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2002. – Vol. 1, № 1. – P. 1–21.

36. Renno, R.Z., Delori, F.C., Holzer, R.A., Gragoudas, E.S., Miller, J.W. Photodynamic therapy using Lu-Tex induces apoptosis in vitro, and its effect is potentiated by angiostatin in retinal capillary endothelial cells // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2000. – Vol. 41, № 12. – P. 3963–3971.
37. Shinoda Y., Kato D., Ando R., et al. Systematic Review and Meta-Analysis of In Vitro Anti-Human Cancer Experiments Investigating the Use of 5-Aminolevulinic Acid (5-ALA) for Photodynamic Therapy // *Pharmaceuticals (Basel)*. – 2021. – Vol. 14, № 3. – P. 229.
39. Martinou, J. C., Desagher, S., Antonsson, B. Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing // *Nature Cell Biology*. – 2000. – Vol. 2, № 3. – P. E41–E43.
40. Chiu, S., Oleinick N.L. Dissociation of mitochondrial depolarisation from cytochrome c release during apoptosis induced by photodynamic therapy // *British Journal of Cancer*. – 2001. – Vol. 84, № 8. – P. 1099–1106.
41. Varnes, M. E., Chiu, S. M., Xue, L. Y., Oleinick, N. L. Photodynamic therapy-induced apoptosis in lymphoma cells: Translocation of cytochrome c causes inhibition of respiration as well as caspase activation // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1999. – Vol. 255, № 3. – P. 673–679.
42. Gosh, S., May, M. J., Kopp, E. B. NF- $\kappa$ B and Rel proteins: Evolutionary conserved mediators of immune responses // *Annual Review of Immunology*. – 1998. – Vol. 16. – P. 225–260.
43. Karin, M., Cao, Y., Greten, F.R., Li, Z.W. NF-kappaB in cancer: From innocent bystander to major culprit // *Nature Reviews Cancer*. – 2002. – Vol. 2, № 4. – P. 301–310.
44. Karin, M., Ben-Neriah, Y. Phosphorylation meets ubiquitination: The control of NF $\kappa$ B activity // *Annual Review of Immunology*. – 2000. – Vol. 18. – P. 621–663.
45. Ryter S.W., Gomer C.J. Nuclear factor kappa B binding activity ion mouse L1210 cells following photofrin II-mediated photosensitization // *Photochemistry and Photobiology*. – 1993. – Vol. 58, № 5. – P. 753–756.

46. Granville D.J., Carthy C.M., Jiang H., Levy J.G., McManus B.M., Matroule J.Y., Piette J., Hunt, D.W.C. Nuklear factor  $\kappa$ B activation by the phototherapeutic agent verteporfin // *Blood*. – 2000. – Vol. 95. – P. 256–262.
47. Kitsis R.N., Molkenstin J.D. Apoptotic cell death "Nixed" by an ER-mitochondrial necrotic pathway // *The Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 107. – P. 9031–9032.
48. Proskuryakov S.Y., Gabai V.L. Mechanisms of tumor cell necrosis // *Current Pharmaceutical Design*. – 2010. – Vol. 16, № 1. – P. 56–68.
49. Buytaert E., Dewaele M., Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2007. – Vol. 1776, № 1. – P. 86–107.
50. Nagata S., Obana A., Gohto Y., Nakajima S. Necrotic and apoptotic cell death of human malignant melanoma cells following photodynamic therapy using an amphiphilic photosensitizer, ATX-S10(Na) // *Lasers in Surgery and Medicine*. – 2003. – Vol. 33, № 1. – P. 64–70.
51. Kessel D., Poretz R.D. Sites of photodamage induced by photodynamic therapy with a chlorin e6 triacetoxymethyl ester (CAME) // *Photochemistry and Photobiology*. – 2000. – Vol. 71, № 1. – P. 94–96.
52. Lavie G., Kaplinsky C., Toren A., Aizman I., Meruelo D., Mazur Y., Mandel M. A photodynamic pathway to apoptosis and necrosis induced by dimethyl tetrahydroxyhelianthron and hypericin in leukaemic cells: Possible relevance to photodynamic therapy // *British Journal of Cancer*. – 1999. – Vol. 79, № 3–4. – P. 423–432.
53. Mathew R., Karantza-Wadsworth V., White E. Role of autophagy in cancer. // *Nature Reviews Cancer*. – 2007. – Vol. 7, № 12. – P. 961–967.
54. Kroemer G., Jaattela M. Lysosomes and autophagy in cell death control // *Nature Reviews Cancer*. – 2005. – Vol. 5, № 11. – P. 886–897.
55. Kessel D., Vicente M.G., Reiners J.J.Jr., Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy // *Lasers in Surgery and Medicine*. – 2006. – Vol. 38, № 5. – P. 482–488.

