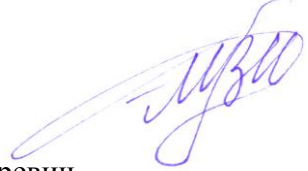


На правах рукописи



Макаров Владимир Игоревич

**Спектральные свойства кристаллических наночастиц
фталоцианина алюминия при лазерном возбуждении**

Специальность: 01.04.21 – Лазерная физика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Москва-2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук

Научный руководитель: Лощенов Виктор Борисович,
д.ф.-м.н., проф., заведующий лабораторией
лазерной биоспектроскопии ЦЕНИ ИОФРАН

Официальные оппоненты: Гончуков Сергей Александрович
д.ф.-м.н., проф., кафедра №37 НИЯУ МИФИ

Любин Евгений Валерьевич
к.ф.-м.н., научный сотрудник МГУ имени М.В.
Ломоносова, Физический факультет, отделение
радиофизики, кафедра квантовой электроники

Ведущая организация: Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования «Национальный
исследовательский университет «Московский
институт электронной техники»

Защита диссертации состоится 04 марта 2019 г. в 15:00 на заседании
Диссертационного совета Д 002.063.03 при Институте общей физики
им. А.М. Прохорова РАН по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д.38, корп. 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИОФ РАН
Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
канд. физ.-мат. наук
тел. +7(499) 503-81-47



Воляк Т.Б.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Флуоресцентная диагностика и неинвазивная терапия онкологических и воспалительных заболеваний при возбуждении светом фоточувствительных соединений (фотосенсибилизаторов) являются прецизионным инструментом современной медицины. Применение фотосенсибилизаторов (ФС) в форме наночастиц позволяет повысить селективность, специфичность, чувствительность методов спектроскопии обратного рассеяния, а также минимизировать их накопление в коже и здоровых органах, сохранив при этом высокую фототерапевтическую эффективность. В последнее время в научном сообществе все большее внимание уделяется наночастицам, состоящим из органических молекул: производным хлоринов, порфиринов и фталоцианинов различных металлов. Одним из перспективных для исследования типов нанофотосенсибилизаторов являются кристаллические наночастицы фталоцианина алюминия (НЧ-АIPc). В кристаллическом виде они водонерастворимы и нетоксичны, но при контакте с опухолевыми или иммунными клетками и патогенной микрофлорой приобретают фотоактивность и меняют спектроскопические свойства (приобретают способность флуоресцировать и становятся фототоксичными). Это свойство делает их перспективными для селективной терагностики.

Объяснение природы возникновения этих эффектов является важной фундаментальной задачей, которая впервые была решена в рамках диссертационной работы. Существует также и прикладной интерес, заключающийся в применении НЧ-АIPc для диагностики, терапии и профилактики различных воспалительных заболеваний.

Целью данной работы являлось выявление механизмов, приводящих к изменению флуоресцентных свойств кристаллических НЧ-АIPc в зависимости от микроокружения, а также разработка методов исследования и лазерно-спектроскопического комплекса для оценки состояния НЧ-АIPc в биологических

средах с целью их использования для фототераностики воспалительных заболеваний.

Для достижения поставленной цели требовалось решить следующие **задачи**:

1. Разработать методику исследования, лазерно-спектроскопический аппаратный комплекс с временным разрешением для оценки взаимодействия наночастиц, лазерного излучения и микроокружения для апробации использования НЧ-АІРс на биологических моделях, на клеточном уровне и на экспериментальных животных.
2. Разработать комплексный метод оценки размеров наночастиц в водном растворе с помощью методов динамического рассеяния лазерного излучения (DLS, dynamic light scattering) и лазерной спектроскопии. Исследовать динамику изменения интенсивности, длины волны и времени жизни флуоресценции в зависимости от типа микроокружения методами времяразрешенной лазерной спектроскопии на макро- и микроуровне.
3. Выявить механизм возникновения и исчезновения флуоресценции НЧ-АІРс в зависимости от типа микроокружения и характеристик лазерного облучения.
4. Исследовать возможности использования НЧ-АІРс и разработанной аппаратуры для диагностики патологических состояний воспалительных заболеваний, таких как артроз коленного сустава и трансплантация кожи.

Научная новизна

1. Экспериментально обнаружено возникновение флуоресценции не флуоресцирующих в воде НЧ-АІРс в некоторых специфических средах, не вызывающих растворение НЧ.
2. Исследованы спектрально-флуоресцентные свойства НЧ-АІРс, а также кинетика затухания флуоресценции при различных режимах лазерного облучения и типа микроокружения.
3. Установлены характерные времена жизни флуоресценции НЧ-АІРс при взаимодействии с иммуннокомпетентными клетками, отвечающими за воспалительные реакции в организме.

4. Определен квантовый выход синглетного кислорода при лазерном возбуждении НЧ-АІРС в иммунных клетках; показано его значимое увеличение в клетках, ответственных за воспаления (макрофагах).

Практическая значимость работы

1. Созданные исследовательский комплекс и методика определения динамики изменения флуоресцентных свойств НЧ-АІРС при взаимодействии с микроокружением в воспалительных реакциях могут позволить производить количественную оценку интенсивности и характер воспаления (при трансплантации органов, воспалительных заболеваниях опорно-двигательного аппарата). Результат может быть использован такими институтами и клиническими центрами, как НОКЦ пластической хирургии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова, Ожоговый центр при Институте хирургии им. А.В. Вишневского, Ожоговый центр ГБУЗ ДГКБ № 9 им. Г.Н. Сперанского.
2. Созданы волоконно-оптические инструменты для лазерной флуоресцентной диагностики и лазерной фотодинамической терапии крупных сосудов, шейки и тела матки и для внутрисуставного использования.
3. Результаты исследования флуоресцентных свойств НЧ-АІРС в макрофагах могут быть использованы для разделения макрофагов по их функциональному типу в организме, что позволит контролировать процесс терапии не только воспалительных, но и онкологических заболеваний.

