

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук  
Центр естественно-научных исследований

На правах рукописи

Макаров Владимир Игоревич

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

Специальность: 01.04.21 – Лазерная физика

Диссертация на соискание ученой степени кандидата

Физико-математических наук

Научный руководитель:

д.ф.-м.н. Лощенов Виктор Борисович

Москва – 2018

## Оглавление

Оглавление .....	2
Список сокращений .....	5
Введение.....	6
Актуальность диссертационной работы .....	6
Цель и задачи исследований .....	6
Научная новизна.....	7
Научно-практическая значимость работы .....	7
Положения, выносимые на защиту .....	8
Обоснованность и достоверность полученных результатов.....	8
Апробация работы.....	8
Личный вклад автора .....	11
Гранты .....	11
Благодарности.....	11
Структура и объем диссертации .....	12
ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. СПЕТРАЛЬНО- ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ФТАЛОЦИАНИНОВ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ И НАНОФОРМАХ.....	13
1.1. Структура и спектроскопические свойства молекул фталоцианинов в растворах.....	13
1.2. Фотодинамический эффект и генерация синглетного кислорода молекулярных фталоцианинов при лазерном воздействии в биологических средах. ....	21
1.3. Недостатки применения молекулярных форм фотосенсибилизаторов в клинической практике. ....	30
1.4. Структура и спектроскопические свойства нанокристаллических фталоцианинов.....	32
1.5. Современное состояние исследований в области наночастиц фталоцианинов. ....	39
Заключение по главе 1. ....	42
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И АППАРАТУРА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ. ....	44
2.1. Создание коллоидных растворов молекулярных НЧ-АІРс и их характеристика по размерам, кристаллической структуре, спектрам поглощения, рассеяния, фотолюминесценции.....	44
2.2. Используемая (серийная) научно-исследовательская аппаратура. ....	50
2.2.1. Установка лазерная электронно-спектральная ЛЭСА-01- «БИОСПЕК» .....	50
2.2.2. Спектрометр динамического рассеяния света Photocor Complex (Photocor, Россия) для определения гидродинамических размеров наночастиц в водных коллоидах. ....	52

2.2.3. Лазерный сканирующий микроскоп. ....	52
2.3 Разработанный лазерный спектроскопический комплекс с пикосекундным разрешением на основе стрик-камеры C10627-13 Hamamatsu Photonics.....	53
2.4 Методы расчета изменения временных характеристик лазерного импульса и флуоресценции при распространении света в ткани. ....	58
2.5. Разработанный лазерный спектроскопический комплекс для оценки состояния биологических тканей с НЧ АІРс . ....	61
2.5.1.Метод оценки степени оксигенации и уровня кровенаполненности кожных трансплантатов в процессе их приживления. ....	62
2.5.2. Метод оценки типа дыхания клеток приживляемых трансплантатов (аэробное/анаэробное) по измерению спектров люминесценции окисленной и восстановленной формы NADH. ....	64
2.5.3. Метод видеофлуоресцентного цифрового анализа динамики приживления трансплантатов в красном и ближнем инфракрасном диапазоне спектра с применением одновременно наночастиц фталоцианина алюминия и индоцианина зеленого, позволяющий одновременно измерять динамику кровотока и лимфотока, как в трансплантируемой ткани, так и в нижележащих слоях. ....	64
2.6. Волоконно-оптические инструменты для лазерной флуоресцентной диагностики и лазерной фотодинамической терапии крупных сосудов и для внутрисуставного использования.....	67
<b>ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИЗМЕНЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ СВОЙСТВ НЧ-АІРс В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МИКРООКРУЖЕНИЯ. ....</b>	<b>71</b>
3.1. Динамика изменения интенсивности, длины волны и времени жизни флуоресценции НЧ-АІРс в модельных системах. ....	71
3.2. Исследование внутриклеточного накопления, локализации и динамики изменения спектральных свойств НЧ-АІРс в клеточных культурах.....	78
3.3. Оценка квантового выхода флуоресценции и эффективности генерации синглетного кислорода при селективном лазерном возбуждении. Оценка эффективности генерации синглетного кислорода в модельных системах и клеточных культурах. ....	86
3.4 Исследование фазового состояния НЧ-АІРс внутри клеток. ....	98
3.5 Результаты сравнения теоретических расчетов и экспериментальных значений изменения временных характеристик лазерного импульса и флуоресценции при распространении света в ткани. ....	102
Заключение по главе 3. ....	105

ГЛАВА 4. ПРИМЕНЕНИЕ НЧ-АІРС, ЛАЗЕРНО-СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЙ АППАРАТУРЫ, ИНСТРУМЕНТОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДИАГНОСТИКИ, ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ.....	106
4.1. Флуоресцентные методы контроля фотодинамической терапии артрозов с применением наночастиц фталоцианина алюминия в эксперименте. ....	106
4.2. Спектроскопический метод оценки неоангиогенеза при приживлении кожных трансплантатов с применением НЧ-АІРС.....	110
4.3. Метод внутрисосудистой флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии атеросклеротических бляшек. ....	122
Заключение по главе 4. ....	125
ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ .....	127
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	128

**Список сокращений**

НЧ – наночастица

Рс – фталоцианин; AlPc –фталоцианин алюминия; MPc – металлокомплекс фталоцианина

Фс (Ps) – фотосенсибилизатор

НФс – нанофотосенсибилизатор

ФД – флуоресцентная диагностика

ФДТ – фотодинамическая терапия

ОДР – обратное диффузное рассеяние

DMCO – диметилсульфоксид

IC – внутренняя конверсия (internal conversion)

ISC – интеркомбинационная конверсия (intersystem crossing)

MPT – магниторезонансная томография

КТ – компьютерная томография

LSM – лазерная сканирующая микроскопия (Laser Scanning Microscopy)

КВСЕФ – Коррелированный по времени счёт единичных фотонов

РФА – рентгенофазовый анализ

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

УЗД – ультразвуковое диспергирование

НАД – никотинамидадениндинуклеотид

ICG – индоцианин зеленый

АСБ – атеросклеротическая бляшка

ТНР-1 – культура клеток моноцитов человека

С6 – культура клеток мезинхимальных фибробластов, полученных из кожи человека

HeLa – линия «бессмертных» клеток, из раковой опухоли шейки матки

## **Введение.**

### **Актуальность диссертационной работы**

Флуоресцентная диагностика и неинвазивная терапия онкологических и воспалительных заболеваний при возбуждении светом фоточувствительных соединений (фотосенсибилизаторов) являются прецизионным инструментом современной медицины. Применение фотосенсибилизаторов в форме наночастиц позволяет устранить недостатки применения молекулярных растворов фотосенсибилизаторов, сохранив при этом все положительные возможности данного подхода, а также увеличить чувствительность и специфичность оптических методов тераностики. В последнее время в научном сообществе все большее внимание уделяется наночастицам органических молекул: производным хлоринов, порфиринов и фталоцианинов различных металлов. Одними из перспективных для исследования нанофотосенсибилизаторов являются кристаллические наночастицы фталоцианина алюминия (НЧ-АІРс). В кристаллическом виде они не растворимы в воде 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 агентами фототераностики. Ранее, объяснению природы возникновения этих эффектов дано не было, поэтому исследование природы этих явлений актуально. Однако, кроме фундаментальной задачи, существует также и прикладной интерес, заключающийся в возможности применения НЧ-АІРс для диагностики, терапии и профилактики различных воспалительных заболеваний.

### **Цель и задачи исследований**

Целью данной работы являлось выяснение природы изменения люминесцентных свойств кристаллических НЧ-АІРс в зависимости от микроокружения, а также разработка методов исследования и лазерно-спектроскопического комплекса для оценки состояния НЧ-АІРс 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 времязрешенной 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 иммунокомпетентными 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).

### **Научно-практическая значимость работы**

1. Созданный 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 характера 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 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. Разгорание 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 в 637 нм, 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 макрофогоподобных 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.

### **Апробация работы**

По результатам работы опубликовано 13 статей в журналах, в том числе 13, удовлетворяющих требованиям ВАК, 30 тезисов докладов, из них 8 на международных и 22 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.

### Основные доклады 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.** et al. 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.**, Лощенов 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.** и др. 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 рН 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.** и др. 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.

Список основных публикаций по теме диссертации:

- 1) Рябова А. В., Поминова Д. В., Романишкин И. Д., Грачев П. В., **Макаров В. И.**, Бурмистров И. А., Орловский Ю. В. Визуализация наночастиц LaF<sub>3</sub>, допированных Nd<sup>3+</sup>, для биоимиджинга в ближнем инфракрасном диапазоне по ап-конверсионной люминесценции при микроскопии с мультифотонным возбуждением //Biomedical Photonics. – 2018. – Т. 7. – №. 1. – С. 4-12.
- 2) Романишкин И. Д., Поминова Д. В., Грачев П. В., **Макаров В. И.** и др. НЕИНВАЗИВНАЯ ОЦЕНКА ЛОКАЛЬНОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ НАГРЕВА БИОТКАНЕЙ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ ПО СПЕКТРАМ ЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ИОНОВ Nd<sup>3+</sup> //Biomedical Photonics. – 2018. – Т. 7. – №. 2. – С. 25-36.
- 3) Ширяев А. А., ..., **Макаров В.И.** и др. Флуоресцентная диагностика и фотодинамическая терапия в комбинированном лечении холангиоцеллюлярного рака //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. Gonarthrits 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.** et al. Photonic methods for quality evaluation of skin engraftment //Biomedical Photonics. – 2016. – Т. 5. – №. 3. – С. 30-40.
- 7) Бокерия Л. А., ... , **Макаров В.И.** и др. 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.** et al. 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.** et al. 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.** и др. 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.

### **Личный вклад автора**

Автором был проведен критический анализ научной литературы; разработаны методики измерения; создан стенд для количественной оценки энергетического выхода люминесценции с интегрирующей сферой; 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.

### **Гранты**

Работа частично поддержана грантами РФФИ 16-32-00930\_мол-а (Исследование механизма возникновения флуоресценции и фотодинамической активности кристаллических наночастиц фталоцианина алюминия методами пикосекундной спектроскопии), 15-29-04869\_офи-м (Разработка спектроскопического метода оценки неоангиогенеза при приживлении кожных трансплантатов с применением наночастиц спектрально чувствительных к воспалительным реакциям).

### **Благодарности**

Автор благодарит своего научного руководителя Лощенова Виктора Борисовича за неоценимую помощь на всех этапах работы над диссертацией. Автор выражает благодарность всем сотрудникам Лаборатории лазерной биоспектроскопии за полезные дискуссии и дружескую поддержку. Особая благодарность Дарье Поминовой и Анастасии Рябовой за помощь в проведении исследований на клеточных культурах, Павлу Грачеву и Татьяне Савельевой за помощь в разработке методов численного моделирования распространения света в тканях, Игорю Романишкину за помощь в обработке времяразрешенных спектров флуоресценции, Владимиру Владимировичу Волкову за помощь в разработке волоконно-оптического инструментария, а также заведующему лабораторией, профессору Виктору Борисовичу Лощенову, за чуткое руководство и возможность выполнения работы в лаборатории. Автор также благодарит сотрудников ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет) (Иванников Сергей Викторович и Жарова Татьяна Альбертовна) и ФГБУ «НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева» (Городков Александр Юрьевич) Минздрава России за помощь и возможность проведения исследований на лабораторных животных.

**Структура и объем диссертации**

Работа состоит из введения, четырех глав, заключения и списка литературы. Общий объем диссертации - \_\_страницы, включая \_\_ рисунков, \_\_ таблиц и список литературы из \_\_ наименований.

## **ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ. СПЕТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ФТАЛОЦИАНИНОВ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ И НАНОФОРМАХ**

В данной главе рассмотрены основные оптические свойства фталоцианинов в молекулярной и наноформах, а также ключевые различия в их структурных и спектрально-люминесцентных свойствах.

Первый параграф главы посвящен описанию структуры и спектроскопических свойств отдельных молекул фталоцианинов, существующих на сегодняшний день. Во втором параграфе описаны основные факторы, влияющие на фотодинамический эффект и генерацию синглетного кислорода молекулярных растворов фталоцианинов при лазерном воздействии в биологических средах. Третий параграф посвящен развитию нового подхода к повышению чувствительности и специфичности оптических методов тераностики при использовании наночастиц - молекулярных нанокристаллов, структурными компонентами которых являются органические молекулы фталоцианинов, общепризнанных фотосенсибилизаторов. В четвертом и пятом параграфах описаны основные недостатки применения молекулярных форм фталоцианинов в клинической практике и приведен обзор современного состояния исследований и обзор перспектив практического применения нанокристаллических фталоцианинов в областях биофотоники.

### **1.1. Структура и спектроскопические свойства молекул фталоцианинов в растворах**

На сегодняшний день, неоспорима значимость и важность тетрапиррольных макроциклов в природе. Такие соединения как гем и хлорофилл играют важнейшую роль в биологических системах. Гем входит в состав гемоглобина, который осуществляет доставку кислорода в клетки. При участии хлорофилла в растениях происходит процесс фотосинтеза - превращения света в полезную энергию в растениях. Хлорофилл – основная молекула в реакции фотосинтеза, которая является главным средством ввода неорганического углерода в биологический цикл. Весь свободный кислород атмосферы — биогенного происхождения и является побочным продуктом фотосинтеза. Другие соединения участвуют в переносе электронов в митохондриях и защите клеток от окислительных повреждений. Уникальные физические, химические и оптические свойства этого класса соединений, наряду с разнообразием в их структурных особенностях, являются ключевыми факторами, определяющими их важность и полезность во внушительном списке потенциальных применений. Синтетические тетрапиррольные соединения, такие как фталоцианины (Рисунок 1), были предложены в качестве удобных молекулярных моделей для исследования физико-химических свойств встречающихся в природе тетрапиррольных макроциклов, в том числе, из-за их структурного сходства. Однако благодаря их более высокой стабильности,

лучшим спектральным характеристикам, разнообразным координационным свойствам и архитектурной гибкости, фталоцианины превосходят порфирины в ряде применений, а их огромный потенциал в различных областях делает их одним из наиболее изученных макроциклических и координационных соединений.

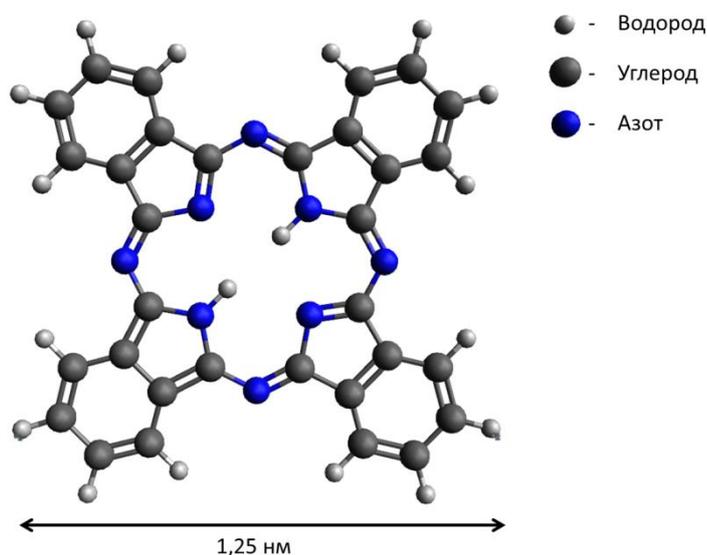


Рисунок 1. Основной фталоцианиновый макроцикл.

С момента открытия и идентификации в начале 1900-х годов [1,2] фталоцианины широко используются в качестве красителей и пигментов в лакокрасочной, полиграфической, текстильной и бумажной промышленности из-за их насыщенного и яркого сине-зеленого цвета, фотостабильности, нерастворимости в большинстве растворителей и химической инертности. Например, фталоцианин меди, на сегодняшний день, является самым широко используемым синтетическим красителем. Также фталоцианины применяются в качестве катализаторов во множестве химических реакций [3; 4]. Например, Рс – это единственное тетрапиррольное соединение, используемое в качестве промышленного катализатора для окисления соединений серы в бензиновых фракциях [4;5;6.]. В последнее время фталоцианины нашли широкое применение в таких наукоемких технологиях как фотопечать [7;8], производстве химических сенсоров [9;10;11], электрохромизме [12], молекулярных металлах [13], жидких кристаллах [11], пленках Ленгмюра-Блоджетт [14], полупроводниках [15], а также в качестве фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии [16]. Потенциал возможности такого широкого применения фталоцианинов обусловлен их высокой степенью ароматичности, уникальными химической структурой и электронными спектрами.

Хорошо известно, что фталоцианины плохо растворимы в воде, что обусловлено гидрофобностью ароматического ядра и плоским строением молекулы. Растворимость в

большинстве универсальных органических растворителях, таких как сульфолан, диметилсульфоксид (ДМСО) и тетрагидрофуран, невелика и составляет менее 1% по массе. Для увеличения растворимости, к бензольным кольцам на периферии этих макроциклов добавляют ряд функциональных групп. Физические, химические и электронные свойства фталоцианинов также могут быть отрегулированы путем добавления к молекуле подходящих заместителей и функциональных групп. Одним из примеров создания растворимой формы фталоцианинов является сульфирование фталоцианина, которое может быть достигнуто нагреванием фталоцианинового макроцикла в олеуме (20-30% растворе серного ангидрида  $\text{SO}_3$ ) [17].

Как уже было сказано выше, фталоцианины имеют много наукоемких применений. Фталоцианины используются в качестве фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии; в качестве поглотителей света в красной и ближней инфракрасной областях спектра для оптических систем хранения данных; фотопроводниках; в системах искусственного фотосинтеза и солнечных элементах. К настоящему моменту написано много научных трудов, посвященных изучению электронных спектров поглощения фталоцианинов и близким к ним соединениям.

Поглощение молекулой фталоцианина кванта света ультрафиолетового или видимого диапазонов вызывает возбуждение молекулы и ее переход в более высокоэнергетичное состояние. Одним из возбужденных электронных состояний является возбужденное синглетное состояние, когда спины электронов антипараллельны и нет суммарного магнитного момента. Другое возбужденное состояние представляет собой триплетное состояние, в котором спины электронов сонаправлены, что приводит к появлению магнитного момента. Низкоэнергетические состояния с антипараллельными и параллельными спинами называются соответственно низшими возбужденными синглетными ( $S_1$ ) и триплетными ( $T_1$ ) состояниями. Анализируя спектры поглощения и фотолюминесценции, можно оценить энергии этих возбужденных состояний. Энергетическая диаграмма и последовательность дезактивации энергии показаны на Рисунке 2.

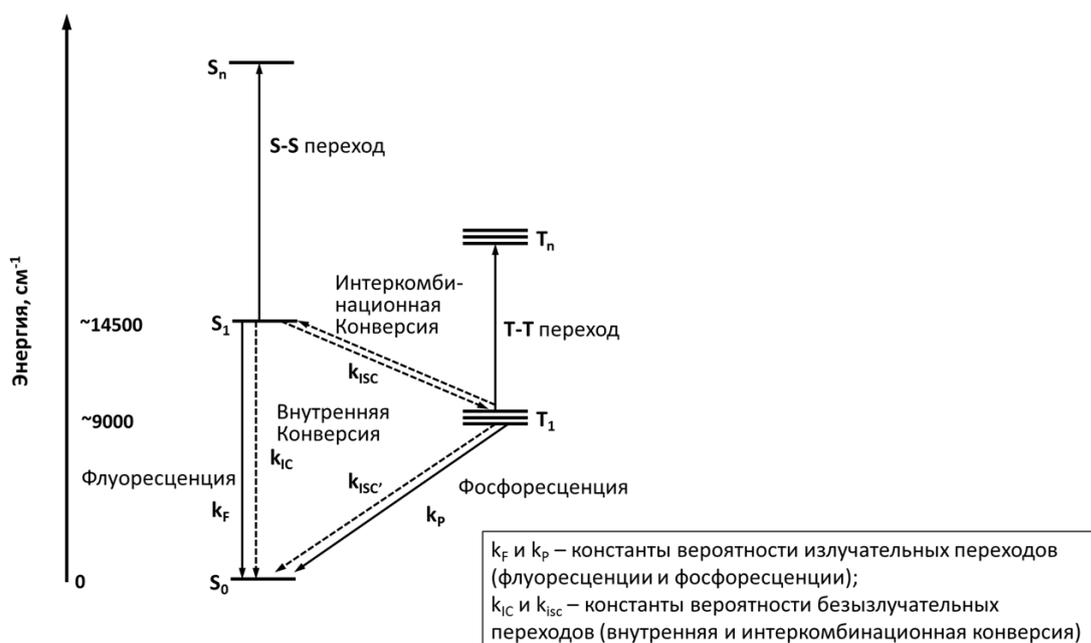


Рисунок 2. Диаграмма энергетических уровней и возможные типы миграции энергии у молекулы фталоцианина.

После фотовозбуждения основные фотофизические процессы можно классифицировать как следующие излучательные и безызлучательные передачи энергии:

1. «Разрешенный» или синглет-синглетный излучательный переход, называемый флуоресценцией ( $S_1 \rightarrow h\nu + S_0$ ), характеризующийся константой вероятности перехода  $k_F$  или временем жизни  $\tau_F$ ;
2. «Запрещенный» или триплет-синглетный излучательный переход, называемый фосфоресценцией ( $T_1 \rightarrow h\nu + S_0$ ), характеризующийся константой вероятности перехода  $k_P$  или временем жизни  $\tau_P$ ;
3. «Разрешенные» безызлучательные переходы между состояниями одного и того же спина, называемые внутренней конверсией, ( $S_1 \rightarrow S_0 + \text{тепло}$ ), характеризующиеся константой скорости внутренней конверсии  $k_{IC}$ ;
4. «Запрещенные» безызлучательные переходы между синглетным состоянием  $S_1$  и синглетным состояниями  $S_0$  через триплет  $T_1$ , называемые интеркомбинационной конверсией ISC ( $S_1 \rightarrow T_1 + \text{тепло}$ ,  $T_1 \rightarrow S_0 + \text{тепло}$ ) характеризующиеся  $k_{ISC}$  ( $k_{ISC}$ ).
5. «Запрещенные» безызлучательные переходы между триплетным  $T_1$  и синглетным состоянием  $S_1$ , происходит с поглощением фонона.

Константа излучательного перехода пропорциональна коэффициенту экстинкции электронного поглощения. Константа безызлучательного перехода связана с эффектом Франка-Кондона перекрытия волновых функций [18]. Динамика состояний  $S_1$  и  $T_1$  характеризуются наблюдаемыми параметрами: временем жизни возбужденных состояний ( $\tau_S$ ,  $\tau_F$ ,  $\tau_T$ ,  $\tau_P$ ),

квантовым выходом фотолюминесценции ( $\Phi_F$ ,  $\Phi_P$ ) и квантовым выходом триплета следующим образом:

$$\tau_S = \tau_F = 1/(k_F + k_{IC} + k_{ISC}) \quad (1)$$

$$\tau_T = \tau_P = 1/(k_P + k_{ISC'}) \quad (2)$$

$$\Phi_F = k_F/(k_F + k_{IC} + k_{ISC}) \quad (3)$$

$$\Phi_T = k_{ISC}/(k_F + k_{IC} + k_{ISC}) \quad (4)$$

$$\Phi_P = \Phi_T \times k_P/(k_P + k_{ISC'}) \quad (5)$$

На практике квантовый выход фотолюминесценции ( $\Phi_F$ ,  $\Phi_P$ ) определяется спектроскопическими измерениями в стационарном режиме. Времена жизни возбужденных состояний ( $\tau_S$ ,  $\tau_F$ ,  $\tau_T$ ,  $\tau_P$ ) измеряются методами времязрешенной спектроскопии. Время жизни состояния  $S_1$  ( $\tau_S = \tau_F$ ) может быть определено при помощи времязрешенной спектроскопии поглощения (переход с  $S_1$  на более высокоэнергетическое состояние  $S_n$ ) или флуоресценции (переход  $S_1 \rightarrow S_0$ ). Аналогично, время жизни состояния  $T_1$  ( $\tau_T = \tau_P$ ) также получают методами времязрешенной спектроскопии поглощения (переход  $T_1 \rightarrow T_n$ ), или фосфоресценции (переход  $T_1 \rightarrow S_0$ ) [18].

Типичный спектр поглощения раствора сульфированного фталоцианина алюминия (от ди- до тетразамещенного) представлен на Рисунок 3. Интенсивное поглощение электронных переходов на состояния  $S_1$  и  $S_2$  называют полосами Q и B (полоса Core). У фталоцианинов состояния  $S_2$ ,  $S_1$ , и  $T_1$  соответствуют  $\sim 27000 \text{ см}^{-1}$  (370 нм),  $\sim 14500 \text{ см}^{-1}$  (690 нм) и  $\sim 9000 \text{ см}^{-1}$  (1100 нм) соответственно.

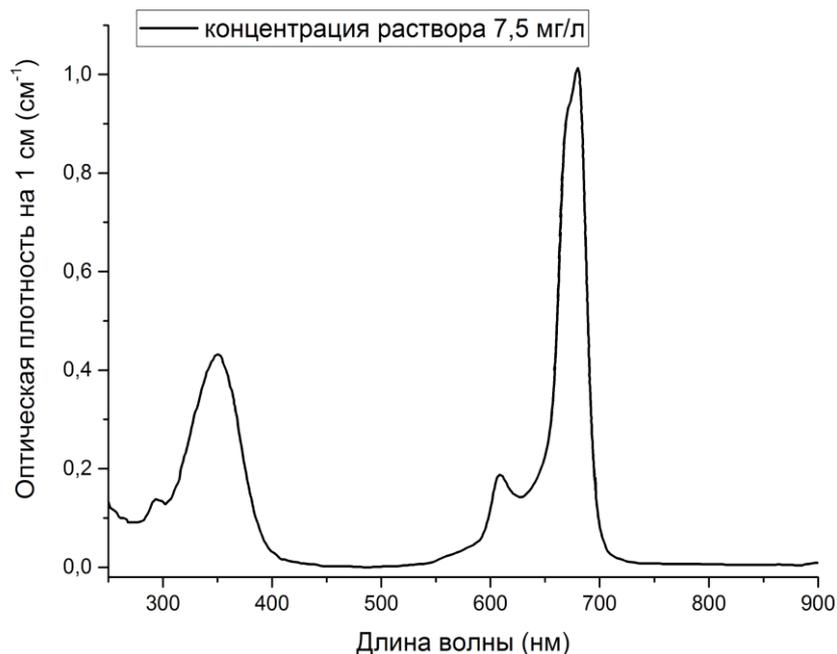


Рисунок 3. Спектр поглощения водного раствора сульфированного фталоцианина алюминия (от ди- до тетра-замещенного) с концентрацией 7,5 мг/л.

На Рисунке 4 представлены типичные спектры флуоресценции и спектры возбуждения флуоресценции фталоцианина цинка в толуене. Пик флуоресценции фталоцианиновых комплексов расположен вблизи  $\lambda \approx 700$  нм. Стоксов сдвиг незначителен, так как координационные сдвиги атомных координат фталоцианинов при возбуждении довольно малы. Интенсивная флуоресценция Q-полосы обусловлена большой величиной дипольного момента и, как следствие, большим значением константы перехода  $k_F$ . Для металлокомплексов MPcs (M=Mg, AlCl, GaCl, Cd и InCl), величина  $k_F$  составляет порядка  $7,7-9,1 \times 10^7 \text{ с}^{-1}$ , [19; 20], что указывает на то, что  $k_F$  незначительно зависит от типа центрального атома. Основным безызлучательным путем перехода молекулы из  $S_1$  состояния в  $T_1$  является интеркомбинационная конверсия, в то время как внутренняя конверсия при переходе  $S_1 \rightarrow S_0$  гораздо менее вероятна. Так как интеркомбинационная конверсия осуществляется за счет спин-орбитального взаимодействия с центральным атомом, то и флуоресцентные свойства фталоцианинов определяются типом центрального атома.

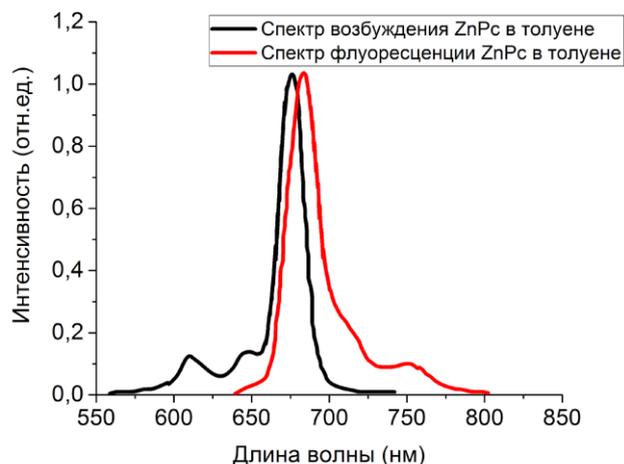


Рисунок 4. Спектры флуоресценции и спектры возбуждения флуоресценции ZnPc в толуене.

Например, когда центральный атом принадлежит первому, второму или периоду в периодической таблице Менделеева ( $H_2$ , Mg, Al или Si), то значения времени жизни флуоресценции достаточно велики (3,8-9,0 нс), а величина квантового выхода достаточно высокая (0,57-0,85) [21; 22]. С другой стороны, для металлов из более высоких периодов время жизни и квантовый выход флуоресценции снижаются. Так, для Zn и Ga эти величины составляют 3,1-4,7 нс и 0,3-0,37 соответственно [23]. А для таких атомов как Cd, In и Sb времена жизни флуоресценции составляют порядка 0,37-0,60 нс, а квантовый выход всего 0,03-0,08 [24]. И хотя для таких элементов как Ge и Sn были зафиксированы достаточно высокие величины квантового выхода флуоресценции, но все же они также снижаются от Ge к Sn [25]. Такие различия обусловлены особенностями интеркомбинационной конверсии, вызванной спин-орбитальным взаимодействием с центральным атомом, механизм которого будет описан далее.

Фосфоресценция комплексов фталоцианинов наблюдается в области  $\sim 1100$  нм. Квантовый выход фосфоресценции для фталоцианинов с такими центральными атомами как Mg, Zn или Cd очень низка ( $\Phi_p = 5 \times 10^{-6} \sim 6 \times 10^{-4}$ ) [26] по сравнению с интенсивной фосфоресценцией элементами платиновой группы, которую можно наблюдать даже при комнатной температуре.

Времяразрешенная спектроскопия поглощения – это метод, который может быть использован для исследования динамики миграции энергии с возбужденного триплетного состояния нефосфоресцирующих комплексов MePcs, а также для изучения динамики сверхбыстрого возбужденного состояния. Howe и Zhang в своей работе [27] исследовали фотофизические свойства  $H_2PcS_4$  и  $ZnPcS_4$  методами времяразрешенной спектроскопии поглощения. После возбуждения молекулы в  $S_2$  состояние (150 фс, 390 нм), кинетика релаксации хорошо описывается двухэкспоненциальной функцией с быстрой и медленной

компонентами. Быстрая компонента одинакова для обоих соединений ( $10 \pm 4$  пс), в то время как длинная компонента релаксации составляет порядка 370 пс для  $H_2PcS_4$  и 460 пс для  $ZnPcS_4$ . Эти временные профили релаксации могут быть проанализированы с использованием простой кинетической модели трех состояний следующим образом:



Быстрый переход (10 пс) объясняется конверсией  $S_2 \rightarrow S_1$ , возможно, с участием колебательной релаксации в состоянии  $S_1$ . Времена жизни состояния  $S_1$  для  $H_2PcS_4$  и  $ZnPcS_4$  составляют 130 и 160 пс соответственно. Этот переход возможен тремя различными путями: с испусканием фотона, путем внутренней конверсии  $S_1 \rightarrow S_0$ , а также путем интрекомбинационной конверсии  $S_1 \rightarrow T_1$ .

В качестве примера дифференциальный спектр поглощения  $SitVPc(OH)_2$  [18] приведен на Рисунке 5, где отчетливо видно уменьшение поглощения Q-полосы и небольшое увеличение триплет-триплетного поглощения около 500 нм. Также было подтверждено, что время перехода с уровня  $T_1$  зависит от начальной заселенности  $T_1$ . При высоких заселенностях состояния  $T_1$ , кинетика уменьшения поглощения отклоняется от линейной кинетики, но при низких заселенностях переход описывается линейным законом.

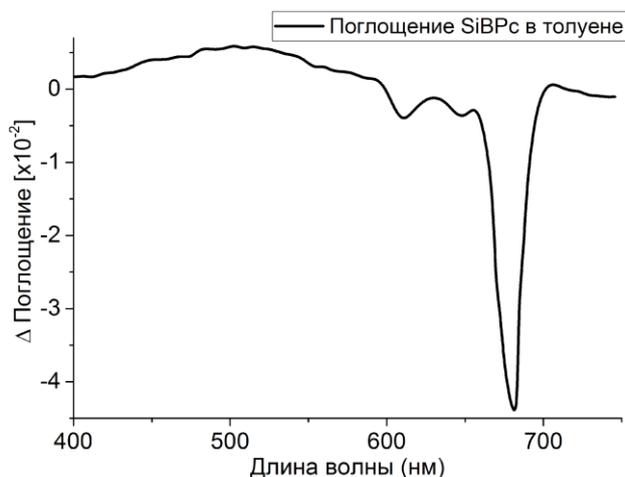


Рисунок 5. Дифференциальный спектр поглощения  $SitVPc(OH)_2$  в толуене. Спектр измерялся через 200 мкс после лазерного возбуждения.

В работе [23] исследовалось влияние галогенирования на фотофизические свойства  $ZnPc$ . Было показано, что галогенирование снижает квантовый выход и время жизни флуоресценции, увеличивает заселенность триплетного уровня и сокращает время жизни триплета. Эти эффекты, возрастающие в порядке  $Cl < Br < I$ , могут быть объяснены теорией спин-орбитального взаимодействия.

В работе Veeby et al. [28] сравнивались фотофизические свойства  $AlPcS_2$  в  $H_2O$  и  $D_2O$ . Было обнаружено, что времена жизни флуоресценции и триплетного состояния в  $D_2O$  (6,8 нс

и 1590 мкс) короче, чем в  $\text{H}_2\text{O}$  (5,1 нс и 600 мкс). В тяжелой воде скорости флуоресценции и интеркомбинационной конверсии остаются такими же, как и в обычной воде, однако скорость внутренней конверсии  $S_1 \rightarrow S_0$  значительно сокращается. Это увеличивает квантовый выход флуоресценции ( $\Phi_F=0,4$  в воде и  $\Phi_F=0,52$  в  $\text{D}_2\text{O}$ ), а также времена жизни  $S_1$  и  $T_1$  энергетических состояний. Этот эффект, где в качестве растворителя применяются разные изотопы, может быть объяснен влиянием аксиального лиганда (ОН). В  $\text{D}_2\text{O}$  нижняя колебательная частота аксиального лиганда приводит к меньшему интегралу колебательного перекрытия волновых функций, а, следовательно, менее энергетически эффективному релаксационному пути. Bishop et al. также изучали динамику возбужденного состояния полностью дейтерированного  $\text{ZnPc-d16}$  [29]. В отличие от  $\text{AlPcS}_2$ , кинетики возбужденного состояния и квантовые выходы дейтерированного  $\text{ZnPc}$  абсолютно такие же, как и для недейтерированного  $\text{ZnPc}$ , что говорит о том, что колебательные моды С-Н в молекуле  $\text{ZnPc}$  несущественно влияют на безызлучательный механизм релаксации энергии с состояний  $S_1$  и  $T_1$ . Этот факт достаточно удивителен, так как считалось, что ангармонические колебания растяжения связи С-Н принимают наибольшее участие в безызлучательных релаксациях энергии в различных углеводородах, в том числе порфиринах. Таким образом, можно предположить, что эффект влияния дейтеризации на безызлучательные процессы релаксации возбужденного состояния фталоцианина зависит от лиганда, растворителя и центрального атома металла.

В комплексах  $\text{SbPc}$  центральный атом  $\text{Sb}$  может быть двух валентностей  $\text{Sb(III)}$  и  $\text{Sb(V)}$  [30; 24]. Флуоресцентные свойства  $\text{Sb(V)Pc}$  ничем не отличаются от свойств других  $\text{MPcs}$ , с другой стороны, комплекс  $\text{Sb(III)Pc}$  не флуоресцирует. Предполагается, что отсутствие флуоресценции данного комплекса связано с переносом заряда от металла к кольцу, как и в соответствующих гиперпорфиринах. Gilat и Ebbesen исследовали динамику возбужденного состояния  $\text{Li}_2\text{Pc}$  и  $\text{LiPc}$  методом времязрешенной спектроскопии поглощения [31]. Свойства возбужденного состояния  $\text{Li}_2\text{Pc}$  ( $\tau_S=5,3$  нс и  $\Phi_F=0,5 \pm 0,1$ ) очень близки к свойствам у других  $\text{MPcs}$ , за исключением довольно высокого квантового выхода триплета ( $\Phi_T=0,5 \pm 0,1$ ). С другой стороны, время жизни нижнего возбужденного состояния у  $\text{LiPc}$  очень короткое ( $=130$  пс). Таким образом, было показано, что парамагнитная конфигурация окисленного лиганда у фталоцианинов приводит к очень короткому времени жизни возбужденного дублета.

## **1.2. Фотодинамический эффект и генерация синглетного кислорода молекулярных фталоцианинов при лазерном воздействии в биологических средах**

Впервые явление, называемое фотодинамическим действием или эффектом на клеточном уровне, наблюдалось студентом Оскаром Рааба и профессором Херманном фон Таппайнера в Мюнхенском Фармакологическом институте, результаты были опубликованы в 1900 г. [32]. При высокой интенсивности света в поле микроскопа, окрашенные акридином или

другими флуоресцирующими красителями клетки парамеции погибали, причем спектр действия этого эффекта соответствовал спектрам поглощения красителей. Таким образом, был обнаружен способ световой регуляции движения и жизнеспособности клеток. Вскоре было показано, что для наблюдения этого эффекта необходим кислород.

Фотодинамический эффект (или фотодинамическое действие) играет важную роль в регуляции метаболизма различных клеток, например зрительных фоторецепторов. В зрительных органах фотодинамическая регуляция метаболических процессов защищает сетчатку и хрусталик от фотоповреждений [33]. В клетках, не имеющих эффективных фоторецепторов, фотодинамическое действие как часть окислительного стресса играет сигнальную функцию, активируя экспрессию генов и синтезируя каскад ферментов, ответственных за защитные реакции клеток. Возможно, именно это и объясняет некоторые из биологических и терапевтических эффектов, вызванных лазерным излучением низкой интенсивности.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) представляет собой фотохимическое воздействие с участием света, фотосенсибилизатора и молекулярного кислорода. ФДТ способна убивать микробные клетки, включая бактерии, грибы и вирусы. ФДТ широко используется для лечения акне, псориаза, атеросклероза, а также вируса герпеса. И конечно, в первую очередь, ФДТ направлена на лечение злокачественных онкологических заболеваний головы и шеи, легких, мочевого пузыря, кожи и др. При ФДТ пациенту вводится светочувствительное вещество-фотосенсибилизатор, обладающее способностью селективно накапливаться в определенных типах ткани (например, активно пролиферирующие клетки, области воспалительных процессов и др.). По прошествии определенного времени необходимого для биораспределения (и/или синтеза) Фс осуществляется облучение пораженной биоткани светом с длиной волны, соответствующей поглощению фотосенсибилизатора. При этом, несмотря на интенсивное поглощение большинства фотосенсибилизаторов на границе ультрафиолет-видимый свет (т.н. полоса Соре), для терапевтического облучения предпочтительнее использовать излучение в красном диапазоне спектра. Это связано со значительно большей глубиной проникновения красного излучения в биоткани (т.н. «окно прозрачности» биоткани, Рисунок 7), что позволяет более глубоко распространить терапевтический процесс.

На Рисунке 6 показаны процессы поглощения света и передачи энергии, лежащие в основе механизма ФДТ. В основном состоянии у фотосенсибилизатора на низкоэнергетической молекулярной орбитали находятся два электрона с противоположными спинами (синглетное состояние). После поглощения света (фотона) молекула фотосенсибилизатора переходит в более высокоэнергетическое состояние с сохранением спинов электронов на внешней орбитали (это первое возбужденное синглетное состояние). Эти короткоживущие (несколько наносекунд

или пикосекунд) состояния могут релаксировать, излучив энергию в виде света (флуоресценции), или путем внутренней конверсии с выделением тепла. Именно этот факт, способности фотосенсибилизаторов флуоресцировать, привел к разработке чувствительных спектроскопических методов количественной оценки концентрации Фс в клетках или тканях, что позволяет методами флуоресцентной визуализации проводить измерения фармакокинетики и распределения Фс у животных и людей *in vivo*. Возбужденное синглетное состояние Фс также может перейти (за счет интеркомбинационной конверсии) в возбужденное долгоживущее (микросекунды или миллисекунды) триплетное состояние, в котором спины электронов параллельны. Длительное время жизни этого состояния объясняется тем, что прямой переход за счет излучения света (фосфоресценции) запрещен правилами отбора.

Возбужденное триплетное состояние Фс может релаксировать двумя способами. Во-первых, в реакции Типа I [33] Фс может провзаимодействовать непосредственно с окружающим субстратом, таким как клеточная мембрана или молекула, и перенести на них протон или электрон с образованием анионного или катионного радикала соответственно. Эти радикалы могут дополнительно взаимодействовать с кислородом с образованием активных форм кислорода (АФК). Во-вторых, в реакции Типа II триплетное состояние Фс может передать свою энергию непосредственно на молекулярный кислород, находящийся в основном триплетном состоянии, с образованием возбужденного синглетного кислорода. Реакции Типа I и Типа II могут происходить одновременно, а соотношение между этими процессами зависит от типа используемого Фс, концентраций субстрата и кислорода. [34].

Реакция по первому типу часто протекает с образованием супероксид аниона путем переноса электрона с триплета Фс на молекулярный кислород (моновалентное восстановление). Сам по себе супероксид не является высоко реакционноспособным в биологических системах и не вызывает значительного окислительного повреждения, но может реагировать сам с собой с образованием перекиси водорода и кислорода – реакция, известная как «дисмутация», которая может быть катализована ферментом (супероксиддисмутазой) [35]. Перекись водорода играет важную роль в биологических системах, поскольку она легко проникает через клеточные мембраны и необходима для функционирования многих ферментов. Супероксид также важен для получения высокоактивного гидроксильного радикала ( $\text{HO}^*$ ), где супероксид действует как восстановитель, а не как окислитель. Супероксид может взаимодействовать с гидроксильным радикалом с образованием синглетного кислорода или с оксидом азота ( $\text{NO}^-$ ) (также радикалом) с образованием пероксинитрита ( $\text{OONO}^-$ ), еще одной высоко активной окислительной молекулы.

Синглетный молекулярный кислород интенсивно исследовался в течение последних нескольких десятилетий, прежде всего в отношении реакций фотосенсибилизации. Синглетный

кислород ( $^1\text{O}_2$ ) – самое низкое возбужденное состояние молекулярного кислорода – на несколько порядков более химически активен, чем кислород в основном триплетном состоянии ( $^3\text{O}_2$ ), и он легко окисляет широкий спектр биологических молекул. Как уже было сказано выше,  $^1\text{O}_2$  очень эффективно генерируется передачей энергии с возбужденного триплетного состояния Фс.

Переход  $^1\text{O}_2 \rightarrow ^3\text{O}_2$  запрещен правилами отбора, поэтому  $^3\text{O}_2$  является относительно долгоживущим состоянием. Если кислород находится в синглетном возбужденном состоянии, то он может вернуться в основное состояние несколькими путями:

- 1) Физическое тушение:  $^1\text{O}_2 + \text{A} \xrightarrow{k_p} ^3\text{O}_2 + \text{A}$ , которое приводит только к дезактивации синглетного кислорода тушителем (A) без расходования  $\text{O}_2$ ;
- 2) Химическое тушение:  $^1\text{O}_2 + \text{A} \xrightarrow{k_c} \text{P}$ , которое приводит к образованию нового продукта (P) при взаимодействии  $^1\text{O}_2$  с тушителем (A).

В научных работах [36; 37] было показано, что многие порфириноподобные соединения обладают возможностью эффективно генерировать синглетный кислород, передавая ему энергию с возбужденного триплетного состояния. Однако во многих случаях они также одновременно являются эффективными тушителями синглетного кислорода. Таким образом, может возникнуть ситуация, когда фотосенсибилизаторы, используемые для генерации синглетного кислорода, сами же и будут его тушить. Данный факт может привести к фотобликингу и фотодеградации Фс.

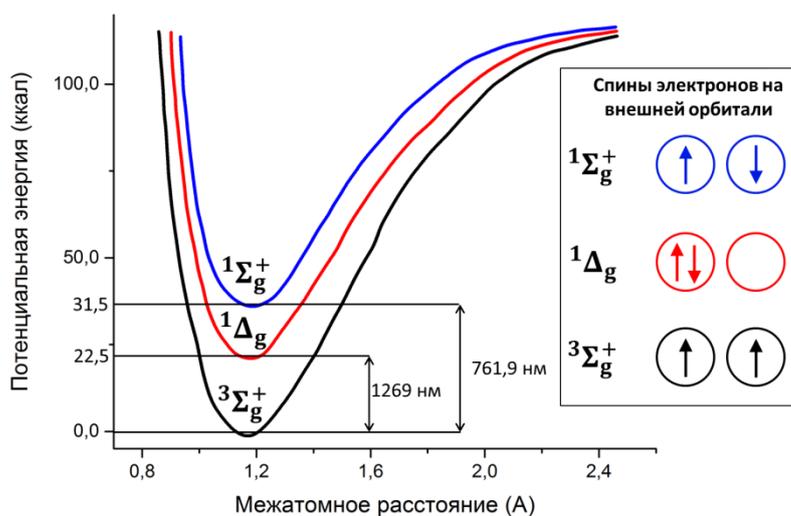


Рисунок 6. Кривые потенциальной энергии для трех наиболее низкоэнергетических состояний молекулярного кислорода.

Существует много известных соединений, способных генерировать  $^1\text{O}_2$ , однако в данной работе будет описан только метод генерации при помощи Фс. Фотосенсибилизированная

генерация – это простой и управляемый способ получения  $^1\text{O}_2$ , для которого требуются только кислород, свет определенной длины волны и Фс, способный поглощать и использовать энергию света для возбуждения молекулярного кислорода в синглетное состояние. Возбуждение Фс обычно достигается посредством перехода при поглощении кванта света ( $h\nu$ ) между основным состоянием  $S_0$  и синглетным возбужденным состоянием  $S_n$  (подробнее механизмы передачи энергии в системе «молекула Фс + кислород» описаны в предыдущем параграфе).

Для эффективной генерации синглетного кислорода сенсibilизатор должен иметь высокий квантовый выход триплетного состояния, достаточно продолжительное время жизни ( $10^{-4}$ - $10^{-2}$  с) и энергию триплетного состояния не ниже  $7900\text{ см}^{-1}$  для возможности передачи энергии возбужденного состояния молекуле кислорода. Квантовый выход генерации синглетного кислорода (или количество молекул синглетного кислорода, образуемых в результате поглощения одной молекулой Фс одного кванта света) является основным параметром при подборе сенсibilизатора. Для самых эффективных Фс квантовый выход генерации синглетного кислорода составляет более 0,5.

Большое значение имеет также наличие интенсивного максимума поглощения Фс в красной и ближней инфракрасной области спектра, где биологические ткани относительно прозрачны, для более полного воздействия на обширные и глубокие опухоли (Рисунок 7).