56. Reiners J.J.Jr., Agostinis P., Berg K., Oleinick N.L., Kessel D. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy // *Autophagy*. – 2010. – Vol. 6, № 1. – P. 7–18.
57. Scherz-Shouval R., Shvets E., Fass E., Shorer H., Gil L., Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4 // *The EMBO Journal*. – 2007. – Vol. 26, № 7. – P. 1749–1760.
58. Sasnauskiene A., Kadziauskas J., Vezelyte N., Jonusiene V., Kirveliene V. Apoptosis, autophagy and cell cycle arrest following photodamage to mitochondrial interior // *Apoptosis*. – 2009. – Vol. 14, № 3. – P. 276–286.
59. Scherz-Shouval R., Elazar Z. ROS, mitochondria and the regulation of autophagy // *Trends in Cell Biology*. – 2007. – Vol. 17, № 9. – P. 422–427.
60. Kessel D., Oleinick N.L. Initiation of autophagy by photodynamic therapy // *Methods in Enzymology*. – 2009. – Vol. 453. – P. 1–16.
61. Kessel D., Arroyo A.S. Apoptotic and autophagic responses to Bcl-2 inhibition and photodamage // *Photochemical & Photobiological Sciences*. – 2007. – Vol. 6, № 12. – P. 1290–1295.
62. Kessel D., Reiners J.J.Jr. Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage // *Photochemistry and Photobiology*. – 2007. – Vol. 83, № 5. – P. 1024–1028.
63. Xue L.Y., Chiu S.M., Azizuddin K., Joseph S., Oleinick N.L. The death of human cancer cells following photodynamic therapy: Apoptosis competence is necessary for Bcl-2 protection but not for induction of autophagy // *Photochemistry and Photobiology*. – 2007. – Vol. 83, № 5. – P. 1016–1023.
64. Berg K., Moan J. Lysosomes as photochemical targets // *International Journal of Cancer*. – 1994. – Vol. 59, № 6. – P. 814–822.
65. Stromhaug P.E., Berg T.O., Berg K., Seglen P.O. A novel method for the study of autophagy: Destruction of hepatocytic lysosomes, but not autophagosomes, by the photosensitizing porphyrin tetra(4-sulphonatophenyl)porphine // *Biochemical Journal*. – 1997. – Vol. 321, Pt. 1. – P. 217–225.

66. Apel A., Herr I., Schwarz H., Rodemann H.P., Mayer A. Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy // *American Association for Cancer Research*. – 2008. – Vol. 68, № 5. – P. 1485–1494.
67. Monika A. J., Pyka J., Michalczyk-Wetula D., Baczyński K., Cieśla M., Susz A., Ferdek P.E., Płonka B.K., Fiedor L., Płonka P.M. Electron paramagnetic resonance spectroscopy reveals alterations in the redox state of endogenous copper and iron complexes in photodynamic stress-induced ischemic mouse liver // *Redox Biology*. – 2020. – Vol. 34. – P. 101566.
68. J.W. Miller. Higher Irradiance and Photodynamic Therapy for Age-Related Macular Degeneration (An AOS Thesis) // *Transactions of the American Ophthalmological Society*. – 2008. – Vol. 106. – P. 357–382.
69. Ushasri C., Lingamallu G. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future // *The Chemical Record*. – 2017. – Vol. 17, № 8. – P. 775–802.
70. K. Plaetzer, B. Krammer, J. Berlanda, F. Berr, T. Kiesslich, Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects // *Lasers in Medical Science*. – 2008. – Vol. 24, № 2. – P. 1–15.
71. Yanovsky R. L., Bartenstein D. W., Rogers G. S., Isakoff S. J., Chen S. T. Photodynamic therapy for solid tumors: A review of the literature // *Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine*. – 2019. – Vol. 35, № 5. – P. 295–303.
72. Dos Santos A.F., De Almeida D.R., Terra L.F., Baptista M.S., Labriola L. Photodynamic therapy in cancer treatment-an update review // *Journal of Cancer Metastasis and Treatment*. – 2019. – Vol. 5, № 25. – P. 1–20.
73. Филоненко Е.В, Серова Л.Г. Фотодинамическая терапия в клинической практике // *Biomedical Photonics*. – 2016. – Т. 5, № 2. – С. 26–37
74. Berg K., Selbo P.K., Weyergang A., Dietze A., Prasmickaite L., Bonsted A., Engesaeter B.Ø., Angell-Petersen E., Warloe T., Frandsen N., Høgset A. Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications // *Journal of Microscopy*. – 2005. – Vol. 218, Pt. 2. – P. 133–47.