Положения, выносимые на защиту

1. Возникновение флуоресценции НЧ-АІРС и ее затухание связано с изменением положения поверхностных молекул фталоцианина алюминия, которое, в свою очередь, зависит от типа микроокружения.
2. Для характеристики микроокружения НЧ-АІРС необходимо анализировать кинетику распада флуоресценции по двум экспонентам в диапазоне от 500 пс до 20 нс при возбуждении лазерным излучением с длиной волны 637 нм и длительностью импульса 100 пс.

3. Лазерное облучение клеток, содержащих НЧ-АІРС, при условии возникновения флуоресценции приводит к дезактивации или гибели этих клеток, что в свою очередь вызывает уменьшение интенсивности флуоресценции.
4. Фотодинамическая дезактивация макрофагов и макрофагоподобных клеток приводит к уменьшению воспаления, что положительно сказывается на процессе заживления воспалений аутоиммунного происхождения.

Обоснованность и достоверность полученных результатов

Обоснованность и достоверность полученных результатов обеспечивается использованием комплекса современных экспериментальных методов исследования, анализом литературных данных и выводами и результатами других исследователей. Достоверность и надежность результатов обоснована использованием научного оборудования, которое верифицируется в соответствии с международными стандартами обеспечения единства измерений и единообразием средств измерений.

Личный вклад автора

Автором был проведен критический анализ научной литературы; разработаны методики измерения; создан стенд с интегрирующей сферой для количественной оценки энергетического выхода люминесценции; измерены времена жизни флуоресценции с использованием метода счета одиночных фотонов; проведен анализ и интерпретация полученных результатов, сформулированы выводы. Автор принимал непосредственное участие в обсуждении полученных результатов, презентации результатов на конференциях и оформлении их в виде научных публикаций.

Публикации и апробация работы

По результатам работы опубликовано 14 статей в журналах, в том числе 13, удовлетворяющих требованиям ВАК, 24 тезисов докладов, из них 8 на международных и 16 на российских конференциях. Каждая из четырех оригинальных глав диссертации написана на основе полученных результатов, опубликованных в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

Публикации автора отражены в следующих библиографических базах данных: Web of Science, Scopus, РИНЦ.

Структура и объем диссертации

Работа состоит из введения, четырех глав, заключения, списка основных публикаций по теме диссертации и списка цитируемой литературы. Общий объем диссертации 136 страниц, включая 90 рисунков, 10 таблиц и список литературы из 143 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **Введении** обоснована актуальность темы исследования, сформулированы цель и основные задачи работы, изложены основные положения, выносимые на защиту, отмечена научная новизна, достоверность и научно-практическая значимость полученных результатов, перечислены публикации и основные доклады по теме диссертации.

В первой главе рассмотрены основные оптические свойства фталоцианинов в молекулярной и наноформах, а также ключевые различия в их структурных и спектрально-люминесцентных свойствах. Описаны структурные особенности и спектроскопические свойства отдельных молекул фталоцианинов, существующих на сегодняшний день. Перечислены основные факторы, влияющие на фотодинамический эффект и генерацию синглетного кислорода молекулярных растворов фталоцианинов при лазерном воздействии в биологических средах. Предложен новый подход к повышению чувствительности и специфичности оптических методов тераностики при использовании наночастиц — молекулярных нанокристаллов, структурными компонентами которых являются органические молекулы фталоцианинов, общепризнанных фотосенсибилизаторов. Обращено внимание на основные недостатки применения молекулярных форм фталоцианинов в клинической практике и приведен обзор современного состояния исследований и перспектив практического применения нанокристаллических фталоцианинов в областях биофотоники.

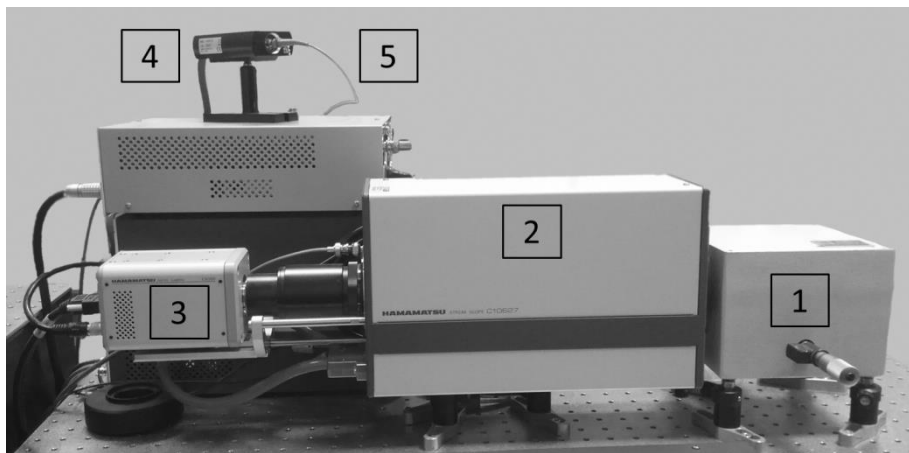


Рисунок 1. Изображение экспериментального комплекса: 1) полихроматор; 2) Стрик-скоп; 3) CCD-камера 4) лазер с оптоволоконным выходом; 5) оптоволоконный зонд.

Вторая глава посвящена экспериментальным методам исследования и разработке аппаратного комплекса оборудования, использованном в работе. Описана методика приготовления коллоидных растворов НЧ-АІРс с характеристикой их по размерам, кристаллической структуре, спектрам поглощения, рассеяния, фотолюминесценции, оценкой квантового выхода флуоресценции и генерации синглетного кислорода при селективном лазерном возбуждении. Показано устройство лазерного спектроскопического комплекса для экспериментального определения времени жизни флуоресценции в нано- и пикосекундном диапазонах. Измерения проводятся в диапазоне длин волн 400–900 нм, длительность возбуждающего лазерного импульса 100 пс, длина волны возбуждающего лазера 637 нм, временное разрешение 15 пс. Схема установки представлена на рисунке 1.