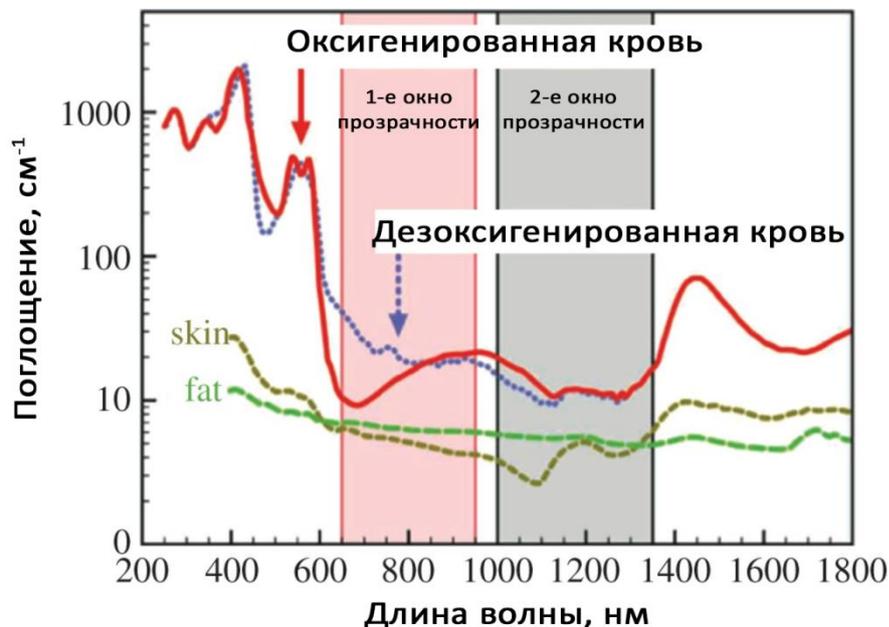
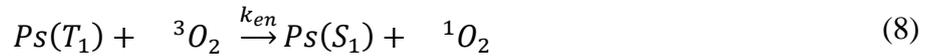


Рисунок 7. Спектральное окно прозрачности для биологических тканей

Как уже было сказано выше, синглетный кислород может образоваться двумя способами по Типу I или Типу II. Механизм Типа I включает в себя абсорбцию атома водорода или передачу электрона от возбужденного Фс к окружающему субстрату, в результате чего

образуются активные радикалы [37]. Эти радикалы могут взаимодействовать с кислородом с образованием активных форм кислорода, например супероксид радикал. В механизме Типа II, синглетный кислород образуется в результате непосредственного взаимодействия Фс и триплетного кислорода.



Каждая молекула Фс обычно может произвести  $10^3 - 10^5$  молекул  ${}^1O_2$  перед деградацией путем фотобличинга или за счет какого-либо другого процесса. Способность фотосенсибилизатора продуцировать синглетный кислород определяется при помощи измерения квантового выхода генерации синглетного кислорода. Квантовый выход синглетного кислорода можно измерить, используя различные фотофизические и фотохимические процессы. С реакциями (8) и (9) конкурируют также и мономолекулярные излучательные и безызлучательные процессы:



Бимолекулярные реакции, такие как физическая дезактивация молекулярным кислородом или электронным переносом, также конкурируют в процессе трансфера энергии:

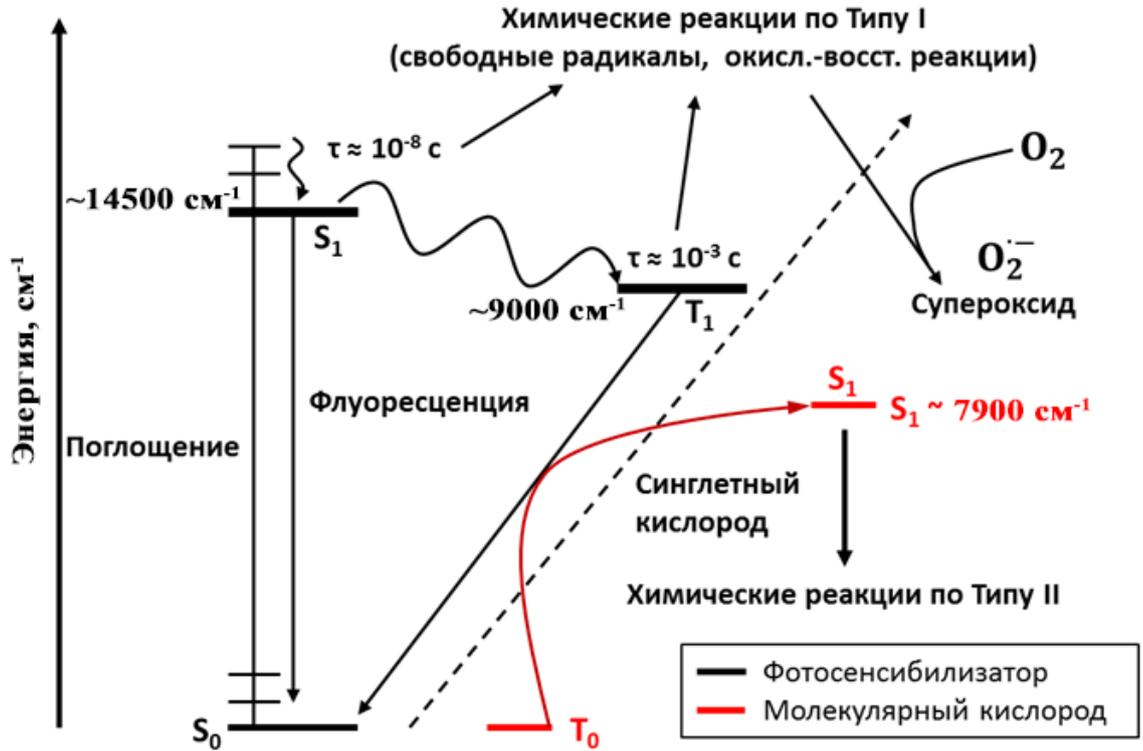


Рисунок 8. Схема миграции энергии в системе фотосенсибилизатор-кислород-биоорганическая молекула.



Исходя из уравнений (7)-(12), квантовый выход генерации синглетного кислорода  $\Phi_{\Delta}$  может быть определен как [38]:

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta} \varphi_{en} = \Phi_T \left( \frac{k_{en}[O_2]}{k_r + k_{nr} + k_q[O_2]} \right) \quad (13)$$

Где  $\Phi_T$  – квантовый выход триплетного состояния;  $\varphi_{en}$  – эффективность передачи энергии;  $k_{en}$  – константа скорости передачи энергии;  $k_q$  – суммарная константа скорости тушения триплетного состояния  $Ps(T_1)$  посредством  $O_2$  ( $k_{en} + k_{dO_2} + k_{et}$ ).

Для измерения квантового выхода генерации синглетного кислорода ( $\Phi_{\Delta}$ ) используются различные методы такие как: прямое измерение люминесценции ( $\lambda \approx 1270$  нм) при релаксации  $^1O_2$  в основное состояние (в стационарном режиме или с разрешением по времени); калориметрические методы (фотоакустическая калориметрия с термическое линзированием с разрешением по времени); количественный анализ реакций фотоокисления по поглощению или флуоресценции зондовой молекулы (используя т.н. кислородные ловушки); и наконец, разработанный в лаборатории лазерной биоспектроскопии ИОФ РАН метод, основанный на

изменении спектра поглощения гемоглобина при его переходе из оксигенированной в дезоксигенированную форму при ФДТ воздействии [39].

В лаборатории лазерной биоспектроскопии ИОФ РАН были проведены многочисленные сравнительные исследования по оценке эффективности генерации синглетного кислорода различными фотосенсибилизаторами (в том числе производных фталоцианинов) в биологических средах при лазерном воздействии с различной длиной волны.

С помощью разработанной системы можно следить за процессом «выгорания» Фс в разных средах, а также измерять зависимость скорости выгорания Фс от насыщенности среды кислородом. Для Фотосенса (коммерческий Фс на основе сульфированного фталоцианина алюминия) в концентрации 10 мг/литр в образце эритроцитарной массы (40%) со степенью оксигенации гемоглобина 80% в физиологическом растворе при плотности мощности облучения 400 мВт/см<sup>2</sup> за время уменьшения степени дезоксигенации до 0% интенсивность флуоресценции уменьшилась до 40% и далее практически не изменялась, что свидетельствует об участии молекулярного кислорода в процессе фотобличинга Фотосенса (Рисунок 9).

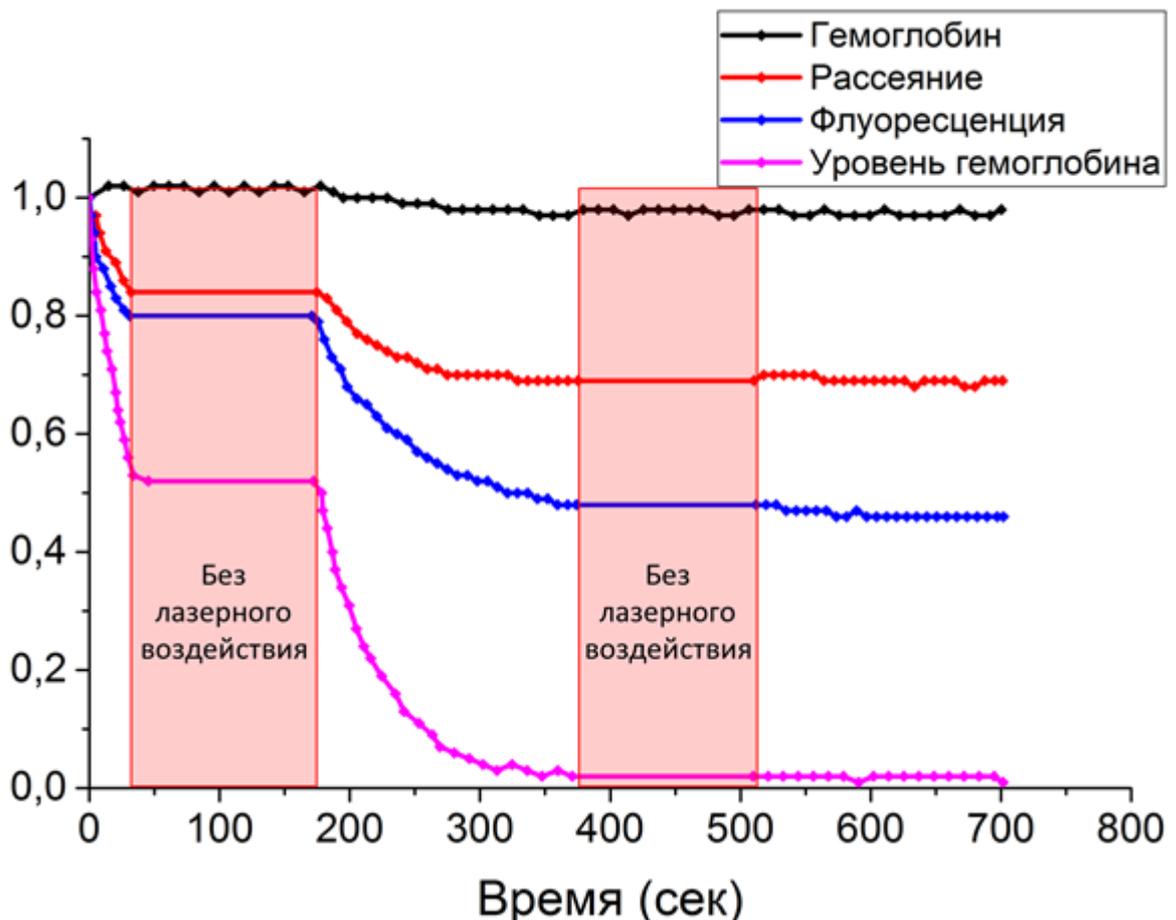


Рисунок 9. Мониторинг основных параметров, характеризующих эффективность лазерного взаимодействия с биологическими объектами, содержащими Фс, в тонком слое эритроцитарной массы (40%) в физиологическом растворе при прерывном режиме облучения. Концентрация Фотосенса в образце составила 10 мг/литр, плотность мощности облучения –

400 мВт/см<sup>2</sup>. Данные каждого измеряемого параметра поделены на свое начальное значение [140].

Во время проведения фотодинамической процедуры важно быть уверенным, является ли лазерное облучение постоянно необходимым фактором, либо какие-то процессы могут быть им запущены и протекать далее независимо. Для этого в ряде экспериментов чередовали включение и выключение лазера при записи динамических кривых процесса ФДТ обработки. Из полученных данных видно, что лазерное облучение является необходимым условием для дезоксигенации образца и фотобличинга Фс. Исключением является процесс гемолиза эритроцитов: начиная с определенного количества повреждений, нанесенных мембранам, гемолиз может протекать и в темноте.

Скорость потребления кислорода при ФДТ, при условии, что сам по себе дефицит кислорода не является лимитирующим фактором, при низкой плотности мощности облучения, когда уменьшение заселения основного уровня Фс незначительно, можно выразить следующим уравнением:

$$\Gamma_{PDT} = \alpha \varphi_{ch} [C] P \quad (14)$$

где  $\Gamma_{PDT}$  – скорость потребления кислорода, измеряемая в моль/литр·с, [C] – концентрация Фс, измеряемая в молях/литр, P – плотность мощности излучения, измеряемая в Вт/см<sup>2</sup>,  $\alpha$  – коэффициент эффективности генерации синглетного кислорода измеряемый в см<sup>2</sup>/Дж,  $\varphi_{ch}$  – квантовый выход химического (необратимого) тушения синглетного кислорода. Реализуется так же механизм физического (обратимого) тушения, во время которого синглетный кислород в результате дезактивации переходит в триплетное состояние, то есть в обычный молекулярный кислород. Коэффициент эффективности генерации синглетного кислорода может быть записан следующим образом:

$$\alpha = \frac{\sigma}{E_{hv}} \varphi_{\Delta} \approx 1,925 \times 10^{-5} \lambda \varepsilon \varphi_{\Delta} \quad (15)$$

где  $\sigma$  – поперечное сечение поглощения молекулы Фс [см<sup>2</sup>],  $E_{hv}$  – энергия фотона [Дж],  $\lambda$  – длина волны облучения [нм],  $\varphi_{\Delta}$  – квантовый выход образования синглетного кислорода,  $\varepsilon$  – коэффициент экстинкции Фс [моль<sup>-1</sup>см<sup>-1</sup>]. Величина  $\alpha$  имеет смысл количества молекул синглетного кислорода образованного одной молекулой Фс при световой дозе в 1 Дж/см<sup>2</sup>, а произведение  $\alpha \varphi_{ch}$  в формуле (15) имеет смысл количества утилизированных молекул кислорода на одну молекулу Фс также при световой дозе 1 Дж/см<sup>2</sup>. При этом предполагается, что кислород в основном (триплетном) состоянии присутствует в избытке и не является лимитирующим звеном при генерации синглетного кислорода.

Коэффициент потребления кислорода может быть вычислен из наклона кривой оксигенации гемоглобина в начальный момент времени после включения облучения по формуле:

$$\alpha\varphi_{ch} = \frac{-4[HbT] \frac{dS_{O_2}}{dt}}{[C_0]P} \quad (16)$$

где  $[HbT]=([Hb_1]+[Hb_1O_2])/4$  – суммарная молярная концентрация гемоглобина в крови,  $S_{O_2}$  – насыщение гемоглобина кислородом,  $C_0$  – коэффициент, учитывающий вклад рассеяния и поглощения ткани, не связанных с гемоглобином.

Для исследуемых фотосенсибилизаторов теоретически рассчитывались значения  $\alpha$  и из экспериментальных кривых вычислялись значения  $\alpha\varphi_{ch}$  с помощью формулы (17). Количественные значения представлены в Таблице 1. В качестве сравнения в Таблице 1 приведены теоретические и экспериментальные значения  $\alpha\varphi_{ch}$  для исследуемых фотосенсибилизаторов в эритроцитарной массе (40%) в физиологическом растворе, а также приведены экспериментально полученные значения квантового выхода образования синглетного кислорода и экспериментальное значение коэффициента потребления кислорода для различных Фс.

Фотосенсибилизатор	Максимум поглощения $\lambda_{abs}$ , нм	Коэффициент экстинкции $\epsilon$ [моль <sup>-1</sup> см <sup>-1</sup> ]	Квантовый выход образования синглетного кислорода $\varphi_{\Delta}$	Экспериментальное значение $\alpha\varphi_{ch}$ [см <sup>2</sup> /Дж]
AlPc[S <sub>2</sub> -S <sub>4</sub> ]]	675	$2,0 \cdot 10^5$	0.3	$22 \pm 2,2$
Хлорин Е6	660	$0,6 \cdot 10^5$	0.77	$25,7 \pm 2,6$
ICG	800	$2,0 \cdot 10^5$	-	$0,0012 \pm 0,0001$

Таблица 1. Экспериментально значения  $\alpha\varphi_{ch}$  для исследуемых фотосенсибилизаторов в эритроцитарной массе (40%) в физиологическом растворе [152].

Столь большое различие в значениях образования синглетного кислорода и химического тушения синглетного кислорода обусловлено, как уже говорилось выше, наличием физического тушения молекул синглетного кислорода. Также на эффективность химического тушения синглетного кислорода влияет микроокружение фотосенсибилизатора, и оно тем выше, чем больше в растворе белковых и липидных молекул.

### 1.3. Недостатки применения молекулярных форм фотосенсибилизаторов в клинической практике

Идеальный молекулярный Фс должен обладать способностью преимущественного накопления в опухолевой ткани, а также быстро выводиться из здоровой ткани. Еще один критерий – это амфифильность, которая при системном введении Фс позволяет последнему беспрепятственно добираться до опухоли (для чего требуется достаточная степень

гидрофильности), а затем Фс должен связаться с опухолевыми клетками (для чего требуется определенная степень липофильности) [40]. Он также должен иметь низкую темновую токсичность (нет воздействия на организм в отсутствии света), высокий квантовый выход образования триплетного состояния и подходящее время жизни триплета для взаимодействия с кислородом или другими субстратами для высокой степени генерации АФК. Полоса поглощения Фс должна находиться в дальней красной или ближней инфракрасной области спектра, для обеспечения более глубокого проникновения света в ткани. С таким большим количеством почти несопоставимых требований очень трудно получить препарат, который может квалифицироваться как идеальный Фс. Тем не менее, многие Фс, не полностью удовлетворяющие всем этим требованиям, были одобрены для клинического применения.

Фс первого поколения, разработанные в 1970-х и начале 1980-х годах, в большинстве своем основаны на порфириновых соединениях. Гематопорфирин (HrD) или производные гематопорфирина (HrD) являются примерами Фс первого поколения, которые впервые были использованы в клинической практике [41]. Их преимущества заключаются в том, что они способны эффективно разрушать опухолевые ткани, проявляют низкую темновую токсичность и хорошо растворимы в воде. Однако эти Фс слабо поглощают свет в красном диапазоне спектра, что значительно снижает эффективность лечения. Низкий коэффициент экстинкции требует высоких доз введения препарата для получения удовлетворительного ФДТ эффекта. Кроме того, период эффективного воздействия после введения Фс обычно составляет 48-72 ч, во время которого пациент должен быть защищен от светового воздействия. Более того, период выведения препарата из кожи составляет 4-6 недель, что приводит к длительной фоточувствительности после лечения. Все эти недостатки, а также недостаточная селективность накопления, сильно ограничивают клиническое применение Фс первого поколения [42].

Порфириновые соединения, содержащие макроциклические структуры на основе порфирина, такие как хлорины, бактериохлорины, фталоцианины, феофорбиды, бактериофеофорбиды и другие, а также непорфириновые соединения, такие как антрахиноны, фнотиазины, ксантены, цианины и куркуминоиды известны как второе поколение Фс [43]. Их начали разрабатывать начиная с конца 1980-х для преодоления недостатков Фс первого поколения. Фс второго поколения обычно имеют максимум поглощения на длинах волн более 630 нм, а также высокие коэффициенты экстинкции. Как правило, Фс второго поколения имеют более высокие значения квантового выхода генерации  $^1\text{O}_2$ , более высокий контраст накопления опухоль/норма по сравнению с HrD и, следовательно, обладают лучшим противоопухолевым эффектом [44]. Более того, время накопления Фс второго поколения в опухолевой ткани значительно ниже, поэтому ФДТ можно проводить в день введения Фс. Также ниже и длительность выведения Фс из кожи (менее 2 недель).

Хорошо известно, что гидрофобные Фс демонстрируют более высокий контраст опухоль/норма (до 8:1) [44; 35], тогда как эквивалентные гидрофильные Фс показывают контраст только 2:1 [46]. Однако гидрофобность препятствует растворимости Фс в физиологических растворителях, ограничивая их клинические применения [48; 49]. Для улучшения растворимости Фс, к ним присоединяют различные гидрофильные полярные заместители. Таким образом, фотосенсибилизаторы, не содержащие заряженные периферические группы, будут более гидрофобны, а Фс с тремя или более заряженными заместителями, вероятно, будут гидрофильными, а Фс с двумя заряженными периферийными группами, скорее всего, будет амфифильным [40]. Также известно, что Фс с анионными заместителями (сульфонатные или карбоксильные группы) накапливаются преимущественно в цитоплазме, тогда как Фс с катионными группами проникают через митохондриальную мембрану и накапливаются в митохондриях [49; 50]. Однако точные структурные характеристики и механизм распределения и локализации Фс пока очень туманны, а проблема максимизации селективности накопления в опухолевой ткани все еще не решена.

Значительная часть исследований в настоящее время направлена на разработку Фс третьего поколения, которые работают в более длинноволновом диапазоне спектра, имеют короткое время выведения и, что наиболее важно, имеют лучшую тропность к опухоли. Это может быть достигнуто либо путем (а) модификации существующих Фс различными биологическими конъюгатами (пептиды, антитела и оптомеры), что позволит увеличить тропность Фс к опухолевым клеткам [50, 51, 52]; или (б) или химическое присоединение/инкапсулирование Фс в средствах доставки или носителях, которые могут эффективно транспортировать лекарственное средство в крови к ткани-мишени.

Несмотря на то, что ФДТ имеет потенциал использоваться в качестве метода для лечения различных типов рака на разных стадиях, в настоящее время ФДТ используется только для лечения поверхностных и плоских поражений, доступных через эндоскопы или в качестве дополнительного постхирургического лечения, а также для лечения и профилактики дисплазий при заболеваниях на начальной стадии.

#### **1.4. Структура и спектроскопические свойства нанокристаллических фталоцианинов.**

Для преодоления недостатков и ограничений молекулярных Фс в мировой практике предлагают использовать наноразмерные частицы [53; 54; 55]. Как правило, НЧ определяются как субмикронные частицы с размерами от 1 до 100 нм. В зависимости от типа наноносителя и способа прикрепления к нему Фс, использование НЧ для ФДТ может иметь следующие преимущества:

- Оптимальный показатель соотношения площади поверхности к объему, что позволяет значительно увеличить количество Фс, доставляемое к клеткам-мишеням.
- НЧ могут предотвращать преждевременное высвобождение Фс, препятствуя его неспецифическому накоплению в нормальных тканях.
- Связывают гидрофобные Фс, что позволяет наночастицам беспрепятственно перемещаться с кровотоком и локализовать Фс в опухолевой ткани.
- НЧ обладают эффектом повышенной проницаемости и удержанием в опухолевой ткани, вызванные аномальной негерметичной васкуляризацией и плохим лимфатическим дренированием опухолевой ткани.
- Поверхность НЧ может быть дополнительно модифицирована функциональными группами или нацеливающими агентами, тем самым улучшая биораспределение, фармакокинетику, накопление в клетках и тропность к опухолевым клеткам.

В последние годы было проведено много исследований, посвященных разработке различных подходов использования НЧ для ФДТ. НЧ для ФДТ обычно классифицируют как пассивные (участвующие только в переноске Фс) или активные (принимающие непосредственное участие в процессе ФДТ).

Одними из перспективных нанофотосенсибилизаторов (НФс) являются молекулярные нанокристаллы фталоцианина алюминия (МНК-АlPc или НЧ-АlPc). НЧ-АlPc не флуоресцируют и фотодинамически не активны, но при попадании в организм под воздействием биологического окружения, начинают проявлять спектральные свойства, часть из которых присуща раствору молекул АlPc, в дальнейшем будем называть это явление "активацией" НЧ. Причем, после введения в организм, активация НЧ-АlPc происходит в патологически измененной биоткани, в здоровых тканях этот процесс значительно слабее.

Для того чтобы разобраться в механизме активации НЧ-АlPc, необходимо разобраться в особенностях структуры и спектроскопических свойствах димеров, олигомеров и, наконец, молекулярных нанокристаллов фталоцианинов. Основная теория гомо-димеров (состоящих из одинаковых молекул) объясняется экситонным и зарядово-резонансным взаимодействиями. Для изучения электронной структуры димеров обычно используют метод времязрешенного ЭПР.

Фотофизические свойства димеров, состоящих из одинаковых единиц, могут быть объяснены межплоскостным взаимодействием между двумя молекулами фталоцианина (А и В). То есть экситонным взаимодействием (ЕХ) и взаимодействием, связанным с переносом электронного заряда с одной молекулы на другую (СР). Все волновые функции в возбужденных состояниях записываются как линейные комбинации конфигураций ЕХ и СР, выражающиеся следующим образом:

$$\psi_{EX(\pm)} = (\psi_A^* \psi_B \pm \psi_A \psi_B^*) / \sqrt{2} \quad (17)$$

$$\psi_{CP(\pm)} = (\psi_A^+ \psi_B^- \pm \psi_A^- \psi_B^+) / \sqrt{2} \quad (18)$$

Здесь верхние индексы \*, +, и - обозначают состояние  $S_1$  или  $T_1$  и основные состояния катиона и аниона мономера фталоцианина, соответственно. Эти конфигурации показаны на Рисунке 10. Волновая функция димеров фталоцианина в возбужденных состояниях  ${}^{1,3}\psi_{DM}$  может быть записана следующим образом:

$${}^{1,3}\psi_{DM} = a {}^{1,3}\psi_{EX(\pm)} + b {}^{1,3}\psi_{CP(\pm)} \quad (19)$$

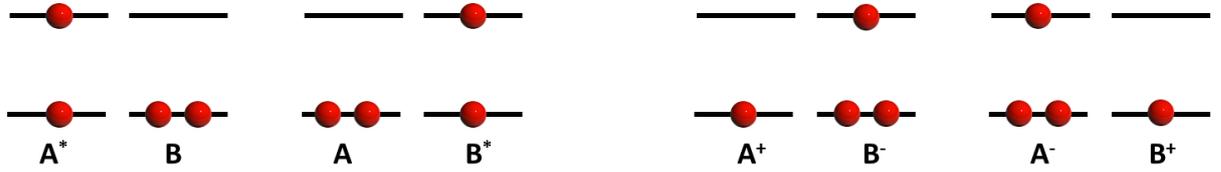


Рисунок 10. Схема взаимодействия фталоцианинового димера в возбужденных состояниях.

$${}^{1,3}\Psi_{EX(\pm)} = 2^{-\frac{1}{2}}(A^*B \pm AB^*)$$

$${}^{1,3}\Psi_{CR(\pm)} = 2^{-\frac{1}{2}}(A^+B^- \pm A^-B^+) \quad (20)$$

$${}^{1,3}\Psi_{DM} = a \cdot {}^{1,3}\Psi_{EX(\pm)} + b \cdot {}^{1,3}\Psi_{CR(\pm)}$$

Экситонное взаимодействие аппроксимируется переходным электрическим диполь-дипольным взаимодействием. Зависимость между экситонным взаимодействием и структурой димера показаны на Рисунке 11. Для димеров, молекулы которых лежат в параллельных плоскостях друг против друга (кофациальные), переход между состоянием  $S_0$  и верхним экситонным состоянием разрешен, в то время как между основным и нижним экситонным состоянием запрещен (Рисунок 11а). А для димеров, молекулы которых лежат в одной плоскости (компланарные), переход в верхнее возбужденное энергетическое состояние запрещен, а в нижнее возбужденное разрешен (Рисунок 11б). В случае наклонных димеров (Рисунок 11в) существует зависимость от двугранного угла между плоскостью молекул.

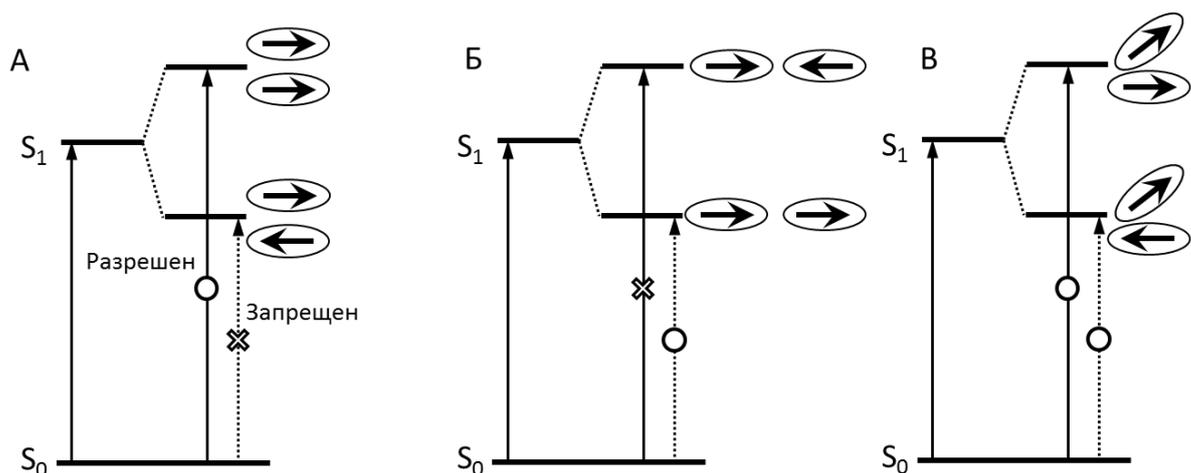


Рисунок 11. Связь между экситонным взаимодействием и пространственной геометрией димера. (а) Молекулы димера в параллельных плоскостях, (б) молекулы димера лежат в одной плоскости, (в) наклонные димеры.

Многочисленные исследования спектров поглощения основного состояния показали, что дипольные моменты перехода и расщепление энергии сильно зависят от структуры и димера. В случае, когда молекулы димера лежат в параллельных плоскостях и сильно связаны, также начинает играть роль центральные атомы и радикалы.

В состоянии  $T_1$  экситонное взаимодействие невелико из-за спин-запрещенного перехода  $S_0 \leftrightarrow T_1$ . Передача энергии с  $T_1$  происходит по механизму Декстера, в отличие от механизма Фёрстера с уровня  $S_1$ . Для сильносвязанных димеров вклад взаимодействия с переносом заряда играет важную роль, даже в состоянии  $T_1$ . Смещение экситонного взаимодействия и взаимодействия с переносом заряда показаны на Рисунке 12. В результате взаимодействия экситонов состояния  $S_1$  делятся на верхние и нижние экситонные состояния, а расщепление экситонов  $T_1$  пренебрежимо мало. Когда энергии  ${}^{1,3}CR$  выше, чем энергии  ${}^{1,3}EX$ , возбужденные состояния, которые в основном состоят из  ${}^{1,3}EX$  конфигураций, смещаются в сторону меньшей энергии как в синглетном, так и в триплетном состояниях.

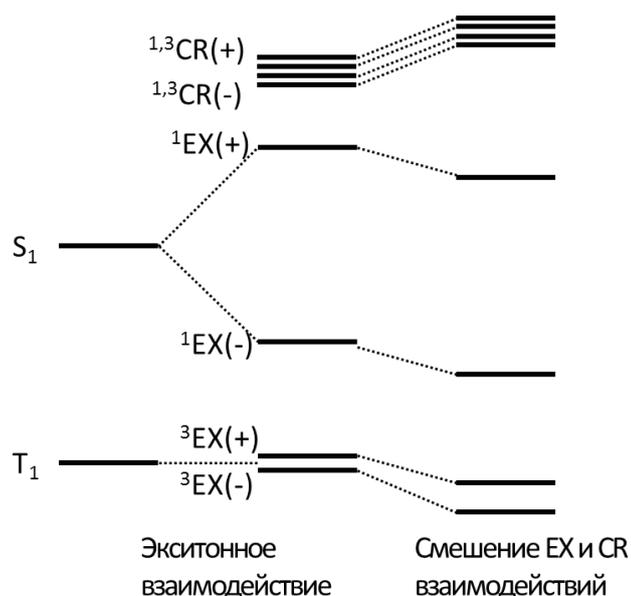


Рисунок 12. Смещение экситонного взаимодействия (EX) и взаимодействия с переносом заряда (CR).

В отличие от мономера, флуоресценция димера сдвигается к более низкой энергии примерно на  $4000 \text{ см}^{-1}$ , а квантовый выход излучения уменьшается в  $10^3$  раз. Например, в работе Oddos-Marcel et al. [56] изучали флуоресцентные свойства димеров SiPc, Рисунок 13(а). Электронный спектр поглощения и спектр флуоресценции показан на Рисунке 13(б).

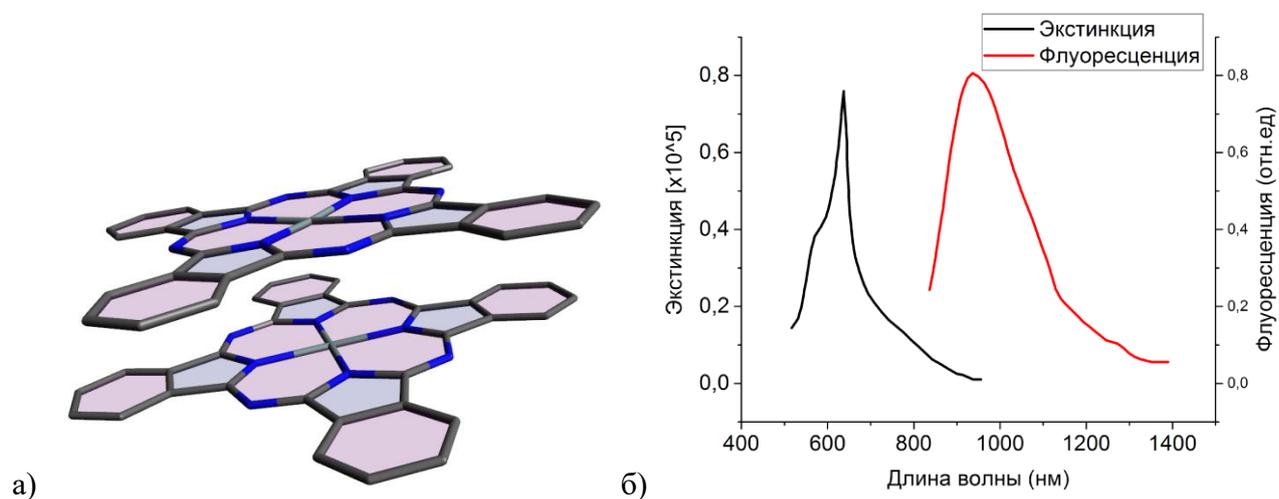


Рисунок 13. (а) Структурная формула димера SiPc. (б) Спектр поглощения (штриховая линия) и спектр флуоресценции SiPc.

Энергетические сдвиги и низкая эффективность такого димера согласуются с запрещенным переходом между состоянием  $S_0$  и низшего экситонного состояния, Рисунок 11(а). Разница в энергиях при экситонном расщеплении между нижним и верхним возбужденными состояниями оценивается как  $3800 \text{ см}^{-1}$ .

Практически полное отсутствие испускания флуоресценции в таких димерах обусловлено быстрым переходом из верхнего экситонного состояния в самое нижнее, которое согласно Рисунку 11(а) является «темным». Основным эффектом димеризации является резкое увеличение вероятности перехода внутренней конверсии (в 30-200 раз) и небольшое повышение вероятности интеркомбинационной конверсии (в 3-7 раз). Увеличение вероятности внутренней конверсии связано с тем, что нижнее экситонное состояние в результате расщепления расположено близко к основному состоянию. Аналогично, константа скорости интеркомбинационной конверсии увеличивается, так как нижнее экситонное состояние приближается к соответствующему триплетному состоянию по энергии.

Роджерс и коллеги [57] провели измерения времен жизни возбужденного синглетного состояния для Si-O-Si, Si-O-Ge и Si-O-Sn составили 128, 197 и 103 пс соответственно. Жермен и Эббесен исследовали [58] Lu(Pc)<sub>2</sub> в трех разных окислительно-восстановительных состояниях с использованием переходных сорбционных методов. Времена жизни возбужденных состояний оказались очень короткими 60, 60 и 36 пс для [Lu(Pc)<sub>2</sub>]<sup>+</sup>, [Lu(Pc)<sub>2</sub>] и [Lu(Pc)<sub>2</sub>]<sup>-</sup> соответственно.

На сегодняшний день известны результаты нескольких исследований кофациальных олигомеров в их столбчатой жидкористаллической или кристаллической фазах в терминах жкситон-прыжков и экситон-экситон аннигиляции. Ern et al. [59] изучили фемтосекундное переходное поглощение полисилоксана фталоцианина – линейного полимера, состоящего из 32 кофациально состыкованных молекул SiPc с расстоянием между молекулами  $d=0,33$  нм, представляющие собой довольно жесткие стержни длиной 11 нм. Обнаружено, что время жизни возбужденного состояния однократно возбужденных цепей составляет около 4,5 пс, и уменьшается примерно до 0,5 пс для двукратно возбужденных цепей и становится еще меньше при более высоких значениях возбуждения. Это указывает на то, что при более высоких плотностях возбуждения в наблюдаемой динамике релаксации в SiPc доминирует экситон-экситона аннигиляция.

Также были изучены фотофизические свойства кристаллические частицы ZnPc (Рисунок 14). Считается, что длина диффузии экситона в присутствии комплексов меди составляет порядка 100-200 Å. Markovitsi et al. [60; 61; 62] провели измерения поглощения от времени в нано- и пикосекундном диапазонах. Для малых энергий лазерного импульса (<6 мДж) переходная оптическая плотность является линейной функцией возбуждающей энергии: при более высоких энергиях наблюдается насыщение. При высоких энергиях возбуждения переходный процесс соответствует кинетике второго порядка, т. е. T-T аннигиляции. Длительные распады хорошо описываются моделью «случайного блуждания» по линейной цепочке, содержащей ловушки.

Структура кристаллического фталоцианина алюминия, использованного в настоящем исследовании представлена Рисунке 15. AlPc кристаллизуется в триклинной сингонии пространственной группы P1.

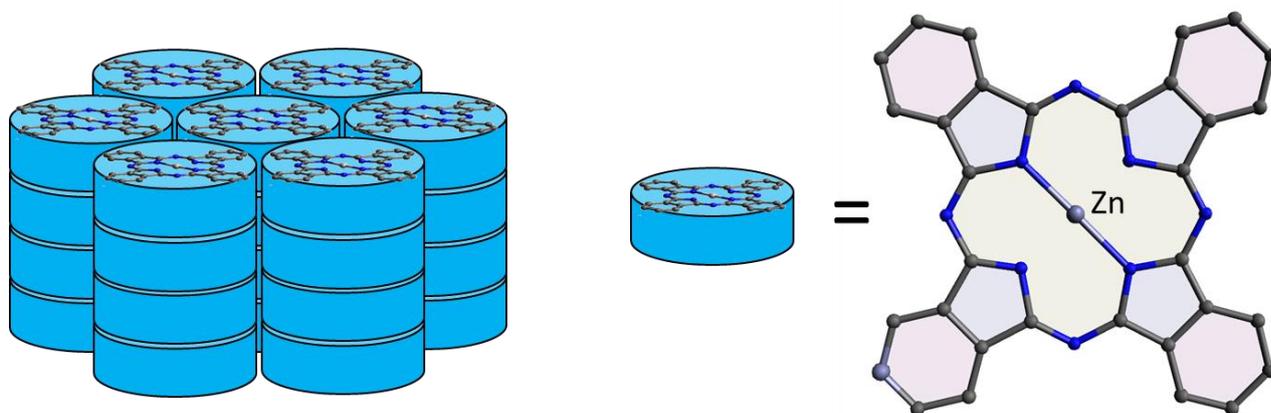


Рисунок 14. Кристаллическая наночастицы ZnPc.

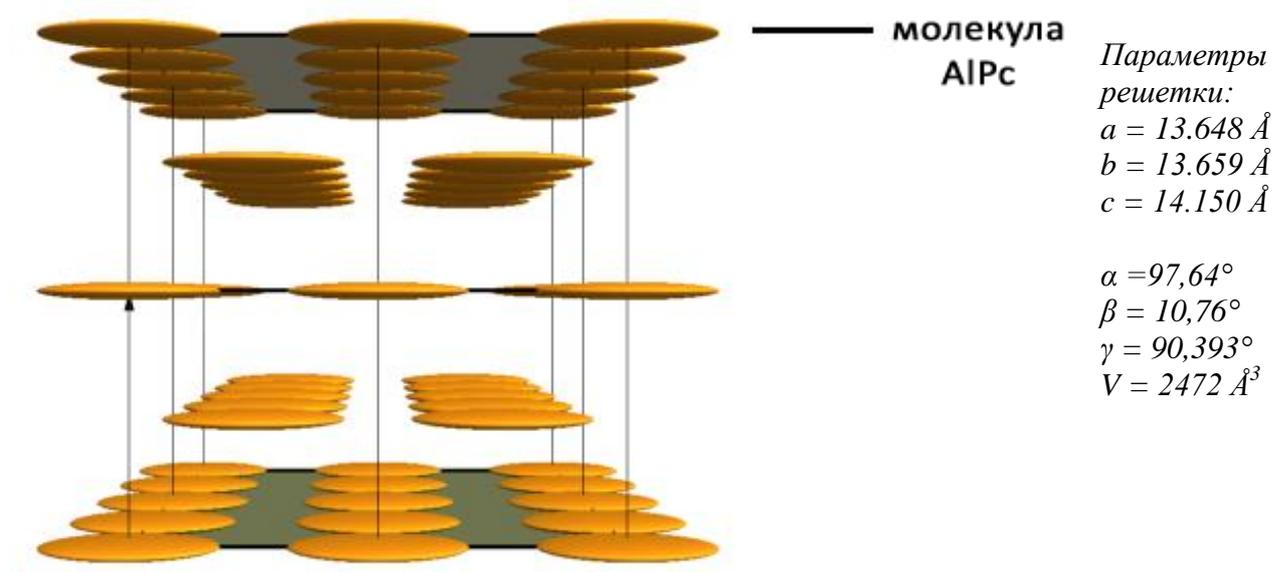


Рисунок 15. Кристаллическая структура AlPc в проекции (001).

Оптические и структурные свойства кристаллических фталоцианинов можно определять при помощи метода вычисления эффективного валентного Гамильтониана (ЭВГ). Например, в кристалле LiPc [63] фталоцианиновые кольца уложены друг на друга вдоль кристаллической оси  $c$ ; расстояние между плоскостями  $3,245 \text{ \AA}$ . Электронная полосовая структура ЭВГ, рассчитанная для кристалла LiPc воль оси укладки  $c$  схематически изображена Рисунок 16.

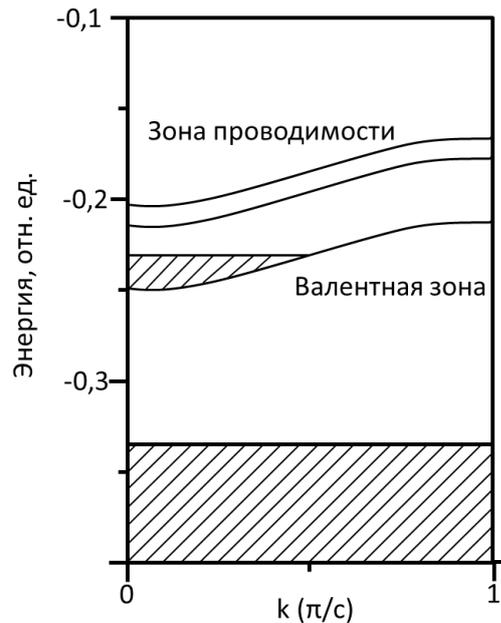


Рисунок 16. Структура ЭВГ для кристалла  $PcLi$  вдоль оси укладки [64.].  $VB$  и  $CB$  обозначают валентную зону и зону проводимости соответственно.  $VB$  заполнена только наполовину.

Эта структура показывает те же основные особенности, которые ранее наблюдались для легированных кристаллов фталоцианина. Первое оптическое поглощение соответствует внутризонным переходам в верхней заполненной полосе. Предполагается, что первый прямой межзонный переход будет иметь значение с энергией 1,50 эВ. Это значение очень хорошо коррелирует с полосой поглощения, измеренной при 806 нм (1,54 эВ) для кристалла  $PcLi$  [65]. Спектр поглощения кристалла  $PcLi$  имеет тот же характер, что и для молекулы  $PcLi$ , и поэтому можно ожидать, что распределение поглощающих полос, аналогичное описанному выше для молекулы  $PcLi$ . На спектре виден дополнительный пик поглощения в районе 720 нм (1,72 эВ), который может быть объяснен электронным переходом  $VB \rightarrow CB$  при  $k = 0$ , который имеет энергию 1,65 эВ.

### 1.5. Современное состояние исследований в области наночастиц фталоцианинов

С конца прошлого столетия фталоцианины представляют большой интерес не только в медицине, но и в других областях. В дополнение к традиционным приложениям в качестве красителей, фталоцианины в последние несколько десятилетий вызвали большой исследовательский интерес из-за их высокого потенциала применения в функциональных молекулярных материалах, включая органические полупроводники для органических фотоэлектрических элементов [66], транзисторы с полевым эффектом [67; 68], светодиодов [69], сенсibilизированные красителем солнечные элементы [70; 79], мономолекулярные магниты [71], нелинейные оптические материалы [72] и катализаторы для химических и фоторезоксидных реакций [73]. Соединения на основе фталоцианинов [75] были

рассмотрены для разработок электрохромных дисплеев [74], газовых сенсоров [76], ксерографических машин [76], цветных принтеров [8], оптических ограничителей [77], органических транзисторов, молекулярных преобразователей [78], записываемых универсальных цифровых дисков (DVD) [79].

Наряду со всеми вышеперечисленными возможностями применения фталоцианиновых комплексов, одним из перспективных направлений было и остается использование фталоцианинов в качестве фотосенсибилизаторов для флуоресцентных методов диагностики и фотодинамической терапии. Биологическая ткань обладает оптимальной прозрачностью в красном видимом диапазоне и в ближнем инфракрасном диапазоне. Синтезирование фотосенсибилизаторов с пиком поглощения в этом диапазоне значительно увеличивает эффективность ФДТ. С этой целью было разработано несколько новых классов потенциальных сенсибилизаторов для ФДТ. Было обнаружено, что среди них фталоцианины обладают высокой способностью из-за высокого коэффициента поглощения в области 650-680 нм [80; 81]. Фталоцианиновые Фс представляют собой тетрапиррольные ароматические макроциклы, способные образовывать интенсивно окрашенные комплексы металлов для различных промышленных, биологических и медицинских применений [82]. Фталоцианиновые Фс стремятся агрегированию в физиологических условиях с самотушением флуоресценции и потерей фотодинамической активности [83]. Кроме того, благодаря своей многоплановой ароматической системе фталоцианины проявляют высокую склонность к агрегации, что приводит к плохой растворимости в воде в случае незамещенных родительских производных или затрудняет очистку и характеристику соединений во многих отношениях вместе с более низкой эффективностью их использования для ФДТ [84; 85]. Подходы к преодолению гидрофобности фталоцианиновых Фс основывались главным образом на химической модификации [86; 87] и фармацевтической нанотехнологии [88; 89]. Согласно последнему подходу, представление Фс в конъюгированной, инкапсулированной или ассоциированной форме с диспергируемыми в воде наноносителями значительно улучшало фотодинамическую активность. Наноносители уменьшают плотность гидрофобных Фс для агрегации в водных средах, увеличивают время циркуляции, позволяют производить пассивную и активную внутриопухолевую и внутриклеточную доставку Фс [90]. Из-за своего размера наноносители могут избирательно накапливаться в опухолевой ткани из-за эффекта «усиленного проникновения и удержания», который характеризуется наличием больших пор в стенках сосудов вследствие наличия неполного эндотелиального барьера, дефектной сосудистой архитектуры и нарушенной лимфодренажной системы опухоли [91; 92]. Так, например, поры сосудов нормальной ткани составляют 2-3 нм, а в опухолевых тканях диаметр пор может достигать 500 нм.