75. Wagnieres G.A., Star W.M., Wilson B.C. In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications // *Photochemistry and Photobiology*. – 1998. – Vol. 68, № 5. – P. 603—32.
76. Richards-Kortum R., Sevick-Muraca E. Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis // *Annual Review of Physical Chemistry*. – 1996. – Vol. 47. – P. 555—606.
77. Diamond K.R., Patterson M.S., Farrell T.J. Quantification of fluorophore concentration in tissue-simulating media by fluorescence measurements with a single optical fiber // *Applied Optics*. – 2003. – Vol. 42. – P. 2436—2442.
78. Allison R., Mang T., Hewson G., et al. Photodynamic therapy for chest wall progression from breast carcinoma is an underutilized treatment modality // *Cancer*. – 2001. – Vol. 91, № 1. – P. 1–8.
79. Overholt B.F., Panjehpour M. Photodynamic therapy in the management of Barrett's esophagus with dysplasia // *Journal of Gastrointestinal Surgery*. – 2000. – Vol. 4, № 2. – P. 129–30.
80. Panjehpour M., Overholt B.F., Haydek J.M., et al. Results of photodynamic therapy for ablation of dysplasia and early cancer in Barrett's esophagus and effect of oral steroids on stricture formation // *American Journal of Gastroenterology*. – 2000. – Vol. 95, № 9. – P. 2177–2184.
81. Runfola M.A., Weber T.K., Rodriguez-Bigas M.A., et al. Photodynamic therapy for residual neoplasms of the perianal skin // *Diseases of the Colon & Rectum*. – 2000. – Vol. 43, № 4. – P. 499–502.
82. Чиссов В.И., Скобелкин О.К. и соавт. Фотодинамическая терапия и флуоресцентная диагностика злокачественных опухолей с препаратом Фотогем // *Хирургия*. – 1994. – Т. 12. – С. 3–6.
83. Henderson B.W., Fingar V.H. Relationship of tumor hypoxia and response to photodynamic treatment in an experimental mouse tumor // *Cancer Research*. – 1987. – Vol. 47. – P. 3110–3114.
84. Henderson B.W., Bellnier D.A. Tissue localization of photosensitizers and the mechanism of photodynamic tissue destruction // *Ciba Foundation symposium*. – 1989. – Vol. 146. – P. 112–125.

85. Kennedy J.C., Pottier R.H. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 1992. – Vol. 14, № 4. – P. 275–292.
86. Peng Q., Warloe T., Berg K., et al. 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges // *Cancer*. – 1997. – Vol. 79, № 12. – P. 2282–2308.
87. Wang I., Bendsoe N., Klinteberg C.A., et al. Photodynamic therapy vs. cryosurgery of basalcellcarcinomas: results of a phase III clinical trial // *British Journal of Dermatology*. – 2001. – Vol. 144, № 4. – P. 832–840.
88. Morton C.A., Whitehurst C., McColl J.H., et al. Photodynamic therapy for large or multiple patches of Bowen disease and basalcellcarcinoma // *Archives of Dermatological Research*. – 2001. – Vol. 137, № 3. – P. 319–324.
89. Fan K.F., Hopper C., Speight P.M., et al. Photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid for premalignant and malignant lesions of the oral cavity // *Cancer*. – 1996. – Vol. 78, № 7. – P. 1374–1383.
90. Waidelich R., Beyer W., Knuchel R., et al. Whole bladder PDT with 5-ALA and a white light source // *Urology*. – 2003. – Vol. 61. – P. 332–337.
91. Freeman M., Vinciullo C., Francis D., et al. A comparison of photodynamic therapy using topicalmethylaminolevulinate (Metvix) with single cycle cryotherapy in patients with actinic keratosis: a prospective, randomized study // *Journal of Dermatological Treatment*. – 2003. – Vol. 14, № 2. – P. 99–106.
92. Ca M. Methyl aminolevulinate (Metvix) photodynamic therapy – practical pearls // *Journal of Dermatological Treatment*. – 2003. – Vol. 14, Suppl. 3. – P. 23–26.
93. Tsuchihashi T., Mori K., Ueyama K., Yoneya S. Five-year results of photodynamic therapy with verteporfin for Japanese patients with neovascular age-related macular degeneration // *Clinical Ophthalmology*. – 2013. – Vol. 7. – P. 615–620.
94. Pece A., Milani P., Isola V., Pierro L. A long-term study of photodynamic therapy with verteporfin for choroidal neovascularization at the edge of chorioretinal atrophy in pathologic myopia // *Ophthalmologica*. – 2011. – Vol. 225. – P. 161–168.