Уникальностью данного приборного комплекса является разработанная нами схема доставки лазерного импульса и приема флуоресцентного сигнала по оптическим волокнам. Это позволяет проводить измерения *in vivo*, а также не ограничивает размеры исследуемого образца. Принцип работы жгута из оптических волокон представлен на рисунке 2.

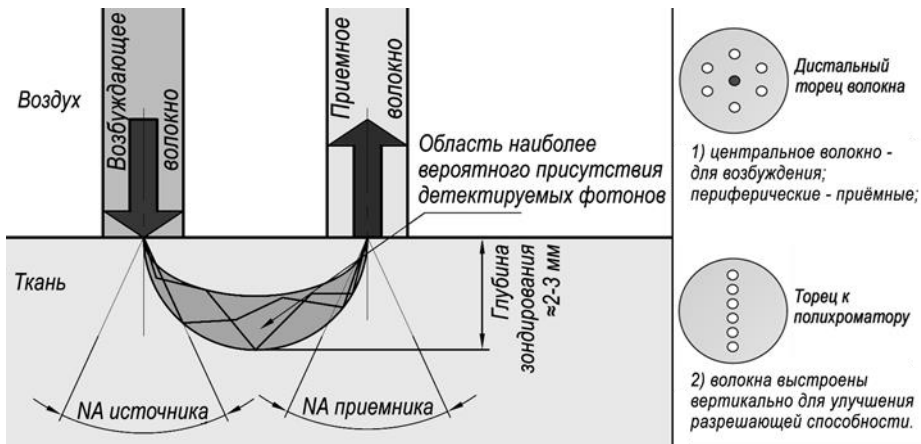


Рисунок 2. Принцип работы волоконно-оптического зонда, состоящего из 7 оптических волокон. По центральному волокну лазерный импульс доставляется к исследуемому образцу, а 6 периферических волокон собирают обратно рассеянный свет, в том числе и флуоресценцию. Центранно-симметричное расположение волокон на дистальном торце зонда позволяет детектировать флуоресценцию независимо от геометрического расположения зонда.

Описана методика и аппаратура для исследования динамики взаимодействия НЧ-АИРС с компонентами клеток (липидами, белками, элементами цитоскелета и внеклеточного матрикса) при селективном возбуждении лазерным излучением с использованием конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (LSM-710-NLO Carl Zeiss), волоконно-оптического спектрометра «ЛЭСА-01-БИОСПЕК» и полупроводниковых лазеров ЛФТ-01-БИОСПЕК с различными длинами волн (630–675 нм). Разработан приборный комплекс (для исследования на лабораторных животных) неинвазивной спектроскопической оценки состояния кожного покрова с регистрацией и обработкой информации в цифровом виде с достаточной степенью достоверности и точности.

В рамках исследования были разработаны и экспериментально апробированы спектрально-люминесцентные методы и приборы оценки и мониторинга параметров, отвечающих за степень приживления трансплантируемых тканей: (1) степень оксигенации гемоглобина в микроциркуляторном русле ткани; (2) уровень кровенаполненности; (3) скорость

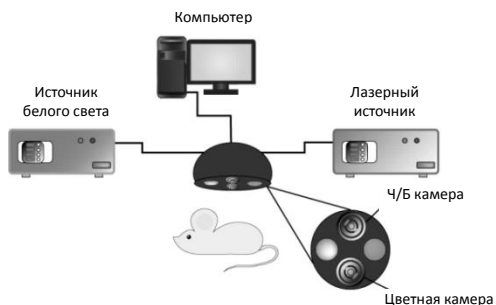


Рисунок 3. (а) Макет приборного комплекса неинвазивной спектроскопической оценки состояния кожного покрова и степени прижизнения трансплантируемых тканей; (б) схема работы системы для видеофлуоресцентного анализа.

кровотока и лимфотока; (4) внутриклеточный метаболизм; (5) тип клеточного дыхания (аэробное/анаэробное).

Комплекс включает в себя три лазера с различными длинами волн (633, 670 и 785 нм), два источника белого света (вольфрам-галогеновый и светодиодный), систему оптических волокон и светофильтров, персональный компьютер со специальным программным обеспечением и две CCD-камеры для регистрации видимого и флуоресцентного изображений (рисунок 3).

Были изучены механизмы взаимодействия НЧ-АІРс с иммунокомпетентными клетками при световом воздействии. На рисунке 3 представлен макет разработанного приборного комплекса.

Описаны впервые разработанные волоконно-оптические инструменты для лазерной флуоресцентной диагностики (ФД) и лазерной фотодинамической терапии (ФДТ) крупных сосудов и для внутрисуставного использования.

В третьей главе описаны результаты исследования изменения спектрально-люминесцентных свойств НЧ-АІРс при взаимодействии их с различным микроокружением (средами с различными рН, белковыми структурами и лизосомальными ферментами иммунных и раковых клеток). В параграфе 3.1 получены результаты изменения интенсивности флуоресценции и поглощения, длины волны и времени жизни флуоресценции НЧ-АІРс в модельных системах с различными рН, белковыми структурами и лизосомальными ферментами

иммунных и раковых клеток. На рисунке 4а,б показаны изменения спектров поглощения и люминесценции при различных рН. При этом также наблюдается и изменение времени жизни флуоресценции (рисунок 4в,г).