Были разработаны новые соединения безметалльных фталоцианинов и фталоцианина цинка (II), замещенные четырьмя 1-(2-оксиэтил)-4-пиперидонными этиленкетными группами в периферическом положении в качестве потенциальных ФДТ агентов. Спектроскопические исследования этих новых соединений в различных растворителях показали, что соединение фталоцианина цинка (II) образовало J-агрегаты в хлороформе и дихлорметане в результате комплементарной координации атома азота в заместителях одной молекулы к центральному атому металла цинка другой молекулы посредством водородной связи. J-агрегаты среди молекул фталоцианина цинка (II) были разрушены добавлением координирующего растворителя, такого как метанол. В ДМСО были исследованы фотофизические (квантовые выходы флуоресценции и времена жизни флуоресценции) и фотохимические свойства (квантовые выходы синглетного кислорода и фотодеградации) соединений, фталоцианина не содержащие металлы и цинка (II). Соединение фталоцианина замещенного цинка (II) показывает хорошую генерацию синглетного кислорода и дает представление о потенциале этого комплекса в фотокаталитических применениях, таких как фотодинамическая терапия рака [93].

Фталоцианины металлов оказались высокоэффективными в противораковой ФДТ [94], поскольку они эффективно накапливаются в раковых клетках и хорошо поглощают проникающий в ткань красный свет с высоким квантовым выходом синглетного кислорода. Было также продемонстрировано, что фталоцианины инактивируют антибиотикорезистентные микробные патогены, что дает возможность их применения для антибактериальной ФДТ [95].

Также из AlPc был разработан нанофотосенсибилизатор на основе липидов, полимеров и неорганических биоматериалов. Они включали в основном наноэмульсии [96; 97], липосомы [98], твердые липидные наночастицы [99], полимерные мицеллы [100], полимерные наночастицы [101] и золото, диоксид титана и графеновые нанопластики [102-104]. Показано, что эти нанослои значительно усиливают фотодинамическую активность AlPc. Однако подавление фталоцианиновой флуоресценции в форме наночастиц [105] может потребовать высвобождения Фс на целевом участке визуализации [106] или химической модификации наноуглерода для предотвращения тушения флуоресценции [107] для визуализации и диагностики флуоресценции.

Среди различных систем доставки липосомы представляют интерес из-за их биосовместимости, легкости подготовки и длительной циркуляции в крови [108-109]. Закрытые двухслойные фосфолипидные системы или липосомы представляют класс систем доставки лекарств, которые открывают новые возможности для внутриклеточного и внутритканевого распределения молекул лекарственных средств в определенных опухолевых образованиях.

В работе [110] AlPc превращали в биосовместимую наноструктуру путем включения внутрь полимерной амфифильной наночастицы из полиэтиленгликоль-поликапролактона (PECL), что позволило улучшить биораспределение Фс с помощью поверхностных характеристик наночастиц полиэтиленгликоля. Фотофизические свойства AlPc были улучшены путем инкапсулирования AlPc в PECL, с максимумом флуоресценции 687 нм, что говорит об отсутствии агрегации молекул AlPc внутри наночастиц. Средний размер наночастиц варьировался от 115 до 274 нм. Все наночастицы обладали отрицательными значениями дзета-потенциала, что объясняет их коллоидную стабильность. Исследование для времени жизни триплетного возбужденного состояния AlPc методами времязрешенной спектроскопии показывают, что инкапсуляция в наночастицах увеличивает время жизни триплета, что выгодно для эффективности ФДТ [111]. Включение молекул AlPc внутрь наночастиц улучшает некоторые параметры фотофизических свойств AlPc. Исследования на клеточных культурах показали увеличение фотодинамической активности молекул AlPc, находящихся внутри полимерных наночастиц.

Несмотря на большой прогресс в области функциональных фталоцианинов, теоретические и технические проблемы все еще существуют для практических применений [112]. Было отмечено, фталоцианин в кристаллической форме для ФДТ в мире не применяется.

## **Заключение по главе 1**

О люминесцентных свойствах и применении различных фталоцианиновых комплексов опубликовано большое количество работ. Наряду со всеми вышеперечисленными возможностями применения фталоцианиновых комплексов, одним из перспективных направлений было и остается использование фталоцианинов в качестве фотосенсибилизаторов для флуоресцентных методов диагностики и фотодинамической терапии в медицине. Однако применение молекулярных форм фталоцианинов сопряжено с некоторыми неудобствами, в первую очередь для пациента.

Новым витком в развитии применения фталоцианинов для медицины стало использование различных наночастиц фталоцианинов: на основе липидов, полимеров и неорганических биоматериалов. Такие как: наноземли, липосомы, твердые липидные наночастицы, полимерные мицеллы, полимерные и золотые наночастицы, диоксид титана и графеновые нанопластики, а также нанокристаллические агрегаты фталоцианинов. Такие подходы позволяют устранить недостатки молекулярных форм фталоцианинов.

Оптимизация и изучение фотофизических параметров наноконструкций фталоцианинов с целью получения «smart» («умных») фотосенсибилизаторов по-прежнему остается важной

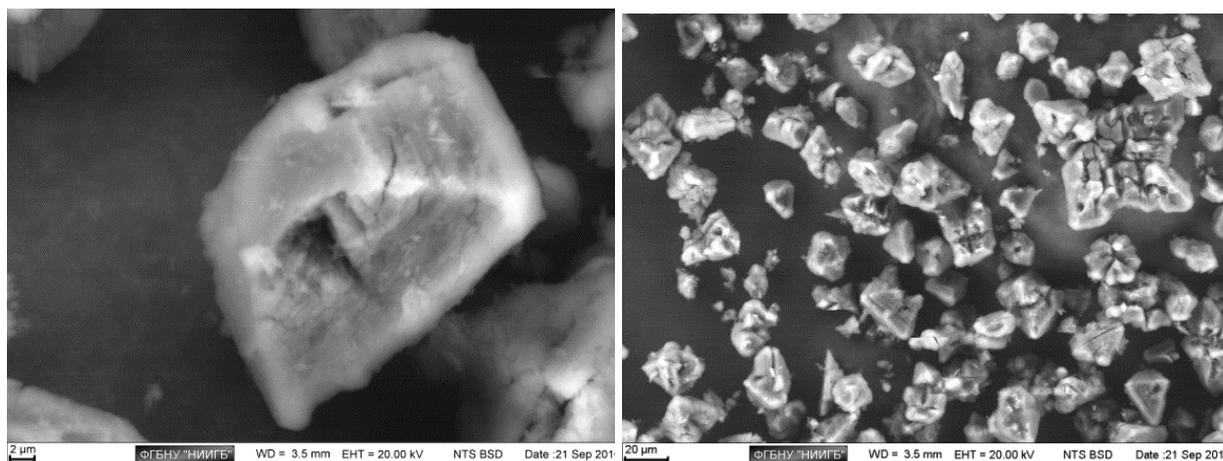
задачей, так как может значительно повысить их качество и открыть новые возможности для их применения. Взаимодействие наночастиц фталоцианинов с окружением и лазерным излучением – это сложный многофакторный процесс, поэтому комплексная оценка всех факторов взаимодействия весьма затруднительна, необходимо использовать как экспериментальные, так и современные численные методы для теоретического моделирования.

## **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ И АППАРАТУРА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Данная глава посвящена экспериментальным методам исследования и разработке аппаратного комплекса для исследования, использованным в работе. В параграфе 2.1 описана методика приготовления коллоидных растворов НЧ-АІРс с характеристикой их по размерам, кристаллической структуре, спектрам поглощения, рассеяния, фотолюминесценции, оценка квантового выхода флуоресценции и генерации синглетного кислорода при селективном лазерном возбуждении. В параграфе 2.2 описано устройство лазерного спектроскопического комплекса, разработанного в ходе работы для экспериментального определения времени жизни флуоресценции в нано- и пикосекундном диапазонах. Диапазон измерений по длинам волн 400-900 нм, длительность лазерного импульса возбуждения 100 пс, длина волны возбуждающего лазера 637 нм, временное разрешение 15 пс. Описана методика и аппаратура для исследования динамики взаимодействия НЧ-АІРс с компонентами клеток (липидов, белков, элементов 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). Описан разработанный 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 параграфе 2.3 описаны впервые разработанные волоконно-оптические инструменты для лазерной флуоресцентной диагностики и лазерной фотодинамической терапии крупных сосудов и для внутрисуставного использования.

### **2.1. Создание коллоидных растворов молекулярных НЧ-АІРс и их характеристика по размерам, кристаллической структуре, спектрам поглощения, рассеяния, фотолюминесценции**

В качестве исходных образцов для исследования были взяты крупнодисперсные кристаллы (Рисунок 17) фталоцианина алюминия (АІРс) производства ФГУП «ГНЦ «НИОПИК» (Россия). Взвесь АІРс в дистиллированной воде подвергали диспергации с использованием ультразвукового гомогенизатора Bandelin SONOPLUS HD2070 с насадкой KE76 (20 кГц, амплитуда 165  $\mu\text{м}$ ).



*Рисунок 17. СЭМ изображения крупнодисперсных кристаллов AlPc.*

Интенсивность процесса взаимодействия НЧ-AlPc в биотканях в сильно зависит от размеров используемых частиц, поэтому была разработана методика получения коллоидных растворов наночастиц AlPc различного размера.

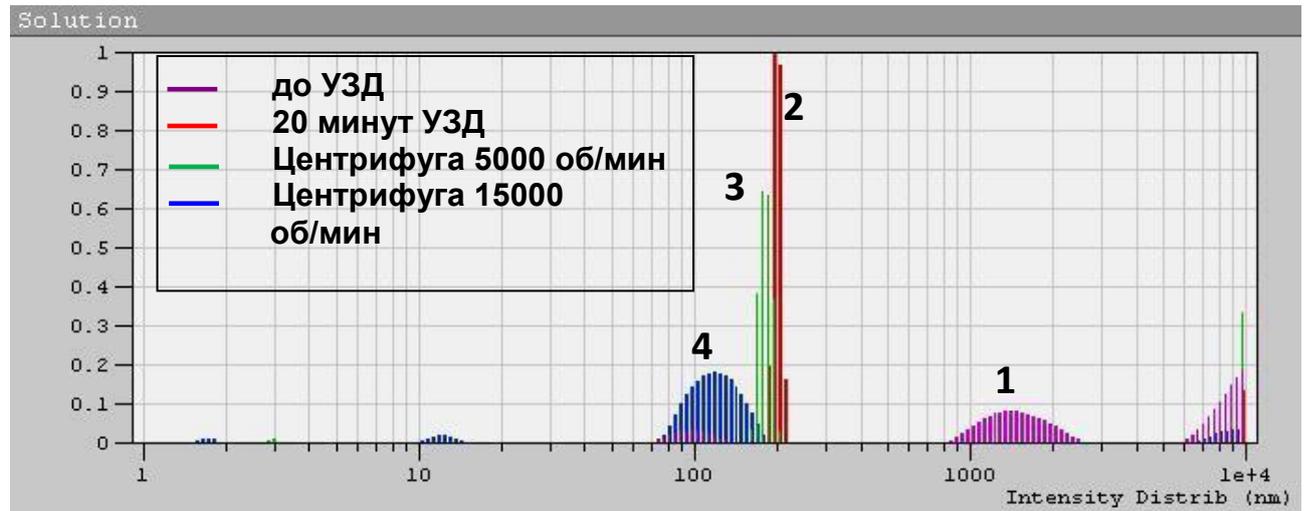
На Рисунке 18 представлено изображение коллоидных растворов НЧ-AlPc, полученных посредством ультразвуковой диспергации (УЗД) (время диспергации 1-15 минут). Для сравнения также показаны суспензия крупнодисперсного AlPc (исходный раствор, использовавшийся для приготовления наночастиц), и раствор сульфированного (водорастворимого) AlPc той же концентрации.



*Рисунок 18. Коллоидные растворы НЧ-AlPc, полученные при различной длительности диспергации (значение указано на рисунке). Также показана суспензия крупнодисперсного AlPc (исходный раствор, использовавшийся для приготовления наночастиц, обозначен 0) и раствор сульфированного (водорастворимого) AlPc (обозначен P). Все растворы имеют концентрацию 100 мг/л.*

Ниже приведены протоколы определения гидродинамического радиуса НЧ-AlPc в зависимости от времени УЗД (Рисунок 19). Гидродинамический радиус частиц определялся при

помощи спектрометра динамического рассеяния света Photocor Complex. Принцип работы и его технические характеристики представлены в п.2.2.2.



Коллоид	Среднее значение гидродинамического радиуса, нм
1) До УЗД	1490±130 9700±800
2) После 20 минут УЗД	200±20
3) После центрифугирования 5000 об/мин	180±20
4) После центрифугирования 15000 об/мин	120±50 15±5

Рисунок 19. Протокол определения гидродинамического радиуса коллоидов НЧ АІРС: 1) До УЗД; 2) После 20 минут УЗД; 3) После центрифугирования 5000 об/мин; 4) После центрифугирования 15000 об/мин.

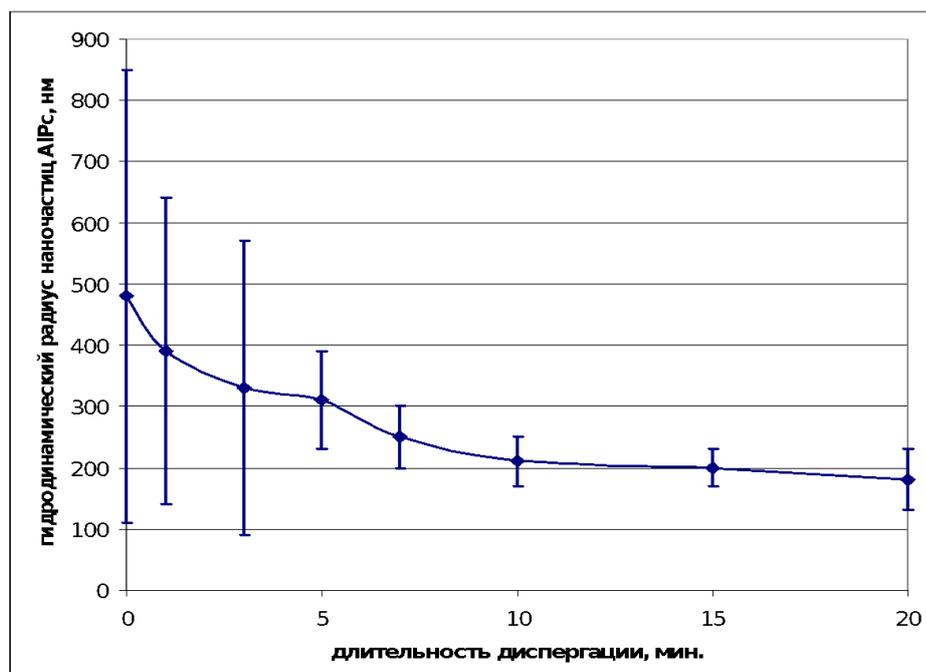


Рисунок 20. Зависимость гидродинамического радиуса наночастиц АІРС от длительности ультразвукового воздействия.

Из графика (Рисунок 20) видно, что с увеличением длительности диспергации средний гидродинамический радиус наночастиц стабильно уменьшается в течение 10 минут до 200 нм, а затем кривая выходит на плато. Выделение мелкоразмерных фракций осуществлялось посредством центрифугирования полученных коллоидов, в результате чего более крупные частицы выпадают в осадок.

Таким образом, из коллоида наночастиц AlPc со средним гидродинамическим радиусом 180 нм удалось выделить фракцию наночастиц с гидродинамическим радиусом до 100 нм и менее. Изменяя параметры центрифугирования (угловая скорость, длительность), можно получать коллоидные растворы НЧ-AlPc со средними размерами от 50 до 300 нм.

Важно учесть, что при центрифугировании изменяется массовая концентрация НЧ-AlPc в коллоиде. Для определения получившейся после центрифугирования концентрации коллоида НЧ-AlPc удобно использовать *показатель ослабления  $\mu$  (показатель экстинкции)* — величину, обратную расстоянию, на котором поток излучения, образующего параллельный пучок, уменьшается за счет поглощения и рассеяния в среде в некоторое заранее оговоренное число раз. Если в определении показателя ослабления степень ослабления выбрана равной 10, то получающийся в результате показатель ослабления  $\mu$  называют десятичным. В этом случае расчет производится по формуле:

$$\mu = \frac{1}{l} \log_{10} \left( \frac{\Phi_0}{\Phi(l)} \right) \quad (21)$$

где  $\Phi_0$  — поток излучения на входе в среду,  $\Phi(l)$  — поток излучения после прохождения им в среде расстояния  $l$ . В качестве размерности данной величины в настоящем исследовании используются обратные сантиметры ( $\text{см}^{-1}$ ).

Для корректного определения получившейся после центрифугирования концентрации коллоида НЧ-AlPc, необходимо построить нормировочную кривую (Рисунок 22). Для этого при помощи спектрофотометра Hitachi U-3400 измерялись спектры экстинкции коллоида НЧ-AlPc для различных концентраций. Для измерений использовались миллиметровые кюветы, что позволило проводить измерения в приближении однократного рассеяния, поэтому десятичные показатели ослабления  $\mu$  для разных длин волн (400, 532 и 755 нм) практически линейно зависят от концентрации (Рисунок 22). На Рисунке 21 приведены спектры экстинкции для различных концентраций НЧ-AlPc от 10 до 250 мг/л.

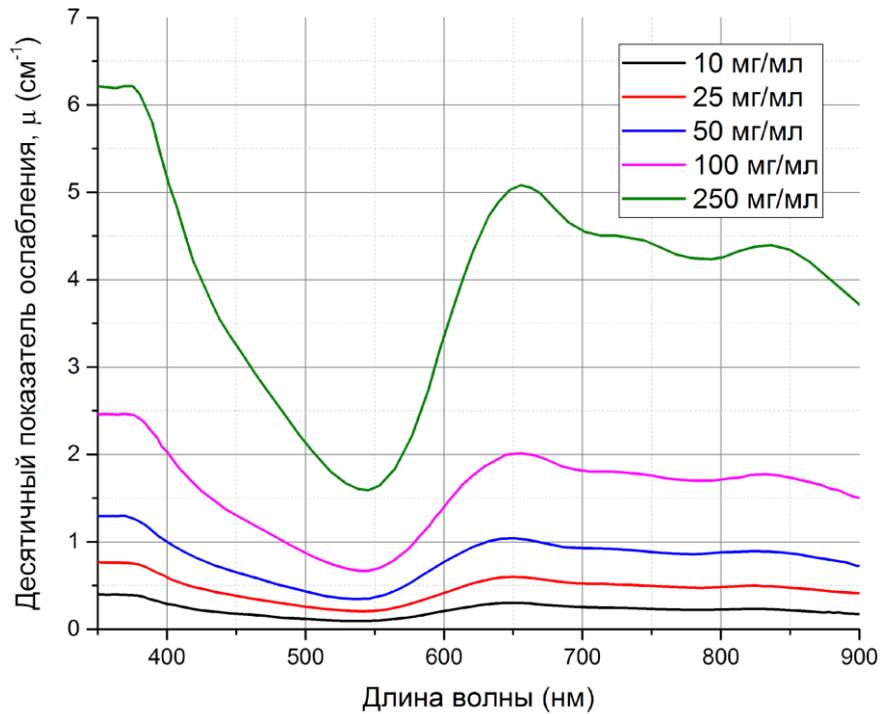


Рисунок 21. Спектры экстинкции для различных концентраций коллоида НЧ-АПс: (1)  $c=250$  мг/л; (2)  $c=100$  мг/л; (3)  $c=50$  мг/л; (4)  $c=20$  мг/л; (5)  $c=10$  мг/л. Стрелками показаны длины волн (400, 532 и 755 нм), для которых определялись  $\mu$ .

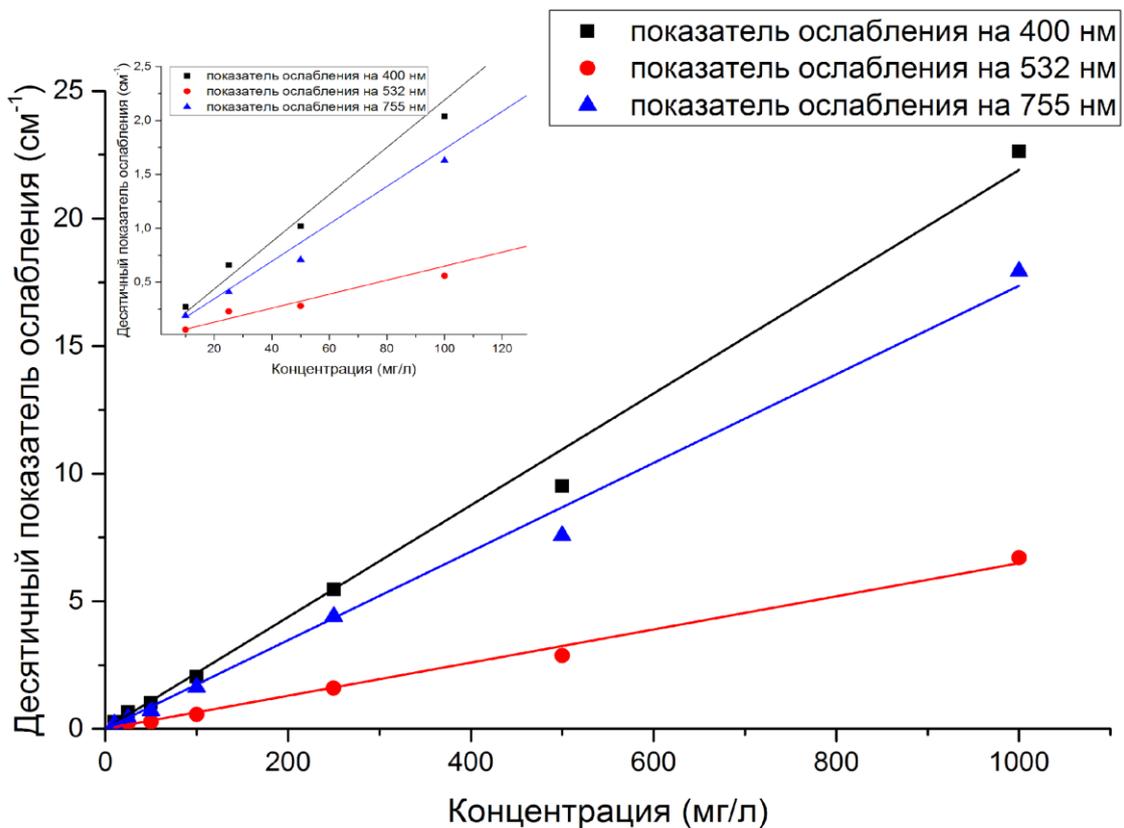


Рисунок 22. Нормировочные кривые для определения концентрации НЧ-АПс в коллоиде.

Важно отметить, что НЧ-АІРс имеют плоскую слоистую форму, что подтверждается исследованием НЧ-АІРс на просвечивающем и сканирующем электронных микроскопах (Рисунок 23), а также полученный коллоид НЧ-АІРс не флуоресцировал при возбуждении лазером с длиной волны 632,8 нм (Рисунок 24).

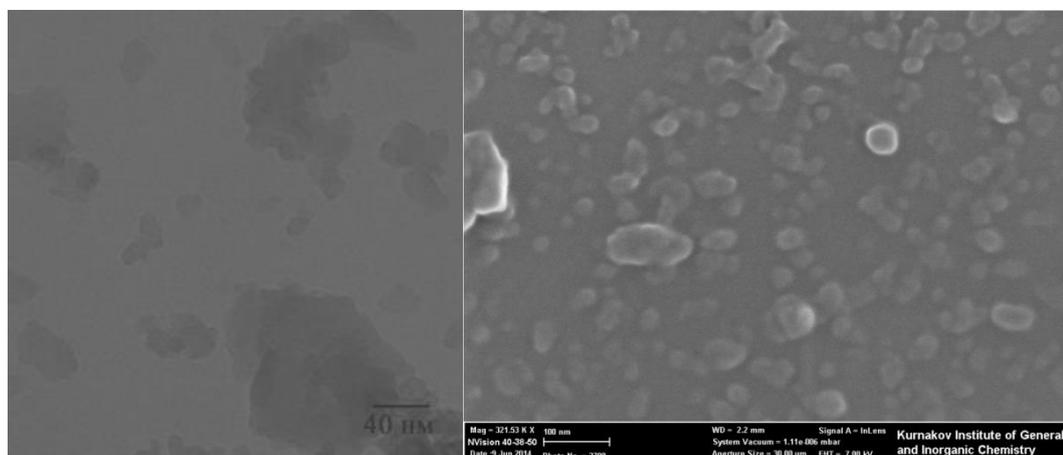


Рисунок 23. ПЭМ и СЭМ изображения НЧ-АІРс.

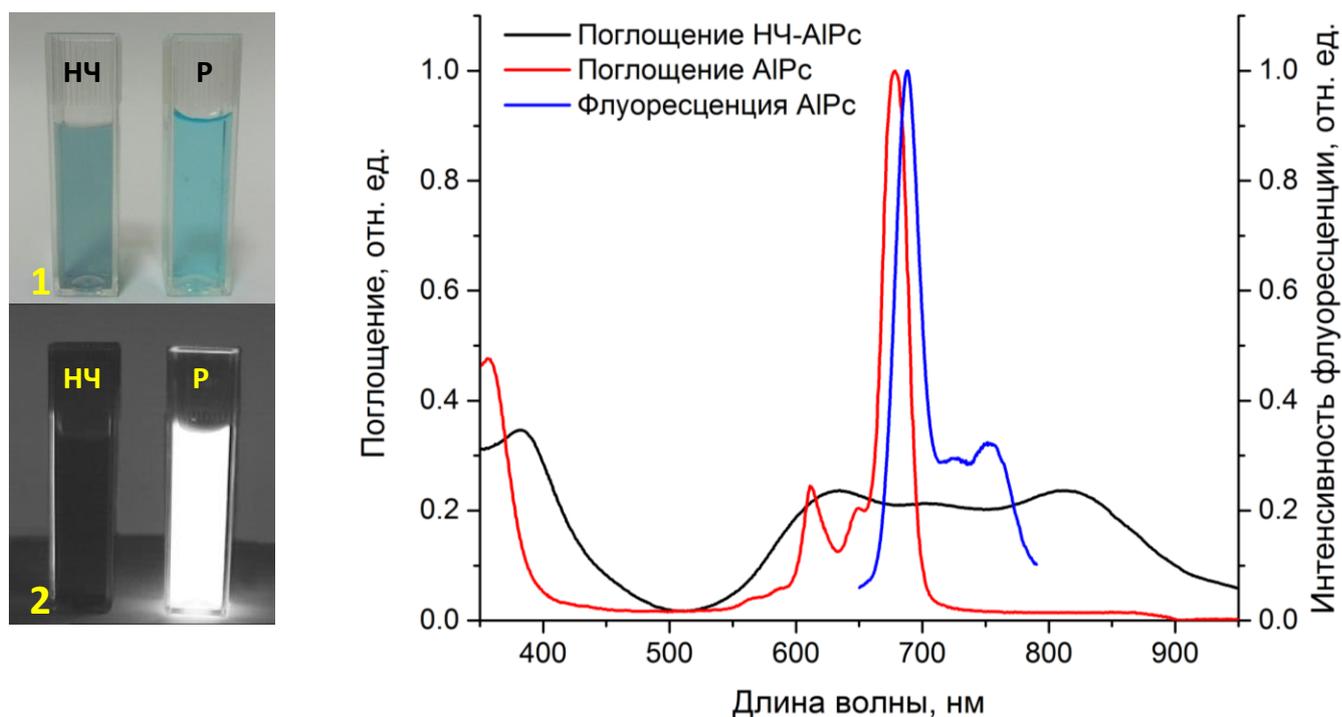


Рисунок 24. Изображения раствора АІРс (обозначен Р) и коллоида НЧ-АІРс (НЧ) при обычном освещении (1) и во флуоресцентном режиме (2) при возбуждении 635 нм. Справа – спектры экстинкции водного раствора АІРс и коллоида кристаллических НЧ-АІРс и спектр флуоресценции раствора АІРс.

Характеризация НЧ-АІРс по кристаллической структуре проводилась методами рентгеноструктурного анализа на рентгеновском дифрактометре D8 Advance (Bruker).

Рентгенограмма, измеренная от порошка крупнодисперсных кристаллов АІРс и от коллоидов НЧ-АІРс в различных средах, через 3 часа после инкубации представлена на Рисунке 25.

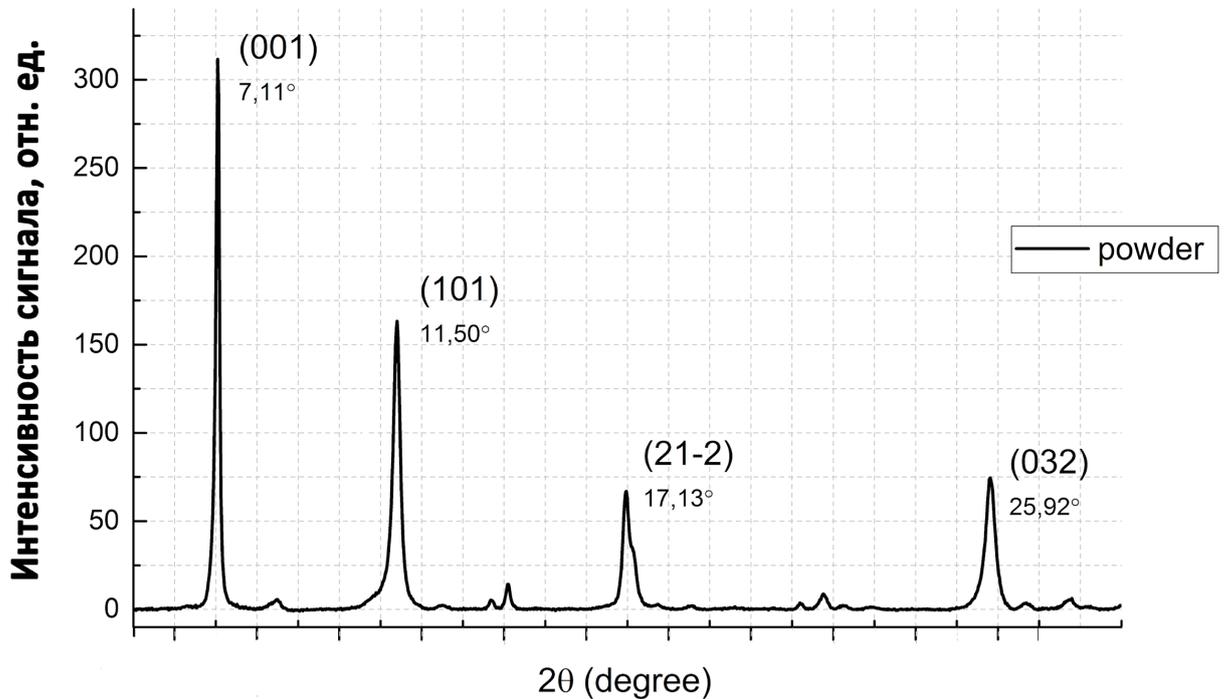


Рисунок 25. Рентгенограмма измеренная от порошка АІРс.

Установлено, что АІРс кристаллизуется в триклинной сингонии пространственной группы P1 с параметрами решетки, представленными в Таблице 2.

$a$ [Å]	$b$ [Å]	$c$ [Å]	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	$V$ [Å <sup>3</sup> ]
13.648	13.659	14.150	97.64	108.76	90.393	2472.0

Таблица 2. Данные рентгенодифракционного анализа для порошка НЧ-АІРс.

## 2.2 Используемая (серийная) научно-исследовательская аппаратура

### 2.2.1 Установка лазерная электронно-спектральная ЛЭСА-01- «БИОСПЕК»

Схема разработанной портативной спектроскопической системы представлена на Рисунке 26. Свет от лазерного источника 4 или лампы фокусируется на входной конец 6 Y-образного волоконно-оптического зонда 5. Излучение доставляется к исследуемому объекту на расстоянии от нескольких сантиметров до полного контакта с тканью (в зависимости от характера рассматриваемой проблемы). Дистальный конец зонда 7 устроен таким образом, что его можно ввести в биопсийный канал обычного эндоскопа для исследования полых органов или в иглу для внутритканевых исследований. Флуоресцентное излучение и рассеянный назад от ткани свет поступает в приемные волокна, которые окружают центральное волокно, служащее для доставки возбуждающего флуоресценцию лазерного излучения. Изменение

расстояния между рабочей частью зонда и тканью от 0 до 2 см и угла наклона от 0 до 30° не приводит к ошибке в определении концентрации Фс более чем на 10%, если препарат распределен равномерно по глубине ткани. В противном случае необходимо учитывать неравномерность распределения, которая обычно связана с разной степенью накопления препарата в слизистом и подслизистом слое органа. На выходном конце 8, который соединяется со спектрографом, волокна сформированы в ряд, чтобы увеличить световой поток, не теряя в разрешении. Перед входом в спектрограф установлен узкополосный светофильтр, снижающий интенсивность рассеянного назад лазерного света. Это позволяет в одном масштабе анализировать спектры флуоресценции и рассеянного лазерного излучения. Такой подход позволяет нормализовать спектры и количественно оценивать концентрацию Фс в различных тканях, а также сравнивать результаты, полученные в разное время на разных приборах.

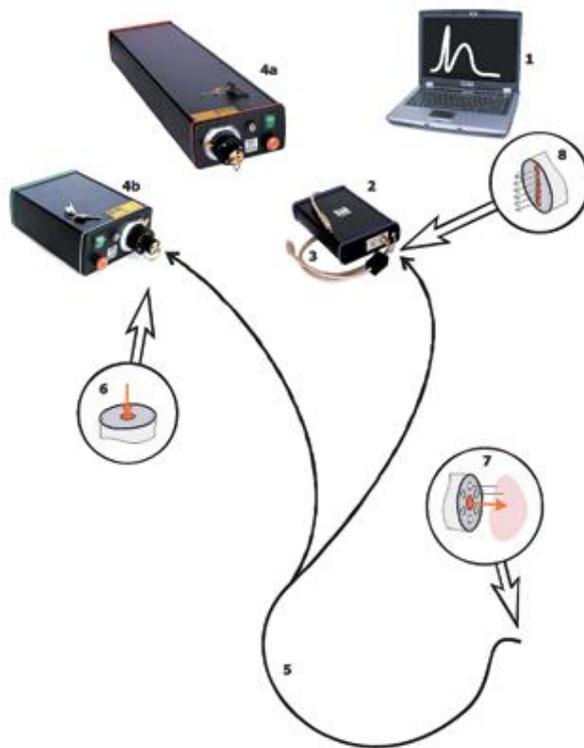


Рисунок 26. Схематическое устройство портативной системы для измерения спектров флуоресценции и отражения тканей *in vivo* методом локальной спектроскопии:

1 – компьютер с программным обеспечением; 2 – спектрометр; 3 – кабель USB; 4 – лазерный источник He-Ne и источник на лазерных диодах или твердотельный лазер; 5 – Y-образный волоконно-оптический зонд; 6 – вход; 7 – рабочая часть; 8 – выход.

### 2.2.2 Спектрометр динамического рассеяния света Photocor Complex (Photocor, Россия) для определения гидродинамических размеров наночастиц в водных коллоидах

Спектрометр (Рисунок 27) предназначен для измерения размеров наночастиц, эффективен для традиционных физико-химических исследований, а также для новых применений в нанотехнологии, биохимии и биофизике. Принцип работы спектрометра Photocor Complex основан на явлении динамического рассеяния света, методом фотонной корреляционной спектроскопии (<https://www.photocor.ru/theory>). На жестком основании (6) смонтированы прецизионный гониометр (10) и оптическая скамья (5), на которой размещены He-Ne лазер (1) и фокусирующий узел (3). Термостат (7) и адаптер кювет (8) установлены на гониометре коаксиально с его осью. На поворотной консоли (11) гониометра располагается фотоприемный блок (14), в состав которого входит приемная оптическая система (13) со сменной диафрагмой выбора апертуры (12), малошумящий фотоумножитель, работающий в режиме счета фотонов, быстрый усилитель-дискриминатор (15) со сквозным по постоянному току трактом и специальный высоковольтный источник питания ФЭУ без паразитных корреляций. Сигнал с выхода фотоприемного блока анализируется многоканальным коррелятором, который подключается непосредственно к персональному компьютеру. С помощью компьютера осуществляется управление процессом измерения и обработка результатов измерения.

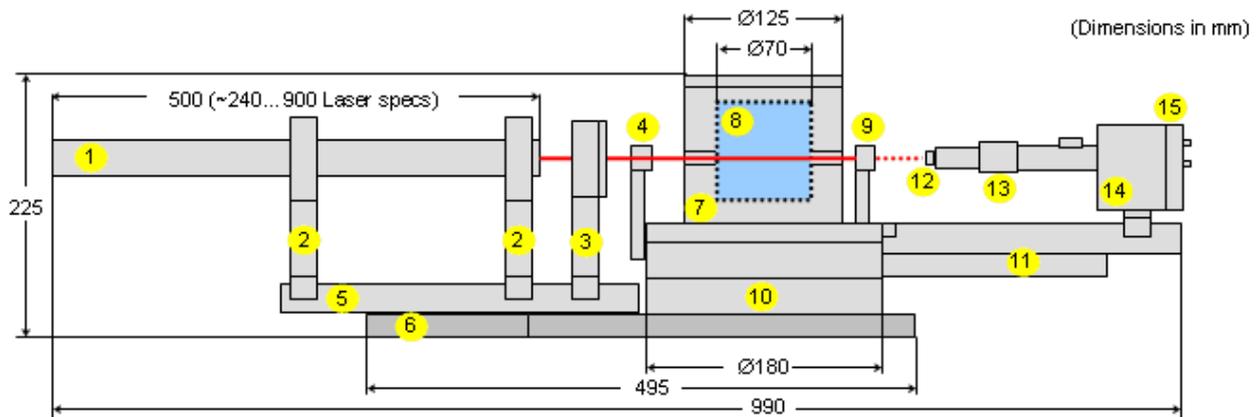


Рисунок 27. Схема спектрометра «Photocor Complex».

Диапазон измерений размеров частиц составляет от 0,5 до 6 мкм с типичной погрешностью  $\pm 1\%$ . Минимально возможный объем образца составляет 10 мкл, максимальный – 10 мл.

### 2.2.3 Лазерный сканирующий микроскоп

Для проведения исследований на клеточных культурах использовался лазерный сканирующий микроскоп LSM-710-NLO (Carl Zeiss, Германия) в комплексе с мультифотонным фемтосекундным перестраиваемым лазером Chameleon Ultra II (680-1080 нм) (Coherent, США).



Рисунок 28. Лазерный сканирующий микроскоп LSM-710-NLO.

LSM 710 NLO является универсальной системой и способна решать обширный спектр исследовательских задач, она хорошо подходит для высокочувствительных флуоресцентных исследований по глубине живых образцов или организмов. Прецизионные установки фемтосекундного лазера и максимально эффективное детектирование обеспечивают качественное изображение в глубоких слоях ткани. Эксперименты по фотобличингу и фотоманипуляции можно проводить с очень большой точностью благодаря заданной 3D зоне возбуждения. Возможны следующие применения: временные серии изображений, мультифлуоресцентное изображение, изображение и измерение концентраций ионов, количественная колокализация, микроскопия в проходящем свете, FRET анализ.

### **2.3 Разработанный лазерный спектроскопический комплекс с пикосекундным разрешением на основе стрик-камеры C10627-13 Hamamatsu Photonics**

Для исследования кинетики фотолуминесценции нанофотосенсибилизаторов коллективом лаборатории, в том числе автором данного исследования, был разработан измерительный комплекс, основанный на стрик-камере Hamamatsu C10627-13, с временным разрешением 15 пс, сопряжённой с волоконно-оптическим спектрометром (Рисунок 29-31). Для возбуждения использовался полупроводниковый лазер Hamamatsu с длительностью импульса 100 пс и длиной волны 637 нм. В процессе измерений использовался метод, называемый "Коррелированный по времени счёт единичных фотонов" (КВСФ). Суть метода заключается в следующем: люминесценцию исследуемого образца возбуждают короткими лазерными

импульсами, следующими с постоянной частотой, и затем анализируют распределение зарегистрированных фотонов по времени. Частоту импульсов и временную развёртку стрик камеры подбирают таким образом, чтобы время жизни флуоресценции  $\tau_F$  было соизмеримо с временной развёрткой и интервалом между импульсами.

В случае выбора слишком длинной временной развёртки  $T$  для конкретного  $\tau_F$  ( $\tau_F \ll T$ ), спад интенсивности флуоресценции после лазерного импульса возбуждения будет слишком быстрым и система не сможет различить двух фотонов, пришедших в различное время. Максимальное разрешение по времени определяется количеством пикселей CCD матрицы. В нашем случае – 480 пикселей, поэтому временная разрешающая способность для конкретной  $T$  определяется как  $t = T/480$  (например, для  $T = 100$  нс, разрешение по времени  $t = 100 \text{ нс} / 480 \approx 0,2 \text{ нс}$ ).

В случае же выбора слишком короткой временной развёртки  $T$  ( $\tau_F \gg T$ ), снижение интенсивности флуоресценции  $I_F$  за время  $T$  будет незначительным, что может быть воспринято системой как внешняя засветка, что не позволит корректно рассчитать  $\tau_F$ .

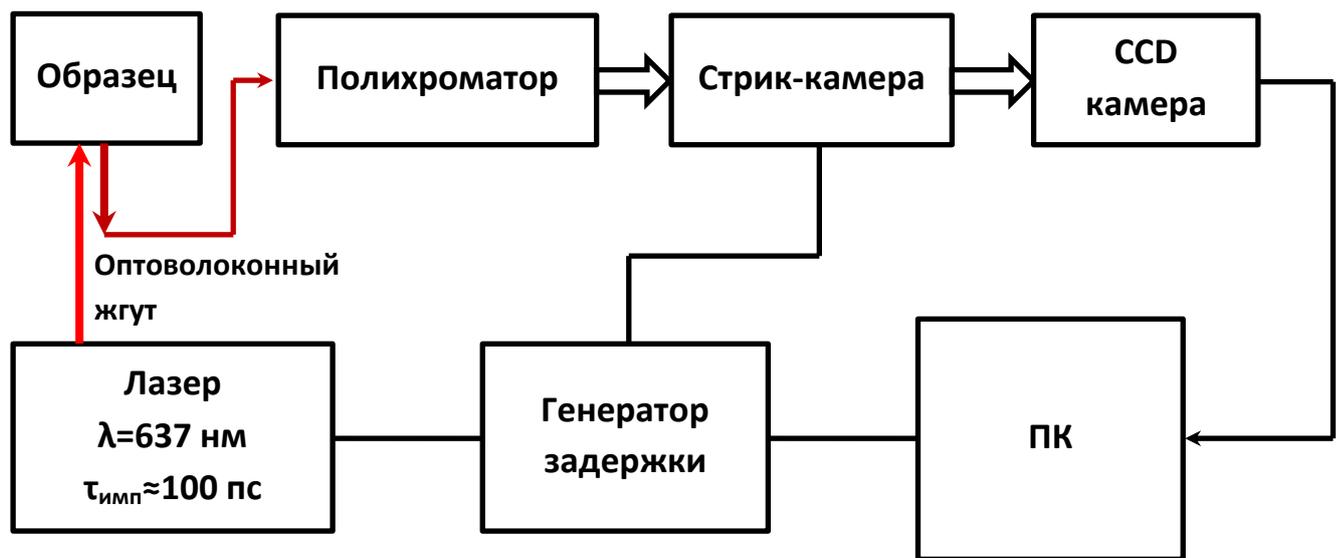


Рисунок 29. Блок-схема экспериментальной установки.

Люминесценция, возбуждённая в образце лазерным источником, собирается в оптическое волокно и далее попадает в полихроматор. Излучение, прошедшее полихроматор, формирует на фотокатоде изображение, которое конвертируется в электронный сигнал. Внутри электронно-оптического преобразователя параллельно оптической оси на электроны действует ускоряющее поле, которое заставляет их двигаться от фотокатода к фосфорному экрану. В процессе движения, к электронам прикладывается переменное поле, перпендикулярное направлению их движения, осуществляющее развёртку по времени. После развёртки электроны попадают на МКП (микроканальная пластина – аналог фотоэлектронного умножителя с разрешением по двум координатам), которая является усилителем потока электронов в

результате вторичной электронной эмиссии (Рисунок 30). Далее сигнал регистрируется CCD камерой и передаётся на компьютер, где происходит математическая обработка полученной кинетики флуоресценции с целью получения информации о времени жизни флуоресценции и о распределении числа фотонов зарегистрированных стрик-камерой между компонентами времени жизни.

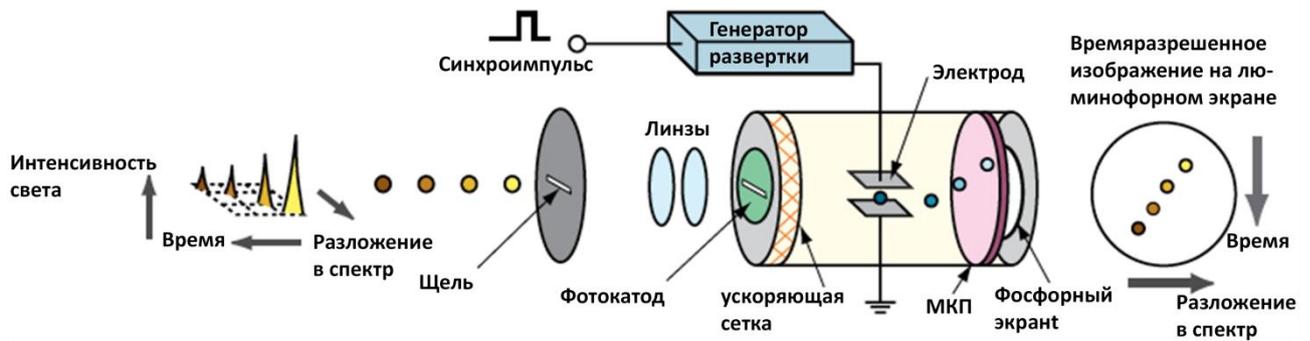


Рисунок 30. Схема работы электронно-оптического преобразователя (стрик-скопа)

Hamamatsu C10627.

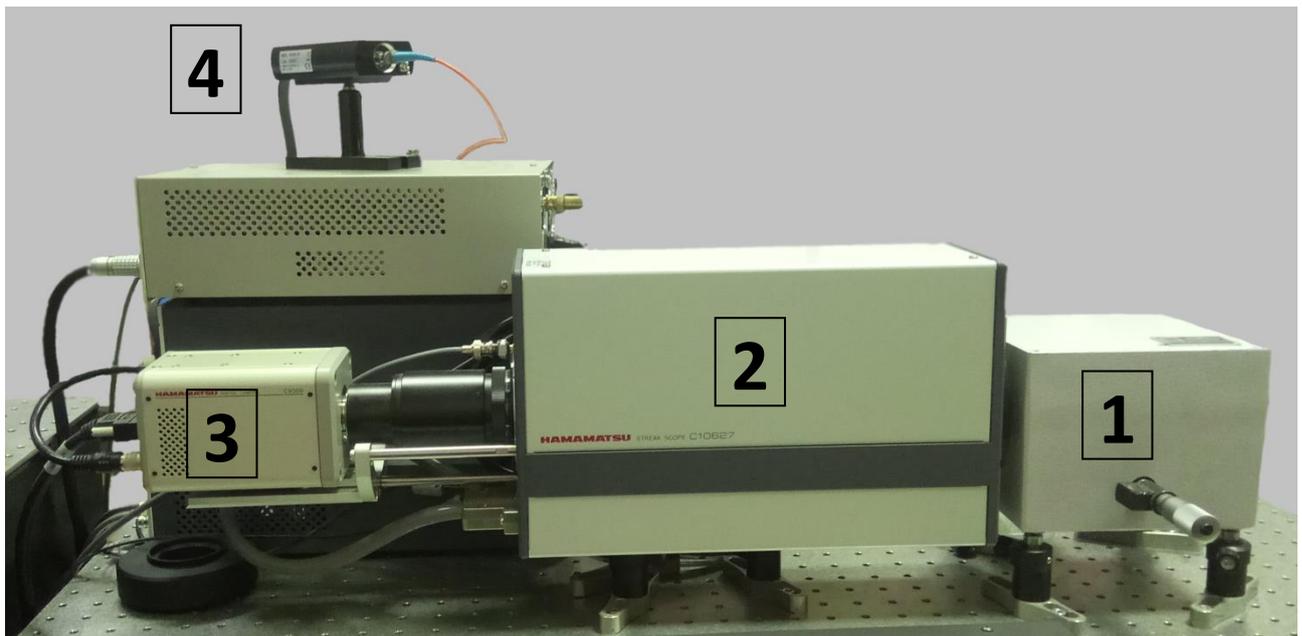


Рисунок 31. Изображение экспериментального комплекса. 1) полихроматор; 2) стрик-скоп; 3) CCD камера 4) лазер с оптоволоконным выходом.