95. Young S.W., Woodburn K.W., Wright M., et al. Lutetium texaphyrin (PCI-0123): a near-infrared, water-soluble photosensitizer // *Photochemistry and Photobiology*. – 1996. – Vol. 63, № 6. – P. 892–897.
96. Grégory T., Guangan H., Sajal S., et al. Oxaliplatin Pt(IV) prodrugs conjugated to gadolinium-texaphyrin as potential antitumor agents // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2020. – Vol. 117, № 13. – P. 7021–7029.
97. Story W., Sultan A.A., Bottini G., Vaz F., Lee G., Hopper C. Strategies of airway management for head and neck photo-dynamic therapy // *Lasers in Surgery and Medicine*. – 2013. – Vol. 45, № 6. – P. 370–376.
98. Pereira S.P., Ayaru L., Rogowska A., Mosse A., Hatfield A.R., Bown S.G. Photodynamic therapy of malignant biliary strictures using meso-tetrahydroxyphenylchlorin // *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. – 2007. – Vol. 19. – P. 479–485.
99. Wyss P., Schwarz V., Dobler-Girdziunaite D., Hornung R., Walt H., Degen A., et al. Photodynamic therapy of locoregional breast cancer recurrences using a chlorin-type photosensitizer // *International Journal of Cancer*. – 2001. – Vol. 93, № 5. – P. 720–724.
100. Bown S.G., Rogowska A.Z., Whitelaw D.E., Lees W.R., Lovat L.B., Ripley P., et al. Photodynamic therapy for cancer of the pancreas // *Gut*. – 2002. – Vol. 50, № 4. – P. 549–557.
101. Meier D., Botter S.M., Campanile C., Robl B., Gräfe S., Pellegrini G., Born W., Fuchs B. Foscan and foslip based photodynamic therapy in osteosarcoma in vitro and in intratibial mouse models // *International Journal of Cancer*. – 2017. – Vol. 140, № 7. – P. 1680–1692.
102. Mang T.S., Allison R., Hewson G., Snider W., Moskowitz R. A phase II/III clinical study of tin ethyl etiopurpurin (Purlytin)-induced photodynamic therapy for the treatment of recurrent cutaneous metastatic breast cancer // *The cancer journal from Scientific American*. – 1998. – Vol. 4, № 6. – P. 378–384.
103. Shimizu K., Nitta M., Komori T., Maruyama T., Yasuda T., Fujii Y., et al. Intraoperative photodynamic diagnosis using Talaporfin sodium simultaneously applied

for photodynamic therapy against malignant glioma: a prospective clinical study // *Frontiers in Neurology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 24.

104. Privalov V. A., Lappa A. V., Kochneva E. V. Five years experience of photodynamic therapy with new chlorin photosensitizer // *SPIE Conference Proceedings*. – 2005. – Vol. 5863. – P. 186–198.

105. Douillard S., Lhommeau I., Olivier D., Patrice T. In vitro evaluation of Radachlorin sensitizer for photodynamic therapy // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2010. – Vol. 98, № 2. – P. 128–137.

106. Juzeniene A. Chlorin e6-based photosensitizers for photodynamic therapy and photodiagnosis // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2009. – Vol. 6, № 2. – P. 94–96.

107. Narumi A., Tsuji T., Shinohara K., Yamazaki H., Kikuchi M., Kawaguchi S., et al. Maltotriose-conjugation to a fluorinated chlorin derivative generating a PDT photosensitizer with improved water-solubility // *Organic & Biomolecular Chemistry*. – 2016. – Vol. 14. – P. 3608–3613.

108. Kataoka H., Nishie H., Hayashi N., et al. New photodynamic therapy with next-generation photosensitizers // *Annals of Translational Medicine*. – 2017. – Vol. 5, № 8. – P. 183.

109. Shiryayev A. A., Musaev G. K., Levkin V. V., Reshetov I. V., Loshchenov M. V., Alekseeva P. M., Volkov V. V., Linkov K. G., Makarov V. I., Shchekoturov I. O., Borodkin A. V., Loschenov V. B. Combined treatment of nonresectable cholangiocarcinoma complicated by obstructive jaundice // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. – 2019. – Vol. 26. – P. 218–223.

110. Nair P.R. Delivering Combination Chemotherapies and Targeting Oncogenic Pathways via Polymeric Drug Delivery Systems // *Polymers*. – 2019. – Vol. 11, № 4. – P. 630.

111. Pan J., Rostamizadeh K., Filipczak N., Torchilin V.P. Polymeric Co-Delivery Systems in Cancer Treatment: An Overview on Component Drugs' Dosage Ratio Effect // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24, № 6. – P. 1035.