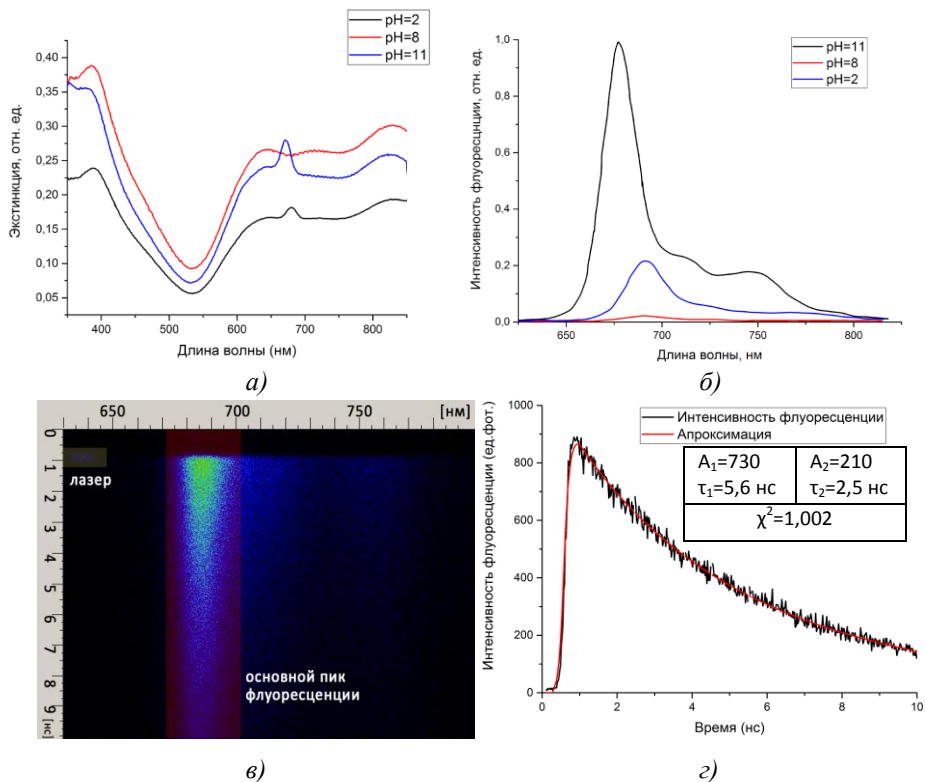


Рисунок 4. а) Спектры поглощения НЧ-ALPc в коллоиде в зависимости от рН; б) спектры флуоресценции НЧ-ALPc в коллоиде при различных рН; в) разрешенный по времени спектр флуоресценции НЧ-ALPc при рН 11; г) кинетика интенсивности флуоресценции экспериментальные данные и аппроксимация.

В параграфе 3.2 представлены результаты исследований изменения времени жизни флуоресценции НЧ-ALPc в культурах раковых (HeLa, рак шейки матки) и иммунокомпетентных клеток (моноцитов THP-1). Результаты исследования внутриклеточной локализации НЧ-ALPc на культуре клеток HeLa после 24 часов инкубации представлены на Рисунке 5. Лизосомы клеток дополнительно были окрашены. При первом сканировании лазером с длиной волны 633 нм для

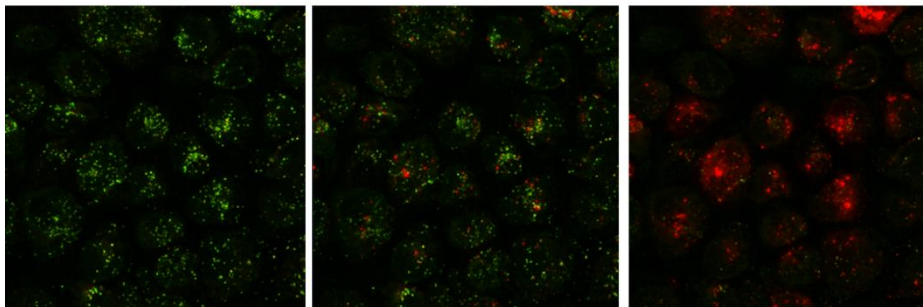


Рисунок 5. Флуоресцентное изображение клеток *HeLa* после 24 часов инкубации с НЧ-АІРс: а) клетки без НЧ-АІРс (зеленый – лизосомы), б) клетки с НЧ-АІРс (зеленый – лизосомы, красный – флуоресценция НЧ-АІРс), в) во время облучения лазером с длиной волны 633 нм происходит разрушение лизосом.

получения микроскопического изображения флуоресцентные сигналы лизосомального красителя и НЧ-АІРс колокализованы. При длительном воздействии на клетки лазерным излучением с длиной волны 633 нм происходит разрушение лизосом, накопивших НЧ-АІРс, выгорание лизосомального красителя вследствие фотодинамической активности АІРс, разгорание флуоресценции АІРс на длине волны 682 нм и распространение фотоактивных НЧ-АІРс по объему цитоплазмы клеток. Возникновение люминесценции НЧ-АІРс связано с кислой средой и большим количеством растворимых гидролитических ферментов в полости лизосом.

На Рисунке 6 представлены характерные изображения моноцитов ТНР-1 и

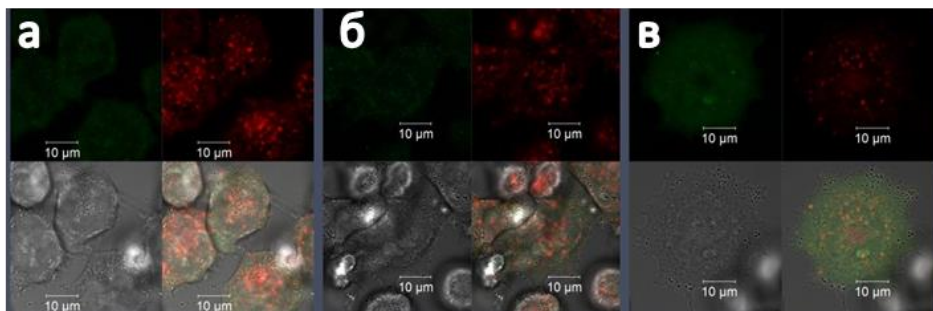


Рисунок 6. Флуоресцентные изображения моноцитов ТНР-1 (а) и полученных из них макрофагов, предварительно активированных лектинами Кон А (б) и ФГА (в), после 24 часов инкубации с коллоидом НЧ-АІРс.