Электронно-оптический преобразователь (ЭОП) Hamamatsu C10627 используется для исследования кинетики затухания фотоиндуцированной люминесценции. В основе его работы лежит метод коррелированного по времени счета единичных фотонов. Данный ЭОП имеет временное разрешение 15 пс. Развёртка по времени может осуществляться с частотой вплоть до 20 МГц, для временного развёртки 1 и 2 нс.

Настройки Hamamatsu C10627, такие как частота развёртки, напряжение на микроканальной пластине и открытие-закрытие оптического затвора, контролируются с помощью персонального компьютера, что позволяет значительно упростить его использование.

Для синхронизации источника лазерного излучения со стрик-камерой нами используется Hamamatsu synchronous delay generator C10647-01. Генератор задержки может работать в двух режимах: "Внутреннем" - когда синхронизация осуществляется по внутренним часам генератора задержки и "Внешнем" - когда синхронизация осуществляется по внешнему импульсу, идущему от источника лазерного излучения. Контроль над генератором задержки осуществляется через персональный компьютер.

Для регистрации распределения фотонов на выходе электронно-оптического преобразователя нами используется цифровая CCD-камера Hamamatsu C9300-508. Данная камера использует VGA интерфейс, охлаждение матрицы осуществляется с помощью элементов Пельтье, что позволяет значительно уменьшить темновой шум. Так же понизить шум помогает 12 битный цифровой выход. Управление камерой осуществляется с помощью персонального компьютера. CCD-камера обладает спектральной чувствительностью позволяющей исследовать люминесценцию в видимом и ближнем ИК диапазонах (Рисунок 32).

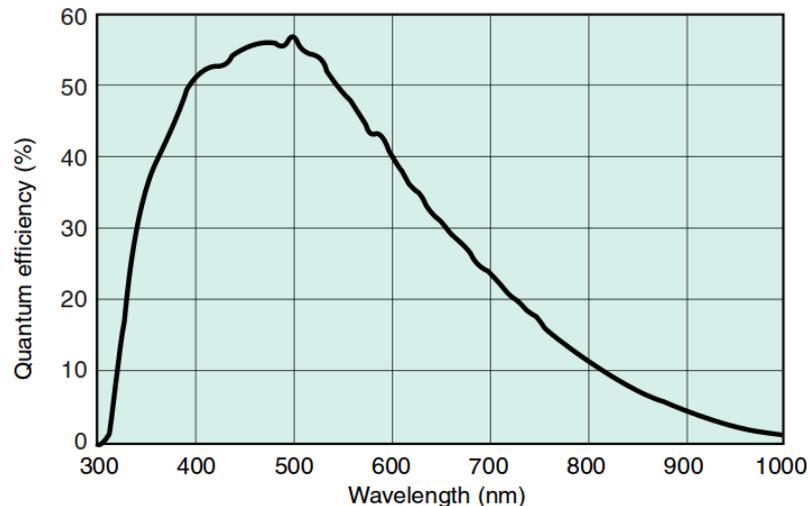


Рисунок 32. Спектральная чувствительность CCD-камеры Hamamatsu C9300-508.

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 33.

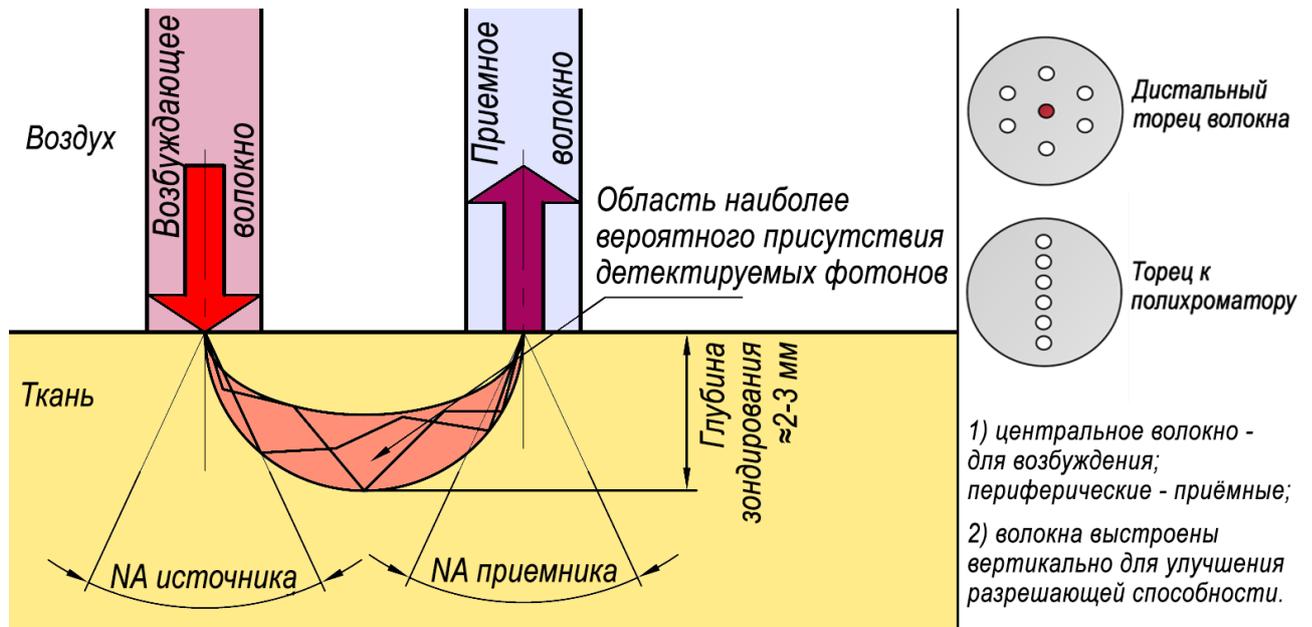


Рисунок 33. Принцип работы волоконно-оптического зонда, состоящего из 7 оптических волокон. По центральному волокну лазерный импульс доставляется к исследуемому образцу, а в периферических волокон собирают обратно рассеянный свет, в том числе и флуоресценцию. Центрантно-симметричное расположение волокон на дистальном торце зонда позволяет детектировать флуоресценцию независимо от расположения зонда к образцу.

Для доставки лазерного излучения использовалось многомодовое кварц-полимерное оптическое волокно с диаметром сердцевины 50 мкм и числовой апертурой  $NA=0,22$ . В качестве приемника излучения использовались 6 многомодовых кварц-кварцевых оптических волокон с диаметром сердцевины 200 мкм и числовой апертурой  $NA=0,22$ . Общая длина оптического жгута в данной конфигурации измерительной системы составила 4 метра. На такой длине уширение сигнала из-за разницы длины пробега фотона в волокне с апертурой  $NA=0,22$  будет достигать  $\Delta l=0,1$  м, что уширит регистрируемый лазерный импульс и флуоресценцию на величину порядка:

$$\Delta\tau_{\text{имп теор}} = \frac{\Delta l}{c \cdot n_{\text{кварц}}} \approx 0,5 \text{ нс} \quad (22)$$

Однако реальное уширение сигнала составляет 60 пс. Это происходит вследствие геометрии фотокатода стрик-камеры, высота которого составляет 70 мкм. Таким образом, регистрируются только близкие к центральным моды. Это значительно ослабляет регистрируемый сигнал, однако ослабление происходит в значительно меньшей степени, чем при использовании одномодовых волокон. А также позволяет использовать оптические волокна с большей площадью сечения, что увеличивает чувствительность установки.

## 2.4 Методы расчета изменения временных характеристик лазерного импульса и флуоресценции при распространении света в ткани

Используя лазерный спектроскопический комплекс с временным разрешением (п. 2.3), необходимо учитывать, что биологические ткани являются оптически неоднородными поглощающими средами, которые искажают волновые фронты и рассеивают свет в разных направлениях. Из-за этого возможно уширение по времени обратно рассеянного лазерного импульса и увеличение времени жизни флуоресценции, вследствие разброса вероятной длины пробега фотонов в ткани, прежде чем он попадет в приемное волокно.

Таким образом, для корректного определения времен жизни флуоресценции необходимо было определить, с какой точностью происходит регистрация измеряемых временных спектральных характеристик. Для интерполяции данного метода измерений на различные ткани и органы необходимо разработать модель, учитывающую оптические параметры различных органов и тканей таких как: рассеяние, поглощение, показатель преломления и фактор анизотропии.

Для того чтобы оценить абсолютную величину уширения, необходимо определить среднюю длину пробега фотона в ткани при данной геометрии измерений, а также минимальную и максимальную длину пробега.

В оптически однородной ткани свет ослабляется по закону Бугера-Ламберта-Бера:

$$\frac{dI}{ds} = -\mu I \quad (23)$$

Что проще представить в экспоненциальном виде:

$$I(s) = I_0 e^{-\mu s} \quad (24)$$

Где  $s$  – длина пути,  $I_0$  – начальная интенсивность. Глубина проникновения света в ткань в таком случае задается формулой:

$$L = \frac{1}{\mu} \quad (25)$$

Одним из наиболее подходящих методов моделирования распространения света в тканях является метод Монте-Карло (МК). Метод МК начинается с запуска фотона в ткань с выбором начального направления: вглубь ткани, если падающий пучок коллимирован, либо случайно, в случае диффузного рассеяния. В настоящее время наиболее часто используемый общедоступный алгоритм, который был разработан Жаком для многослойных биологических тканей [143]. Этот алгоритм заключается в распространении множества фотонов (пакета фотонов) вдоль каждого направления. Пакет фотонов имеет свой «вес», который экспоненциально уменьшается в процессе распространения света в ткани в соответствии с показателями поглощения и рассеяния среды. Когда «вес» фотона становится меньше

определенного заданного порога, случайно определяется, поглотится фотон или продолжит свой путь.

Если рассмотреть отдельный фотон, то он распространяется отдельными небольшими «прыжками» между актами рассеяния. Длина прыжка должна быть много меньше средней длины свободного пробега фотона в ткани, которая задается формулой:

$$\Delta s \ll \frac{1}{\mu_t} = \frac{1}{\mu_s + \mu_a} \quad (26)$$

где  $\mu_t$ ,  $\mu_a$  и  $\mu_s$  – коэффициенты полного ослабления, поглощения и рассеяния соответственно. Однако в таком приближении, если размер шага слишком мал, то фотон редко взаимодействует с тканью и метод Монте-Карло будет неэффективным, и наоборот, если размер шага слишком велик, то путь проходимый фотоном будет плохим приближением к пути реального фотона.

Намного эффективнее ввести переменную длину «прыжка»:

$$\Delta s = -\frac{\ln(\xi)}{\mu_t} \quad (27)$$

где  $\xi$  – случайное число от 0 до 1. Поглощение в среде учитывается потерей «веса» фотона в конце каждого шага. Величина потери «веса» фотона весу фотона, умноженному на  $(1-\Lambda)$ , где  $\Lambda$  – альбеда. Затем фотон снова рассеивается, а новое направление рассеяния выбирается, исходя из фазовой функции рассеяния, аппроксимированной феноменологической функцией Хенши-Гринштейна:

$$p(\theta) = \frac{1}{4\pi} \cdot \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2g \cos \theta)^{3/2}} \quad (28)$$

где  $g$  – параметр анизотропии рассеяния (средний косинус угла рассеяния  $\theta$ ):

$$g \equiv \langle \cos \theta \rangle = \int_0^\pi p(\theta) \cos \theta \cdot 2\pi \sin \theta d\theta \quad (29)$$

Значение  $g$  меняется в диапазоне от -1 до 1. В случае изотропного рассеяния (рэлеевского)  $g=0$ . При полном рассеянии назад или вперед  $g=-1$  и  $g=1$  соответственно.

Когда фотон пересекает границу с внешней средой, его «вес» вносит вклад в диффузное отражение или пропускание. В случае отражения, пакет фотонов продолжает миграцию, в противном случае миграция фотона прекращается. Для получения статистически значимых результатов требуется большое число фотонов – от 1 до 100 млн.

В данной работе исследования *in vivo* проводились на коже. Представим кожу как плоскую многослойную рассеивающую и поглощающую среду, состоящую из трех слоев: эпидермиса, дермы и гиподермы (подкожно-жировой клетчатки). Каждый слой характеризуется

параметрами  $\mu_a$ ,  $\mu_s$ ,  $g$ , толщиной  $d$  и средним показателем преломления среды  $n$ . Величины этих параметров для кожи представлены в Таблице 3.

Таблица 3. Оптические параметры кожи для длины волны 637 нм.

Слой кожи	$\mu_a$ , $\text{см}^{-1}$	$\mu_s$ , $\text{см}^{-1}$	$g$	$n$	Средняя толщина, мкм
эпидермис	35	450	0,8	1,45	80
дерма	2,7	187	0,8	1,38	1000
Подкожно-жировая клетчатка	0,7	120	0,9	1,44	3000

Используя алгоритм МК, можно рассчитать распределение света по интенсивности в ткани в зависимости от глубины, задав параметры излучателя и приемного волокна. Если расположить источник лазерного излучения и приёмник рассеянного излучения на некотором расстоянии друг от друга, то испущенные фотоны от одного волокна будут проходить к другому в области, имеющей форму «банана» (Рисунок 34). В данном исследовании в качестве источника использовалось кварцевое оптическое волокно с диаметром  $D_{\text{ист}}=50$  мкм и числовой апертурой  $NA=0,22$ , а в качестве приемника использовались 6 кварцевых волокон с диаметром  $D_{\text{прием}}=200$  мкм и числовой апертурой  $NA=0,22$ , расположенных симметрично относительно источника.

В силу симметрии, если поменять волокно-приемник на волокно-источник, то картина распределения фотонов не изменится, вследствие отсутствия корреляции между световыми полями от волокон-источников. Области наиболее вероятного прохождения фотонов от первого волокна ко второму и от второго к первому будут совпадать, а интенсивности суммироваться. Чем больше фотонов рассеются в данной точке, тем ярче будет пиксель. Изображение имеет 32-битную глубину цвета, что позволяет уловить малые изменения яркости в световом поле, и хранится в формате «tif».

Для обработки полученных изображений использовалась разработанная в лаборатории лазерной биоспектроскопии программа TiffReader [139]. Чтение и запись файлов осуществляется в соответствии со спецификацией формата «tif». В отличие от известных графических редакторов, таких как Adobe Photoshop, CorelDraw, данная программа позволяет обрабатывать графические файлы \*.tif с глубиной цвета более чем 24 бита без потери глубины цвета изображения, позволяет измерять расстояния между заданными точками на изображении, строить профили яркости, как на прямой, так и на выделенной области. Существует возможность подавления шума сглаживающими линейными фильтрами с выбором масок Собела и Превитта. В программу входят алгоритмы поиска максимума яркости на изображении и поиска глубины зондирования.

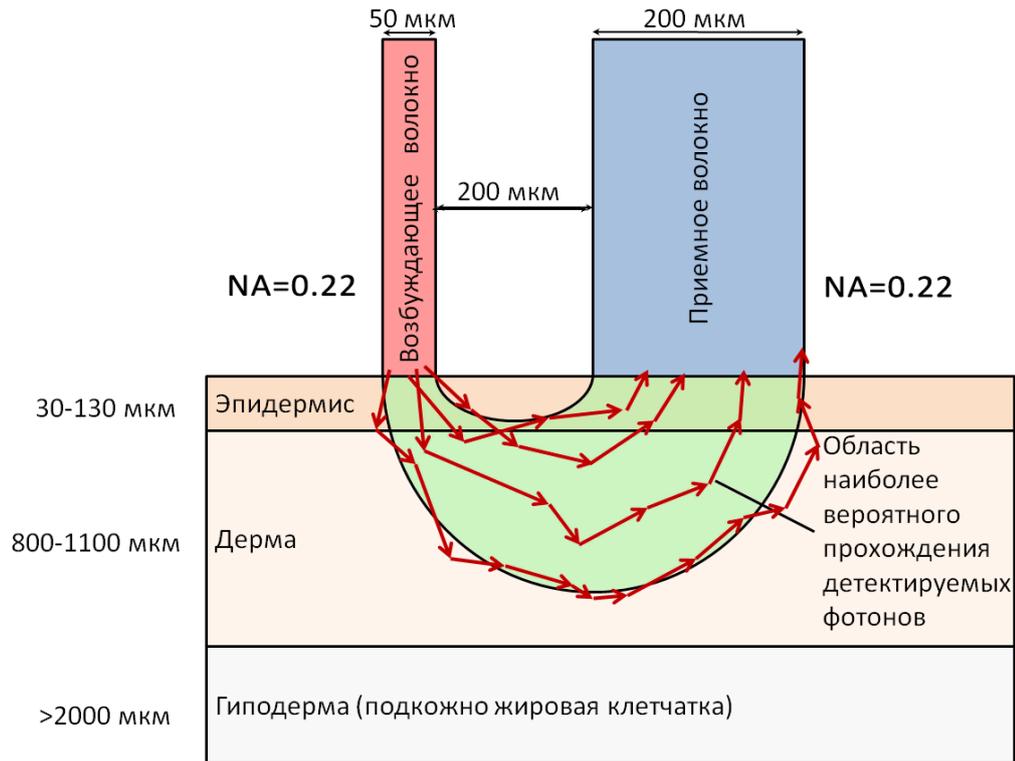


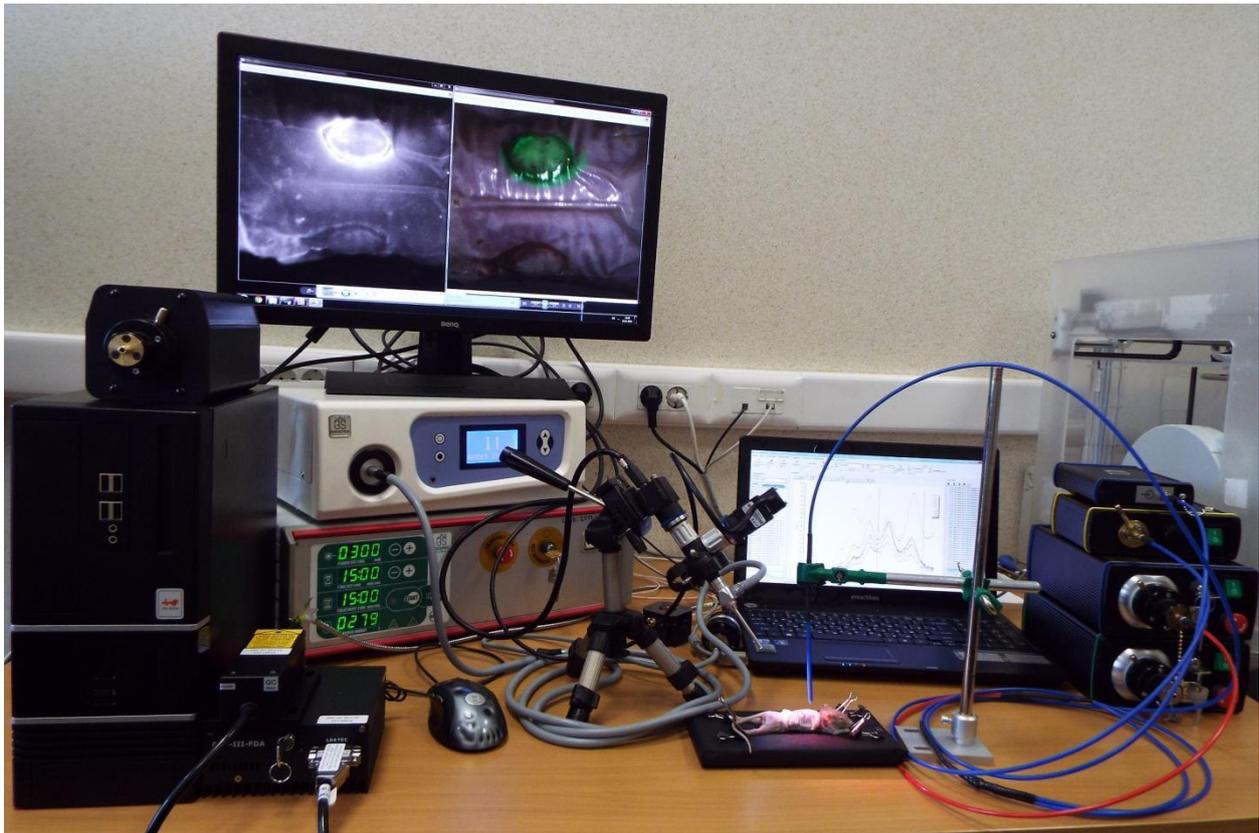
Рисунок 34. Распределение фотонов, вылетающих из волокна-источника и попадающих в волокно-приемник.

## 2.5. Разработанный лазерный спектроскопический комплекс для оценки состояния биологических тканей с использованием НЧ-АІРс

В рамках работы 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 кровотока и лимфотока,
- 4) оценка внутриклеточного метаболизма,
- 5) оценка типа клеточного дыхания (аэробное/анаэробное).

На Рисунке 35 представлен макет разработанного приборного комплекса.



*Рисунок 35. Макет приборного комплекса неинвазивной спектроскопической оценки состояния кожного покрова и степени приживления трансплантируемых тканей.*

Для понимания принципа работы приборного комплекса в целом, необходимо пояснить работу каждой из его частей.

### **2.5.1. Метод оценки степени оксигенации и уровня кровенаполненности кожных трансплантатов в процессе их приживления**

За основу измерительной части степени оксигенации и кровенаполненности ткани был взят принцип, разработанный и запатентованный ранее для слизистых оболочек и для тест-объектов с фотосенсибилизаторами [112; 113]. В отличие от слизистой оболочки, где кровеносные капилляры расположены близко к поверхности и разделены тонким слоем ткани с незначительным коэффициентом рассеяния, в кожном покрове микрокапиллярное русло расположено глубже от поверхности и отделено эпидермисом, коэффициент рассеяния которого существенно выше. Задача разработки заключалась в подборе оптических комплектующих с учетом этих особенностей.

Схема экспериментальной установки для измерения спектров обратного диффузного рассеяния (ОДР) *in vivo* представлена на Рисунке 36. Свет от галогеновой лампы (1) в спектральном диапазоне 400-1100 нм фокусировался на торец передающего оптического волокна (2). В качестве передающих волокон использовалось кварцевое оптическое волокно диаметром 250 мкм с числовой апертурой  $NA = 0,22$ . Передающее волокно доставляло свет к

ткани (3). Далее свет проходил через ткань, испытывая рассеяние и поглощение, и поступал в 6 приемных волокон диаметром, расположенных гексагонально вокруг передающего волокна (7) для обеспечения пространственной локальности детектирования света на поверхности ткани, а со стороны спектрометра – уложенных в линию (8) для сохранения спектрального разрешения. Такая конструкция жгута позволила в 6 раз увеличить количество собираемого от ткани рассеянного света и сохранить требуемое спектральное разрешение.

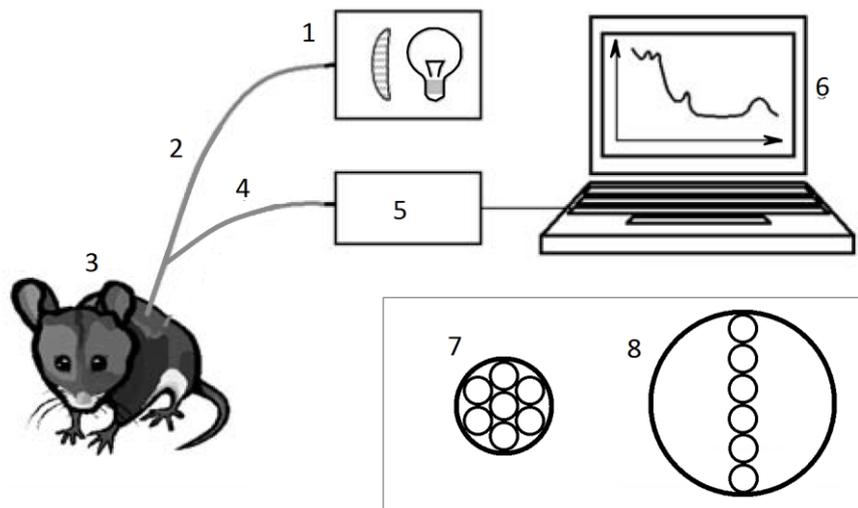


Рисунок 36. Схема экспериментальной установки для измерения спектров ОДР тканей *in vivo*: 1- галогеновая лампа; 2 – передающее волокно; 3 – исследуемая ткань; 4 – приемное волокно; 5 – спектрометр; 6 – ПК. На вставке: 7 – дистальный торец волокна; 8 – торец волокна соединенный со спектрометром.

Приемное и передающие волокна обычно находились в непосредственном контакте с тестируемой тканью или на небольшом расстоянии (до 1 мм) от ее поверхности для того, чтобы избежать влияния на ее оптические свойства при надавливании. С приемного волокна свет поступал в спектрометр 5, который управлялся через USB-интерфейс персональным компьютером 6 с помощью специального программного обеспечения. В качестве приемной части, был разработан и изготовлен волоконно-оптический спектрометр с параметрами оптимизированными для измерения спектров ОДР в диапазоне 450 – 600 нм с разрешением 2 нм. Для исключения влияния спектральной чувствительности детектора, спектра пропускания волокон, а также спектральной излучательной характеристики источника света на детектируемый сигнал измерения проводились относительно стандартного образца ( $\text{BaSO}_4$ ) с коэффициентом отражения близким к единице в интересующем нас спектральном диапазоне. Более подробно методика измерений описана в [114].

### **2.5.2 Метод оценки типа дыхания клеток приживляемых трансплантатов (аэробное/анаэробное) по измерению спектров люминесценции окисленной и восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида ( $\text{NAD}^+$ , $\text{NADH}$ )**

Схема экспериментальной установки для измерения спектров фотолюминесценции  $\text{NADH}$  практически такая же, как и на Рисунке 36. Различие только в том, что вместо вольфрам-галогенового источника использовался импульсный перестраиваемый Nd:YAG лазер Lotis ii ( $\lambda=355$  нм,  $\tau_{\text{имп}}=7$  нс,  $\nu=15$  Гц), который, попадая на исследуемую ткань, возбуждает флуоресценцию. Флуоресценция регистрируется оптоволоконным зондом и попадает на спектрометр ЛЭСА-01-БИОСПЕК (разрешающая способность 2 нм, спектральный диапазон 350–550 нм). Высокоинтенсивное диффузно рассеянное лазерное излучение фильтровалось оптическим фильтром ЖС-11.

Для физического моделирования рассеивающих свойств биологических тканей, как правило, используются растворы жировых эмульсий, поэтому для моделирования рассеивающих свойств кожного покрова был использован водный раствор Липофундина МСТ/ЛСТ 20 % (Lipofundin MCT/LCT 20 %).

Для апробации алгоритма выделения информации о рассеивающих и поглощающих свойствах ткани из спектров диффузного отражения был приготовлен массив фантомов с рядом концентраций  $\text{NAD}$  (от 0,25 до 5 мг/мл), восстановленного натрием, соответствующих различным состояниям кожной ткани. Каждой концентрации  $\text{NADH}$  соответствовал ряд разведений Липофундина 20 % с итоговой концентрацией жировой эмульсии 1,6 %.

### **2.5.3 Метод видеофлуоресцентного цифрового анализа динамики приживления трансплантатов в красном и ближнем инфракрасном диапазоне спектра с применением одновременно наночастиц фталоцианина алюминия и индоцианина зеленого, позволяющий одновременно измерять динамику кровотока и лимфотока, как в трансплантируемой ткани, так и в нижележащих слоях**

Приживление трансплантируемых тканей можно считать успешным в случае естественного образования сосудистой и лимфатической сетей в области трансплантируемой ткани. В идеале ткани в области трансплантата должны снабжаться кровотоком и лимфотоком также как и близлежащие здоровые ткани. Однако достичь такого эффекта непросто и удается только с применением специальных препаратов. Так, при аппликации коллоидного раствора наночастиц  $\text{AlPc}$  на ауто трансплантаты было достигнуто улучшение качества их приживления за счет фотодинамической элиминации патогенной микрофлоры и стимуляции неоангиогенеза. Таким образом, оценка состояния кровотока и лимфотока с применением люминесцирующих

лекарственных препаратов дает довольно широкое представление о стадии процесса приживления.

В свою очередь, размеры кровеносных и лимфатических капилляров довольно малы и составляют всего несколько микрон. Их визуализация осложняется также и глубиной залегания в биологической ткани, которая достигает нескольких миллиметров. Именно поэтому для получения контрастного высокоточного изображения необходимо применение люминесцирующих препаратов, окрашивающих русло кровотока. В качестве люминесцирующих препаратов наиболее эффективными, в целях глубокого проникновения в кожный покров, является выбор соединений с интенсивной полосой поглощения и люминесценции в красной и ближней инфракрасной областях спектра, где собственное поглощение биологической ткани минимально. Такими фотосенсибилизаторами являются: фталоцианин алюминия (максимум поглощения  $\lambda=675$  нм; максимум флуоресценции в крови  $\lambda=690$  нм), Indocyanine green (ICG) (максимум поглощения  $\lambda=800$  нм; максимум флуоресценции в крови  $\lambda=830$  нм); производные бактериохлорина (максимум поглощения  $\lambda\approx 780$  нм, максимум флуоресценции  $\lambda=820$  нм).

Макет измерительной видеосистемы (Рисунок 37) состоит из источника лазерного излучения, широкополосного диодного источника, светоделителя с дихроичным зеркалом и двух цифровых камер для регистрации цветного и люминесцентного изображений. Дихроичный светоделитель используется для спектрального разделения световых потоков, которые несут информацию об исследуемых тканях. В качестве возбуждения люминесценции использовали лазерный источник с длиной волны, попадающей в спектральный максимум поглощения используемого для визуализации препарата. Стоит отметить, что существует возможность менять источники лазерного излучения, путем подбора длины волны для каждой конкретной задачи, учитывая биологические свойства тканей и изучаемой области. В качестве источника белого света используется диодный источник.

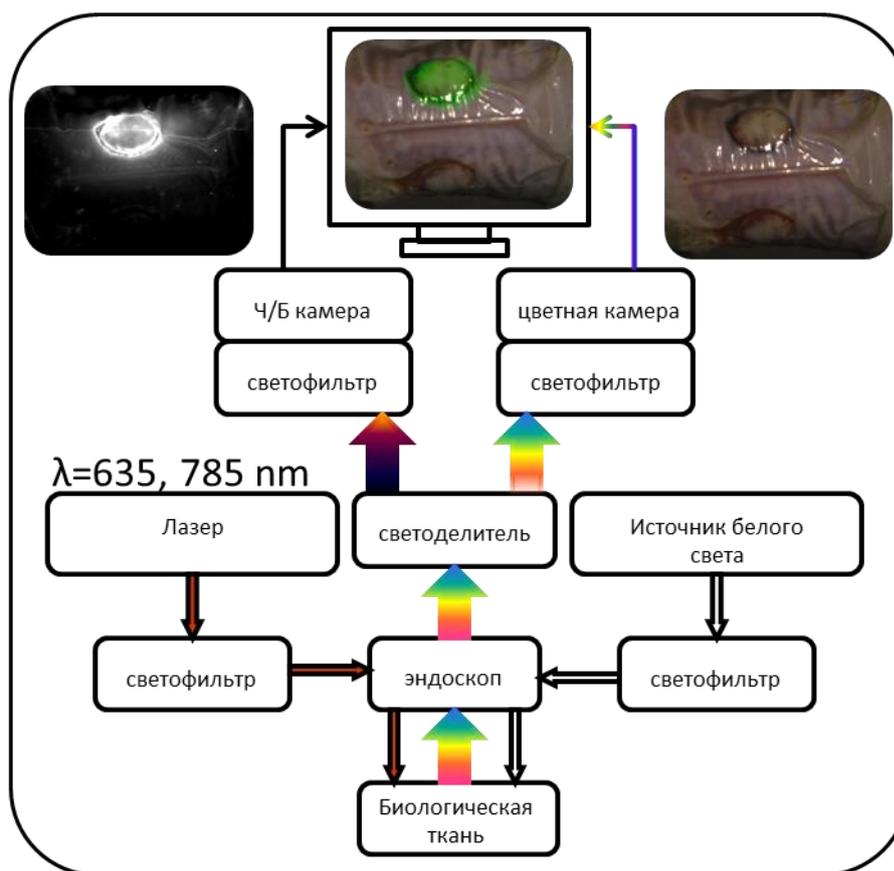


Рисунок 37. Блок-схема макета видеосистемы.

В световой канал оптической трубки вводится по Y-образному волокну излучение от источника белого света и лазерного источника. Вводимое излучение в оптическую схему эндоскопа проходит предварительную фильтрацию. Лазерный источник проходит через систему волоконной фильтрации, чтобы сузить спектр лазерного излучения, а в оптическую схему источника белого света установлен светофильтр, пропускающий все длины волн, вплоть до 625 нм. Такую фильтрацию необходимо проводить для предотвращения наложения излучения от источника белого света и устранить попадания лазерного излучения на матрицу диагностической камеры.

Видеоканал черно-белой камеры позволяет получить люминесцентное изображение исследуемой области, видеоканал цветной камеры позволяет наблюдать ту же картину в режиме реального времени в цвете. Изображение с обеих камер поступает в компьютер в цифровом виде. При помощи разработанного программного обеспечения, после аффинных трансформаций, происходит совмещение изображений с обеих камер, затем полученное комбинированное изображение выводится на экран монитора. Такая конструкция системы позволяет визуализировать флуоресцентный сигнал поверх обычного цветного изображения в режиме реального времени.

## **2.6 Волоконно-оптические инструменты для лазерной флуоресцентной диагностики и лазерной фотодинамической терапии крупных сосудов и для внутрисуставного использования**

Обнаружение, определение состояния и терапия атеросклеротических бляшек (АСБ) является одной из важнейших задач в современной медицине. Исходя из литературных данных [113], известно об избирательном накоплении фотосенсибилизаторов (Фс) (производные фталоцианинов, 5-аминолевулиновой кислоты и гематопорфирина) в атеросклеротических образованиях. Данный факт позволяет разработать модели по определению местоположения атеросклеротических поражений и локализации местонахождения атеросклеротической бляшки путем проведения флуоресцентной диагностики (ФД) стенок сосуда.

Однако проведение ФД и ФДТ атеросклеротических поражений сосудов связано с некоторыми ограничениями, а именно:

- 1) Невозможность неинвазивного проведения процедуры при непрерывном режиме возбуждения и регистрации флуоресценции с поверхности кожи, так как сигнал от бляшки экранируется флуоресценцией фотосенсибилизаторов, накопившихся в коже и мышечном слое над исследуемым сосудом;
- 2) Возникновение погрешностей при измерении спектров флуоресценции в кровотоке и трудность локального облучения пораженного участка сосудистой стенки строго определенным количеством энергии.

Очевидно, что данные ограничения добавляют много трудностей для выполнения ФД и ФДТ стенок сосуда, пораженных атеросклерозом. Применяемые в настоящее время методы не позволяют существенно упростить данную процедуру.

Одной из целей данной работы является попытка устранения некоторых недостатков предыдущих методов и разработка новых подходов проведения процедуры ФД и ФДТ с препаратом «Фотосенс»® и «Аласенс»® (ГНЦ «НИОПИК») [116] для диагностики и терапии атеросклеротических бляшек, разработка волоконно-оптических устройств для реализации данных подходов, а также исследование накопления Фс в АСБ. *Работа проводилась совместно с Российским кардиологическим научно-производственным комплексом МЗСР РФ и Научным центром сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н.Бакулева РАМН.*

Для проведения предклинической апробации методов внутрисосудистой ФД и ФДТ АСБ было необходимо разработать макет специального ангиоскопического волоконно-оптического катетера и провести его предклиническую и клиническую апробацию.

Из-за особенностей кровеносных сосудов, точнее их малого диаметра, катетер должен быть тонким (не более 1,65 мм), а также достаточно гибким, чтобы не повредить стенку сосуда.

Поэтому, для изготовления внешней трубки катетера, используется прозрачный, гибкий, пригодный для медицинского применения материал – полиамид.

Также катетер должен быть рентгеноконтрастным, так как исследования проводятся под непрерывным рентгеноконтролем. Эта проблема решалась двумя способами:

- 1) Использованием оптического волокна в металлической оболочке.
- 2) Использованием специальных рентгеноконтрастных меток.

Для устранения дополнительных погрешностей при измерении флуоресценции, излучаемой АСБ, исследование надо проводить при полном перекрытии сосуда специальным баллоном, который находится на конце катетера (баллон наполняется физиологическим раствором). В результате чего, кровь вытесняется баллоном и не препятствует измерению спектров флуоресценции от стенок сосуда.

С этой целью было разработано несколько моделей баллонных ангиоскопических волоконно-оптических катетеров, которые различались по диаметру и способу возбуждения флуоресценции.

Наиболее простая модель представлена на Рисунке 38 а,б. Как видно из схемы свет испускается вперед и, за счет апертуры оптического волокна или изгиба сосуда, возбуждает флуоресценцию в АСБ на стенках сосуда, которая регистрируется 2-мя или 6-ю оптическими волокнами, идущих на спектрометр. Вторая модель катетера для проведения ФД представлена на Рисунке 38 в,г. Данный катетер имеет на конце отражающую поверхность, при помощи которой лазерное излучение направляется на стенку сосуда. Флуоресцентный свет, также отражаясь от зеркальной поверхности, регистрируется двумя или шестью оптическими волокнами, идущих на спектрометр.

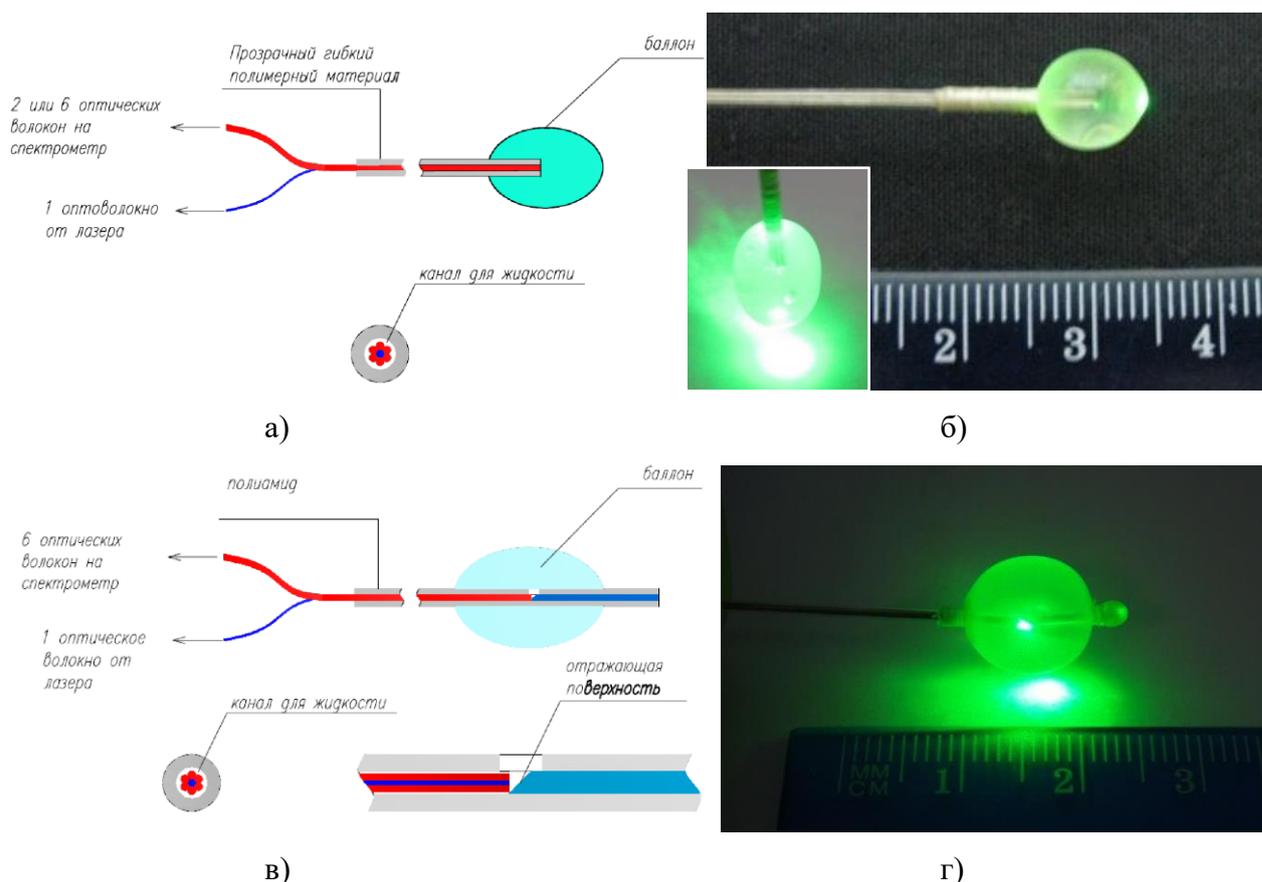


Рисунок 38. а) Схема баллонного катетера для проведения внутрисосудистой ФД АСБ с торцевым облучателем; б) фото баллона, надутого физраствором; в) схема баллонного катетера для проведения внутрисосудистой ФД АСБ с боковым облучателем.

Для проведения процедуры ФДТ используется третий тип катетера (Рисунок 39). Внутри катетера помещено одно оптическое волокно с цилиндрическим рассеивателем на конце. Для улучшения равномерности облучения баллон наполняется 0,5% интралипидом. Интралипид (10%) является хорошей рассеивающей средой (согласно литературным данным: фактор анизотропии рассеяния  $g=0,62$ , коэффициент рассеяния  $\mu_s=5,16 \text{ мм}^{-1}$ ).

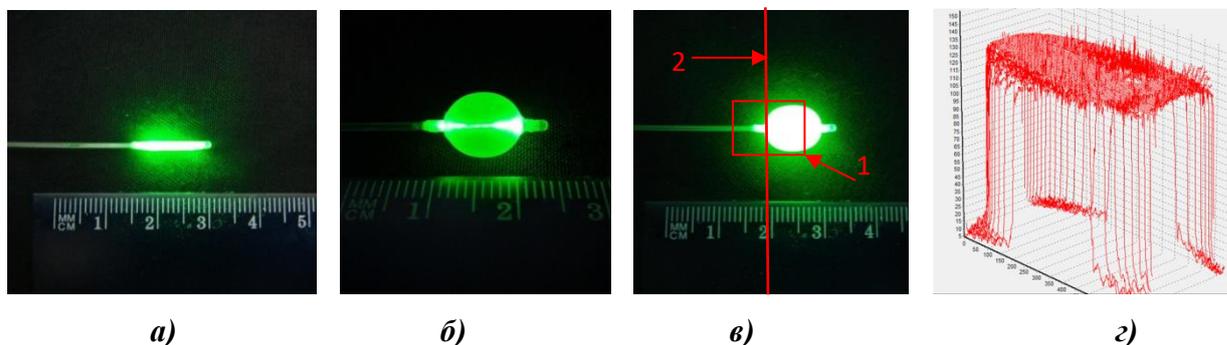


Рисунок 39. Фото модели баллонного катетера для ФДТ АСБ. а) баллон в сдутом состоянии; б) баллон наполнен физраствором; в) баллон наполнен рассеивающей жидкостью; г) профиль интенсивности света.

Таблица 4. Основные технические характеристики баллонных катетеров для проведения внутрисосудистой ФД и ФДТ АСБ.

Тип катетера	Торцевой	Боковой	Для ФДТ
Общая длина, м	3		
Длина дистальной части, м	1,6		
Внешний диаметр, мм	1,3	1,65	1,3
Радиус сгиба, см	2,5		
Тип разъема	SMA-905, D=3,167 – 3,172		
Тип оптического волокна (сердцевина/оболочка/покрытие)	кварц/кварц/металл		кварц/кварц/полимер
Диаметры (сердцевина/ оболочка/ покрытие), мкм	200/220/350		
Числовая апертура	0,22		
Облучающие волокна, количество	1 (центральное)		
Принимающие волокна, количество	2-6 (периферийные)		-

### **ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИЗМЕНЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ СВОЙСТВ НЧ-АІРс В ЗАВИСИМОСТИ ОТ МИКРООКРУЖЕНИЯ**

В данной главе описываются результаты исследования изменения спектрально-люминесцентных свойств НЧ-АІРс при взаимодействии их с различным микроокружением. В параграфе 3.1 рассмотрены результаты изменения интенсивности и длины волны флуоресценции НЧ-АІРс. В параграфе 3.2 представлены результаты исследований изменения времени жизни флуоресценции НЧ-АІРс в модельных системах и культурах раковых и иммунокомпетентных клеток. В параграфе 3.3 описана методика измерения квантового выхода флуоресценции и генерации синглетного кислорода НЧ-АІРс в модельных системах и различных клеточных культурах. Параграф 3.4 посвящен исследованию динамики накопления и выведения НЧ-АІРс при их взаимодействии с клеточными культурами. Произведена оценка фазового состояния НЧ-АІРс внутри клеток. 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 Монте-Карло значений уширения спектра по времени и регистрируемых экспериментальных данных.

#### **3.1 Динамика изменения интенсивности, длины волны и времени жизни флуоресценции НЧ-АІРс в модельных системах**

Известно, что НЧ-АІРс, попадая в биологическое окружение, начинают флуоресцировать, причём интенсивность флуоресценции зависит от типа окружения. Одним из предположений было, что на появление флуоресценции оказывает влияние рН окружающей НЧ среды. Предположение основано на том, что в матриксе злокачественных опухолей рН часто является более кислотным, по сравнению со здоровыми тканями. Также, следует отметить, что лизосомы клеток как здоровых, так и злокачественных тканей, отвечающие за расщепление веществ попавших в клетку, имеют кислотный рН, а некоторые макрофаги типа М2 имеют щелочной рН. В связи с этим были подготовлены образцы с коллоидом наночастиц фталоцианина алюминия при различных рН. В качестве дисперсионной среды использовалась дистиллированная вода. Таким образом, основной целью данного эксперимента было исследование влияния рН на флуоресценцию фталоцианина алюминия в коллоиде.

На первом этапе работ были проведены исследования по изучению зависимости интенсивности флуоресценции коллоида наночастиц фталоцианина алюминия (НЧ-АІРс) от рН и зависимости коэффициента поглощения коллоида НЧ-АІРс от рН. Полученные зависимости спектров поглощения и флуоресценции НЧ-АІРс от рН представлены на Рисунке 40-41

соответственно. Измерение спектров поглощения проводилось на компьютеризированном спектрофотометре Hitachi U-3400. Для измерения спектров флуоресценции использовался лазерный спектрометр ЛЭСА-01-БИОСПЕК. Возбуждение осуществлялась с помощью He-Ne лазера производства фирмы БИОСПЕК.

Как видно из Рисунка 40 коэффициент поглощения коллоида наночастиц фталоцианина алюминия имеет зависимость от pH. Минимум поглощения наблюдается при pH=2. И при pH=2, и pH=11 в области 650-700 нм наблюдается пик поглощения, который отсутствует при близком к нейтральному pH=8 и который, вероятно, связан с химической реакцией взаимодействия наночастиц фталоцианина алюминия со свободными носителями заряда в коллоиде.