112. Pröll S., Wilhelm B., Robert B., Scheer H. Myoglobin with modified tetrapyrrole chromophores: binding specificity and photochemistry // *Biochimica et Biophysica Acta*. – 2006. – Vol. 1757, № 7. – P. 750–763.
113. Bangham A.D. A correlation between surface charge and coagulant action of phospholipids // *Nature*. – 1961. – Vol. 192. – P. 1197–1198.
114. Karami N., Moghimipour E., Salimi A. Liposomes as a Novel Drug Delivery System: Fundamental and Pharmaceutical Application // *Asian Journal of Pharmaceutics*. – 2018. – Vol. 12, № 1. P. 31–41.
115. Pradhan B., Kumar N., Saha S., Roy A. Liposome: method of preparation, advantages, evaluation and its application // *Journal of Applied Pharmaceutical Research*. – 2015. – Vol. 3, № 3. – P. 1–8.
116. Akbarzadeh A., Rezaei-Sadabady R., Davaran S., Joo S.W., Zarghami N., Hanifehpour Y., et al. Liposome: Classification, preparation, and applications // *Nanoscale Res. Lett.* – 2013. – Vol. 8, № 1. – P. 102.
117. Lengyel M., Kállai-Szabó N., Antal V., Laki A.J., Antal I. Microparticles, Microspheres, and Microcapsules for Advanced Drug Delivery // *Scientia Pharmaceutica*. – 2019. – Vol. 87, № 3. – P. 20.
118. Wang B.H., Longquin Hu, T.J.S. Drug Delivery to the Lymphatic System. In *Drug Delivery Principles and Applications* // John Wiley & Sons (Wiley). – 2016. – Vol. 21. – P. 509.
119. Whelehan M., Marison I.W. Microencapsulation using vibrating technology // *Journal of Microencapsulation*. – 2011. – Vol. 28, № 8. – P. 669–688.
120. Peanparkdee M., Iwamoto S., Yamauchi R. Microencapsulation: A Review of Applications in the Food and Pharmaceutical Industries // *Reviews in Agricultural Science*. – 2016. – Vol. 4. – P. 56–65.
121. Desai T., Shea L.D. Advances in islet encapsulation technologies // *Nature reviews. Drug discovery*. – 2016. – Vol. 16, № 5. – P. 338–350.
122. Vasundhra K., Shahid D.W., Surya P.G., Zulfkar L.Q. Role of microspheres in novel drug delivery systems: preparation methods and applications // *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. – 2020. – Vol. 12, № 3. – P. 10–15.

123. Farah F.H. Magnetic Microspheres: A Novel Drug Delivery System // *Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2017. – Vol. 3, № 5. – P. 93–112.
124. Sæther H.V., Holme H.K., Maurstad G., Smidsrød O., Stokke B.T. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan // *Carbohydrate Polymers*. – 2008. – Vol. 74, № 4. – P. 813–821.
125. Farris E., Brown D.M., Ramer-Tait A.E., Pannier A.K. Chitosan-zein nano-in-microparticles capable of mediating in vivo transgene expression following oral delivery // *Journal of Controlled Release*. – 2017. – Vol. 249. – P. 150–161.
126. Riaz T., Iqbal M.W., Saeed M., Yasmin I., Hassanin H.A., Mahmood S., Rehman A. In-vitro survival of *Bifidobacterium bifidum* microencapsulated in zein coated alginate hydrogel microbeads // *Journal of Microencapsulation*. – 2019. – Vol. 36, № 2. – P. 192–203.
127. Papa S., Veglianese P. Improving the Pharmacodynamic and Pharmacological Profile of Bioactive Molecules Using Biopolymers // *Bioresorbable Polymers for Biomedical Applications*. – 2017. – P. 285–302.
128. Colinet I., Dulong V., Mocanu G., Picton L., Le Cerf D. New amphiphilic and pH-sensitive hydrogel for controlled release of a model poorly water-soluble drug // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2009. – Vol. 73, № 3. – P. 345–350.
129. Streubel A., Siepmann J., Bodmeier R. Floating microparticles based on low density foam powder // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2002. – Vol. 241, № 2. – P. 279–292.
130. Mahou R., Meier R.R.H., Bühler L.H., Wandrey C. Alginate-poly(ethylene glycol) hybrid microspheres for primary cell microencapsulation // *Materials*. – 2014. – Vol. 7, № 1. – P. 275–286.
131. Dalpiaz A., Fogagnolo M., Ferraro L., Capuzzo A., Pavan B., Rassu G., Salis A., Giunchedi P., Gavini E. Nasal chitosan microparticles target a zidovudine prodrug to brain HIV sanctuaries // *Antiviral Research*. – 2015. – Vol. 123. – P. 146–157.
132. Santos M.G., Bozza F.T., Thomazini M., Favaro-Trindade C.S. Microencapsulation of xylitol by double emulsion followed by complex coacervation // *Food Chemistry*. – 2015. – Vol. 171. – P. 32–39.