полученных из них макрофагов (путем активации лектинами), накопивших НЧ-АІРС. Флуоресценция НЧ-АІРС во всех типах клеток локализуется в лизосомах. По спектральным данным максимум интенсивности флуоресценции АІРС в органеллах внутри макрофагов соответствует длине волны 682 нм.

Результаты исследования кинетики флуоресценции НЧ-АІРС в моноцитах и макрофагах представлены в Таблице 1. Можно заключить, что взаимодействие НЧ-АІРС с моноцитами/макрофагами приводит к изменению времени жизни их флуоресценции.

Таблица 1. Время жизни флуоресценции НЧ-АІРС в моноцитах ТНР-1 и активированных макрофагах.

Образец	Время жизни τ_i , нс	Распределение фотонов по τ_i	Число зарегистрированных фотонов
ТНР-1 (моноциты) + НЧ-АІРС	6 1,5	93% 7%	6450
ТНР-1 + КонА (макрофаги) + НЧ-АІРС	9 4,5	32% 68%	7335
ТНР-1 + ФГА, (макрофаги) +НЧ-АІРС	9,3 4,1	31% 69%	5391

Таким образом, можно сделать вывод о том, что время жизни флуоресценции наночастиц АІРС сильно зависит от конкретного этапа их взаимодействия с макрофагами и, исходя из полученных нами данных, можно сделать предположение о том, что НЧ-АІРС имеют как минимум два возможных варианта состояния, каждое из которых различается характером взаимодействия молекул на поверхности наночастицы с окружением.

В параграфе 3.3 описана методика измерения квантового выхода флуоресценции и генерации синглетного кислорода НЧ-АІРС в модельных системах и различных клеточных культурах. Эффективность генерации синглетного состояния молекулярного кислорода НЧ-АІРС оценивали на культурах раковых клеток HeLa и моноцитов человека ТНР-1. В качестве положительного контроля проводили сравнение с эффективностью генерации

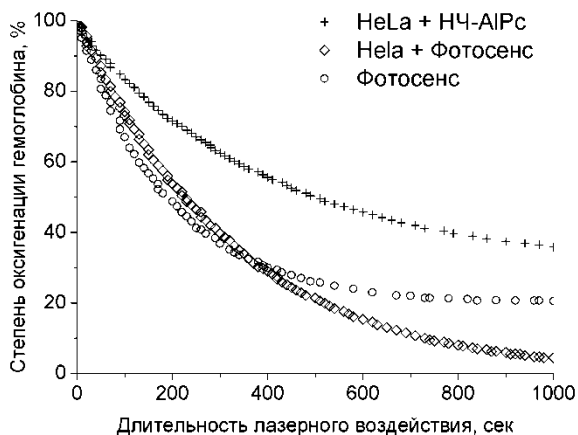


Рисунок 7. Зависимость скорости дезоксигенации от длительности облучения с учетом всех поправочных коэффициентов для культуры клеток HeLa.

синглетного кислорода разрешенным для медицинского применения водорастворимым АІРС (коммерческое название «Фотосенс»). Пример полученных зависимостей представлен на рисунке 7.

Из полученных зависимостей можно сделать вывод, что фотодинамическая эффективность Фотосенса в культурах клеток HeLa и ТНР-1 не снижается по сравнению с моделью «эритроциты + Фс». В случае с НЧ-АІРС фотодинамическая эффективность сопоставима с Фотосенсом в культурах клеток HeLa. Фотодинамическая эффективность НЧ-АІРС в культурах клеток ТНР-1 на начальном этапе облучения превышает эффективность Фотосенса, однако при дальнейшем облучении наблюдается снижение скорости дезоксигенации гемоглобина. Вероятно, это связано со способностью клеток-макрофагов воздействовать на захваченные наночастицы и переводить их в фотодинамически активное состояние. При облучении происходит дезактивация «работающих» молекул НЧ-АІРС вследствие фотодинамического эффекта.

Рассчитанный квантовый выход флуоресценции для Фотосенса и для НЧ-АІРС в клетках составил $QY_{\text{Фотосенс}}^{\text{HeLa}} \approx 13\%$ и $QY_{\text{НЧ-АІРС}}^{\text{HeLa}} \approx 1\%$.

Такой низкий квантовый выход флуоресценции у НЧ-АІРС может быть связан с малым временем инкубации НЧ-АІРС с клетками. При более

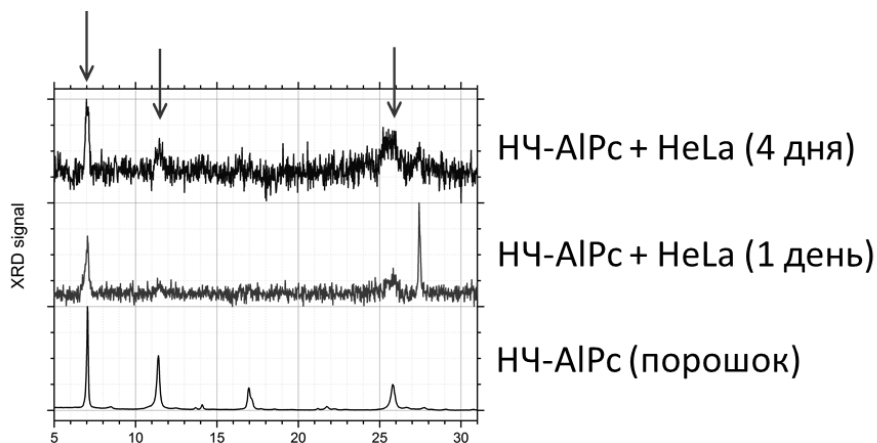


Рисунок 8. Рентгенограмма измеренная в клетках HeLa через 1 сутки и 4 суток после инкубации с H4-AIPc. Также приведены данные измеренные от порошка H4-AIPc без клеточной культуры.

длительном времени инкубации значение квантового выхода может увеличиться.

Параграф 3.4 посвящен исследованию фазового состояния H4-AIPc внутри клеток. Показано, что внутри клеток H4-AIPc сохраняют кристаллическую структуру (рисунок 8).