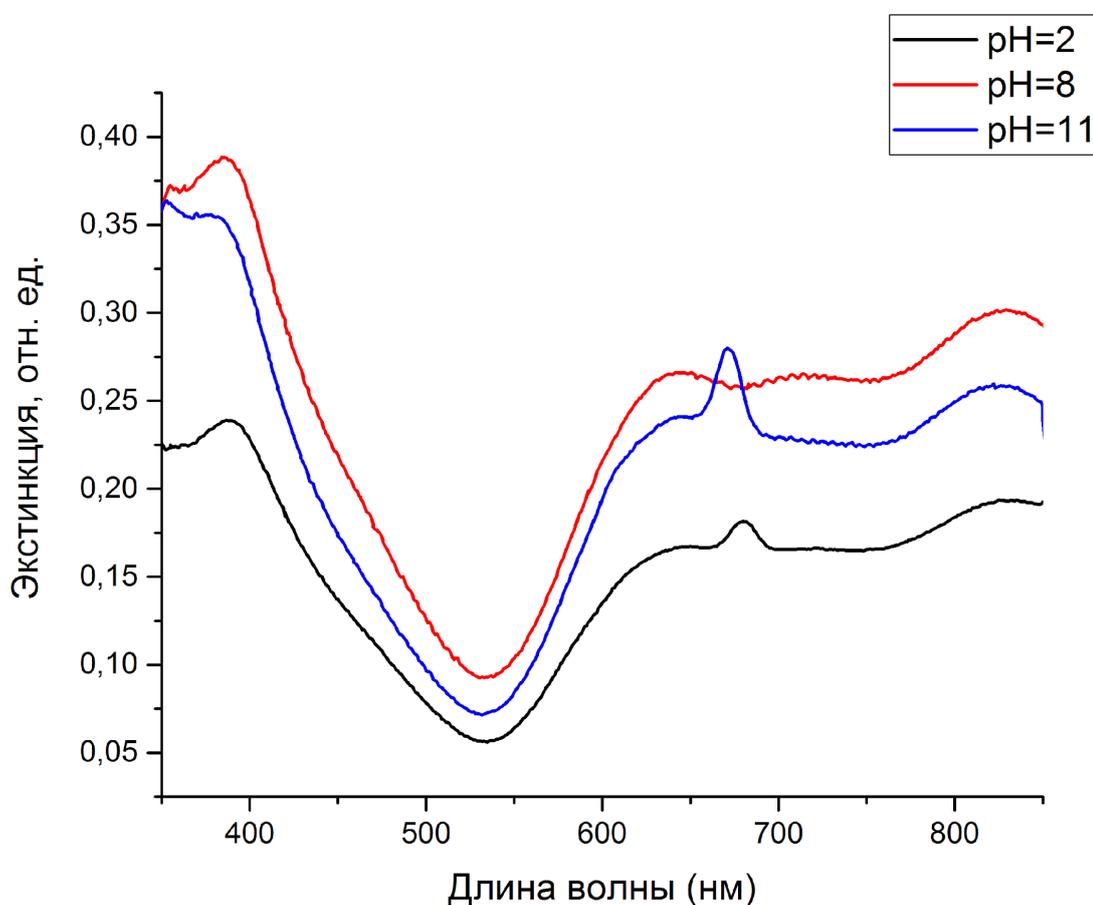


Рисунок 40. Спектры поглощения НЧ-АІРС в коллоиде в зависимости от рН.

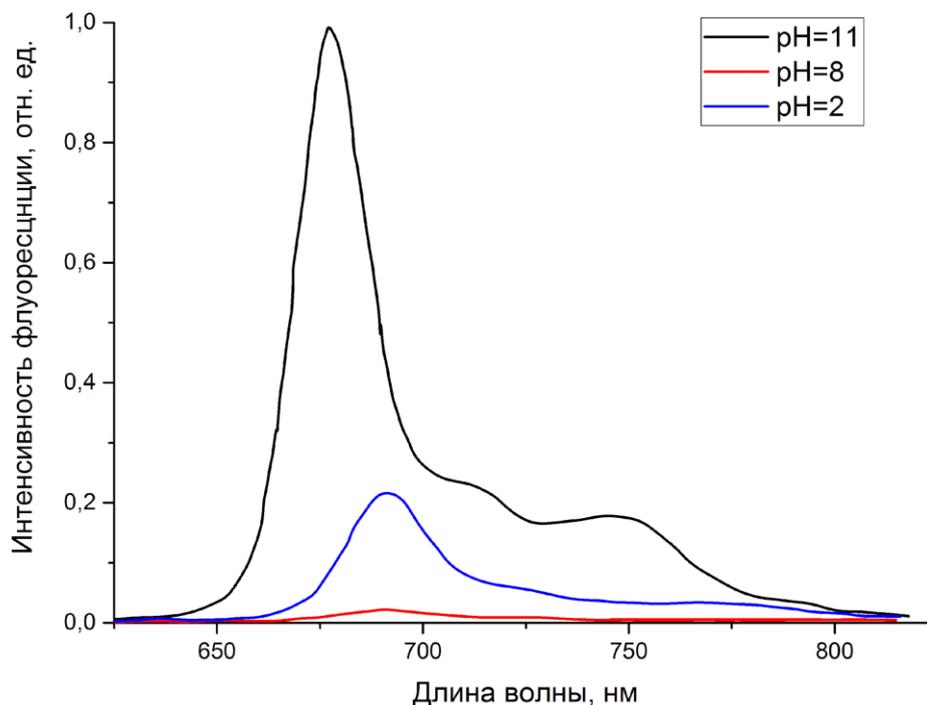


Рисунок 41. Спектры флуоресценции НЧ-АlPc в коллоиде при различных рН: а) рН = 11; б) рН = 2; в) рН = 8.

Из спектров флуоресценции приведенных на Рисунке 41 видно, что интенсивность флуоресценции наночастиц фталоцианина алюминия в коллоиде сильно зависит от рН. Так наиболее интенсивная флуоресценция была зафиксирована при рН=11, при рН=2 интенсивность флуоресценции уменьшилась более чем в 3 раза и при нейтральном рН=8 практически полностью отсутствует. Следует отметить, что в зависимости от рН происходит сдвиг максимума флуоресценции, так при рН=11 максимум флуоресценции наночастиц фталоцианина алюминия находится на длине волны 680 нм, а при рН=2 на длине волны 695 нм.

На Рисунке 42 приведен спектр кинетики флуоресценции наночастиц фталоцианина алюминия, полученный с помощью разработанного комплекса на основе стрик-камеры Hamamatsu. По вертикальной оси здесь отложено время от 0 до 20 нс, что является длительностью временного интервала, внутри которого электронно-оптическим преобразователем осуществляется развёртка. Данное изображение получается путём накопления фотонов. Каждая точка данного рисунка представляет собой определённое число фотонов. От количества фотонов пришедших в данную точку зависит ее цвет на изображении, цвет изменяется, начиная от синего, переходя к светло-зелёному, затем жёлтому, оранжевому и становится чёрным в области, где число фотонов максимально на данном рисунке.

Аппроксимация полученных зависимостей кинетики снижения интенсивности флуоресценции от времени после возбуждающего импульса проводилась экспоненциальной функцией вида:

$$I(t) = A_1 e^{-\frac{x}{\tau_1}} + A_2 e^{-\frac{x}{\tau_2}} + \dots, \quad (30)$$

Где  $A_1, A_2, \dots$  - амплитуды различных компонент времени жизни флуоресценции, прямо пропорциональные вкладу каждой из компонент, а  $\tau_1, \tau_2, \dots$  - соответствующие показатели времени жизни, в данном эксперименте измеряющиеся в наносекундах.

Количество экспоненциальных компонент подбирается таким образом, чтобы величина редуцированного распределения "хи-квадрат" для кривой аппроксимации составила величину близкую к 1 ( $\chi^2=1$ ).

Величина  $\chi^2$  называется редуцированным распределением Пирсона,

$$\chi^2 = \frac{1}{V} \sum_i \frac{(M_i - C_i)^2}{M_i} \quad (31)$$

где  $M_i$  – значение экспериментально исследуемой величины в  $i$ -ой точке,  $C_i$  – математически аппроксимированное значение исследуемой величины в  $i$ -ой точке,  $V$  – количество степеней свободы. Для идеально аппроксимированной кривой  $\chi^2=1$ .

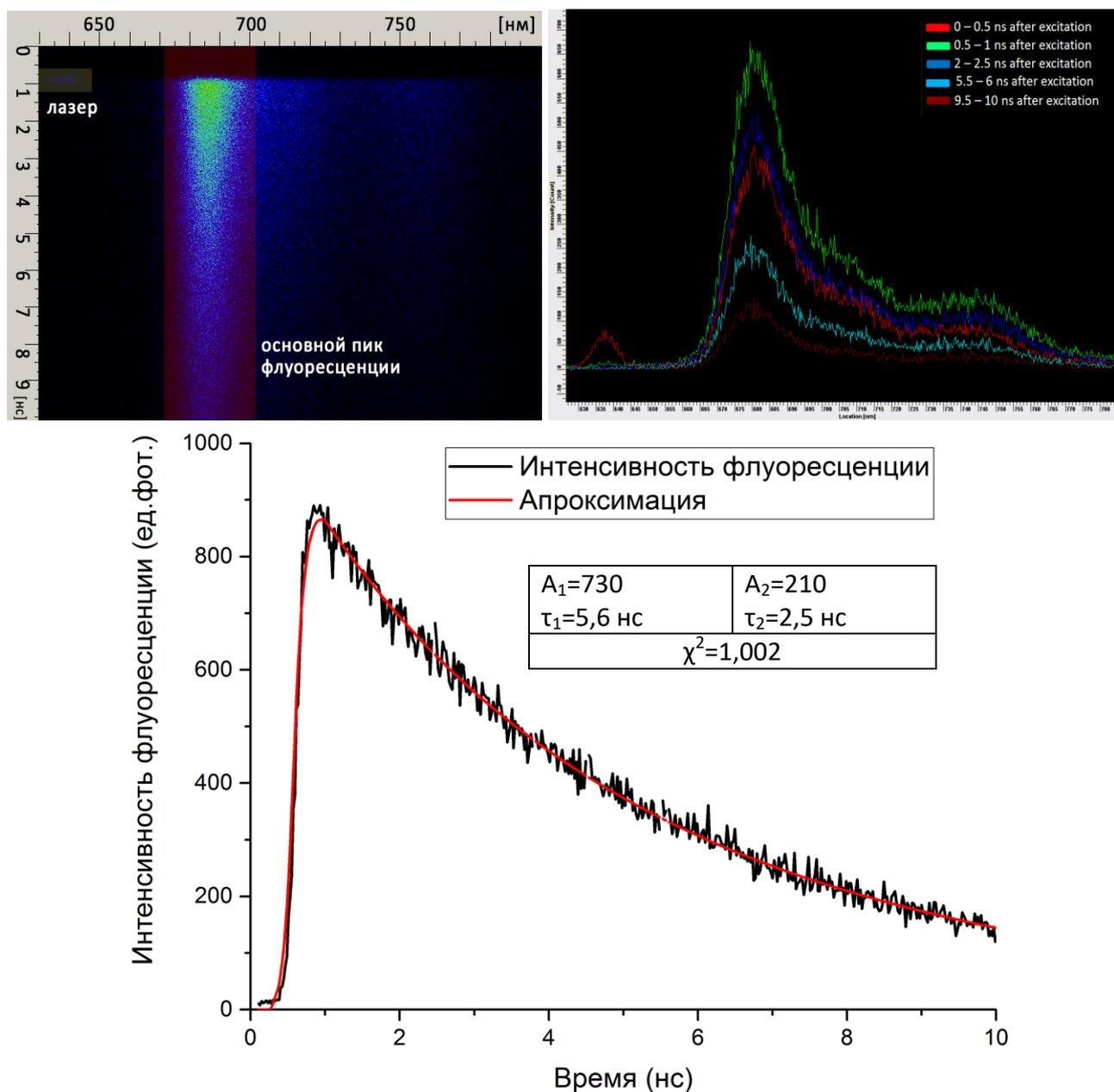


Рисунок 42. Разрешенный по времени спектр флуоресценции НЧ-АІРс при рН=11 (слева).

Разрешённые по времени спектры флуоресценции НЧ-АІРс (справа) при рН=11, полученные в промежутки времени 0-0.5 нс; 0.5-1 нс; 2-2.5 нс; 5.5-6 нс; 9.5-10 нс после возбуждения.

В области длин волн 630-645 нм находится пятно лазера, осуществляющего возбуждение флуоресценции, на входе в стрик-камеру интенсивность лазера уменьшена до минимального значения с помощью оптического фильтра. Лазерный пик необходим для проведения свёртки при компьютерной обработке спектра.

На Рисунке 42 (справа) приведены временные срезы спектра флуоресценции наночастиц фталоцианина алюминия сделанные за интервал времени: 0 - 0.5 нс; 0.5 - 1 нс; 2 - 2.5 нс; 5.5 - 6 нс; 9.5 - 10 нс с момента возбуждения. Проводя визуальный анализ данного рисунка можно сказать, что в спектре кинетики затухания флуоресценции присутствуют как минимум два времени жизни.

Первый пик флуоресценции, находящийся на длине волны 680 нм, является наиболее интенсивным и характерен для данного фотосенсибилизатора. Видно, что флуоресценция на этой длине волны разгорается до максимальной интенсивности за время порядка 1 наносекунды и полностью затухает за время, превышающее 10 нс с момента возбуждения.

С другой стороны, в спектре кинетики флуоресценции присутствует второй максимум, находящийся на длине волны порядка 745 нм. Разгорание флуоресценции этой компоненты происходит чуть дольше, на величину порядка 200 пс по отношению к основной компоненте, и к моменту времени 10 нс практически полностью затухает.

Компьютерный анализ спектров кинетики затухания флуоресценции наночастиц алюминия при  $pH=11$  показал наличие двух компонент времени жизни:  $\tau_1=2,5$  нс и  $\tau_2=5,6$  нс.

При  $pH=3$  и  $pH=10$  (Рисунок 43) эксперимент показал только одно время жизни длительностью 5 нс в обоих случаях. Данные времена жизни совпадают по длительности с временем жизни флуоресценции молекулярной формы фталоцианина алюминия в растворе.

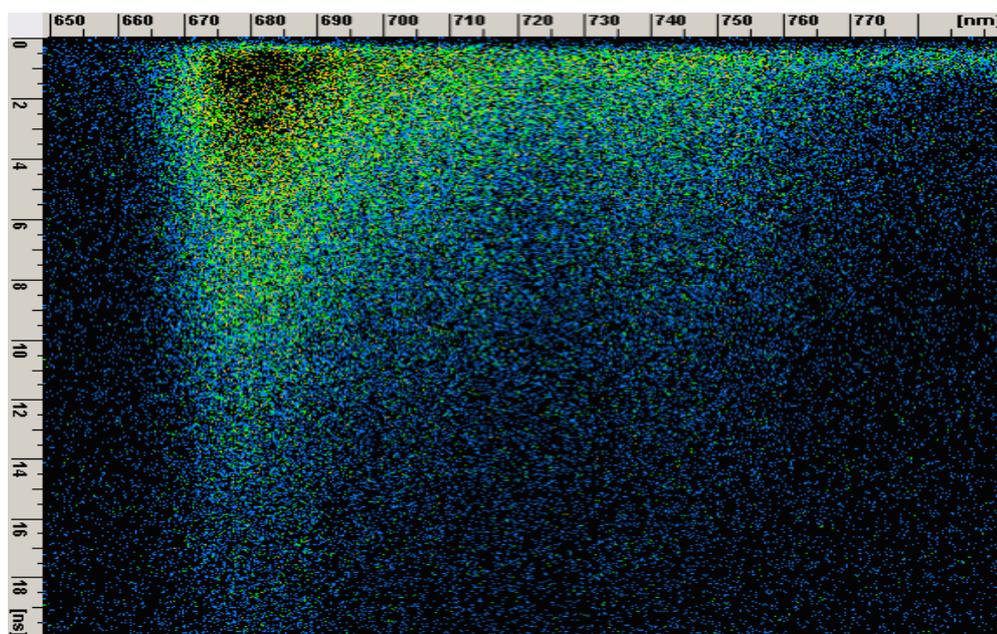


Рисунок 43. Коллоид наночастиц фталоцианина алюминия при  $pH=10$ .

В случае с кислотным  $pH$  интенсивность флуоресценции уменьшилась практически на порядок в сравнении с щелочным  $pH$ . Максимум флуоресценции сдвинут вправо на 10 нанометров (Рисунок 44) что согласуется со спектрами флуоресценции, полученными на спектрометре (Рисунок 41).

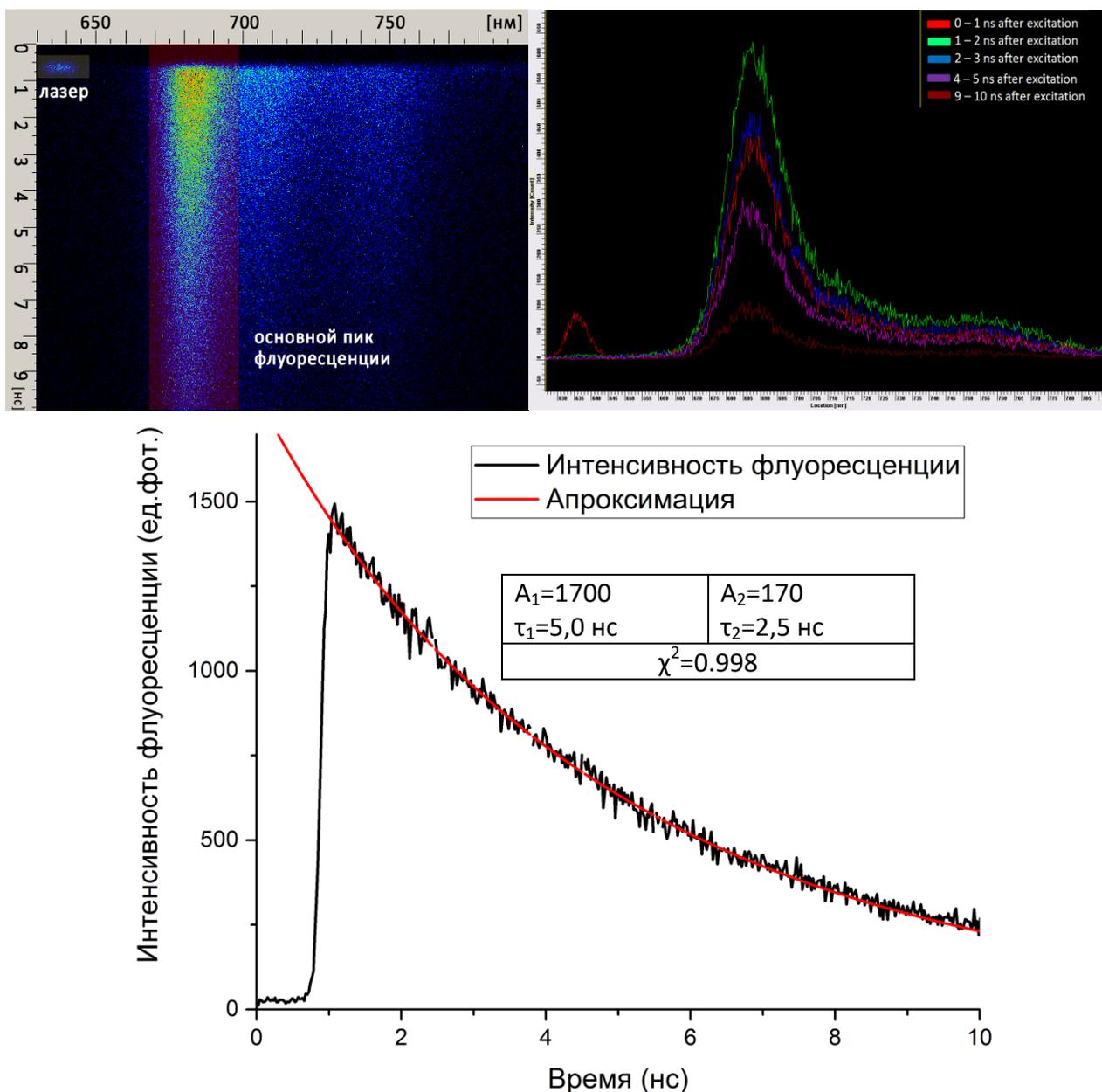


Рисунок 44. Разрешенный по времени спектр флуоресценции НЧ-АlPc при рН=2 (слева).

Разрешённые по времени спектры флуоресценции НЧ-АlPc (справа) при рН=2, полученные в промежутки времени 0-1 нс; 1-2 нс; 2-3 нс; 4-5 нс; 9-10 нс после возбуждения.

На Рисунке 44 (справа) представлены разрешённые по времени спектры флуоресценции наночастиц фталоцианина алюминия полученные за интервалы времени 0 – 1 нс, 1 – 2 нс, 2 – 3 нс, 4 - 5 нс, 9 - 10 нс с момента возбуждения. При визуальном анализе данных спектров можно сказать, что разгорание флуоресценции на длине волны 690 нм, происходит за время аналогичное времени разгорания при рН=11.

Проведя компьютерный анализ кинетики флуоресценции коллоида наночастиц фталоцианина при рН=2, было получено два времени жизни:  $\tau_1 = 5$  нс и  $\tau_2 = 2,5$  нс. Величины зарегистрированных фотонов пришедших от компоненты  $\tau_1$  составляет значение 72% от общего числа зарегистрированных фотонов, и, следовательно, 28% зарегистрированных фотонов

приходится на вторую компоненту. Величина редуцированного распределения "хи-квадрат" для данного результата составила  $\chi^2 = 1,059$ .

Таким образом, можно сказать, что флуоресценция наночастиц фталоцианина алюминия чувствительна к рН. Более того, в спектрах кинетики флуоресценции мы видим значительную разницу во временах жизни.

Для кислотного рН=2 и щелочного рН=11 нами было получено по два времени жизни, длительность одного из которых (5 нс) остаётся постоянной и наблюдается, в том числе, при рН=10 и 3. Но более интересным является тот факт, что длительность второго времени жизни изменяется и равна 10 нс при рН=11 и 2 нс при рН=2. Распределение фотонов между компонентами  $\tau_1$  и  $\tau_2$  также изменяется.

### **3.2 Исследование внутриклеточного накопления, локализации и динамики изменения спектральных свойств НЧ-АІРс в клеточных культурах**

Исследование динамики взаимодействия НЧ-АІРс с клетками проводилось на культурах раковых клеток HeLa и С6, мезенхимальных фибробластах, полученных из кожи человека, и культурах моноцитов человека ТНР-1, которые могут быть дифференцированы в макрофагоподобные клетки путем активации лектинами (например фитогемагглютинин-П (ФГА) и конканавалин А (Кон А)).

Результаты исследования внутриклеточной локализации НЧ-АІРс на культуре клеток HeLa после 24 часов инкубации представлены на Рисунке 45. Лизосомы клеток дополнительно предварительно были окрашены (зеленый цвет на рисунке). При первом сканировании лазером 633 нм для получения микроскопического изображения флуоресцентные сигналы лизосомального красителя и 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.

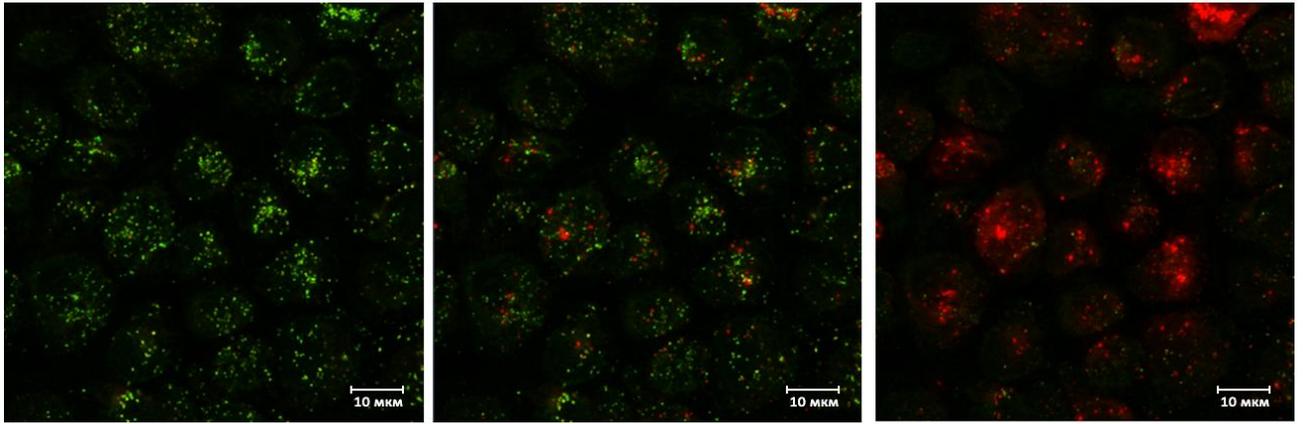


Рисунок 45. Флуоресцентное изображение клеток *HeLa* после 24 часов инкубации с НЧ-АІРс. Верхний ряд: зеленый – лизосомы, красный – флуоресценция АІРс, слева направо – во время облучения лазером 633 нм происходит разрушение лизосом.

На Рисунке 46 представлены характерные изображения моноцитов ТНР-1, накопивших НЧ-АІРс, с предварительной активацией лектинами и без нее. Моноциты без активации и активированные Кон А имеют схожий уровень накопления НЧ-АІРс. Флуоресценция АІРс локализуется в лизосомах. ТНР-1, активированные ФГА проявляют интенсивность флуоресценции АІРс в два раза меньшую, в то время как автофлуоресценция при возбуждении на длине волны 488 нм, соответствующая флавинам, увеличена. По спектральным данным, максимум интенсивности флуоресценции АІРс в органеллах внутри макрофагов соответствует 682 нм.

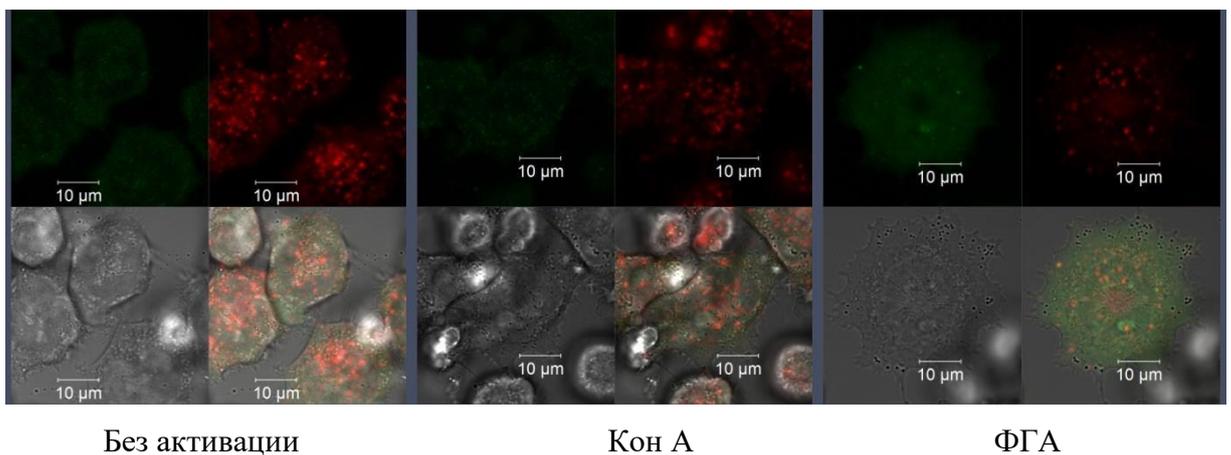
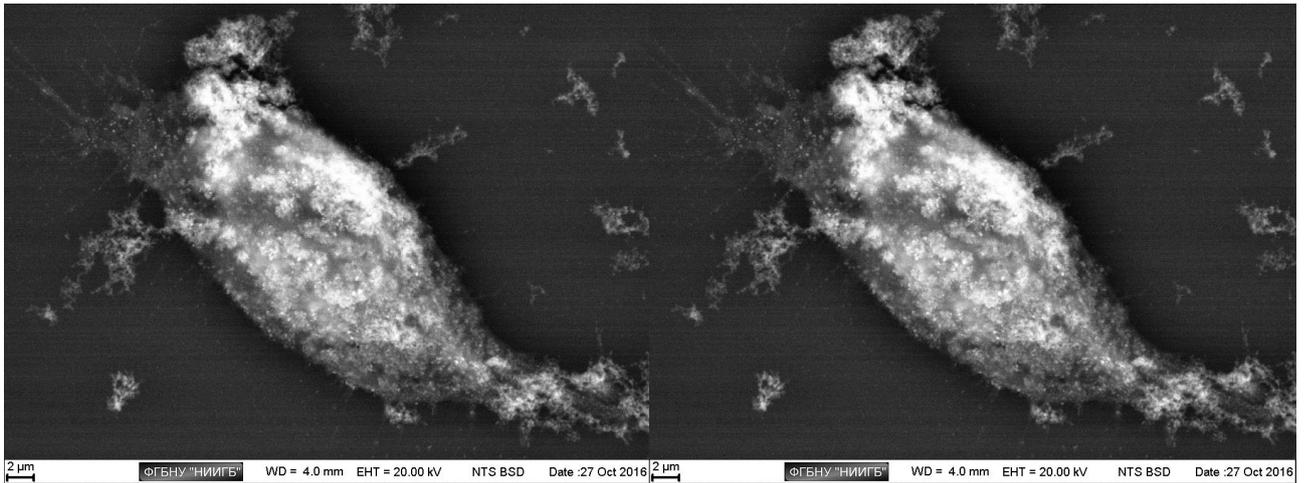


Рисунок 46. Флуоресцентные изображения моноцитов ТНР-1, предварительно активированных лектинами, после 24 часов инкубации с коллоидом НЧ-АІРс.

Исследование внутриклеточного накопления и локализации НЧ-АІРс в мезенхимальных фибробластах, полученных из кожи человека, методом СЭМ представлены на Рисунке 47.



*Рисунок 47. СЭМ изображения мезенхимальных фибробластов после 1 часа инкубации с коллоидом НЧ-АІРс. Светлые точки – НЧ-АІРс. Чем темнее точка, тем глубже в клетку проникла частица в результате эндоцитоза.*

Также стоит отметить, что при дальнейшем облучении макрофагов лазером на длине волны 633 нм происходит снижение интенсивности флуоресценции НЧ-АІРс до практически полного исчезновения пика флуоресценции на длине волны 682 нм (Рисунок 48). Данный эффект снижения интенсивности фотолюминесценции (фотобликинга) отсутствует при использовании молекулярной формы фотосенсибилизатора. Таким образом, эффект возникновения флуоресценции НЧ-АІРс при взаимодействии с макрофагами не может быть объяснен только процессом растворения их внутри клеток. Возможным механизмом появления флуоресценции НЧ-АІРс является трансформация молекул поверхностного слоя НЧ, путем связывания их с биоорганическими молекулами. При лазерном воздействии (вследствие фотодинамического эффекта) эти связи обрываются, и молекулы поверхностного слоя НЧ-АІРс переходят в начальное не флуоресцирующее состояние.

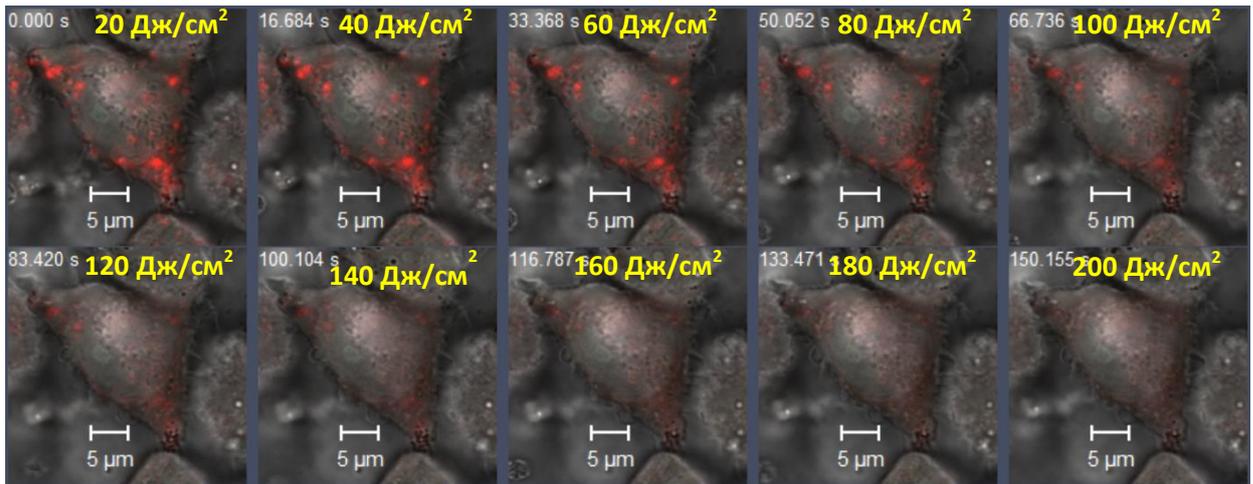


Рисунок 48. Временная серия микрофотографий макрофагов THP-1 после 24 часов инкубации с коллоидом НЧ-АІРС. Красный - флуоресценция АІРС. Каждый кадр соответствует дозе облучения 20 Дж/см<sup>2</sup> лазером 633 нм.

На Рисунке 49 представлены спектры экстинкции для раковых клеток HeLa, измеренные при различной длительности инкубации с НЧ-АІРС.

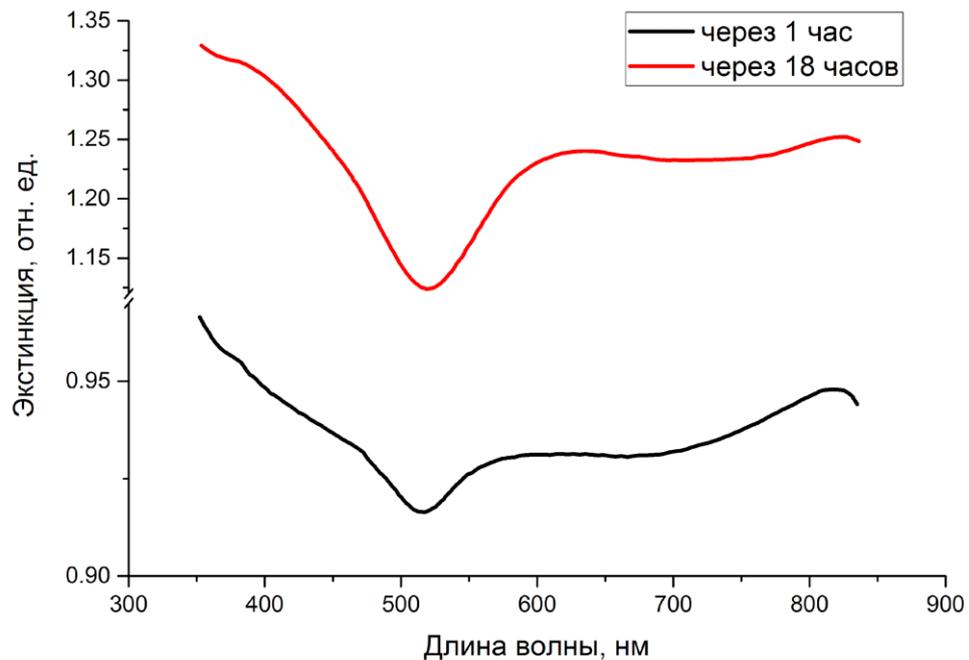


Рисунок 49. Спектры экстинкции клеток HeLa через 1 и 18 часов после инкубации с НЧ-АІРС.

Таким образом, после инкубации коллоидов НЧ-АІРС с клетками, накопленные внутри клеток НЧ-АІРС начинают флуоресцировать. Конфокальная микроскопия внутриклеточного распределения демонстрирует накопление в лизосомах. Спектры поглощения, измеренные от клеточной массы с накопленными внутри НЧ-АІРС, соответствуют спектру поглощения водного коллоида НЧ-АІРС. Также для АІРС в клетках и тканях после лазерного воздействия отмечается

заметный фотобликинг (снижение интенсивности флуоресценции). Для молекулярной формы AlPc этот эффект отсутствует, следовательно, появление фотоактивности нельзя объяснить процессом растворения и отделения отдельных молекул AlPc от НЧ.

Было исследовано количественное накопление НЧ-AlPc внутри клеток. Для этого одинаковое количество клеток культуры HeLa (рак шейки матки) инкубировали с коллоидом наночастиц. В качестве сравнения инкубировали клетки с таким же количеством сульфированного фталоцианина алюминия (Фотосенс, ФГУП «ГНЦ«НИОПИК»).

Через определенные промежутки времени клетки тщательно отмывали, осаждали центрифугированием и измеряли спектры флуоресценции осадка клеток. Исходя из спектров флуоресценции от клеточного осадка, при поглощении кристаллических наночастиц, внутри клетки наблюдается флуоресценция, соответствующая растворенному фталоцианину алюминия. Однако, интенсивность флуоресценции мала по сравнению с интенсивностью для водорастворимого препарата. Если к клеточному осадку добавить растворитель ДМСО, то видно, что количество накопленного фталоцианина при инкубации наночастиц идентично накоплению водорастворимого фталоцианина (Рисунок 50).

Таким образом, установлено, что в клетке есть «запас» наночастиц, не проявляющих фотоактивные свойства, но накопленных в количестве, большем, чем при инкубировании с водорастворимым AlPc.

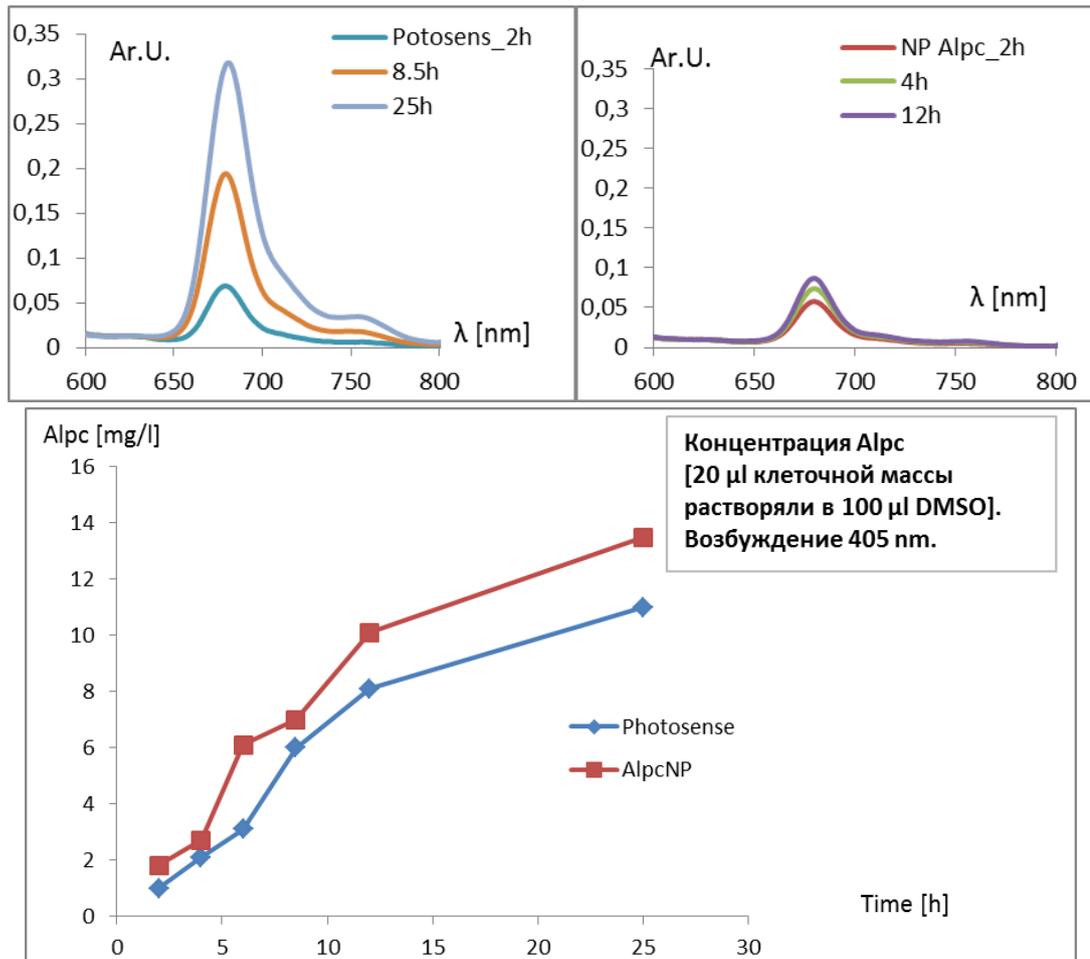


Рисунок 50. Спектры флуоресценции клеток после инкубирования с водорастворимым фталоцианином алюминия (вверху слева), с коллоидом наночастиц НЧ-АlPc (вверху справа). Интенсивность люминесценции в зависимости от времени инкубирования клеток после добавления растворителя, полностью растворяющего наночастицы НЧ-АlPc (внизу).

Исследование по внутриклеточной локализации НЧ-АlPc были выполнены с использованием лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Использовали микроскоп LSM-710-NLO (Carl Zeiss, Германия) с импульсным фемтосекундным лазером, перестраиваемым в области 690–1060 нм (80 MHz, 140 fs, Chameleon Ultra II laser system, Coherent Inc., USA). Для регистрации спектров флуоресценции использовали 32-канальный GaAsP детектор. Для возбуждения флуоресценции АlPc использовали лазер 633 нм.

Особый интерес в рамках данной работы представляло исследование кинетики тушения флуоресценции НЧ-АlPc, находящихся внутри клеток. Для этого была использована культура моноцитов человека THP-1, которые могут быть дифференцированы в макрофаги. Для индукции пролиферации THP-1 в культуре были использованы фитогемагглютинин-П (ФГА) и конканавалин А (Кон А). ФГА и Кон А добавляли к моноцитам в концентрации 10 мкг/мл. Через 2 суток к активированным таким образом моноцитам добавляли коллоид НЧ-АlPc. Через

сутки после добавления НЧ-АІРС клетки промывали, осаждали центрифугированием, и полученную клеточную массу исследовали с использованием времяразрешенной спектроскопии.

Для контрольного образца моноцитов без активации лектинами анализ кинетики затухания флуоресценции (Рисунок 51) показал наличие двух времен жизни: 6 нс (93% от общего числа зарегистрированных фотонов) и 1,5 нс (7% от общего числа зарегистрированных фотонов) с  $\chi^2 = 1,024$ .

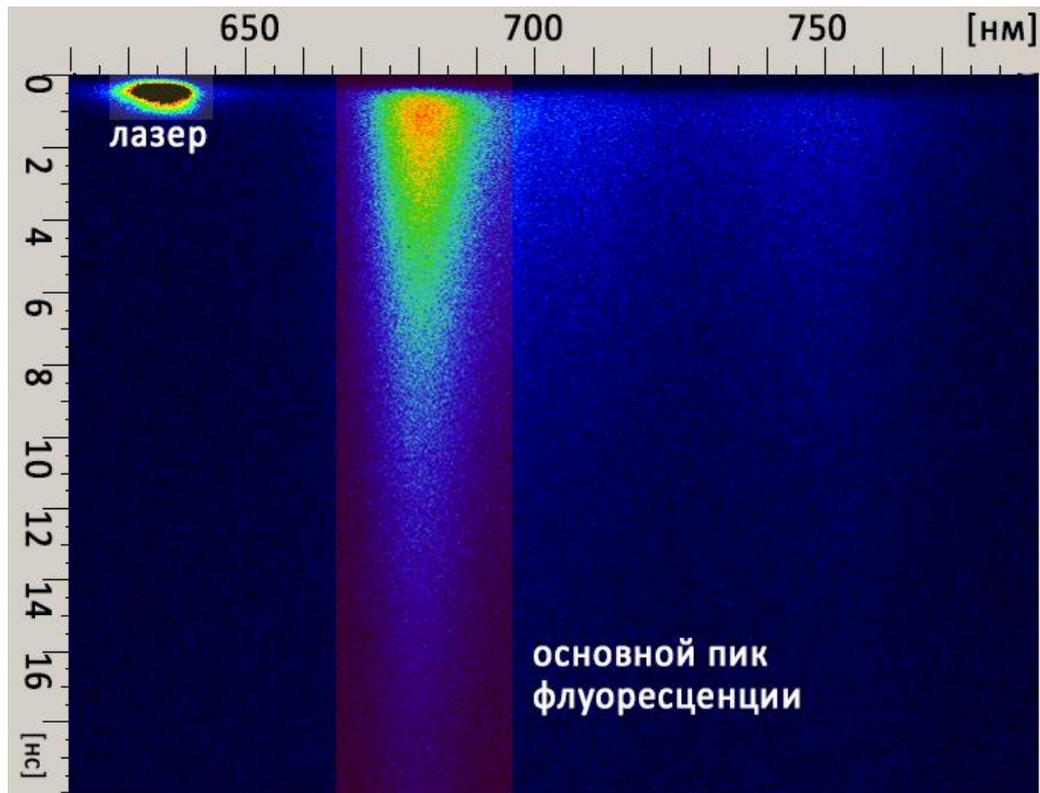


Рисунок 51. Кинетика флуоресценции, полученная от клеточной массы моноцитов THP-1, инкубированных с НЧ-АІРС.

Кинетика затухания флуоресценции НЧ-АІРС в макрофагах активированных ФГА и Кон А не имеет значительных различий (в пределах ошибки) (Рисунок 52). Так, в каждом из этих случаев анализ кинетики показал присутствие двух компонент 9 нс (31% от общего числа зарегистрированных фотонов) и 4 нс (69% от общего числа зарегистрированных фотонов) при  $\chi^2 = 1,037$

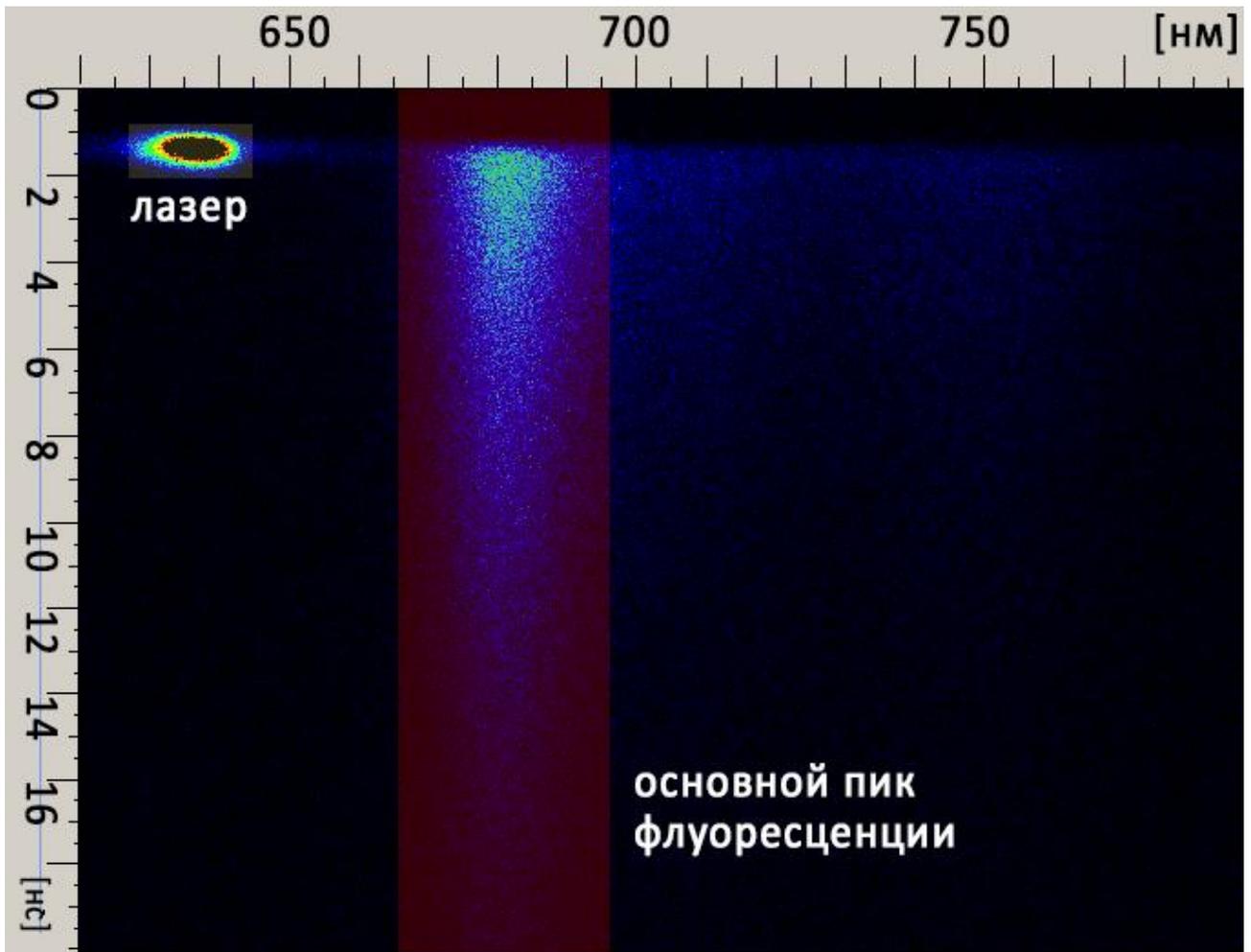


Рисунок 52. Спектр кинетики флуоресценции, полученный с клеточной массы моноцитов THP-1, активированных ФГА и инкубированных с НЧ-АІРС.