133. Emami F., Vatanara A., Park E.J., Na D.H. Drying technologies for the stability and bioavailability of biopharmaceuticals // *Pharmaceutics*. – 2018. – Vol. 10, № 3. – P. 131.
134. Пат. 2367434 Российская Федерация, МПК А61К 31/409, А61Р 35/00. Фотосенсибилизатор и способы его получения / Борисов В.А., Пономарев Г.В., Дерновский В.И.; заявитель и патентообладатель Борисов В.А. – № 2008115234/15; заявл. 2008.04.22; опубл. 2009.09.20.
135. Vargas F., Díaz Y., Yartsev V., Marcano A., Lappa A. Photophysical properties of novel PDT photosensitizer Radachlorin in different media // *Ciencia E Tecnica*. – 2004. – Vol. 12. – P. 70–77.
136. Радахлорин. Описание препарата в справочнике Видаль: сайт. – URL: [https://www.vidal.ru/drugs/radachlorine\\_\\_\\_36419](https://www.vidal.ru/drugs/radachlorine___36419) (дата обращения: 19.02.2020). – Текст: электронный.
137. И.В. Багров, А.В. Дадеко, В.М. Киселев, Т.Д. Муравьева, А.М. Стародубцев. Сравнительные исследования фотофизических свойств димегина, фотодитазина и радахлорина // *Оптика и спектроскопия*. – 2019. – Т. 126, № 2. – С. 162–169.
138. Park J., An K., Hwang Y., Park J.G., Noh H.J., Kim J.Y., Park J.H., Hwang N.M., Hyeon T. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals // *Nature Materials*. – 2004. – Vol. 3, № 12. – P. 891–895.
139. Miyoshi N., Tomita G. Production and reaction of singlet oxygen in aqueous micellar solutions using pyrene as photosensitizer // *Zeitschrift für Naturforschung B*. – 1978. – Vol. 33, № 6. – P. 622–627.
140. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *Journal of Immunological Methods*. – 1983. – Vol. 65, № 1–2. – P. 55–63.
141. Sadat S. M., Jahan S. T., Haddadi A. Effects of size and surface charge of polymeric nanoparticles on in vitro and in vivo applications // *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. – 2016. – Vol. 7, № 2. – P. 91.
142. Sahai D., Lo J.L., Hagen I.K., Bergstrom L., Chernomorsky S., Poretz R.D. Metabolically convertible lipophilic derivatives of pH-sensitive amphipathic

photosensitizers // *Photochemistry and Photobiology*. – 1993. – Vol. 58, № 6. – P. 803–808.

143. Brault D., Vever-Bizet C., Kuzelova K. Interactions of dicarboxylic porphyrins with membranes in relation to their ionization state // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 1993. – Vol. 20, № 2–3. – P. 191–195.

144. Cocks E., Alpar O., Somavarapu S., Greenleaf D. Impact of surfactant selection on the formulation and characterization of microparticles for pulmonary drug delivery // *Drug Development and Industrial Pharmacy*. – 2015. – Vol. 41, № 3. – P. 522–528.

145. 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*. – 2021. – V. 11, № 3. – P. 458–468

146. 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

147. Paul S., Heng P.W.S., Chan L.W. Optimization in solvent selection for chlorin e6 in photodynamic therapy // *Journal of Fluorescence*. – 2013. – Vol. 23, № 2. – P. 283–291.

148. Kamuhabwa A.R., Huygens A., Roskams T., De Witte P.A. Enhancing the photodynamic effect of hypericin in human bladder transitional cell carcinoma spheroids by the use of the oxygen carrier, perfluorodecalin // *International Journal of Oncology*. – 2006. – Vol. 28, № 3. – P. 775–780.

149. Пат. 2688486 Российская Федерация, МПК C12N 1/21, C12P 13/04. Микроорганизмы для повышенного продуцирования аминокислот и связанные с ними способы / Савиль Рене М., Сильвермен Джошуа А., Ланинг Эрик Г., Досс Брэндон Д., Дживер Лоррейн Джоан, Ресник Сол М., Реджитски Дрю Д.; заявитель и патентообладатель Калиста, Инк. (US). – № 2016133407; заявл. 21.02.2018; опубл. 21.05.2019.