Результаты исследований показывают, что взаимодействие H4-AIPc с иммунными и опухолевыми клетками приводит к изменению времени жизни их флуоресценции. Таким образом, время жизни флуоресценции наночастиц AIPc сильно зависит от конкретного этапа их взаимодействия с макрофагами и, исходя из полученных данных, можно сделать предположение о том, что H4-AIPc имеют как минимум два возможных варианта состояния (Рисунок 9), каждое из которых отличается характером взаимодействия молекул на поверхности наночастицы с окружением.

В первом состоянии H4-AIPc пассивна, поверхностные молекулы AIPc находятся в параложеннии относительно плоскости наночастицы (лежат на поверхности). В этом состоянии H4-AIPc не флуоресцирует. Но в результате взаимодействия отдельные молекулы AIPc могут быть оторваны окружающими биоорганическими молекулами; тогда взаимодействие между молекулой

фталоцианина и ухватившей ее биомолекулой можно охарактеризовать слабыми координационными или ван-дер-ваальсовыми связями; в этом случае время затухания флуоресценции будет находиться в диапазоне 5–10 нс.

Во втором состоянии НЧ-АІРс активны, поверхностные молекулы АІРс находятся в ортоположении (флотируют перпендикулярно поверхности НЧ-АІРс). Одной связью поверхностные молекулы держатся за поверхность наночастицы, другой соединяются с биоорганическими молекулами ковалентной связью. В этом случае время затухания флуоресценции составляет 0,5–4,5 пс. При этом, если на эту пару подать энергию, достаточную для активации фотодинамической реакции, то в кинетике флуоресценции появится третья компонента времени жизни, длительность которой будет порядка 1 нс. Этот эффект примечателен тем, что таким образом НЧ могут дезактивировать активность макрофагов.

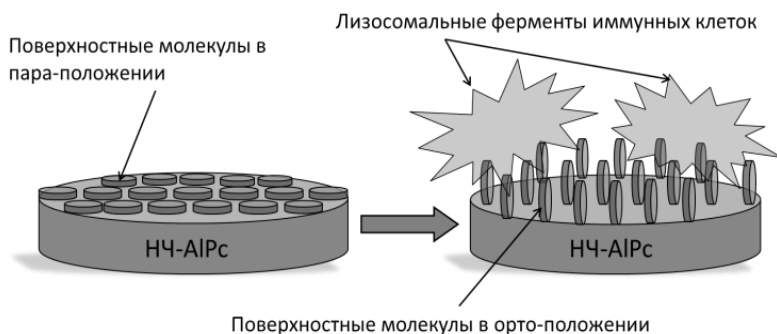


Рисунок 9. Модель перехода НЧ-АІРс в «активное» флуоресцирующее состояние.

Чтобы подтвердить гипотезу и исключить появление дополнительных экспонент за счет уширения при распространении в тканях, проведено теоретический моделирование. В параграфе 3.5 приведены результаты сравнения теоретических расчетов и экспериментальных значений изменения временных характеристик лазерного импульса и флуоресценции при распространении света в ткани. Показана корреляция рассчитанных методом

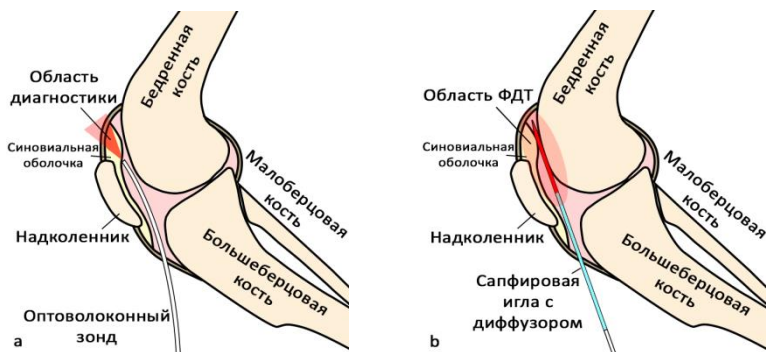


Рисунок 10. Схема проведения внутрисуставной ФД (а) и ФДТ (б).

Монте-Карло значений уширения спектра по времени и регистрируемых экспериментальных данных.

Четвертая глава посвящена исследованию возможности использования наночастиц фталоцианина алюминия (НЧ-АІРс) в качестве нового фотосенсибилизатора для клинических применений. Параграф 4.1 посвящен оценке возможности применения наночастиц фталоцианина алюминия для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии заболеваний крупных суставов, а также продемонстрированы новые методы и волоконно-оптические инструменты для флуоресцентного контроля за фотодинамической терапией артрозов крупных суставов *in vivo* на экспериментальных животных (рисунок 10).

Показано увеличение интенсивности флуоресценции фталоцианина алюминия в патологически измененной ткани сустава, что может быть

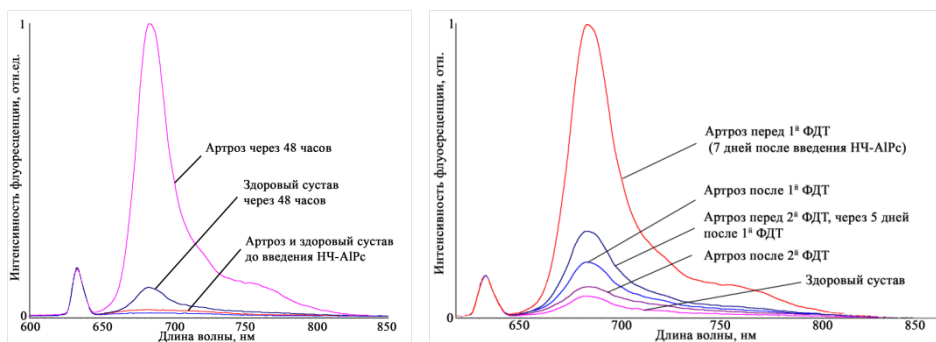


Рисунок 11. Слева спектры флуоресценции, измеренные в здоровом суставе и суставе с артрозом до и через 48 часов после введения НЧ-АІРс. Справа изменение интенсивности флуоресценции после проведения ФДТ.