Суммарно результаты исследования кинетики флуоресценции НЧ-АІРС в макрофагах представлены в Таблице 5.

Таблица 5. Время жизни флуоресценции НЧ-АІРС в моноцитах THP-1 и активированных макрофагах.

Образец	Время жизни, $\tau_i$ , нс	Распределение фотонов по $\tau_i$	Число фотонов пришедших за время t
THP-1 (моноциты) + НЧ-АІРС	= 6 нс = 1,5 нс	93% фотонов 7% фотонов	6450 фотонов
THP-1 + Кон А (макрофаги) + НЧ- АІРС	= 9 нс = 4,5 нс	32% фотонов 68% фотонов	7335 фотонов
THP-1 + ФГА, (макрофаги) +НЧ-АІРС	= 9,3 нс = 4,1 нс	31% фотонов 69% фотонов	5391 фотонов

Результаты исследований показывают, что взаимодействие НЧ-АІРс с моноцитами/макрофагами приводит к изменению времени жизни их флуоресценции.

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.

### **3.3 Оценка квантового выхода флуоресценции и эффективности генерации синглетного кислорода при селективном лазерном возбуждении. Оценка эффективности генерации синглетного кислорода в модельных системах и клеточных культурах**

Основным механизмом разрушающего действия  $\Phi_c$ , применяемых для ФДТ, является генерация синглетного кислорода. Разработанный в нашей лаборатории метод оценки фотодинамической активности  $\Phi_c$  основан на одновременной регистрации спектров флуоресценции  $\Phi_c$  и изменения спектров поглощения гемоглобина при дезоксигенации. При облучении  $\Phi_c$  лазерным излучением в полосу поглощения в системе происходит передача энергии от  $\Phi_c$  на молекулярный кислород и его переход в синглетное состояние, с последующим химическим тушением, в результате чего концентрация молекулярного кислорода в системе уменьшается. Гемоглобин является дополнительным источником кислорода, поэтому для восстановления равновесной концентрации, гемоглобин отдает запасенный кислород в систему, и происходит дезоксигенация гемоглобина.

Для регистрации спектров поглощения и флуоресценции исследуемых образцов мы использовали волоконно-оптический спектрометр ЛЭСА-01-БИОСПЕК. Схема экспериментальной установки приведена на Рисунке 53. В качестве источника света для возбуждения  $\Phi_c$  использовался полупроводниковый лазерный источник с длиной волны 675 нм и максимальной мощностью 2 Вт («БИОСПЕК»).

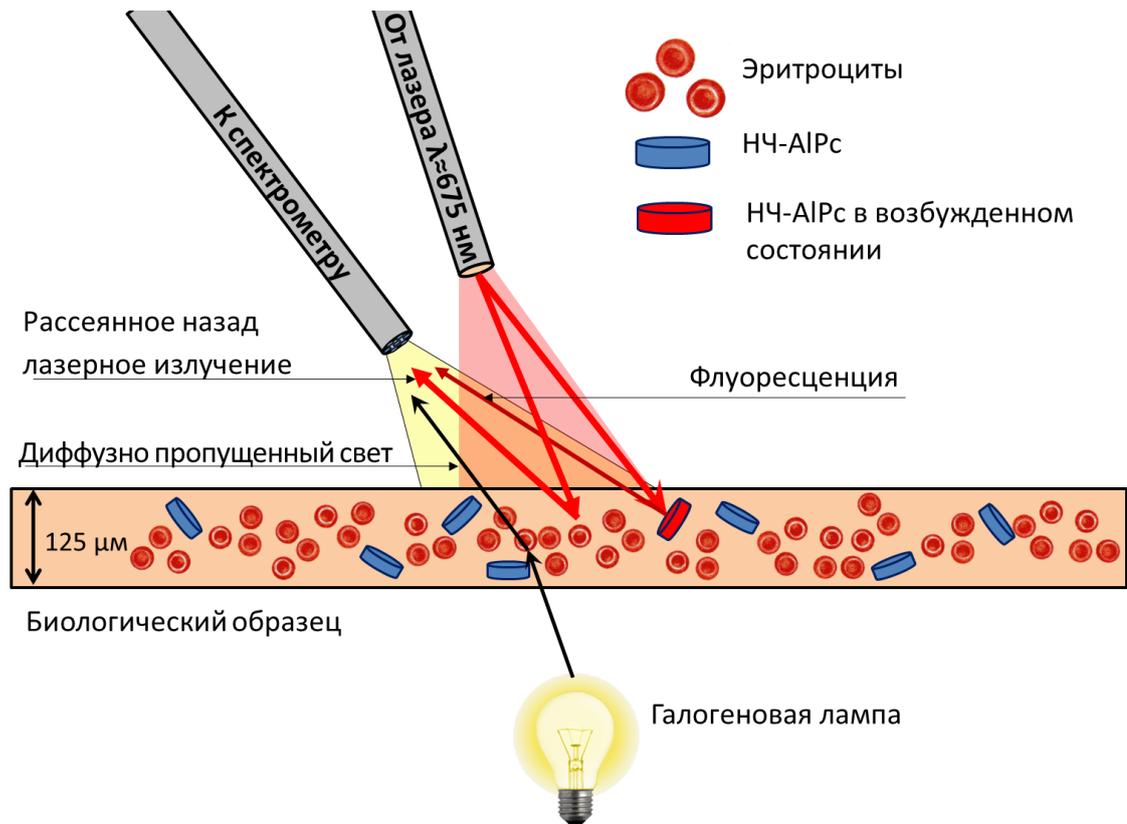


Рисунок 53. Схема экспериментальной установки для измерения фотодинамической эффективности  $\Phi_s$ .

Более подробно данный метод описан в работе [117].

Эффективность генерации синглетного кислорода НЧ-АІРс оценивали на культурах раковых клеток HeLa и моноцитов человека THP-1. В качестве положительного контроля проводили сравнение с эффективностью генерации синглетного кислорода разрешенным для медицинского применения водорастворимым АІРс (коммерческое название «Фотосенс»). Коллоид НЧ-АІРс или Фотосенс добавляли в питательную среду. Время инкубации для НЧ-АІРс составило 24 часа, а для Фотосенса – 4 часа.

Для корректного сравнения были приготовлены 3 типа образцов:

1. Фотосенс + клетки (HeLa или THP-1) + эритроциты. Итоговая концентрация Фотосенса в среде составляла:  $C=20$  мг/кг или 2 мг/кг (для THP-1)
2. НЧ-АІРс + клетки (HeLa или THP-1) + эритроциты. Итоговая массовая концентрация наночастиц в среде составляла:  $C=25$  мг/кг.
3. Фотосенс + эритроциты. Данные образцы использовались для построения нормировочной кривой для сравнения эффективности генерации синглетного кислорода в клетках. Были приготовлены 4 концентрации фотосенса: 1 мг/кг, 5 мг/кг и 20 мг/кг.

Далее представлены экспериментальные зависимости скорости дезоксигенации гемоглобина от времени, полученные на образцах клеток HeLa (Рисунок 54) и THP-1

(Рисунок 55), инкубированных с Фотосенсом и НЧ-АІРс. Также представлены зависимости скорости дезоксигенации, измеренные в образцах без клеток (только с эритроцитами).

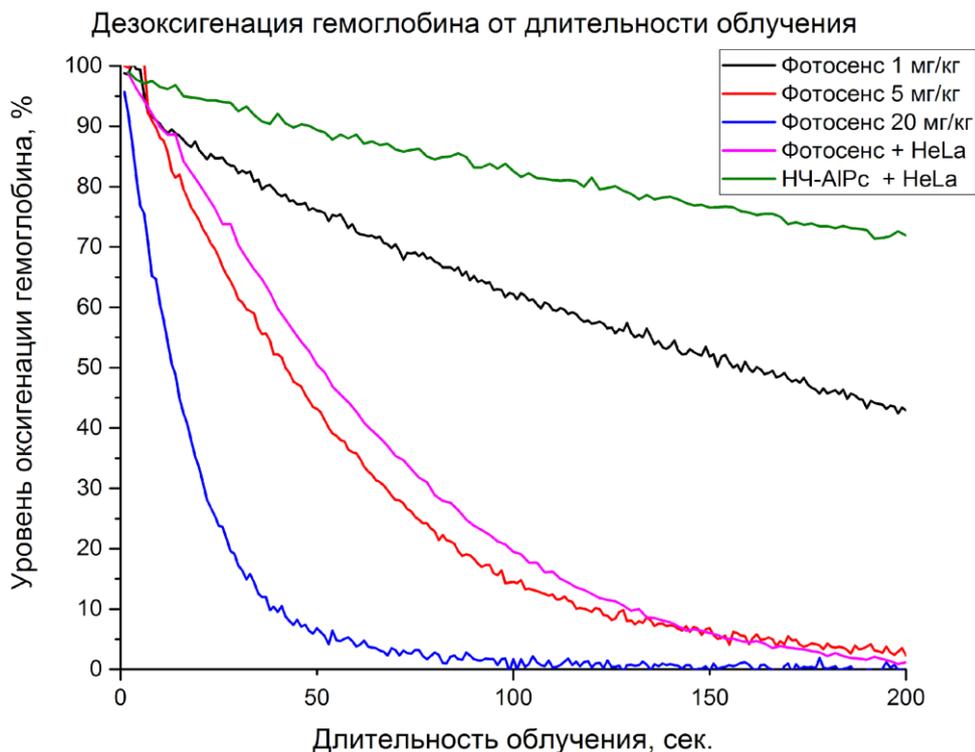


Рисунок 54. Зависимость уровня оксигенации гемоглобина в образце от длительности лазерного облучения на длине волны 675 нм и плотностью мощности 300 мВт/см<sup>2</sup>.

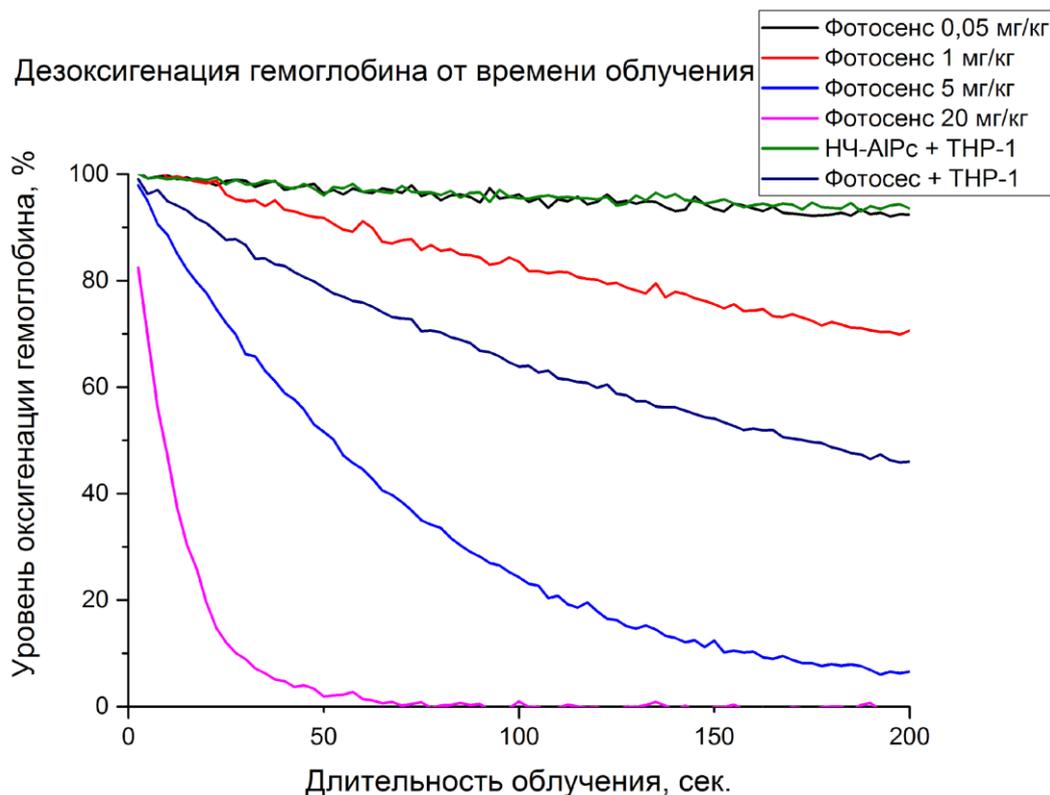


Рисунок 55. Зависимость уровня оксигенации гемоглобина в образце от длительности лазерного облучения на длине волны 675 нм и плотностью мощности 300 мВт/см<sup>2</sup>.

Стоит учесть, что в приведенных выше экспериментальных зависимостях (Рисунок 54 и 55) скорости дезоксигенации гемоглобина, концентрация фотосенсибилизатора, накопленного внутри клеток, и концентрация самих клеток в образце могут существенно различаться. Поэтому для корректного определения эффективности генерации синглетного кислорода НЧ-АІРс в клетках, оценивали среднюю концентрацию накопленных ФС внутри клеток, а также определяли количество клеток в образце.

#### **Оценка количества клеток в образцах**

Оценка количества клеток в образце проводилась в камере Горяева. Расчет количества клеток в 1 мл крови производят исходя из разведения крови, числа сосчитанных квадратов и объема 1 большого квадрата (1/250мкл) по формуле:

$$X \left[ \frac{1}{\text{мкл}} \right] = \frac{a \times 250 \times \text{разбавление}}{\text{число сосчитанных квадратов}} \quad (32)$$

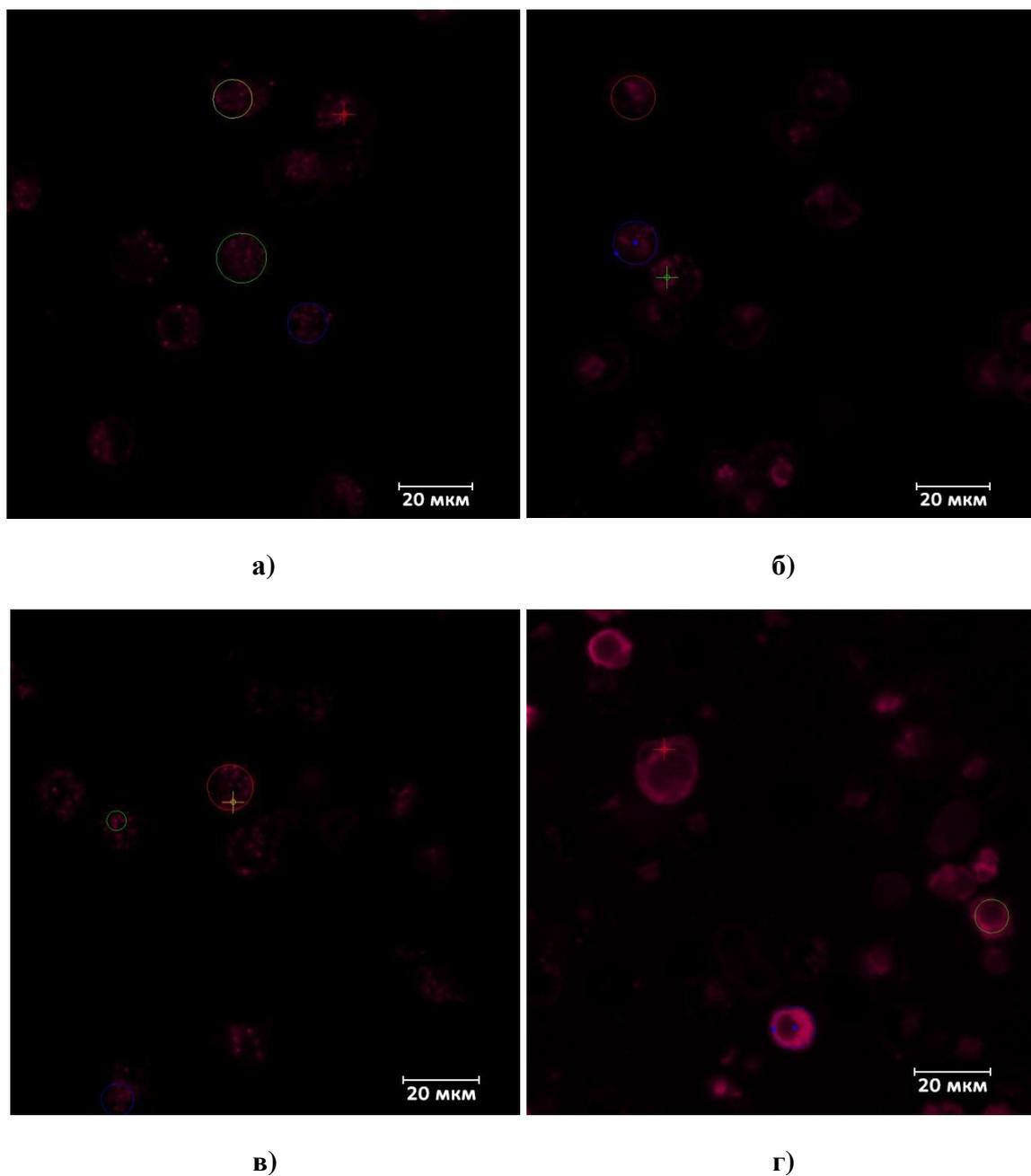
Результаты расчетов приведены в Таблице 6.

*Таблица 6. Оценка количества клеток в образцах.*

Образец	Разбавление	сосчитанных клеток	сосчитанных квадратов	Клеток (1/мл), шт.	Разбавление образца для измерения дезоксигенации
Эритроцитарная масса	10000	323	15	$5.4 \cdot 10^{10}$	-
HeLa + НЧ-АІРс	100	122	20	152 500 000	1:1
HeLa + Фотосенс	100	403	20	503 750 000	1:1
ТНР-1 + Фотосенс	100	22	20	27 500 000	1:1
ТНР-1 +НЧ-АІРс	20	776	20	194 000 000	1:4

#### **Оценка накопления фотосенсибилизатора в образце**

Оценку накопления ФС в клетках проводили при помощи спектрально-разрешенной сканирующей лазерной микроскопии. После окончания времени инкубации клетки тщательно промывали, осаждали центрифугированием, ресуспензировали в физиологическом растворе и исследовали полученные суспензии. Регистрировали флуоресцентные изображения и спектры люминесценции клеток, накопивших исследуемый препарат (НЧ-АІРс или Фотосенс), Рисунок 56.



*Рисунок 56. Флуоресцентные изображения клеток HeLa (а) и THP-1 (б), инкубированных с НЧ-APC в течение 1 суток. Флуоресцентные изображения клеток HeLa (в) и THP-1 (г), инкубированных с Фотосенсом в течение 4 часов.*

На первом этапе оценивали концентрацию НЧ-APC в активной (флуоресцирующей) форме. Затем, для оценки массовой концентрации НЧ-APC, накопленных в клетках, добавляли ДМСО с целью растворить все частицы, содержащиеся внутри клеток (Рисунок 57).

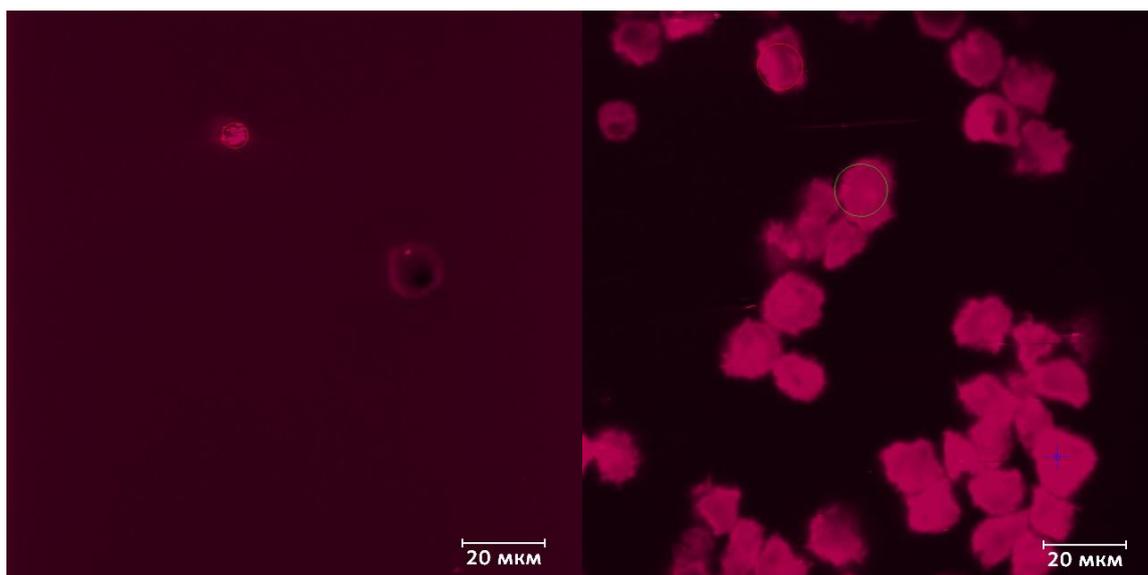


Рисунок 57. Флуоресцентные изображения клеток *HeLa* (слева) и *THP-1* (справа), инкубированных с НЧ-АІРС в течение 1 суток, после добавления ДМСО и растворения всех запасенных наночастиц.

Расчет концентрации проводили по площади под пиком люминесценции (Рисунок 58). Для учета статистического разброса для образцов с клетками проводили усреднение спектра флуоресценции по трем клеткам.

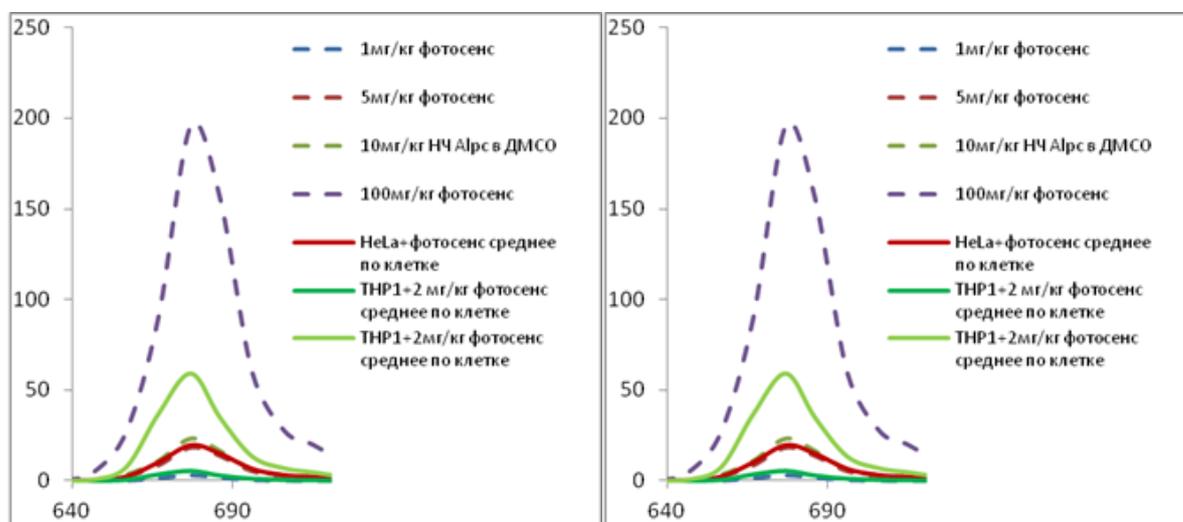


Рисунок 58. Спектры флуоресценции, измеренные в клетках *HeLa* и *THP-1*, инкубированных с НЧ-АІРС в течение суток и Фотосенсом в течение 4 часов.

Для количественной оценки концентрации проводили калибровку. В качестве стандартных образцов для калибровки использовали тонкие слои (20 мкм, что примерно соответствует размеру клетки) растворов НЧ-АІРС в ДМСО и Фотосенса в воде с концентрациями 1, 5, 10 и 100 мг/л. Полученные калибровочные кривые приведены на Рисунке 59. На график нанесены точки, соответствующие площадям под пиками флуоресценции для отдельных клеток и усредненные значения.

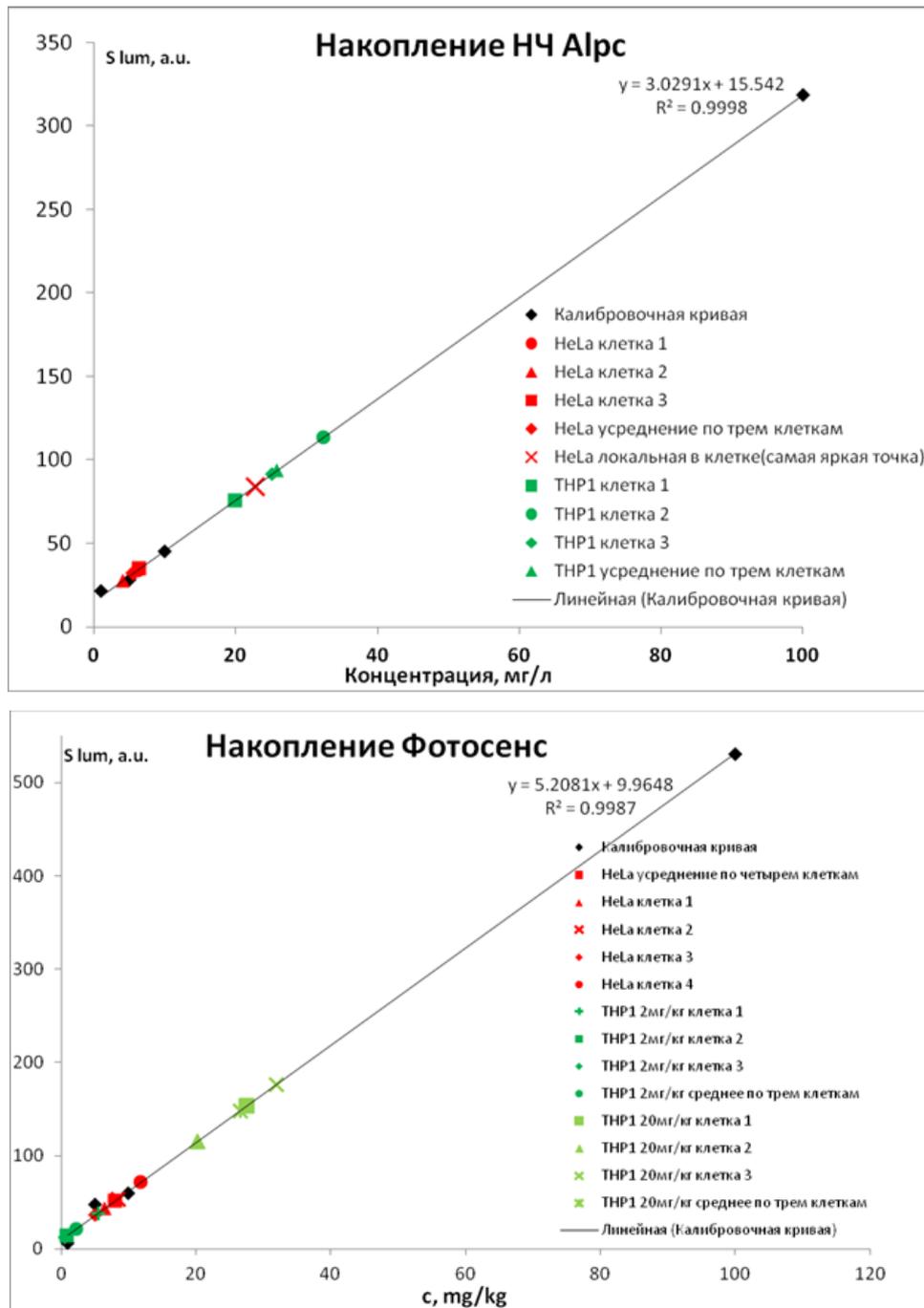


Рисунок 59. Калибровочные кривые для расчета концентрации НЧ-АІРС и Фотосенса в клетках.

Было установлено, что концентрация активной формы НЧ-АІРС в клетках HeLa составила 5,5 мг/кг, в клетках THP-1 25,5 мг/кг. После инкубации коллоидов НЧ-АІРС вместе с клетками накопленных внутри клеток НЧ-АІРС переходит в активную форму. Внутриклеточное накопление НЧ-АІРС по массе сопоставимо с растворимой формой АІРС. Концентрация Фотосенса в клетках HeLa составила 7,9 мг/кг, в клетках THP-1 26,5 мг/кг (при начальной концентрации в среде 20 мг/кг) и 2,3 мг/кг (при начальной концентрации в среде 2 мг/кг).

### Оценка эффективности фотосенсибилизатора

С учетом разного накопления, количества клеток и пропорции разбавления с эритроцитарной массой были введены поправочные коэффициенты для расчета скорости дезоксигенации (Таблица 7).

Таблица 7. Значения поправочных коэффициентов для учета разной концентрации накопления ФС, количества клеток в образце и разбавления.

Образец	Концентрация, мг/кг	Коэф.	Клеток в образце, млн	Коэф.	Разбавление	Коэф.
HeLa + НЧ-АІРс	5.5	1	142	2.02	1:1	2
ТНР1 + НЧ-АІРс	25.5	1	194	2.77	1:4	5
HeLa + Фотосенс	7.9	1.43	503,8	7.19	1:1	2
ТНР1 + Фотосенс 20 мг/кг	26.5	1.03	70	1	1:1	2
ТНР1 фотосенс 2 мг/кг	2.3	-	27,5	-	1:1	2

Аппроксимация полученных зависимостей скорости дезоксигенации от времени облучения проводилась экспоненциальной функцией:

$$y = A_1 e^{-\frac{x}{t_1}} \quad (33)$$

Пример аппроксимации полученных зависимостей представлен на Рисунке 60.

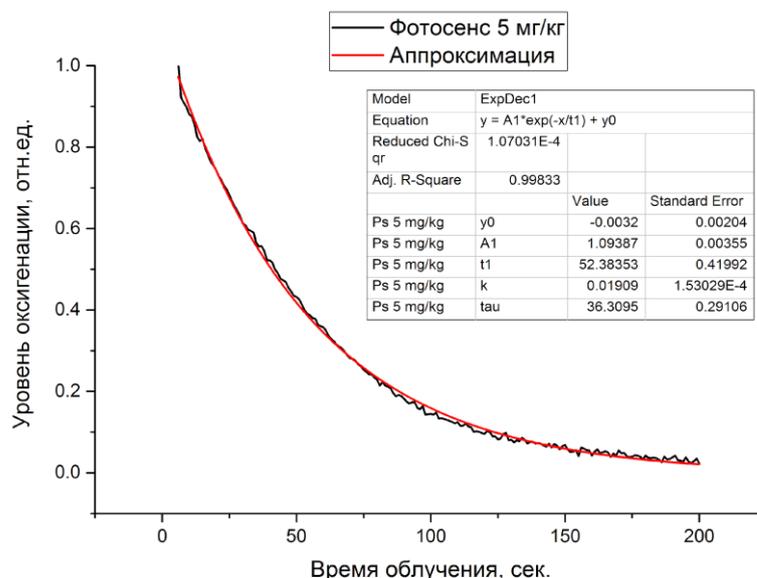


Рисунок 60. Аппроксимация полученных данных экспоненциальной зависимостью в программной среде OriginPro. Скорость дезоксигенации определяется коэффициентом:  $k=1/t_1$ , который пропорционален эффективности фотосенсибилизатора

С учетом всех поправочных коэффициентов, эффективность генерации синглетного кислорода НЧ-АІРс в клетках HeLa представлены в Таблице 8.

Образец	Коэффициенты	Значения с учетом поправок, отн. ед.
Фотосенс 1 мг/кг	y0	0.2
	A1	0.79
	t1	196
	<b>k</b>	<b>0.005</b>
Фотосенс 5 мг/кг	y0	0
	A1	1
	t1	56
	<b>k</b>	<b>0.0176</b>
Фотосенс 20 мг/кг	y0	0
	A1	1
	t1	18
	<b>k</b>	<b>0.0547</b>
HeLa + Фотосенс	y0	0
	A1	1
	t1	62
	<b>k</b>	<b>0.0159</b>
HeLa + НЧ-АІРс	y0	0.29
	A1	0.68
	t1	407
	<b>k</b>	<b>0.0024</b>

Таблица 8. Коэффициенты аппроксимации и расчетное значение скорости дезоксигенации с учетом поправочных коэффициентов для культуры клеток HeLa.

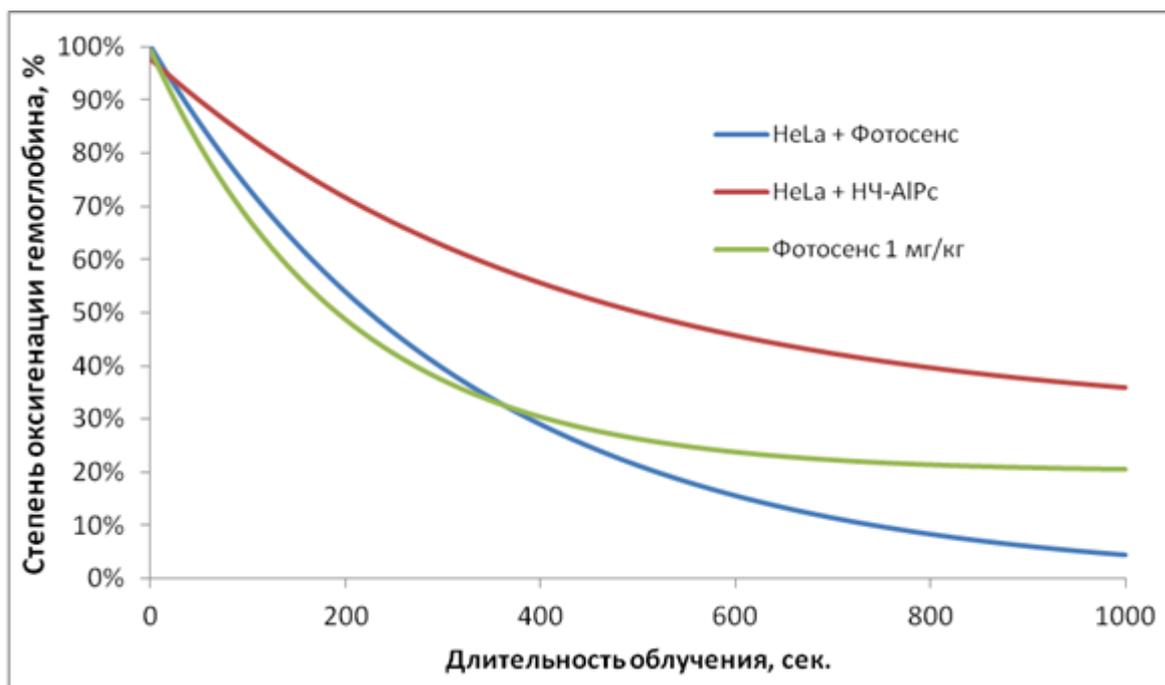


Рисунок б1. Зависимость скорости дезоксигенации от длительности облучения с учетом всех поправочных коэффициентов для культуры клеток HeLa.

С учетом всех поправочных коэффициентов, эффективность генерации синглетного кислорода НЧ-АІРс в клетках ТНР1 представлены в Таблице 9.

Образец	Коэффициенты	Значения
ТНР-1 + НЧ-АІРс	y0	0.907
	A1	0.092
	t1	126
	k	0.00787
ТНР-1 + Фотосенс	y0	0.094
	A1	0.878
	t1	222
	k	0.00449
Фотосенс 1 мг/кг	y0	0.27
	A1	0.66
	t1	348
	k	0.00287

Таблица 9. Коэффициенты аппроксимации и расчетные значения скорости дезоксигенации с учетом поправочных коэффициентов для культуры клеток ТНР-1.

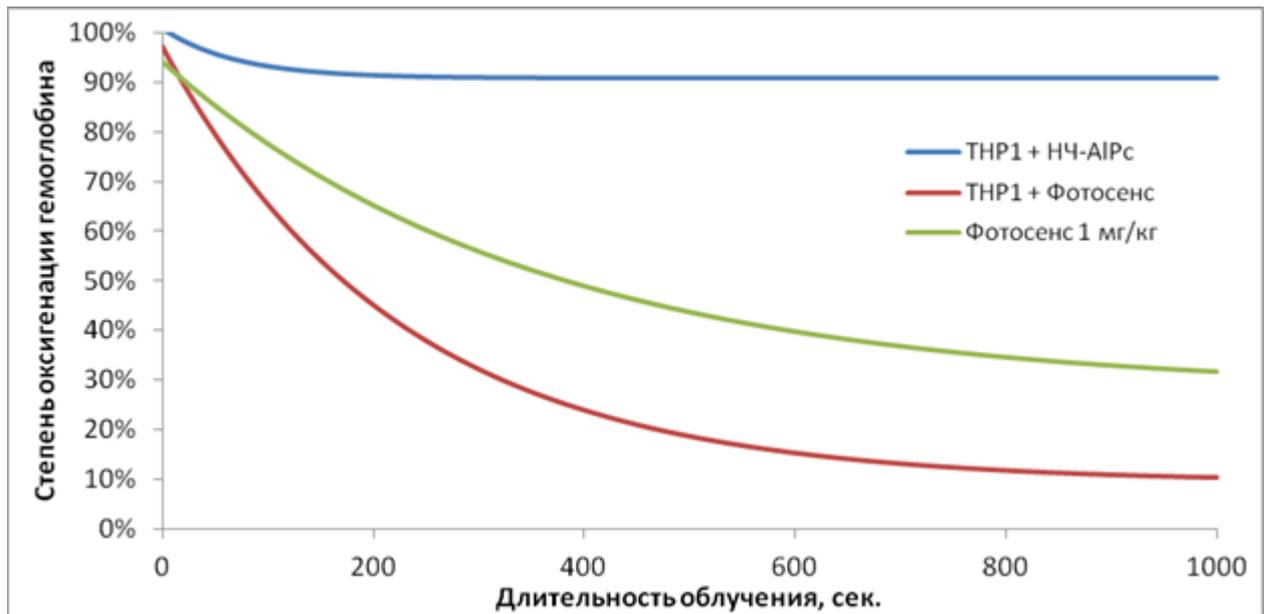


Рисунок 62. Зависимость скорости дезоксигенации от длительности облучения с учетом всех поправочных коэффициентов для культуры клеток ТНР-1.

Из полученных зависимостей можно сделать вывод, что фотодинамическая эффективность Фотосенса в культурах клеток HeLa и ТНР-1 не снижается в сравнении с модельной смесью «эритроциты + Фотосенс». 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.

Оценка квантового выхода флуоресценции НЧ-АІРс в клеточных культурах проводилась при взаимодействии с клетками HeLa. Также было проведено сравнение квантового выхода НЧ-АІРс с квантовым выходом Фотосенса в клетках.

Спектры флуоресценции, с помощью которых в дальнейшем проводился расчет абсолютного квантового выхода, измеряли с помощью следующей установки (Рисунок 63). Образец помещался в модифицированную интегрирующую сферу, возбуждающее лазерное излучение (633 нм) вводилось внутрь сферы и фокусировалось на образец. Рассеянные внутри сферы лазерное излучение и флуоресценция, собирались в волокно и передавались на спектрометр ЛЭСА-01-Биоспек. Так как интенсивность флуоресценции на несколько порядков ниже интенсивности рассеянного лазерного излучения, то на входе излучения в спектрометр

ставился фильтр, на несколько порядков подавляющий рассеянный лазерный свет, но пропускающий флуоресцентное излучение.

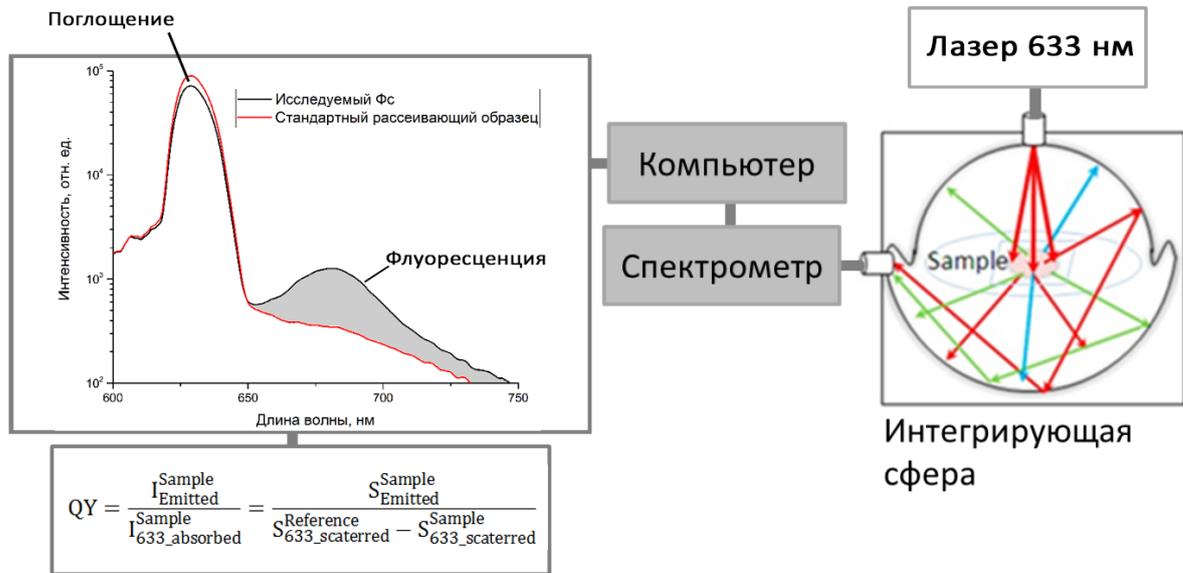


Рисунок 63. Установка для измерения квантового выхода флуоресценции.

Для вычисления истинных спектров эмиссии ФС была учтена аппаратная функция спектрометра с фильтром. Для этого необходимо спектр широкополосного источника белого света без фильтра разделить на спектр этого же источника, но пропущенного через оптический фильтр. Эти спектры и полученная аппаратная функция представлены на Рисунке 64.

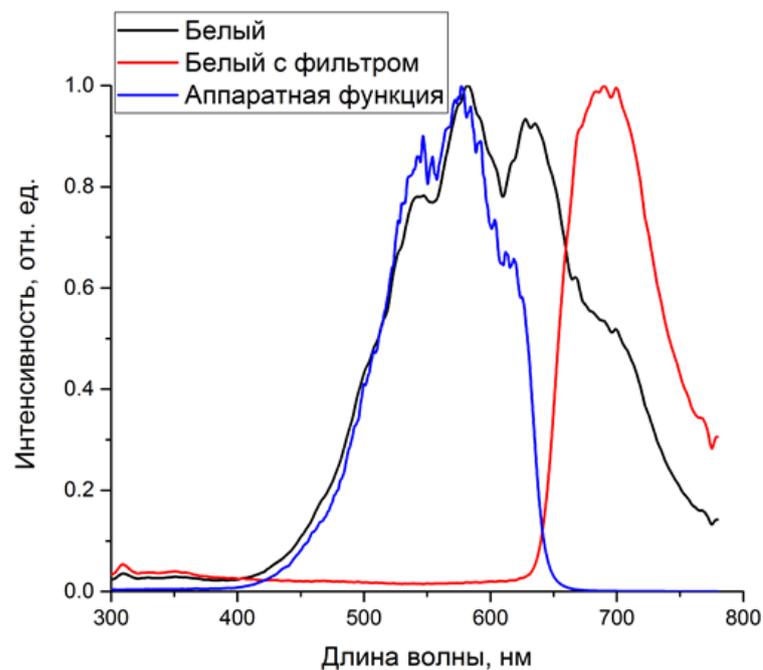


Рисунок 64. Спектры рассеяния и аппаратная функция спектрометра с фильтром.

Оптическая схема спектроанализатора позволяла одновременно измерять спектр люминесценции и спектр рассеянного от образца возбуждающего излучения в одном

динамическом диапазоне интенсивностей. С помощью программы UnoMomento® («БИОСПЕК») была посчитана интегральная площадь, соответствующая пику флуоресценции исследуемых образцов и интегральная площадь под лазерным пиком.

Расчет квантового выхода флуоресценции производили по формуле:

$$QY = \frac{I_{Emitted}^{Sample}}{I_{633\_absorbed}^{Sample}} = \frac{S_{Emitted}^{Sample}}{S_{633\_scattered}^{Reference} - S_{633\_scattered}^{Sample}} \quad (34)$$

Где  $I_{Emitted}^{Sample}$  - интенсивность флуоресценции исследуемого образца, измеряемая как площадь под пиком флуоресценции ( $S_{Emitted}^{Sample}$ ),  $I_{633\_absorbed}^{Sample}$  - интенсивность лазерного излучения, поглощаемая исследуемым образцом, измеряемая как разность площадей под пиком рассеянного лазерного излучения от референсного непоглощающего образца ( $S_{633\_scattered}^{Reference}$ ) и исследуемого образца ( $S_{633\_scattered}^{Sample}$ ). Для повышения точности измерений в качестве референсного непоглощающего образца была использованы культура клеток HeLa без добавления ФС.

Расчитанный квантовый выход флуоресценции для Фотосенса и НЧ-АІРс в клетках составил

$$QY_{\text{Фотосенс}}^{HeLa} \approx 13\% \quad (35)$$

$$QY_{\text{НЧ-АІРс}}^{HeLa} \approx 1\% \quad (36)$$

Такой низкий квантовый выход флуоресценции у НЧ-АІРс может быть связан с малым временем инкубации НЧ-АІРс с клетками. При более длительном времени инкубации, значение квантового выхода может увеличиться.

### 3.4 Исследование фазового состояния НЧ-АІРс внутри клеток

Характеризация НЧ-АІРс по кристаллической структуре проводилась методами рентгеноструктурного анализа на рентгеновском дифрактометре D8 Advance (Bruker). Рентгенограмма, измеренная от порошка крупнодисперсных кристаллов АІРс и от коллоидов НЧ-АІРс в различных средах, через 3 часа после инкубации представлена на Рисунке 65.

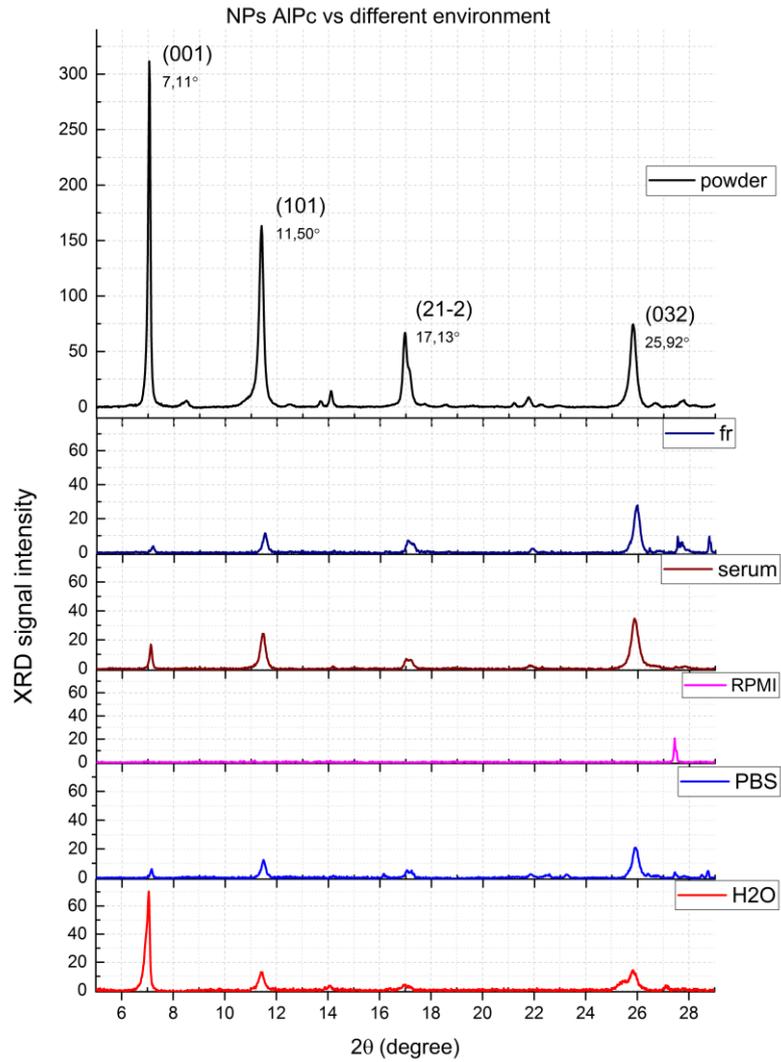


Рисунок 65. Рентгенограммы измеренные от порошка AlPc и H<sub>4</sub>-AlPc в физрастворе, сыворотке крови, питательной среде RPMI, фосфатно-солевом буфере (PBS) и воде.

