Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО»

(Университет ИТМО)

**Зюзин Михаил Валерьевич**

**Светочувствительные неорганические наноматериалы для терапии,
диагностики и доставки биоактивных веществ, механизмы их
взаимодействия с биологическими объектами**

1. Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
доктора физико-математических наук

**Научный консультант:**

доктор физико-математических наук, доцент, Власова Ольга Леонардовна

Санкт-Петербург

2023

2

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

ВВЕДЕНИЕ 4

[ГЛАВА 1 Анализ литературных данных по видам неорганических светочувствительных наноматериалов и их применению в клинической практике 16](#bookmark2)

1. [Создание светочувствительных материалов 16](#bookmark4)
2. [Клинические испытания светочувствительных наноматериалов 35](#bookmark11)

[ГЛАВА 2 Контролируемая фотоопосредованная доставка биоактивных веществ в клетки 47](#bookmark20)

* 1. Особенности взаимодействия наноматериалов с биологическими

объектами 47

* 1. Особенности взаимодействия света со светочувствительных

наноматериалами 65

* 1. Композитные носители для селективного фотоопосредованного

окрашивания клеток 77

* 1. Направленная доставка биоактивных веществ с помощью клеточных

систем, модифицированных светочувствительными материалами 86

Выводы к ГЛАВЕ 2 102

[ГЛАВА 3 Оптическая термометрия с помощью светочувствительных наноматериалов в биологических объектах 105](#bookmark65)

1. Термометрия на наномасштабе с помощью резонансных диэлектрических

наночастиц в клетке 105

1. Мониторинг изменения температуры в реальном времени

фотоопосредованной доставки биоактивных веществ в клетки с помощью композитных носителей, модифицированных флуоресцентными наноалмазами и золотыми наночастицами 115

1. Флуоресцентная термометрия для точного измерения лазерного нагрева

наночастиц в клетках на наномасштабе 127

[Выводы к ГЛАВЕ 3 136](#bookmark90)

3

[ГЛАВА 4 Биовизуализация с помощью светочувствительных наноматериалов
 138](#bookmark91)

1. [Биораспределение наноматериалов ***in vivo*** 138](#bookmark92)
2. Мониторинг внутриклеточного распределения флуоресцентных носителей

биологически активных соединений 146

1. Подходы по флуоресцентной биовизуализации лабораторных животных

при системном и локальном введении наноматериалов 158

[Выводы к ГЛАВЕ 4 162](#bookmark100)

[ГЛАВА 5. Фотоиндуцированная терапия злокачественных новообразований с
помощью светочувствительных наноматериалов 164](#bookmark101)

1. Терапия злокачественных новообразований с помощью

светочувствительных наноматериалов 164

1. Применение светочувствительных материалов в терапии злокачественных

новообразований 172

Выводы к ГЛАВЕ 5 188

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 190

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 194

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

197

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

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

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

191

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

1. Разработаны светочувствительные клеточные системы для

направленной доставки противоопухолевых лекарств и их фотоопосредованного высвобождения в области опухоли на основе мезенхимальных стволовых клеток человека (чМСК). При модификации чМСК субмикрометровыми светочувствительными композитными носителями с загруженным

противоопухолевым лекарством (Винкристин) в количестве не более 10 носителей на клетку, их миграционная активность (спонтанная и направленная миграция) остается прежней. Полученные результаты позволили сделать **вывод** о том, что направленная доставка и фотоопосредованное высвобождение противоопухолевого препарата Винкристин (10 нг/мл) в опухолевые сфероиды меланомы с помощью разработанных клеточных систем в 6 раз эффективнее по сравнению со свободным Винкристином и в 7 раз эффективнее по сравнению с инкапсулированным Винкристином.

1. Теоретически исследован оптический нагрев различных

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

1. Исследуя фототермические параметры плазмонных наночастиц,

192

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

1. Проведен ряд исследований для задач визуализации распределения и удержания светочувствительных носителей в лабораторном животном. Локальное введение разработанных флуоресцентных композитных носителей в опухоль и последующая флуоресцентная визуализация лабораторного животного в течение 10 дней **подтвердила**, что флуоресцентный сигнал исходил в основном из области опухоли (более 95% в течение всего времени наблюдения).
2. Проведено сравнение различных подходов фототермической, радионуклидной, химиотерапии (а также их комбинации) при локальном лечении меланомы у мышей линии C57BL/6. После облучения лазером (1064 нм; 1,7 Вт/см2; 10 мин) опухолей меланомы с инжектированными золотыми наностержнями (400 мкг/мл), модифицированными терапевтическим радионуклидом 188Re (2 МБк), и одновременным введением Паклитаксела (3 мг/кг) было показано, что сочетание всех трех терапий одновременно дает наиболее значимые результаты в ингибировании опухолей в сравнении с терапиями в монорежиме. **Доказан** синергетических эффект от комбинации фототермической, радионуклидной и химиотерапии с помощью рассчитанного комбинированного индекса, который равнялся 0,79.

В целом, комплексное исследование использования светочувствительных неорганических наноматериалов для доставки веществ, нанотермометрии, биовизуализации и терапии позволило по-новому взглянуть на подходы в тераностике и определить новые перспективы в области терапии и диагностики

193

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