использовано для диагностики воспалительных заболеваний суставов (рисунок 11). Также показано, что НЧ-АІРС могут являться более эффективным и безопасным ФС для ФД и ФДТ по сравнению с водорастворимыми молекулярными ФС.

В параграфе 4.2 описан новый спектроскопический метод оценки неоангиогенеза при приживлении кожных трансплантатов с применением НЧ-АІРС. Экспериментально исследована возможность использования НЧ-АІРС для диагностики и терапии патологических состояний при воспалительных реакциях организма при трансплантации кожи. Оптимизированы концентрации НЧ-АІРС, дозы и мощности облучения, диапазон изменения контролируемых спектрально-флуоресцентных параметров, отвечающих за эффективность применения фотодинамической терапии или других альтернативных методов лечения.

Также был разработан и экспериментально апробирован макет приборного комплекса неинвазивной спектроскопической оценки состояния кожного покрова и степени приживления трансплантируемых тканей. Конструкция приборного комплекса такова, что несколько взаимодополняющих методик при помощи спектрально-люминесцентных методов позволяют регистрировать и обрабатывать информацию об уровне оксигенации гемоглобина в микроциркуляторном русле ткани; уровне кровенаполненности; скорости кровотока и лимфотока, внутриклеточном метаболизме и типе клеточного дыхания (аэробное/анаэробное). Таким образом, разработанный в ходе исследования макет приборного комплекса дает возможность фиксировать и оценивать все вышеперечисленные параметры, отвечающие за степень приживления тканей, что позволяет неинвазивно получить максимально полную картину о процессах, происходящих в слоях биологической ткани на глубине в несколько миллиметров. Поэтапная комбинированная оценка сразу нескольких параметров в совокупности представляет собой уникальную методику оценки состояния трансплантируемых тканей.

Параграф 4.3 посвящен разработке методов и инструментария для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии атеросклероза

крупных сосудов, а также профилактике при стентировании. С целью реализации методик разработана и экспериментально апробирована серия ангиоскопических волоконно-оптических баллонных катетеров для доставки лазерного и приема флуоресцентного излучения. Показана хорошая корреляция результатов, полученных при помощи баллонных катетеров, с данными, полученными при помощи ранее существующих устройств. Доказана возможность применения ФДТ для профилактики и лечения атеросклероза: выявлен регресс атеросклеротических поражений облученных участков сосуда по сравнению с необлученными (контрольными) участками. Также показана эффективность ФДТ для предотвращения развития рестеноза после установки стента.

В Заключение сформулированы основные результаты работы.

1. Сформулирована гипотеза, которая наиболее полно отражает экспериментальные данные (включая рентгеноструктурные, спектрально-флуоресцентные, спектрально-кинетические), устанавливает природу изменения флуоресцентных свойств кристаллических НЧ-АІРс при взаимодействии с микроокружением и заключается в изменении пространственного расположения поверхностных молекул НЧ и их переход во флуоресцирующее и фотодинамически активное состояние.
2. Методами лазерной флуоресцентной времяразрешенной спектроскопии установлены динамические зависимости изменения интенсивности, длины волны и времени жизни флуоресценции (в пико- и наносекундном диапазонах) НЧ-АІРс при различных типах лазерного возбуждения и микроокружения.
3. Для экстраполяции методики на биологические ткани с отличающимися от кожи оптическими характеристиками разработана модель, описывающая уширение по времени спектрального сигнала при распространении света в тканях.
4. Разработаны методика и исследовательский комплекс, базирующийся на лазерно-спектроскопических приборах и волоконно-оптических инструментах, для экспериментальной апробации НЧ-АІРс для

фототераностики воспалительных заболеваний на биологических фантомах, на клеточных культурах и на экспериментальных животных.

5. Экспериментально исследована возможность использования НЧ для диагностики и терапии патологических состояний при воспалительных реакциях организма при трансплантации органов и воспалительных заболеваниях опорно-двигательного аппарата. Оптимизированы концентрации НЧ-АИРС, дозы и мощности облучения, диапазон изменения контролируемых спектрально-флуоресцентных параметров, отвечающих за эффективность применения фотодинамической терапии или других альтернативных методов лечения.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) Ryabova A.V., Keevend K., Tsolaki E., Bertazzo S., Pominova D.V., Romanishkin I.D., Grachev P.V., Makarov V.I., Burmistrov I.A., Vanetsev A.S., Orlovskaya E.O., Baranchikov A.E., Sildos I., Sammelselg V., Loschenov V.B., Orlovskii Y.V. Visualization of Nd³⁺-doped LaF₃ nanoparticles for near infrared bioimaging via upconversion luminescence at multiphoton excitation microscopy // Biomedical Photonics. – 2018. – Т. 7. – №. 1. – С. 4-12.
- 2) Romanishkin I.D., Pominova D.V., Grachev P.V., Makarov V.I., Vanetsev A.S., Orlovskaya E.O., Baranchikov A.E., Sildos I., Loschenov V.B., Orlovskii Y.V., Ryabova A.V. Noninvasive estimation of the local temperature of biotissues heating under the action of laser irradiation from the luminescence spectra of Nd³⁺ ions // Biomedical Photonics. – 2018. – Т. 7. – №. 2. – С. 25-36.
- 3) Shiryaev A.A., Musayev G.Kh., Loschenov M.V., Borodkin A.V., Levkin V.V., Okhotnikova N.L., Volkov V.V., Makarov V.I., Loschenov V.B. Fluorescence diagnosis and photodynamic therapy in combined treatment of cholangiocarcinoma // Biomedical Photonics. – 2017. – Т. 5. – №. 4. – С. 15-24.
- 4) Zharova T.A., Ivannikov S.V., Tonenkov A.M., Stranadko E.Ph., Semenova L. A., Smorchkov M.M., **Makarov V.I.**, Romanishkin I.D., Ryabova A.V., Loschenov V.B. Gonarthrititis photodynamic therapy with chlorin e6 derivatives // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2016. – Т. 15. – С. 88-93.
- 5) Bystrov F.G., **Makarov V.I.**, Pominova D.V., Ryabova A.V., Loschenov, V.B. Analysis of photoluminescence decay kinetics of aluminum phthalocyanine nanoparticles interacting with immune cells // Biomedical Photonics. – 2016. – Т. 5. – №. 1. – С. 3-8.