150. Holy C.E., Dang S.M., Davies J.E., Shoichet M.S. In vitro degradation of a novel poly(lactide-co-glycolide) 75/25 foam // *Biomaterials*. – 1999. – Vol. 20, № 13. – P. 1177–1185.
151. Vermathen M., Marzorati M., Vermathen P., Bigler P. pH-dependent distribution of chlorin e6 derivatives across phospholipid bilayers probed by NMR spectroscopy // *Langmuir*. – 2010. – Vol. 26, № 13. – P. 11085–11094.
152. Lojk J., Bregar V.B., Rajh M., et al. Cell type-specific response to high intracellular loading of polyacrylic acid-coated magnetic nanoparticles // *International Journal of Nanomedicine*. – 2015. – Vol. 10. – P. 1449–1462.
153. Phanse Y., Ramer-Tait A.E., Friend S.L., Carrillo-Conde B., Lueth P., Oster C.J., Phillips G.J., Narasimhan B., Wannemuehler M.J., Bellaire B.H. Analyzing Cellular Internalization of Nanoparticles and Bacteria by Multi-spectral Imaging Flow Cytometry // *Journal of Visualized Experiments*. – 2012. – Vol. 64. – P. 3884.
154. Lai D.Y. Approach to using mechanism-based structure activity relationship (SAR) analysis to assess human health hazard potential of nanomaterials // *Food and Chemical Toxicology*. – 2015. – Vol. 85. – P. 120–126.
155. 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, № 3. – С. 47–55
156. Golombek S.K., May J.N., Theek B., Appold L., Drude N., Kiessling F., Lammers T. Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2018. – Vol. 130. – P. 17–38.
157. Kalyane D. et al. Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): Nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer // *Materials Science and Engineering: C*. – 2019. – Vol. 98. – P. 1252–1276.
158. Yoshikawa T. et al. Rapid and continuous accumulation of nitric oxide-releasing liposomes in tumors to augment the enhanced permeability and retention (EPR) effect // *International journal of pharmaceutics*. – 2019. – Vol. 565, №. 10. – P. 481–487.

159. Davda J., Labhasetwar V. Characterization of nanoparticle uptake by endothelial cells // *International journal of pharmaceutics*. – 2002. – Vol. 233, №. 1–2. – P. 51–59.
160. Palazzolo S. et al. The clinical translation of organic nanomaterials for cancer therapy: a focus on polymeric nanoparticles, micelles, liposomes and exosomes // *Current medicinal chemistry*. – 2018. – Vol. 25, №. 34. – P. 4224–4268.
161. Jianbo G. et al. The anti-melanoma efficiency of the intratumoral injection of cucurbitacin-loaded sustained-release carriers: A PLGA particle system // *Journal of pharmaceutical sciences*. – 2013. – Vol. 102, №. 8. – C. 2550–2563.
162. Wang J. W. et al. Improvement of the antitumor efficacy of intratumoral administration of cucurbitacin poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres incorporated in in situ-forming sucrose acetate isobutyrate depots // *Journal of pharmaceutical sciences*. – 2016. – Vol. 105, №. 1. – P. 205–211.
163. Han S., Zhang X., Li M. Progress in research and application of PLGA embolic microspheres // *Frontiers in Bioscience*. – 2016. – Vol. 21. – P. 931–940.
164. Bastian P. et al. Chemo-embolization of experimental liver metastases. Part I: distribution of biodegradable microspheres of different sizes in an animal model for the locoregional therapy // *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*. – 1998. – Vol. 46, №. 3. – P. 243–254.
165. Lee S. Y. et al. Hyaluronic acid/doxorubicin nanoassembly-releasing microspheres for the transarterial chemoembolization of a liver tumor // *Drug delivery*. – 2018. – Vol. 25, №. 1. – P. 1472–1483.
166. Сухова Т.Е. Эффективность фотодинамической терапии базальноклеточного рака кожи с местным введением радахлорина // *Biomedical photonics*. – 2015. – № 3. – С. 24–28.
167. Singh R. Nanotechnology based therapeutic application in cancer diagnosis and therapy // *Biotech*. – 2019. – Vol. 9, № 11. – P. 415.
168. Haimov-Talmoud E., Harel Y., Schori H., Motiei M., Atkins A., Popovtzer R., Lellouche J.P., Shefi O. Magnetic Targeting of mTHPC To Improve the Selectivity and Efficiency of Photodynamic Therapy // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2019. – Vol. 11, № 49. – P. 45368–45380.

169. Craig R.A., McCoy C.P., Gorman S.P., Jones D.S. Photosensitisers—The progression from photodynamic therapy to anti-infective surfaces // *Expert Opinion on Drug Delivery*. – 2015. – Vol. 12. – P. 85–101.
170. Agostinis P., Berg K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., Hahn S.M., Hamblin M.R., Juzeniene A., Kessel D., et al. Photodynamic therapy of cancer: An update // *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. – 2011. – Vol. 61. – P. 250–281.
171. Sun X. et al. Nanoparticles having amphiphilic silane containing Chlorin e6 with strong anti-biofilm activity against periodontitis-related pathogens // *Journal of dentistry*. – 2019. – Vol. 81. – P. 70–84.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А.

Акт внедрения научных результатов диссертации от 21.03.2022

УТВЕРЖДАЮ  
 Проректор по учебной работе  
 ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.  
 Сеченова Минздрава России  
 (Сеченовский Университет)



Литвинова Т.М.  
 «\_\_\_\_\_» 20\_\_ г.