Установлено, что AlPc кристаллизуется в триклинной сингонии пространственной группы P1 с параметрами решетки, представленными в Таблице 10.

Таблица 10. Данные рентгено-дифракционного анализа для порошка H<sub>4</sub>-AlPc.

$a$ [Å]	$b$ [Å]	$c$ [Å]	$\alpha$ [°]	$\beta$ [°]	$\gamma$ [°]	$V$ [Å <sup>3</sup> ]
13.648	13.659	14.150	97.64	108.76	90.393	2472.0

Анализ динамики изменения кристаллической структуры H<sub>4</sub>-AlPc при взаимодействии с клетками проводился на раковых клетках HeLa (Рисунок 66) и С6 (Рисунок 67) через различные промежутки времени после инкубации клеток с H<sub>4</sub>-AlPc.

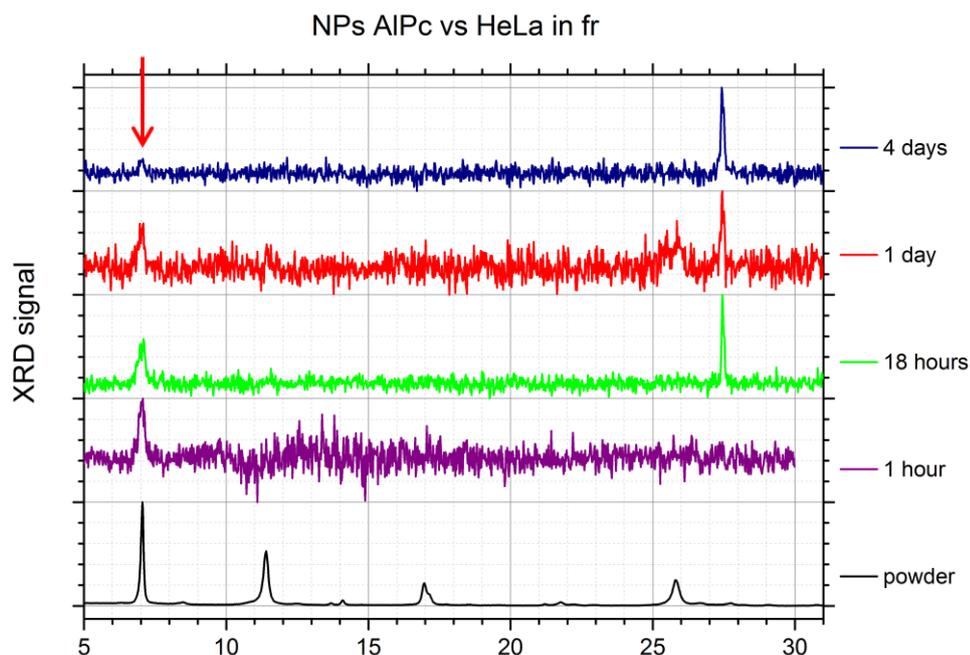


Рисунок 66. Рентгенограмма измеренная в клетках HeLa через 1 час, 18 часов, 1 сутки и 4 суток после инкубации с НЧ-АIPc. Также приведены данные от порошка.

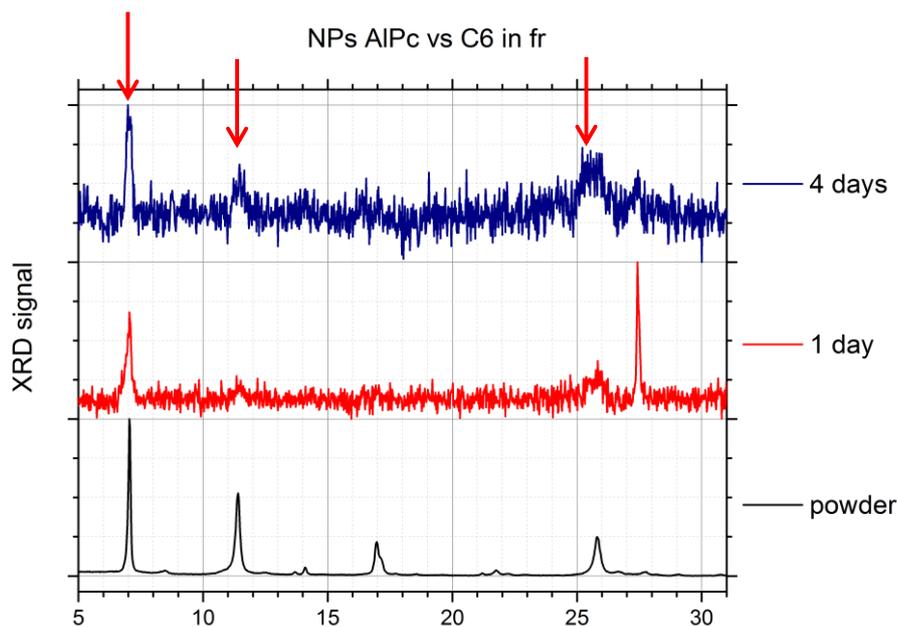


Рисунок 67. Рентгенограмма измеренная в клетках культуры C6 через 1 сутки и 4 суток после инкубации с НЧ-АIPc. Также приведены данные от порошка.

Видно, что внутри клеток сохраняются отдельные дифракционные пики, особенно сильно на  $7^\circ$ , что соответствует кристаллической плоскости с индексами (001). Выявление механизмов трансформации нанокристаллов Фс при взаимодействии с биологическим окружением и лазерном воздействии является фундаментальной научной проблемой, решение которой позволит понять возможности их применения.

На сегодняшний день, несколькими научными группами проведены исследования изменения времени жизни флуоресценции различных фталоцианиновых комплексов на поверхности наночастиц. Обнаружено, что в зависимости от типа расположения молекул фталоцианинов на поверхности изменяются их характерные спектральные свойства и времена жизни флуоресценции. Так, например, в работе [142] показано сдвиг в более длинноволновую область пика флуоресценции и возникновение двух времен жизни флуоресценции, характерные для каждого конкретного расположения молекул фталоцианина на поверхности частицы.

Результаты исследований показывают, что взаимодействие НЧ-АІРс с иммунными и опухолевыми клетками приводит к изменению времени жизни их флуоресценции. 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 данных можно сделать предположение о том, что НЧ-АІРс имеют, как минимум, два возможных варианта состояния (Рисунок 68), каждое из которых различается характером взаимодействия молекул на поверхности наночастицы с окружением.

1. НЧ-АІРс пассивна, поверхностные молекулы АІРс находятся в пароположении относительно плоскости наночастицы (лежат на поверхности). В этом состоянии НЧ-АІРс не флуоресцирует. Но в результате взаимодействия, отдельные молекулы АІРс могут быть оторваны окружающими биоорганическими молекулами в таком случае взаимодействие между молекулой фталоцианина и ухватившей ее биомолекулой можно охарактеризовать слабыми координационными или ван-дер-ваальсовыми связями и в этом случае время затухания флуоресценции будет находится в диапазоне 5-10 нс.

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

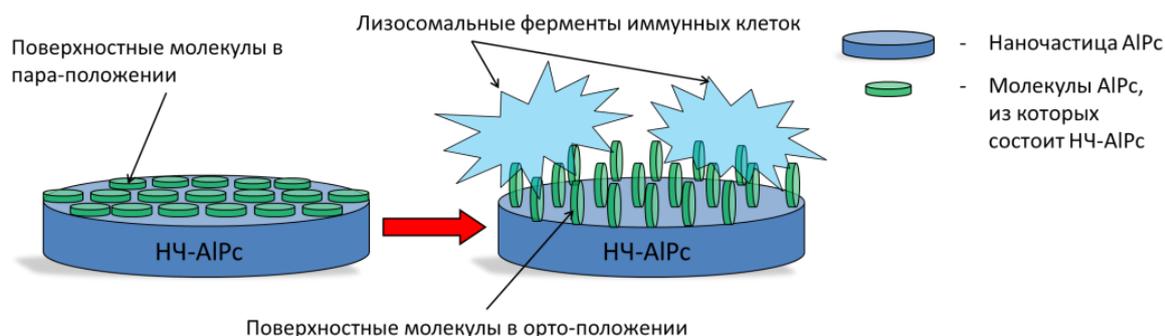


Рисунок 68. Модель перехода НЧ-ALPc в «активное» флуоресцирующее состояние.

### 3.5 Результаты сравнения теоретических расчетов и экспериментальных значений изменения временных характеристик лазерного импульса и флуоресценции при распространении света в ткани

На Рисунке 69 показана картина распределения светового поля рассеянного лазерного излучения от двух волокон в оптической среде с параметрами рассеяния и поглощения  $\mu_s$ ,  $\mu_a$ , показателями преломления  $n$ , толщиной  $d$  и фактором анизотропии  $g$ , соответствующими параметрам трех слоев кожи: эпидермису, дерме и гиподерме (Таблица 3).

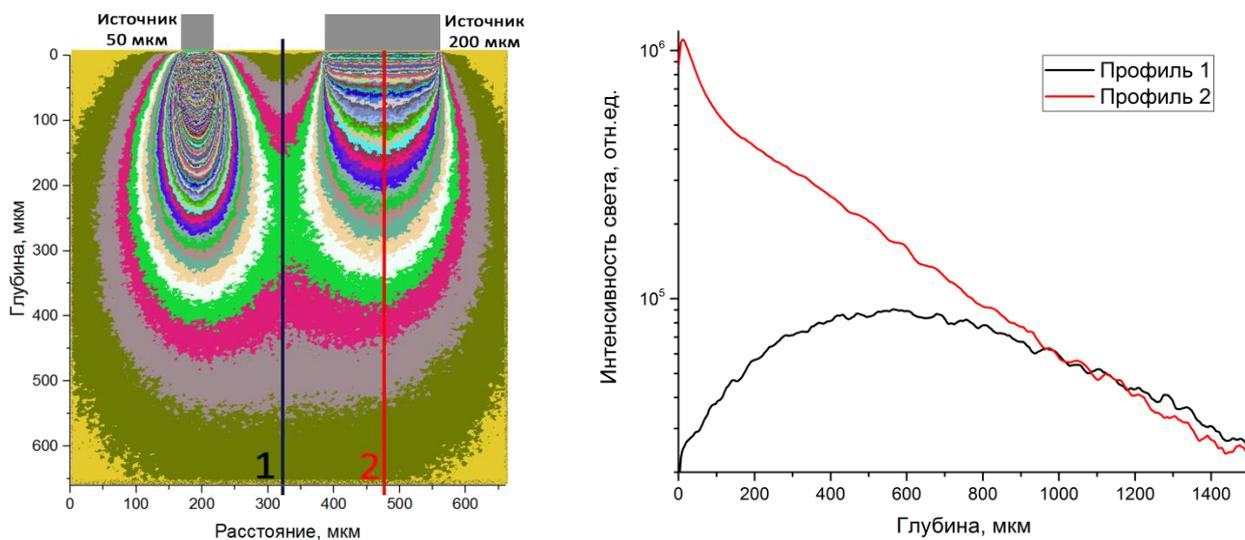


Рисунок 69. (Слева) Обработанное в программе TiffReader изображение светового поля рассеянного лазерного излучения от двух волокон. (Справа) Профили интенсивности распределения светового поля в ткани.

Рассчитанные методом МК области наиболее вероятного прохождения рассеянных фотонов представлены на Рисунке 70. Также были рассчитаны величины среднего пробега фотонов и получено распределение фотонов от длины их пробега в ткани.

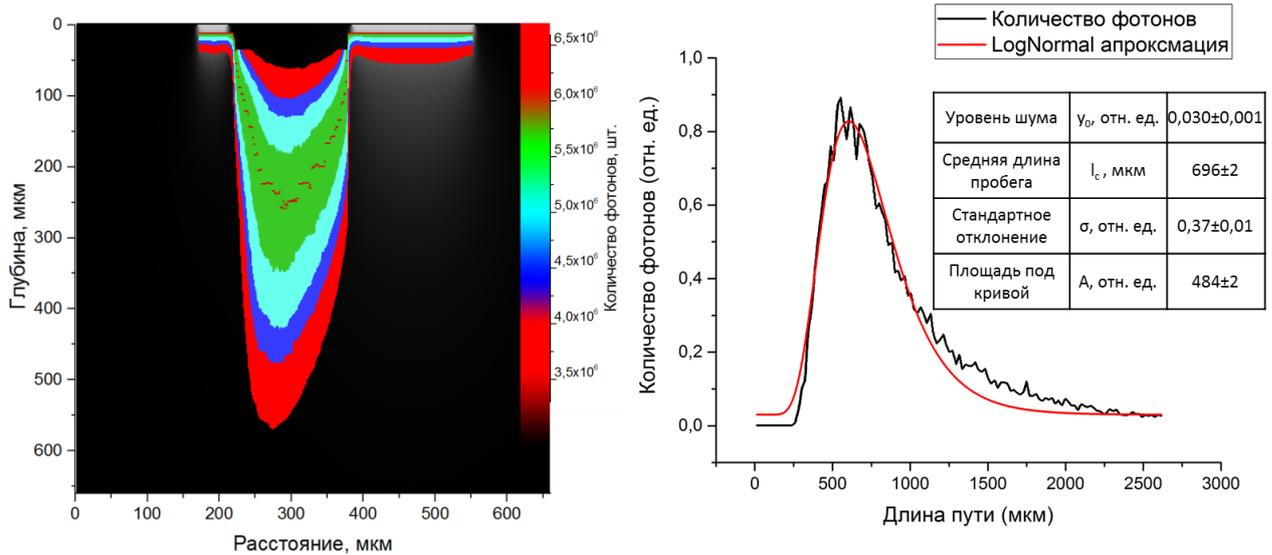


Рисунок 70. (Слева) картина распределения наиболее вероятного пути фотонов в ткани. (Справа) Рассчитанные методом МК распределение пути фотонов.

Результаты численного моделирования распределение фотонов по пробегу в коже с хорошей точностью соответствует логнормальному распределению вида:

$$y(l) = y_0 + \frac{A}{\sqrt{2\pi\sigma l}} e^{-\frac{[\ln \frac{l}{l_c}]^2}{2\sigma^2}} \quad (37)$$

Где  $l$  – длина пробега фотона,  $l_c$  – средняя длина пробега фотона,  $A$  – площадь под кривой (соответствует суммарной длине пробега всех фотонов),  $\sigma$  – стандартное отклонение,  $y_0$  – значение шума. Эти коэффициенты были получены при аппроксимации рассчитанной кривой логнормальным распределением в программе OriginPro.

Разброс по длинам пробега фотонов  $\Delta l$  в ткани будем считать как ширину на полувысоте такого распределения:

$$\Delta l = FWHM[y(l)] = e^{(\ln(l_c) - \sigma^2) + \sqrt{2\sigma^2 \ln 2}} - e^{(\ln(l_c) - \sigma^2) - \sqrt{2\sigma^2 \ln 2}} \approx 650 \text{ мкм} \quad (38)$$

Учитывая это, можно рассчитать уширение регистрируемого сигнала:

$$\Delta \tau_{\text{теор}} = \frac{\Delta l \cdot n}{c} \approx 3,5 \text{ пс} \quad (39)$$

Полученные экспериментальные зависимости уширения лазерного импульса показаны на Рисунке 71.

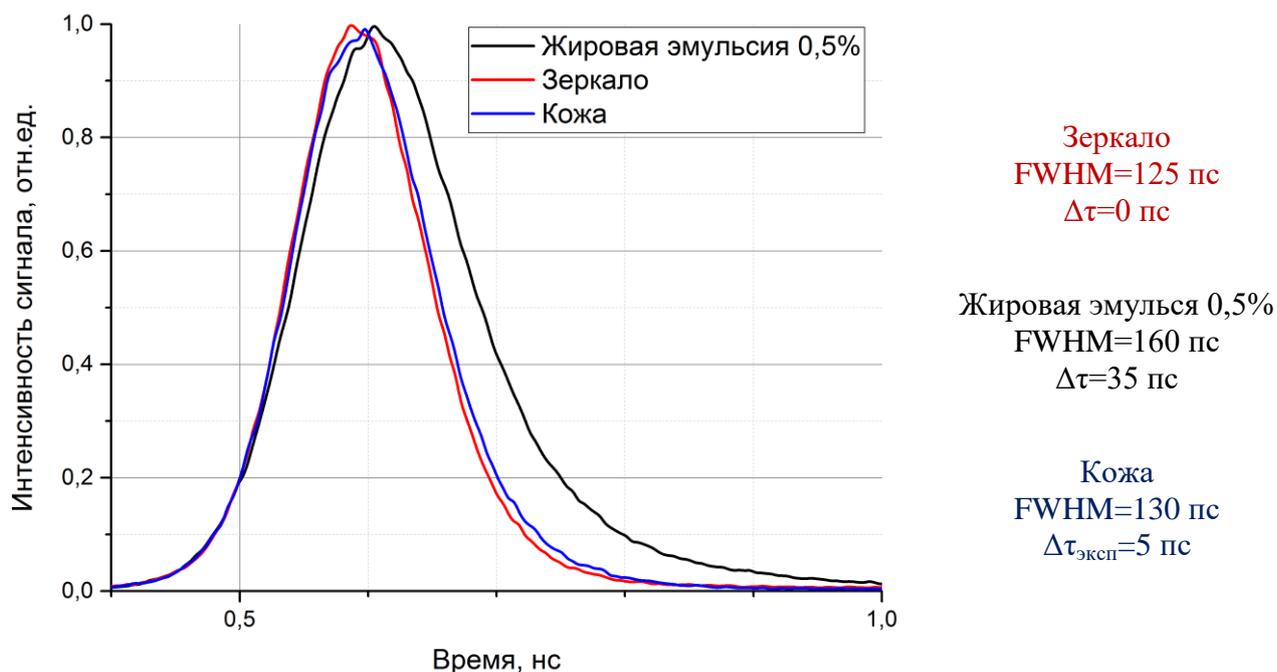


Рисунок 71. Экспериментальные зависимости уширения лазерного импульса в зависимости от рассеивающей среды.

Расчитанное уширение ( $\Delta\tau_{\text{теор}}=3,5$  пс) и измеренное непосредственно от кожи уширение ( $\Delta\tau_{\text{эксп}}=5$  пс) совпадают в пределах ошибки. Ошибка может быть вызвана тем, что в теоретической модели не учитывались следующие факторы:

- 1) Наличие крови в реальной ткани. Кровь является гораздо более оптически плотной средой, чем ткани кожи.
- 2) Не учитывалось время задержки при каждом акте рассеяния. В среднем, в коже на каждый 1 мм свободного пробега приходится 40 актов рассеяния. На длине волны 640 нм каждый акт рассеяния занимает время порядка 20 фс, что на длине пробега 1 мм даст задержку  $\Delta\tau_s \approx 0,8$  пс.
- 3) Индивидуальные особенности кожи. В модели учитывались средние показатели для кожи, а реальные индивидуальные характеристики могут в значительной степени отличаться.

Таким образом, была разработан метод расчета уширения по времени регистрируемого сигнала, применимый для различных тканей и органов. Метод учитывает оптические параметры различных органов и тканей таких как: рассеяние, поглощение, показатель преломления и фактор анизотропии. И хотя разрешение по времени у измерительного комплекса 15 пс, но статистический набор данных позволяет с хорошей точностью определять изменение регистрируемого сигнала до 0,5 пс.

### Заключение по главе 3

На основании исследований зависимости спектральных свойств НЧ-АІРС от показателя рН окружающей среды были получены характерные спектры поглощения и флуоресценции НЧ-АІРС, а также определен характер изменения времени жизни флуоресценции НЧ-АІРС. Таким образом, можно сказать, что флуоресценция наночастиц фталоцианина алюминия чувствительна к рН. Более того, в спектрах кинетики флуоресценции мы видим значительную разницу во временах жизни.

Показано, что после инкубации коллоидов НЧ-АІРС вместе с клетками, накопленные внутри клеток НЧ-АІРС начинают флуоресцировать. Конфокальная микроскопия внутриклеточного распределения демонстрирует накопление в лизосомах. Спектры поглощения, измеренные от клеточной массы с накопленными внутри НЧ-АІРС, соответствуют спектру поглощения водного коллоида НЧ-АІРС. Также для АІРС в клетках и тканях после лазерного воздействия отмечается заметный фотобликинг (снижение интенсивности флуоресценции).

Продемонстрировано, что взаимодействие НЧ-АІРС с моноцитами/макрофагами приводит к изменению времени жизни их флуоресценции. 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.

Рассчитана фотодинамическая эффективность Фотосенса в культурах клеток HeLa и ТНР-1 и показано, что она 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.

Рассчитан квантовый выход флуоресценции НЧ-АІРС при взаимодействии с клетками. Показано, что внутри клеток НЧ-АІРС сохраняют кристаллическую структуру. Предложена модель перехода НЧ-АІРС в «активное» флуоресцирующее состояние.

Апробирован разработанный метод анализа уширения спектра по времени при распространении света в ткани и показана его корреляция с экспериментальными данными.

## **ГЛАВА 4. ПРИМЕНЕНИЕ НЧ-АІРС, ЛАЗЕРНО-СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЙ АППАРАТУРЫ, ИНСТРУМЕНТОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ НОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДИАГНОСТИКИ, ЛЕЧЕНИЯ И ПРОФИЛАКТИКИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

Данная 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 флуоресцентного контроля за фотодинамической терапией артрозов крупных суставов *in vivo*. В параграфе 4.2 описан новый спектроскопический метод оценки неоангиогенеза при приживлении кожных трансплантатов с применением НЧ-АІРС спектрально чувствительных к воспалительным реакциям. Параграф 4.3 посвящен разработке методов и инструментария для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии для диагностики лечения атеросклероза крупных сосудов, а также профилактике при стентировании.

### **4.1 Флуоресцентные методы контроля фотодинамической терапии артрозов с применением наночастиц фталоцианина алюминия в эксперименте**

Задачей исследования являлась оценка возможности применения наночастиц фталоцианина алюминия для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии заболеваний крупных суставов и разработка методов флуоресцентного контроля за фотодинамической терапией артрозов крупных суставов *in vivo*. Апробация разработанных методов проведена на экспериментальных животных (кролики с моделью гонартроза – артроза коленных суставов). Исследование биотканей и контроль за проведением фотодинамической терапии осуществлялись методами лазер-индуцированной люминесцентной спектроскопии и спектроскопии диффузного отражения света с применением волоконно-оптической аппаратуры. Показано, что оптико-спектральные методы могут эффективно использоваться для высокоточной оценки концентрации накопления «активированных» наночастиц фталоцианина алюминия в биотканях крупных суставов в режиме реального времени.

Заболевания, связанные с дегенеративно-дистрофическими изменениями суставов, являются одними из самых распространенных заболеваний опорно-двигательного аппарата [118]. Остеоартроз – это группа заболеваний различной этиологии, основанных на повреждении всех составляющих сустава (хрящ, субхондральная кость, синовиальная оболочка, капсула, связки, периартикулярная ткань) [119]. При остеоартрите наблюдается различная степень функциональных ограничений [120], снижение качества жизни, а также остеоартрит является одной из самых распространенных причин инвалидности во всем мире [121].

Учитывая сложность постановки диагноза [122] и выявления факторов риска и факторов прогрессирования остеоартрита [123], непрерывно разрабатываются новые методы ранней диагностики [124] и лечения этого заболевания [125]. Руководящие принципы и рекомендации Американской академии ортопедических хирургов (AAOS), Американского колледжа ревматологии (ARC), Европейской лиги против ревматизма (EULAR) и Европейского общества клинических и экономических аспектов остеопороза и остеоартрита (ESCEO) постоянно обновляются [126]. Кроме того, Osteoarthritis Research Society International (OARSI) обновила и опубликовала рекомендации по нехирургическому лечению остеоартрита коленного сустава [127].

В процессе разрушения хряща наиболее важную роль играет заболевание синовиальной оболочки и изменение физико-химических свойств синовиальной жидкости [128]. Накопление структурных несоответствий и дегенеративных изменений приводит к увеличению мышечного дисбаланса и нарушения функции конечностей. До сих пор невозможно было разработать эффективные и безопасные препараты для лечения остеоартрита [129]. Поэтому актуальной проблемой является проведение исследований новых методов воздействия на воспалительные процессы при травмах и дегенеративных изменениях суставов.

Опубликованные несколькими авторами за последние 15 лет исследования [130-133] достоверно показали, что снижение активности воспалительного процесса при остеоартрите коленного сустава после фотодинамической терапии (ФДТ) вызывает гибель клеток в воспалительных измененных частях синовиальной мембраны без повреждения здоровой ткани.

Таким образом, экспериментальные результаты демонстрируют выборочное накопление различных рядов порфиринов в воспалительных измененных областях синовиальной мембраны коленного сустава с индуцированным остеоартритом, фотодинамический эффект при лазерном освещении и возможность использования ФДТ для лечения артрита различной этиологии. В том числе в нашей лаборатории совместно с научной группой из ПМГМУ им. И.М.Сеченова под руководством проф. Иванникова С.В. были проведены исследования по накоплению Фс на основе хлорина еб в тканях суставов, а также проведен анализ фотодинамического воздействия на ткань синовиальной оболочки от мощности светового излучения [134].

В представленной работе исследовалась возможность применения фталоцианина алюминия в наноформе (НЧ-АIPс) для ФД и контроля ФДТ артрозов крупных суставов. Применение уже известных препаратов-фотосенсибилизаторов (Фс) или близких к ним по структуре веществ в составе или форме наночастиц для проведения ФД и ФДТ в эксперименте показало свою высокую эффективность при различных патологиях как онкологического, так и неонкологического генеза.

Исследование проводилось на экспериментальных животных - кроликах (самцах). В оба коленных сустава в суставную сумку вводилось 0,5 мл коллоида НЧ-АІРс в физиологическом растворе. На одном коленном суставе предварительно создавалась модель артроза коленного сустава, другой сустав оставляли здоровым. Эта операция проводилась с целью выявления разницы в интенсивности и скорости «активации» наночастиц АІРс в патологии и норме. Измерение спектров флуоресценции проводилось при помощи волоконно-оптического спектрометра «ЛЭСА-01-БИОСПЕК». Возбуждение флуоресценции производилось при помощи He-Ne лазера (длина волны 632,8 нм). Спектры флуоресценции измеряли в здоровой и патологически измененной биоткани сустава до введения НЧ-АІРс, через 1,5 часа, а также через 2, 7, 10 и 12 суток после введения НЧ-АІРс.

Процедура ФДТ проводилась через 7 и 12 суток после введения НЧ-АІРс с использованием полупроводникового лазера (длина волны 672 нм) и волоконно-оптического катетера с сапфировой иглой и диффузором на конце для более равномерного температурного распределения внутри сустава. Световая доза составила 30 Дж/см<sup>3</sup>. Схема проведения ФД и ФДТ показана на Рисунке 72

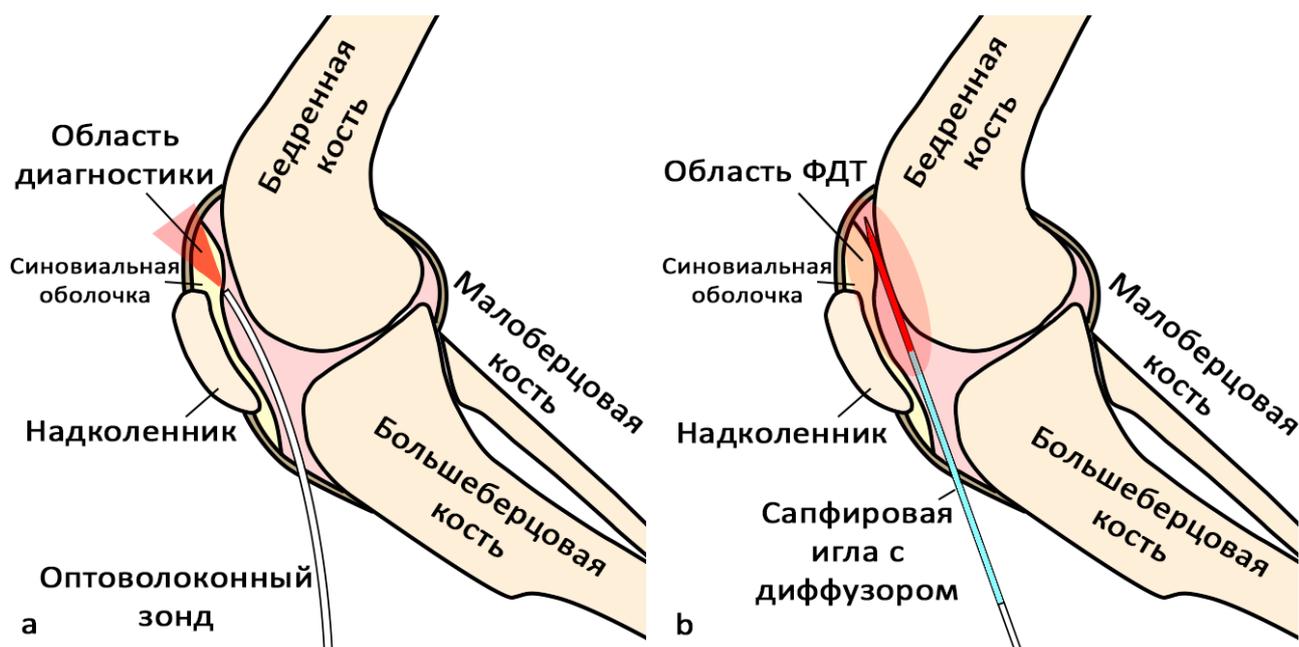


Рисунок 72. Схема проведения внутрисуставной ФД (a) и ФДТ (b).

На Рисунке 73 (слева) представлены спектры флуоресценции, измеренные в патологически измененном и здоровом суставе до введения НЧ-АІРс и через двое суток после введения. Пик на длине волны 632,8 нм соответствует диффузно отраженному лазерному излучению, а широкий пик в диапазоне 645-800 нм – флуоресценции. Из представленных графиков видно, что интенсивность флуоресценции в патологически измененном суставе почти в 10 раз выше, чем в здоровом суставе. Как показали исследования, максимальная разница в интенсивности флуоресценции между здоровым суставом и суставом с артрозом наблюдается

именно через 2 суток после введения НЧ-АІРС. В здоровом суставе интенсивность флуоресценции через 7, 10 и 12 суток выросла примерно в 2 раза. Скорее всего, это произошло из-за усиления воспалительных реакций вследствие неоднократного вмешательства при измерении спектров флуоресценции. В то время как в суставе с артрозом интенсивность флуоресценции НЧ-АІРС осталась на прежнем уровне.

Данный результат позволяет утверждать, что процесс «активации» НЧ-АІРС интенсивно происходит только в тех участках ткани, где идут воспалительные процессы. На Рисунке 73 (справа) представлены спектры флуоресценции, измеренные в патологически измененной биоткани сустава через 7 суток после введения НЧ-АІРС до и после проведения ФДТ. Как видно из представленных графиков, интенсивность флуоресценции после светового воздействия снизилась в 3 раза, практически до показателей здоровой ткани сустава. Через 5 дней после первой ФДТ интенсивность флуоресценции в суставе с артрозом выросла примерно в 2 раза. Поэтому была проведена вторая процедура ФДТ с теми же параметрами

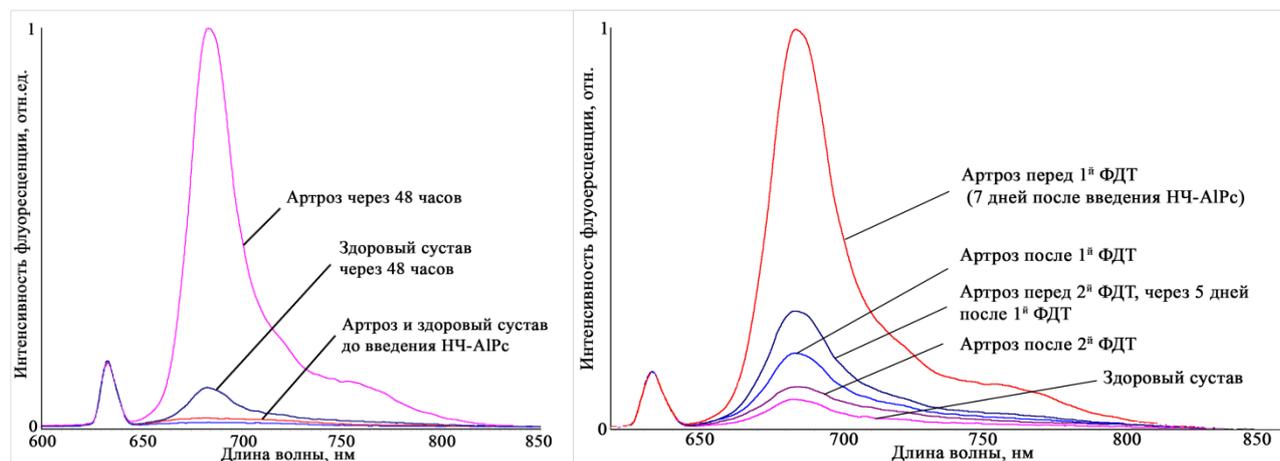


Рисунок 73. (Слева) спектры флуоресценции, измеренные в здоровом суставе и суставе с артрозом до и через 48 часов после введения НЧ-АІРС. (Справа) изменение интенсивности флуоресценции после проведения ФДТ.

После проведения ФДТ кролики были выведены из эксперимента передозировкой препаратом «Золетил» (анестетик диссоциативного действия).

Таким образом, показано увеличение интенсивности флуоресценции фталоцианина алюминия в патологически измененной ткани сустава, что может быть использовано для диагностики воспалительных заболеваний суставов. Также показано, что НЧ-АІРС могут являться более эффективным и безопасным Фс для ФД и ФДТ по сравнению с водорастворимыми молекулярными Фс.

## 4.2 Спектроскопический метод оценки неоангиогенеза при приживлении кожных трансплантатов с применением НЧ-АІРс

Трансплантационная медицина является одной из самых сложных областей современного здравоохранения. За последние 20 лет результаты приживления после трансплантации органов и тканей значительно улучшились в связи с использованием мощных иммуносупрессивных препаратов для предотвращения острого отторжения. Однако диагностика отторжения до сих пор остается нерешенной проблемой.

Независимо от типа пересаженного органа острое отторжение является одной из основных причин функционального отказа при трансплантации, а также основным фактором риска и сокращения срока службы трансплантата. В настоящее время существуют неинвазивные методы оценки качества приживления трансплантата: по уровню сывороточных белков, содержанию креатинина (в случае пересадки почки) [135] и субъективных визуальных признаков, однако они являются недостаточно точными и информативными [136-138].

Единственным, на сегодняшний день, точным методом определения типа и фактора отторжения является биопсия. Однако постановка диагноза таким методом требует временных затрат, представляет опасность для пациента, а также может быть недостаточно точной в связи с ошибкой выборки места биопсии из-за очагового характера отторжения. Повторные биопсии кожи также могут привести к образованию рубцов, что является значительной эстетической проблемой в случае открытых участков кожи. Таким образом, быстрый и неинвазивный количественный мониторинг приживления трансплантата остается актуальной задачей.

Коллективом лаборатории, в том числе автором работы, был разработан макет приборного комплекса неинвазивной спектроскопической оценки состояния трансплантируемых кожных лоскутов малых лабораторных животных. На разработанном макете проведены исследования по динамике изменения степени оксигенации, уровня кровенаполненности кожных трансплантатов при аппликации нанофотосенсибилизаторов, основанных на фталоцианине алюминия. Разработана методика измерения люминесценции NADH и теоретической обработки спектров с отделением полезного сигнала от паразитных. Проведенные исследования трансплантатов показали достаточно высокую диагностическую значимость этого параметра. Разработана методика оценки состояния кровотока и лимфотока с применением НЧ-АІРс, производных хлорина еб и индоцианина зеленого, эффективными в красном и ближнем инфракрасном диапазонах спектра. В целях увеличения глубины зондирования нами был использован краситель, работающий в ближнем ИК диапазоне индоцианин зеленый (работа сверх плана). Исследована динамика "разгорания" флуоресценции наночастиц фталоцианина алюминия в кожных трансплантатах во время приживления. В



Как уже было сказано в параграфе **2.4.3** был разработан макет измерительной видеосистемы, который состоит из источника лазерного излучения, широкополосного диодного источника, светоделителя с дихроичным зеркалом и двух цифровых камер для регистрации цветного и люминесцентного изображений.

Для оценки состояния кровотока в хвостовую вену мыши вводился 50 мкл фотосенсибилизатора ICG при концентрации 2 мг/мл. В режиме реального времени проводилась видеорегистрация флуоресцентных изображений со скоростью 30 кадр/с. Для возбуждения флуоресценции ICG использовался лазер MDL-III-785-1.5W с излучением на длине волны 785 нм. Для регистрации видимого изображения использовался диодный источник белого света.

На Рисунке 75 показано распространение ICG в кожной ткани мышей через несколько минут после введения флуоресцентного красителя и через 7 суток после перекрестной трансплантации кожи. Видно, что трансплантаты флуоресцируют слабее, чем здоровые участки кожи. Это означает, что на данном этапе новые кровеносные сосуды еще не проросли в трансплантаты.

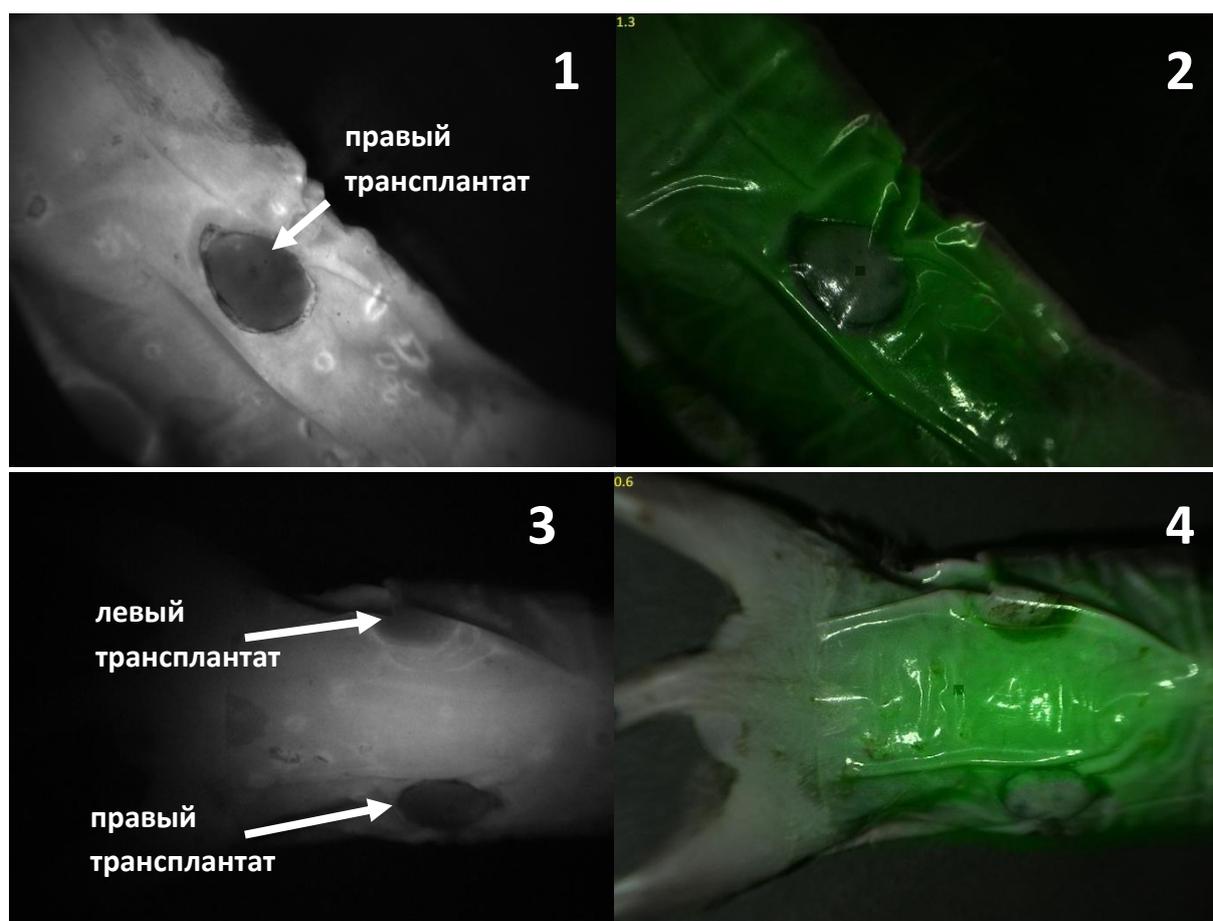
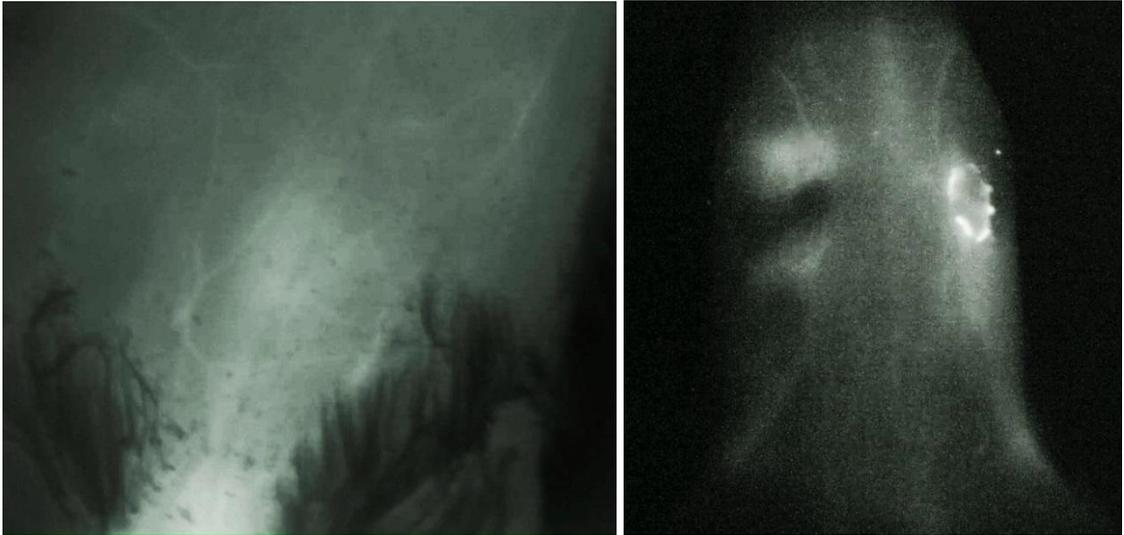


Рисунок 75. Флуоресцентные изображения кожных трансплантатов мыши с ICG (через 7 суток после перекрестной трансплантации). (1),(3) – флуоресцентное изображение; (2), (4) – флуоресцентное изображение, совмещенное с видимым изображением.

На Рисунке 76 показано распространение фотосенсибилизатора метиленового синего в сосудистом русле мышцы через 10 секунд после введения секунд.



*Рисунок 76. Флуоресцентные изображения кожных покровов мышей после введения фотосенсибилизатора метиленовый синий.*

Оценка состояния лимфотока производилась по анализу флуоресцентных изображений кожных трансплантатов, содержащих активированные наночастицы АІРс (Рисунок 77), а также по визуализации динамики распространения фотосенсибилизатора ICG по лимфатической системе мышцы. Исследование взаимодействия НЧ-АІРс с макрофагами показало, что в участке воспаления происходит «разгорание» флуоресценции НЧ-АІРс.