- 6) **Makarov V.I.**, Akhlyustina E.V., Farrakhova D.S., Pominova D.V., Ryabova A.V., Loschenov V.B. Photonic methods for quality evaluation of skin engraftment // *Biomedical Photonics*. – 2016. – Т. 5. – №. 3. – С. 30-40.
- 7) Бокерия Л.А., Городков А.Ю., Тарарак Э.М., Кузьмин С.Г., Лощенко В.Б., Шараев П.И., Коротаева А.А., **Макаров В.И.**, Крестинич И.М., Жоржوليани Ш.Т., Цыганков Ю.М. Разработка эндоваскулярных методов фотодинамической терапии на кроликах с экспериментальным атеросклерозом и стенозированием артерий в местах установки стентов // *Клиническая физиология кровообращения*. – 2015. – №. 1. – С. 53-63.
- 8) **Makarov V.I.**, Vasil'chenko S.Yu., Ryabova A.V., Konov V.I., Shevchenko E.N., Lukyanets E.A., Ermakov A.E., Loschenov V.B. Photodynamic effect of iron (III) oxide nanoparticles coated with zinc phthalocyanine // *Russian Journal of General Chemistry*. – 2015. – Т. 85. – №. 1. – С. 338-340.
- 9) **Makarov V.I.**, Vasil'chenko S.Y., Ryabova A.V., Loschenov V.B. Use of optical-spectral methods for in vivo noninvasive assessment of nanoparticles accumulation in biological tissues // *Russian Journal of General Chemistry*. – 2015. – Т. 85. – №. 1. – С. 341-345.
- 10) **Макаров В.И.**, Бородин А.В., Лощенко М.В., Николенко В.Н., Жарова Т.А., Иванников С.В., Лощенко В.Б. Флуоресцентные методы контроля фотодинамической терапии артрозов с применением наночастиц фталоцианина алюминия (экспериментальное исследование) // *Российский химический журнал*. – 2013. – Т. 57. – №. 5-выпуск 2. – С. 35-38.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ДОКЛАДОВ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

- 1) Farrakhova D., Borodkin A., **Makarov V.I.** The concept of the portable spectrometer for fast assessment of skin engraftment via exogenous and endogenous fluorophores // *Optical Instrument Science, Technology, and Applications*. – International Society for Optics and Photonics, 2018. – Т. 10695. – С. 106950P.
- 2) **Makarov V.I.**, Pominova D.V., Ryabova A.V., Saveleva T.A., Ignateva I.V., Reshetov I.V., Loschenov V.B. Multispectral imaging technique for skin grafts' functional state assessment // *Unconventional Optical Imaging*. – International Society for Optics and Photonics, 2018. – Т. 10677. – С. 1067734.
- 3) Фаррахова Д.С., **Макаров В.И.**, Лощенко В.Б. Оценка приживления кожных трансплантатов с использованием наночастиц фталоцианина алюминия и индоцианина зеленого методами лазерной спектроскопии // VI Международная конференция по фотонике и информационной оптике. – 2017. – С. 536-537.

- 4) **Макаров В.И.**, Поминова Д.В., Холодцова М.Н., Рябова А.В., Лощенов В.Б. Спектроскопический метод оценки приживления кожных трансплантатов с применением наночастиц фталоцианина алюминия спектрально чувствительных к воспалительным реакциям // *Biomedical Photonics*. – 2016. – №. S1. – С. 8-9.
- 5) Быстров Ф.Г., **Макаров В.И.**, Лощенов В.Б. Исследование кинетики фотолюминесценции наночастиц фталоцианина алюминия в пико- и наносекундном диапазоне в зависимости от pH и при взаимодействии с иммунокомпетентными клетками // V Международная конференция по фотонике и информационной оптике. – 2016. – С. 89-90.
- 6) Жарова Т.А., Иванников С.В., Лощенов В.Б., Рябова А.В., **Макаров В.И.** ФДТ артрозов и артритов // *Biomedical Photonics*. – 2016. – №. S1. – С. 25-26.
- 7) Фаррахова Д.С., Ахлюстина Е.В., **Макаров В.И.**, Поминова Д.В. Исследование изменения флуоресцентных свойств наночастиц фталоцианина алюминия в приживляемых тканях при перекрестной трансплантации кожи мышей // *Biomedical Photonics*. – 2016. – №. S1. – С. 7-8.
- 8) Кузнецова Ю.О., **Макаров В.И.** Применение нанофотосенсибилизатора (наночастиц фталоцианина алюминия) для ранней диагностики и профилактики воспалительных заболеваний // V Международная конференция по фотонике и информационной оптике. – 2016. – С. 87-88.
- 9) **Makarov V.I.**, Ryabova A.V., Pominova D.V., Zharova T.A., Ivannikov S.V., Steiner R., Loschenov V.B. Aluminum phthalocyanine crystal nanoparticles for fluorescence diagnosis and photodynamic therapy // *International Conference on Advanced Laser Technologies (ALT)*, 6 - 10 October 2014, Cassis, France.
- 10) **Макаров, В.И.** Динамика изменения флуоресцентных свойств наночастиц фталоцианина алюминия в биотканях суставов при артрозах (экспериментальное исследование) // III Международная молодежная научная школа-конференция «Современные проблемы физики и технологий», 10-13 апреля 2014 г, Москва.