## АКТ

о внедрении результатов диссертации Мирошкиной Анастасии Максимовны  
 в учебный процесс кафедры фармацевтической технологии  
 Института Фармации им. А.П.Нелюбина  
 ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что основные научные  
 положения, выводы и рекомендации кандидатской диссертации  
 Мирошкиной Анастасии Максимовны  
 на тему «Получение наноструктурированных частиц для управляемой доставки и  
 высвобождения действующего вещества для фотодинамической терапии»

внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтической технологии Института  
 Фармации им. А.П.Нелюбина

при изучении дисциплин частная и общая фармацевтическая технология,  
 читаемых студентам по направлению подготовки (специальности)  
 33.05.01 Фармация

Директор Института  
 Института Фармации  
 им. А.П.Нелюбина  
 д.ф.н., профессор



(подпись)

Раменская Г.В.

Заведующий кафедрой  
 Фармацевтической технологии  
 Института Фармации  
 им. А.П. Нелюбина  
 д.ф.н., профессор



(подпись)

Краснюк И.И.

Начальник Учебного управления  
 к.м.н.



(подпись)

Юдина Л.Ю.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б.  
СПЕЦИФИКАЦИЯ

Микрочастицы, приготовленные по методу множественной дисперсии твердое/в  
масле/в воде

Таблица Б.1 – Спецификация на МЧ, приготовленные по методу ТВ/М/В

Показатель	Метод	Норма
МЧ (СМГК+РХ)		
Описание	Визуальный	Лиофилизированная сухая пористая масса белого или молочного цвета без запаха.
Подлинность	Спектрофотометрия	Спектр поглощения раствора, приготовленного для количественного определения, в области от 300 нм до 800 нм должен иметь максимумы при длинах волн: $400 \pm 2$ нм и $660 \pm 2$ нм
Размер частиц	Метод ДРС	Гидродинамический радиус должен составлять $0,112 \pm 0,018$ мкм

## Продолжение Таблицы Б.1

Показатель	Метод	Норма
Количественное определение	Спектрофотометрия	Содержание радахлорина в микрочастицах должно составлять не менее $0,27 \pm 0,11$ мкг/мг
Хранение	В сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше $-18^{\circ}\text{C}$	
Срок годности	Устанавливается	
МЧ (СМГК+РХ+ПФД)		
Описание	Визуальный	Лиофилизированная сухая пористая масса белого или молочного цвета без запаха.
Подлинность	Спектрофотометрия	Спектр поглощения раствора, приготовленного для количественного определения, в области от 300 нм до 800 нм должен иметь максимумы при длинах волн: $400 \pm 2$ нм и $660 \pm 2$ нм

Продолжение Таблицы Б.1

Показатель	Метод	Норма
Размер частиц	Метод ДРС	Гидродинамический радиус должен составлять $0,138 \pm 0,054$ мкм
Количественное определение	Спектрофотометрия	Содержание радахлорина в микрочастицах должно составлять не менее $0,27 \pm 0,20$ мкг/мг
Хранение	В сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше $-18^{\circ}\text{C}$	
Срок годности	Устанавливается	
МЧ (СМГК+РХ+МНЧ)		
Описание		Лиофилизированная сухая пористая масса коричневого или светло-коричневого цвета без запаха.

## Продолжение Таблицы Б.1

Показатель	Метод	Норма
Подлинность	Спектрофотометрия	Спектр поглощения раствора, приготовленного для количественного определения, в области от 300 нм до 800 нм должен иметь максимумы при длинах волн: $400\pm 2$ нм и $660\pm 2$ нм
Размер частиц	Метод ДРС	Гидродинамический радиус должен составлять $0,240\pm 0,045$ мкм
Количественное определение	Спектрофотометрия	Содержание радахлорина в микрочастицах должно составлять не менее $2,34\pm 0,78$ мкг/мг
Хранение	В сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше $-18^{\circ}\text{C}$	
Срок годности	Устанавливается	
МЧ (СМГК+РХ+МНЧ+ПФД)		

## Продолжение Таблицы Б.1

Показатель	Метод	Норма
Описание		Лиофилизированная сухая пористая масса коричневого или светло-коричневого цвета без запаха.
Подлинность	Спектрофотометрия	Спектр поглощения раствора, приготовленного для количественного определения, в области от 300 нм до 800 нм должен иметь максимумы при длинах волн: $400 \pm 2$ нм и $660 \pm 2$ нм
Размер частиц	Метод ДРС	Гидродинамический радиус должен составлять $0,318 \pm 0,150$ мкм
Количественное определение	Спектрофотометрия	Содержание радахлорина в микрочастицах должно составлять не менее $1,16 \pm 0,59$ мкг/мг
Хранение	В сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше $-18^{\circ}\text{C}$	
Срок годности	Устанавливается	