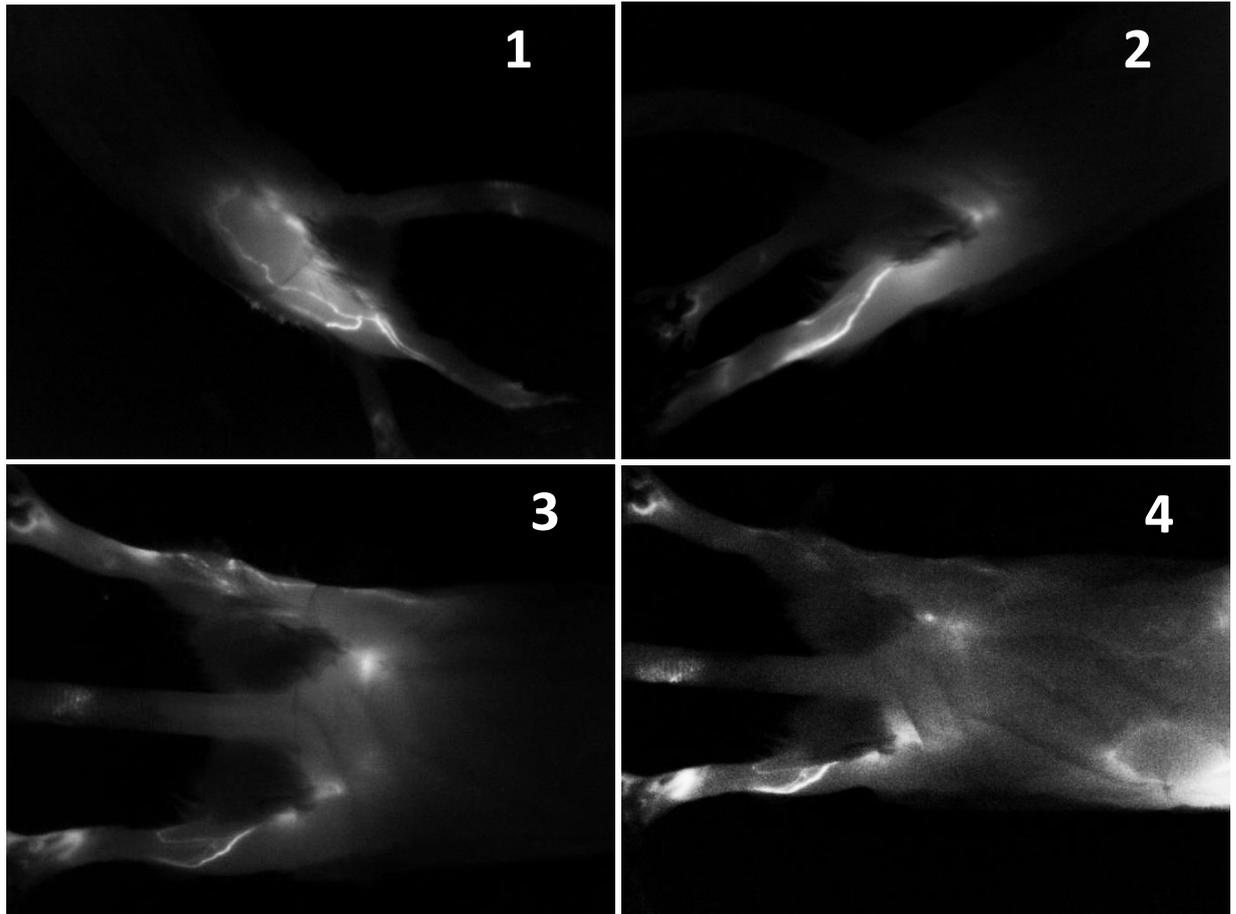
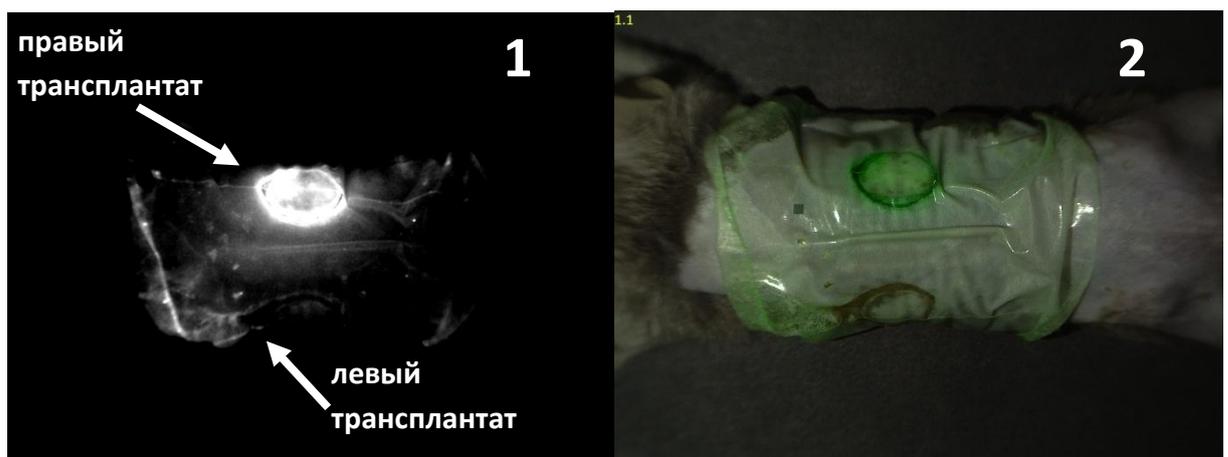
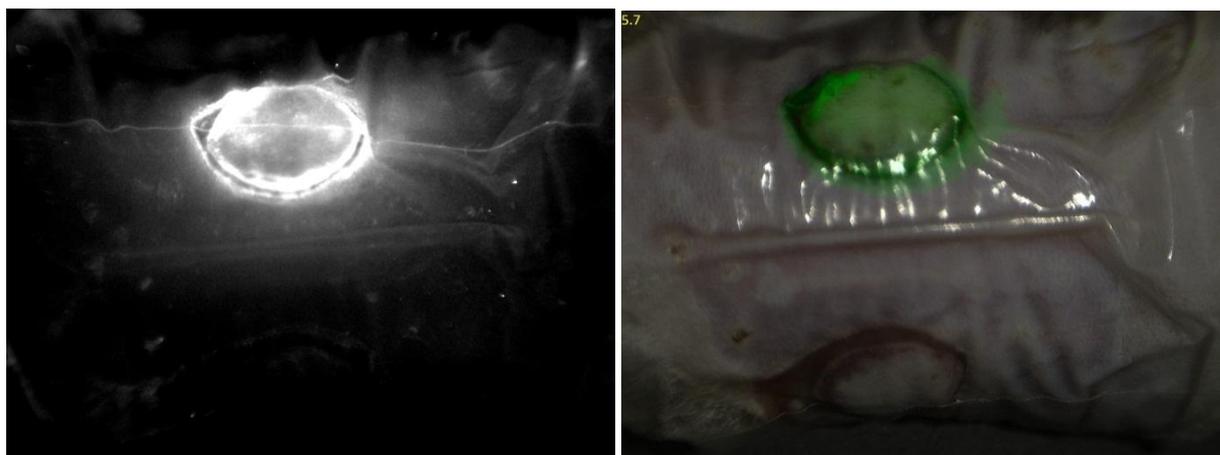


Рисунок 77. Флуоресцентные изображения лимфатической системы мыши после подкожного введения фотосенсибилизатора ICG 1) левая нога через 10 минут; 2) правая нога через 10 минут; 3) нижняя часть спины через 15 минут; 4) спина через 25 минут.

На Рисунке 78 показаны флуоресцентные изображения мышечной ткани через 7 суток после перекрестной трансплантации.





*Рисунок 78. Флуоресцентные изображения НЧ-АІРс в кожных трансплантатах мыши через 7 суток после перекрестной трансплантации.*

В ходе исследований в режиме реального времени при внутривенном введении люминесцентного препарата удалось визуализировать распространение контрастного вещества по кровотоку. Таким образом, была получена картина распространения сосудистой сетки и проведена оценка состояния кровотока в области приживляемых тканей, что позволило сделать выводы о процессах неоангиогенеза в областях с различными стимулирующими данный процесс условиями.

И в том, и в другом случае видеосистема дает возможность оценить по уровню люминесцентного сигнала состояние кровотока и лимфотока в заданной области с высоким разрешением.

Таким образом, в ходе работы был разработан метод регистрации и анализа комбинированных изображений и макет прибора, позволяющих оценивать интенсивность флуоресценции люминесцирующего препарата на фоне полноцветного изображения тканей с одновременным количественным анализом.

Еще одной задачей было определить степень оксигенации гемоглобина в приживляемых трансплантатах у мышей с использованием НЧ-АІРс. Для этого были измерены спектры ОДР света от приживляемых трансплантатов: левого (без наночастиц АІРс) и правого (с наночастицами АІРс), а также для контроля были измерены участки здоровой кожи на задних лапах и спине.

На Рисунке 79 представлены спектры ОДР, нормированные на аппаратную функцию прибора с учетом нелинейной характеристики коэффициента рассеяния от длины волны, измеренные у двух мышей, трансплантаты у которых имели максимальные отличия по динамике приживления. Остальные животные имели промежуточные значения. Так как свет, вышедший из облучающего волокна, прежде чем попасть в приемные волокна, проходит по некой траектории (получившей название «банан»), то, с учетом погрешностей, для

последующего сопоставления с классическими спектрами гемоглобина в растворах, ось «Y» представлена в единицах поглощения в логарифмическом масштабе.

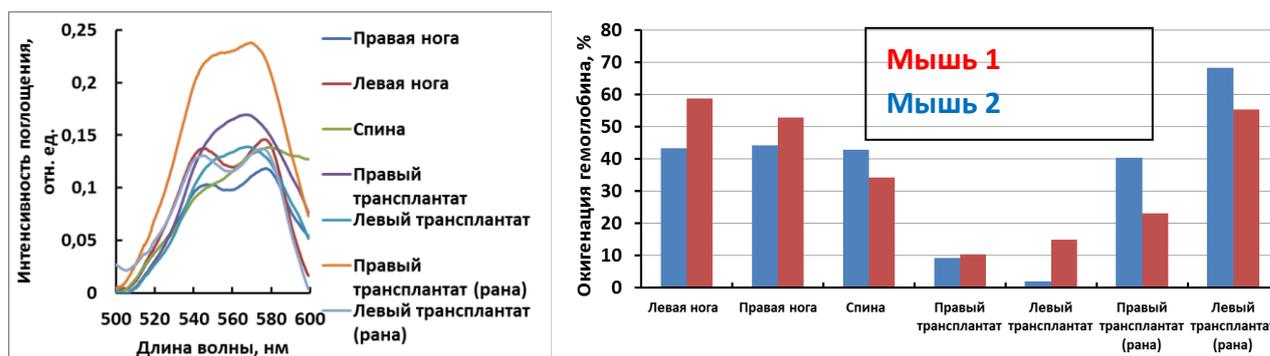


Рисунок 79. (Слева) Спектры ОДР, измеренные в различных участках кожи. (Справа) рассчитанная из спектров степень оксигенации гемоглобина в различных участках кожи у мышей.

Как видно из рисунка, правый трансплантат (с НЧ-АИРС) у обеих мышей имеет одинаковую степень оксигенации и в три раза ниже, чем норма. Левые трансплантаты существенно различаются между собой и, как видно из рисунка, мышь 1 имеет критически малую степень оксигенации, что может свидетельствовать о неблагоприятном прогнозе, относительно приживления. Раневая поверхность (небольшая полоска непокрытой трансплантатом кожи по периметру) у мыши 1 имеет более высокую степень оксигенации, чем у мыши 2, что характеризует более высокую степень воспалительной реакции. Воспаление меньше в ранах, где была проведена аппликация НЧ-АИРС.

Для вычисления истинных спектров эмиссии флуорофоров, измеренных как на мышах, так и на калибровочных фантомах с NADH в различных концентрациях, необходимо учесть аппаратную функцию, то есть произвести коррекцию на чувствительность компонентов экспериментальной установки. Функция коррекции была получена следующим образом: был измерен спектр источника белого света в отражении от  $\text{BaSO}_4$ , который был скорректирован на спектр эмиссии абсолютно чёрного тела  $I_{\text{а.ч.т.}}(\lambda)$  по формуле Планка (температура лабораторного источника белого света – вольфрам-галогеновой лампы,  $I_{\text{а.ч.т.}}(\lambda)$ , была рассчитана как 3200 К).

Функция коррекции  $S(\lambda)$  (см. Рисунок 80):

$$S(\lambda) = \frac{I_{\text{а.ч.т.}}(\lambda)}{I_{\text{галоген}}(\lambda)} \quad (40)$$

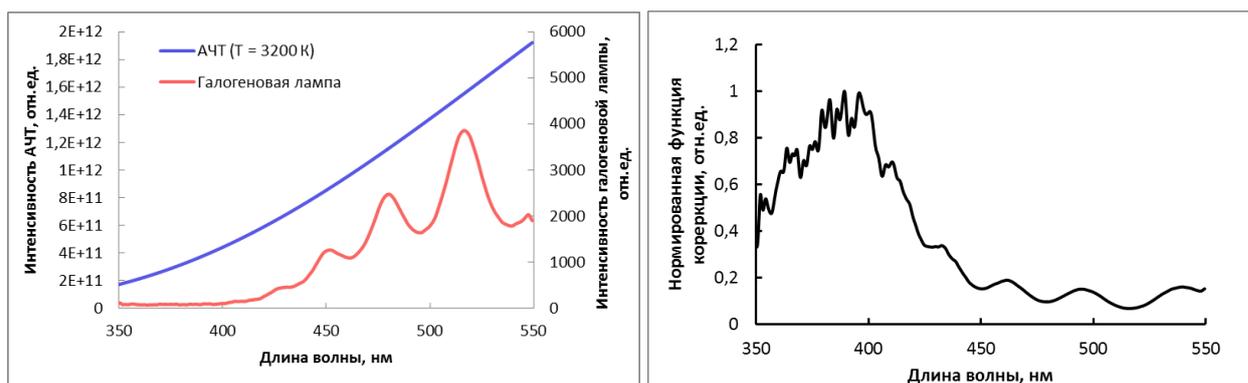


Рисунок 80. (слева) Нормированные интенсивности АЧТ при температуре 3200 К и вольфрам-галогеновой лампы. (справа) нормированная функция коррекции, использованная для получения истинной формы экспериментальных спектров.

Истинные спектры  $I_{ист}(\lambda)$  получаются при умножении экспериментально измеренных спектров на функцию коррекции:  $I_{exp}(\lambda)S(\lambda)$ :

$$I_{ист}(\lambda) = I_{exp}(\lambda)S(\lambda) \quad (41)$$

С помощью метода наименьших квадратов истинный спектр флуоресценции «Тегадерма» был разложен на сумму 4х компонент, заданных с помощью нормального распределения Гаусса:

$$I(\lambda) = \sum_{i=1}^n A_i e^{-\frac{1}{2} \left( \frac{\lambda - \lambda_0^{макс}}{w_i} \right)^2} \quad (42)$$

где  $A_i$  - амплитуда,  $w_i$  – полуширина на полувысоте,  $\lambda_0^{макс}$  - максимум распределения.

Так, например, истинный и измеренный спектры «Тегадерма» выглядят следующим образом (Рисунок 81):

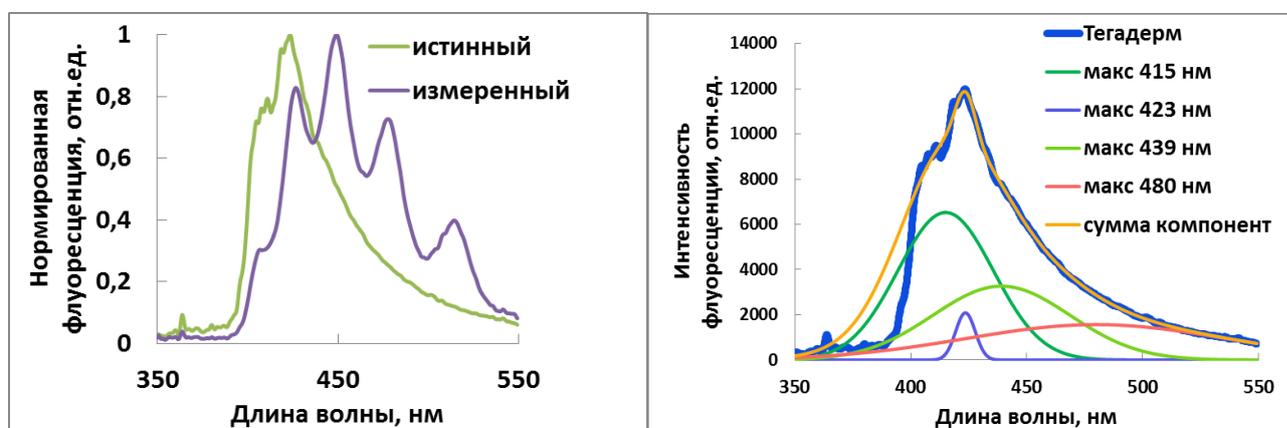


Рисунок 81. (слева) Истинный и измеренный спектры флуоресценции «Тегадерма<sup>TM</sup>». (справа) Декомпозиция спектра «Тегадерма» для учёта его вклада в спектры, измеренные на мышцах.

Так как была использована мембрана «Тегадерм ТМ», которая флуоресцирует в том же диапазоне длин волн, необходимо было учесть его влияние на спектры эмиссии эндогенных флуорофоров, измеренные на мышах. Ошибка в декомпозиции спектров составила около 10 % ( $R_{adj}^2=0.997$ ).

Как видно из Рисунка 81 (справа), вклад «Тегадерма» в общий спектр эмиссии эндогенных флуорофоров на длине волны эмиссии NADH является существенным в диапазоне длин волн менее 450 нм, ввиду того, что флуоресценции NADH проявляется на длине волны в  $460\pm 5$  нм. «Тегадерм» имеет ближайший максимум 480 нм, причём вклад этой компоненты в спектр флуоресценции «Тегадерма» составляет 11 %. Ввиду особенностей измерения спектров у мышей и спектра флуоресценции «Тегадерма ТМ», на первом этапе работ вклад флуоресценции «Тегадерма» в спектр NADH можно принять несущественным.

Аппроксимация измеренных на фантомах спектров флуоресценции NADH была произведена нормальной функцией распределения Гаусса в диапазоне длин волн 420-550 нм (так как в диапазоне длин волн до 420 нм из-за малой чувствительности спектрометра проявляется бóльшая ошибка) с максимумом в диапазоне длин волн 465-470 нм. Результаты аппроксимации представлены на Рисунке 82. Ошибка в аппроксимации была менее 15% ( $R_{adj}^2\geq 0.90$ ). Минимальная концентрация NADH, которая может быть измерена предложенным методом с достаточной степенью достоверности составила 0,05 мг/мл.

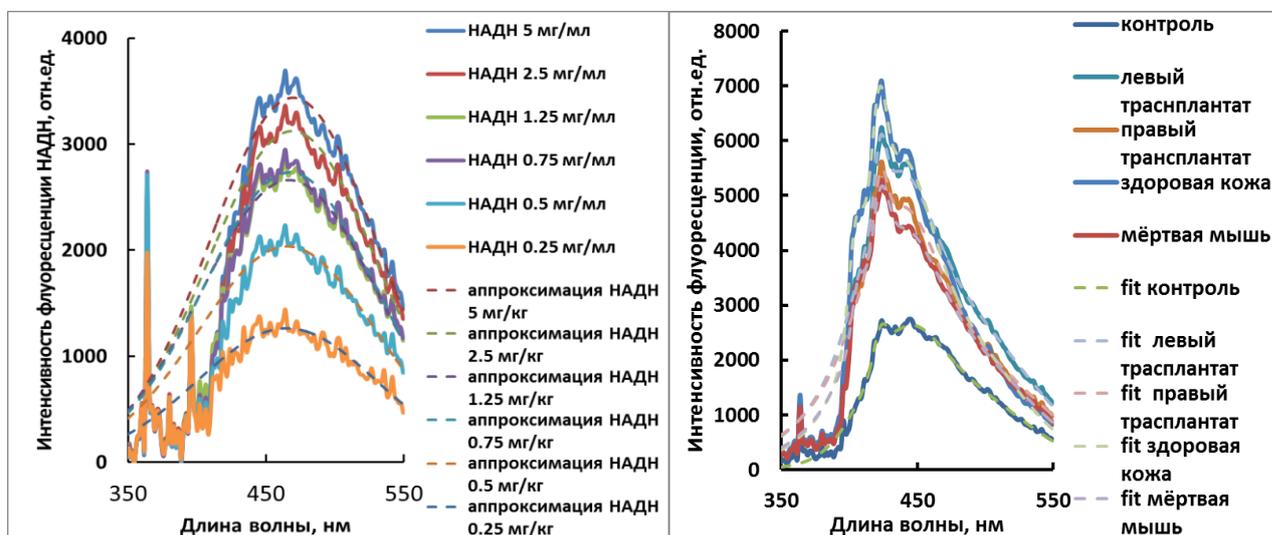


Рисунок 82. (Слева) аппроксимация спектров флуоресценции фантомов NADH нормальной функцией Гаусса; (справа) декомпозиция спектров флуоресценции у мышей по  $n = 4$  компонентам.

Следующим шагом был выделен спектр NADH из истинных спектров эндогенной флуоресценции, снятых на мышах. Декомпозиция была произведена по  $n = 4$  компонентам, известных флуорофоров, находящихся в исследуемом диапазоне длин волн 350-550 нм. Так как

была использована третья гармоника Nd:YAG лазера  $\lambda=355$  нм, что попадает в полосы поглощения следующих флуорофоров: NADH, коллаген, эластин, липопигменты, флавины. Из них, в диапазоне 350-550 нм флуоресцируют NADH, коллаген и эластин. Исходя из этого, истинные спектры флуоресценции были разложены на  $n = 4$  компоненты, ввиду наличия мембраны «Тегадерм». Результаты представлены на Рисунке 82 (справа).

Ошибка в декомпозиции спектров составила менее 10 % ( $R_{adj}^2 \geq 0.99$ ). Компонента, соответствующая флуоресценции NADH, была выявлена с максимумом в диапазоне 460-466 нм.

Спектры флуоресценции, измеренные в водном растворе интралипида 1,6 % при различных концентрациях NADH, были аппроксимированы в диапазоне 400-550 нм функцией нормального распределения Гаусса с максимумом в диапазоне 460-466 нм. Вследствие концентрационного тушения флуоресценции NADH, интеграл флуоресценции в диапазоне длин волн 350-550 нм был аппроксимирован не линейной, а гиперболической функцией от концентрации,  $C$  (мг/мл):

$$F_{350-550\text{нм}}(C) = \frac{a_1 C}{a_2 - C} \quad (43)$$

где  $a_i$  ( $i = 1:2$ ) – подстроечные параметры, найденные с помощью метода наименьших квадратов:  $a_1 = (6.5 \pm 2.5) \cdot 10^6$  и  $a_2 = 0.36 \pm 0.07$ . Результаты аппроксимации представлены на Рисунке 83. Ошибка в аппроксимации составила не более 10% ( $R_{adj}^2 = 0.97$ ).

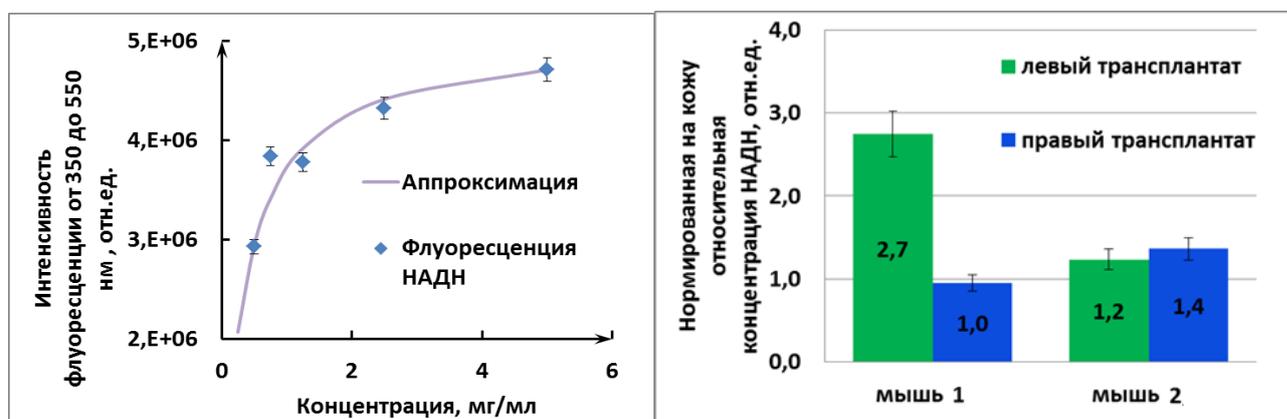


Рисунок 83. (Слева) аппроксимация концентрационной зависимости флуоресценции NADH. (Справа) относительные концентрации NADH в левом и правом трансплантате у мышей.

Как видно из рисунка, правые трансплантаты, (содержащие НЧ-АІРС) имеют одинаковую концентрацию NADH, в пределах ошибки, равную здоровой коже. Левые трансплантаты существенно различны. Концентрация NADH в трансплантате мыши 1 в 2,5 раза выше здоровой ткани. Вероятнее всего это связано с замедленным аэробным дыханием клеток за счет ограниченного кровоснабжения и, соответственно, недостатком, поставляемого к трансплантату, кислорода.

На Рисунке 84 представлены спектры флуоресценции, измеренные в области правого трансплантата с НЧ-АІРс мыши №1. Высокая интенсивность аутофлуоресценции в левом трансплантате наблюдается вследствие активно протекающего воспалительного процесса после пересадки трансплантата, флуоресценции НЧ-АІРс в левом трансплантате не наблюдалось. Спектр флуоресценции здорового участка кожи соответствует стандартному спектру аутофлуоресценции кожи при возбуждении длиной волны 632,8 нм. Динамика «разгорания» флуоресценции НЧ-АІРс в правом трансплантате показана на рисунке 84. Видно, что в области раны (рубца) между трансплантатом и здоровым участком кожи интенсивность флуоресценции НЧ-АІРс растет быстрее, чем в самом трансплантате, что происходит, по-видимому, вследствие более выраженного воспалительного процесса, а следовательно более высокой концентрации макрофагов в данной области. Однако через 7 суток после трансплантации, интенсивности флуоресценции в рубце и трансплантате выравниваются.

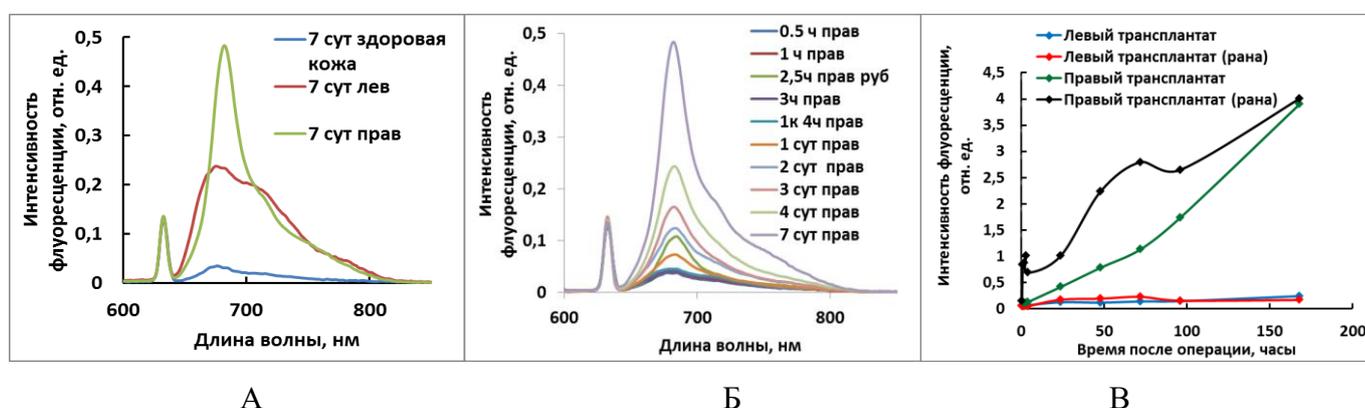


Рисунок 84. Спектры флуоресценции, измеренные в различных участках кожи мыши №1. (А) – через 7 суток после трансплантации; (Б) – в указанный момент времени после трансплантации; (В) – зависимость интенсивности флуоресценции НЧ-АІРс в различных участках кожи от времени.

На Рисунке 85 (слева) показаны спектры флуоресценции измеренные в правом трансплантате мыши (через 10 суток после перекрестной трансплантации кожи) при различной длительности облучения полупроводниковым лазером с длиной  $\lambda=670\pm 5$  нм. Плотность мощности облучения составила  $0,5 \text{ Вт/см}^2$ . На Рисунке 85 (справа) представлена зависимость интенсивности флуоресценции правого трансплантата мыши (через 10 суток после перекрестной трансплантации кожи) от длительности облучения. Из представленных рисунков видно, что наблюдается отчетливый фотобликинг (падение интенсивности флуоресценции фотосенсибилизатора при ФДТ), чего не наблюдается при использовании молекулярной формы АІРс.

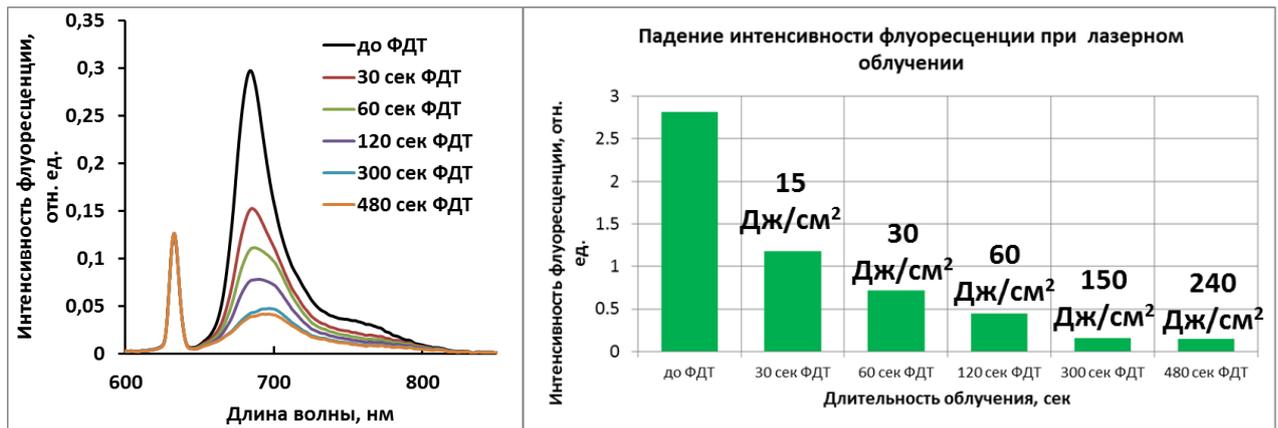


Рисунок 85. (Слева) спектры флуоресценции при различной длительности ФДТ (10 суток после перекрестной трансплантации кожи). (Справа) интенсивность флуоресценции при различной длительности ФДТ.

Также, в данной работе была получена динамика изменения времени жизни флуоресценции НЧ-АІРс в тканях трансплантатов (Рисунок 86).

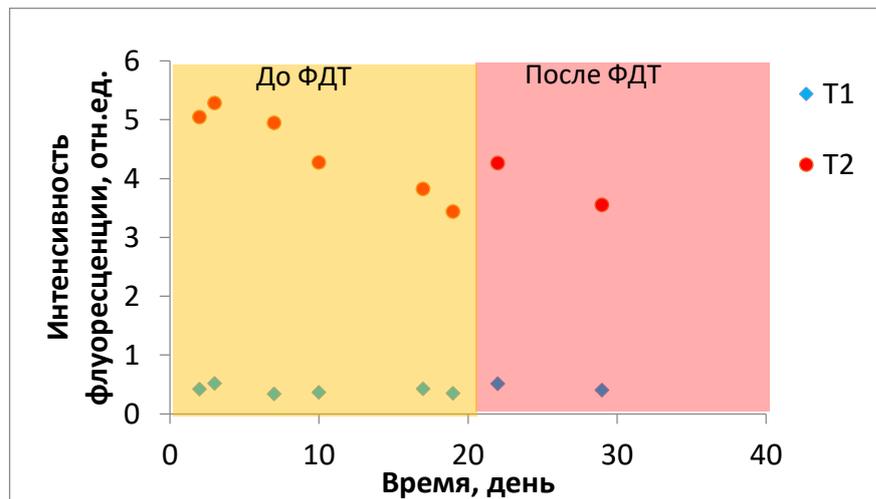


Рисунок 86. Зависимость времени жизни флуоресценции НЧ-АІРс от времени после пересадки.

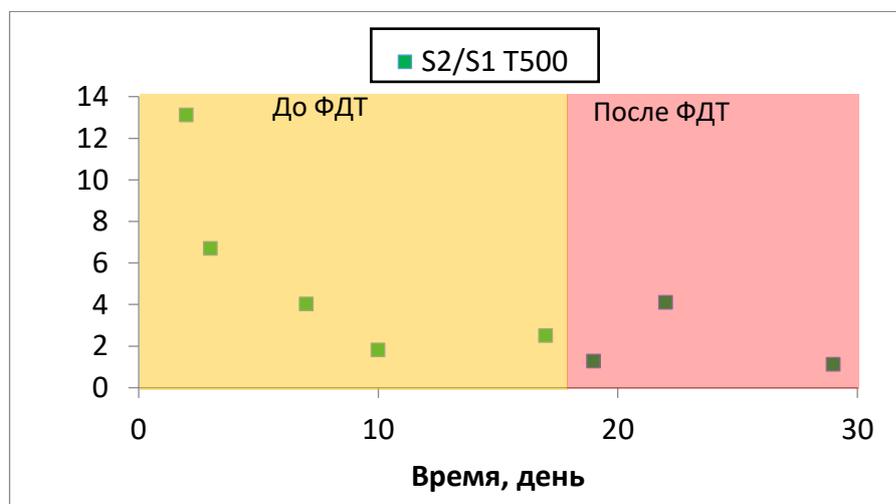


Рисунок 87. Зависимость отношения количества фотонов длинной и короткой компонент времени жизни флуоресценции НЧ-АІРс от времени после пересадки.

В ходе эксперимента было зафиксировано две компоненты времени жизни флуоресценции НЧ-АІРс в тканях трансплантатов. Времена жизни флуоресценции НЧ-АІРс сами по себе меняются незначительно, но вклад каждой из компонент в общую флуоресценцию существенно изменяется (Рисунок 87). А именно, вклад короткой компоненты существенно увеличивается и к концу эксперимента достигает 1,5:1, в то время как впервые дни после трансплантации этот вклад составлял 13:1.

#### 4.3 Метод внутрисосудистой флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии атеросклеротических бляшек

Исследования проводились на экспериментальных животных (кроликах) с индуцированным атеросклерозом. Для прослеживания динамики развития атеросклероза, исследования проводились ежемесячно: после 2-х, 3-х, 4-х месяцев атерогенного рациона.

Путем выделения бедренной артерии, кролику в аорту вводился диагностический катетер (см. п. 2.6.) (Рисунок 88), и последовательно измерялись спектры флуоресценции от стенок аорты с шагом 1 см. Для остановки кровотока и удаления крови из зоны измерения, баллон на конце катетера надувался физиологическим раствором, после чего уже и измерялся спектр флуоресценции.

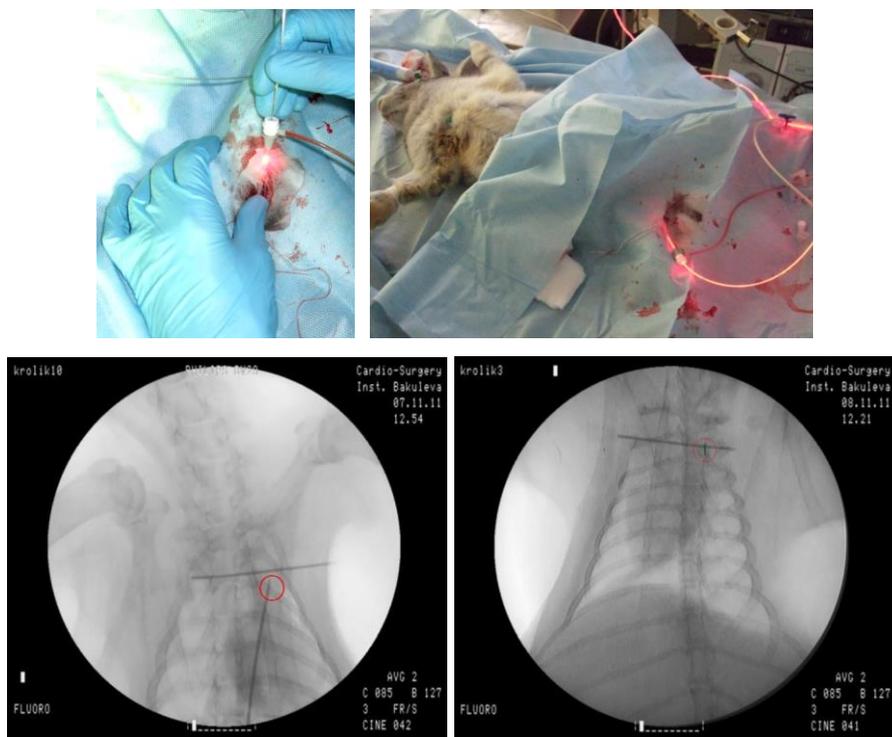


Рисунок 88. (Вверху слева) Введение баллонного катетера в бедренную артерию кролика с индуцированным атеросклерозом *in vivo*. (Вверху справа) облучение аорты кролика *in vivo* с использованием эндоваскулярного баллонного волоконно-оптического катетера. (Внизу) установка катетера в аорте кролика под рентгеноконтролем *in vivo*.

В обоих случаях экспериментальная модель атеросклероза создавалась путем содержания животных на атерогенном рационе в течение 4 месяцев, вследствие чего у них развивался атеросклероз с типичными атеросклеротическими изменениями аорты. Препарат «Фотосенс» вводился внутривенно в дозе 2 мг/кг веса за 24 часа до начала исследования. При таком режиме введения препарата, «Фотосенс» накапливается в бляшках в количестве, достаточном для проведения ФД. Препарат «Аласенс» вводился внутривенно в дозе 60 мг/кг веса за 2 часа до начала исследования. Раствор препарата защелачивался до pH=5,5 путем добавления в раствор гидрокарбоната натрия.

Измерение спектров флуоресценции проводилось при помощи специального эндоваскулярного баллонного волоконно-оптического катетера для ФД (см. п. 2.6), при возбуждении He-Ne лазером на длине волны 632,8 нм или на длине волны 532 нм (Nd:YAG, вторая гармоника). После измерения спектров флуоресценции некоторым кроликам проводилась процедура ФДТ в трех точках с шагом 3 см. По прошествии необходимого времени осуществлялся забой животных и извлечение аорты. Оценку накопления АЛК-индуцированного протопорфирина IX и «Фотосенса» проводили методами флуоресцентной спектроскопии. Измерения проводили на внутренней и внешней стороне удаленной аорты на участках условной нормы и содержащих визуально определяемые бляшки.

Во втором случае извлекали аорту и проводили повторное измерение спектров флуоресценции на удаленном материале с целью сопоставления результатов. Затем удаленную аорту передавали на гистологическое исследование.

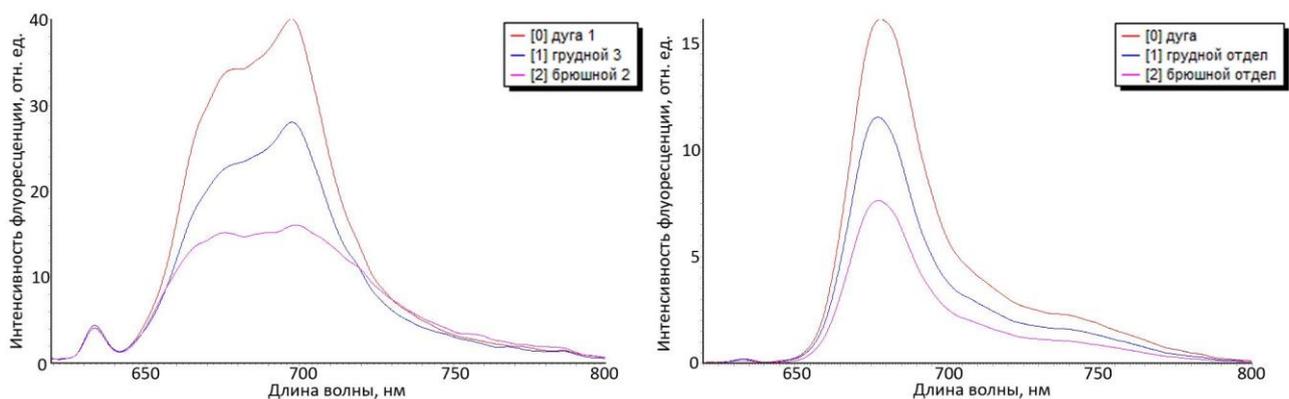


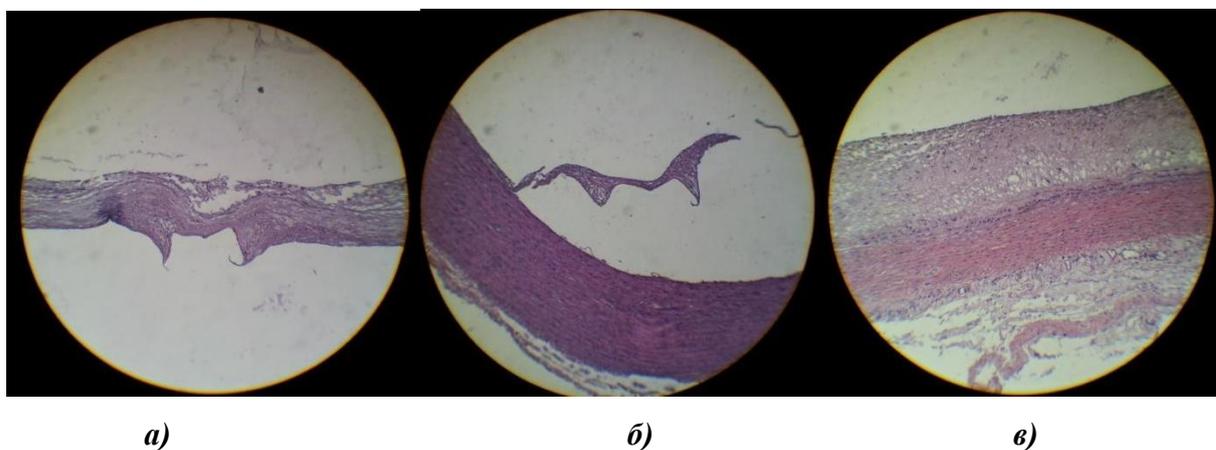
Рисунок 89. (Слева) Спектры флуоресценции дуги, грудной и брюшной части аорты кролика, измеренные через 3 часа после введения Аласенса. (Справа) Спектры флуоресценции дуги, грудной и брюшной части аорты кролика, измеренные через 24 часа после введения Фотосенса. Кролик находился на атерогенном рационе в течении 4 месяцев. Измерения проведены *in vivo* с использованием баллонного катетера. Возбуждение в красном диапазоне спектра. Отмеченная разница в накоплении Фс соответствует различной выраженности патологических процессов в разных участках аорты.

Облучению было подвергнуто 4 животных в соответствии со следующей схемой:

- 3 сеанса облучения: 1-ый через 1 месяц после начала атерогенного питания, 2-ой через 2 месяца, 3-ий через 4 месяца. Через 7 дней после 3-го сеанса облучения животное умерщвлялось, аорта передавалась на гистологические исследования (1 кролик).
- 2 сеанса облучения: 1-ый через 2 месяца после начала атерогенного питания, 2-ой через 4 месяца. Через 7 дней после 2-го сеанса облучения животное умерщвлялось, аорта передавалась на гистологические исследования (1 кролик).
- 1 сеанс облучения: через 4 месяца. Через 7 дней после сеанса облучения животное умерщвлялось, аорта передавалась на гистологические исследования (2 кролика).

Все животные хорошо переносили процедуру облучения. Осложнения, связанные с проведением ФД и ФДТ, не отмечены.

При морфологическом изучении аорт, изъятых у кроликов, находившихся на обычной диете, ни визуально, ни гистологически заметных атеросклеротических изменений сосудистой стенки выявлено не было. У кроликов, находящихся на гиперхолестериновой диете, через 4 месяца гистологическое исследование выявило значительное утолщение интимы, появление бляшек, толщина которых значительно превышает толщину меди, имеются и феномен появления пенных клеток в наружных отделах меди (Рисунок 90а). У кроликов, получивших 3 сеанса ФДТ, замечено значительно меньшее утолщение интимы и отсутствие бляшек (Рисунок 90б).



*Рисунок 90. а) Аорта кролика (неоинтима) в области стента через 4 мес. после начала гиперхолестериновой диеты. б) Аорта кролика в области стента, получавшего ФДТ, через 4 мес. гиперхолестериновой диеты. в) аорта кролика вне стента*

Следовательно, можно сделать вывод о возможности применения ФДТ при стентировании для предотвращения воспалительного процесса.

Таким образом, в ходе исследования разработаны и апробированы в эксперименте на лабораторных животных (кролики с индуцированным атеросклерозом) новые подходы к задаче

малоинвазивной внутрисосудистой флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии атеросклеротических бляшек с использованием препаратов «Фотосенс» и «Аласенс». Был показан селективный характер накопления Фс в атеросклеротически измененных участках сосудов. Анализ спектров флуоресценции «Фотосенса» и АЛК-индуцированного протопорфирина IX выявил четкие различия, как в интенсивности, так и структуре пиков флуоресценции между нормальной и пораженной стенкой кровеносного сосуда (аорты), что показывает принципиальную возможность применения ФД и ФДТ для оптической диагностики и лечения атеросклеротических бляшек.

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.

#### **Заключение по главе 4**

Показана возможность 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.

Разработан 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.

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 позволяют регистрировать и обрабатывать информацию в

цифровом виде с высокой точностью. Спектрально-люминесцентные методы оценки и мониторинга параметров, отвечающих за степень приживления трансплантируемых тканей.

Разработаны методы и инструментарий для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии для диагностики лечения атеросклероза крупных сосудов, а также профилактики 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.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

1. Сформулирована гипотеза наиболее полно отражающая экспериментальные данные, включая рентгеноструктурные, спектрально-флуоресцентные, спектрально-кинетические, устанавливающая природу изменения флуоресцентных свойств кристаллических НЧ-АІРс при взаимодействии с микроокружением, заключающаяся в изменении пространственного расположения поверхностных молекул НЧ и переход их 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 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 фототерапии 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, воспалительных заболеваниях опорно-двигательного аппарата. 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.

## СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Braun A., Tcherniac J. Über die produkte der einwirkung von acetanhydrid auf phthalamid //European Journal of Inorganic Chemistry. – 1907. – Т. 40. – №. 2. – С. 2709-2714.
2. de Diesbach H., von der Weid E. Quelques sels complexes des o-dinitriles avec le cuivre et la pyridine //Helvetica Chimica Acta. – 1927. – Т. 10. – №. 1. – С. 886-888..
3. Moser F. H., Thomas A. L. „The phthalocyanines—manufacture and applications. Vol. II” //CRC, Florida. – 1983.
4. Kaliya O. L., Lukyanets E. A., Vorozhtsov G. N. Catalysis and photocatalysis by phthalocyanines for technology, ecology and medicine //Journal of Porphyrins and Phthalocyanines. – 1999. – Т. 3. – №. 67. – С. 592-610.
5. B Basu B., Satapathy S., Bhatnagar A. K. Merox and related metal phthalocyanine catalyzed oxidation processes //Catalysis Reviews—Science and Engineering. – 1993. – Т. 35. – №. 4. – С. 571-609.
6. Navid A. et al. UV-vis and binding studies of cobalt tetrasulfophthalocyanine–thiolate complexes as intermediates of the Merox process //Journal of Porphyrins and Phthalocyanines. – 1999. – Т. 3. – №. 67. – С. 654-666.
7. Gregory P. Steamrollers, sports cars and security: phthalocyanine progress through the ages //Journal of Porphyrins and Phthalocyanines. – 1999. – Т. 3. – №. 67. – С. 468-476.
8. Gregory P. Industrial applications of phthalocyanines //Journal of Porphyrins and Phthalocyanines. – 2000. – Т. 4. – №. 4. – С. 432-437.
9. Zhou R. et al. Phthalocyanines as sensitive materials for chemical sensors //Applied Organometallic Chemistry. – 1996. – Т. 10. – №. 8. – С. 557-577.
10. Guillaud G., Simon J., Germain J. P. Metallophthalocyanines: Gas sensors, resistors and field effect transistors1 //Coordination Chemistry Reviews. – 1998. – Т. 178. – С. 1433-1484.
11. Claessens C. G. et al. Phthalocyanines and phthalocyanine analogues: the quest for applicable optical properties //Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly. – 2001. – Т. 132. – №. 1. – С. 3-11.
12. R. Jones, A. Krier, K. Davidson. Structure, electrical conductivity and electrochromism in thin films of substituted and unsubstituted lanthanide bisphthalocyanines. // Thin Solid Films, 1997, 298(1-2), P. 228-236.
13. Jones R., Krier A., Davidson K. Structure, electrical conductivity and electrochromism in thin films of substituted and unsubstituted lanthanide bisphthalocyanines //Thin Solid Films. – 1997. – Т. 298. – №. 1-2. – С. 228-236.
14. Davidson K., Jones R., McDonald S. Controlled orientation of Langmuir-Blodgett films of substituted phthalocyanines //Synthetic metals. – 2001. – Т. 121. – №. 1-3. – С. 1399-1400.
15. Guillaud G., Simon J., Germain J. P. Metallophthalocyanines: Gas sensors, resistors and field effect transistors1 //Coordination Chemistry Reviews. – 1998. – Т. 178. – С. 1433-1484.
16. Bonnett R. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy //Chemical Society Reviews. – 1995. – Т. 24. – №. 1. – С. 19-33.
17. Ali H. et al. Biological activities of phthalocyanines-x. Syntheses and analyses of sulfonated phthalocyanines //Photochemistry and photobiology. – 1988. – Т. 47. – №. 5. – С. 713-717.
18. L’Her M., Pondaven A. Phthalocyanines: spectroscopic and electrochemical characterization //The Porphyrin Handbook. – 2003. – Т. 16. – С. 117-170.

19. H. Ohtani, T. Kobayashi, T. Ohno, S. Kato, T. Tanno, A. Yamada. Nanosecond spectroscopy on the mechanism of the reduction of methylviologen sensitized by metallophthalocyanine. // *J. Phys. Chem.* 1984, 88, P. 4431.
20. Ohtani H. et al. Nanosecond spectroscopy on the mechanism of the reduction of methylviologen sensitized by metallophthalocyanine // *The Journal of Physical Chemistry.* – 1984. – T. 88. – №. 19. – C. 4431-4435.
21. D.S Lawrence, D.G. Whitten. Photochemistry and Photophysical Properties of Novel, Unsymmetrically Substituted Metallophthalocyanines. // *Photochemistry and Photobiology*, 1996, 64, P. 923-935.
22. Ishii K. et al. Time-resolved EPR, fluorescence, and transient absorption studies on phthalocyaninatosilicon covalently linked to one or two tempo radicals // *Journal of the American Chemical Society.* – 2001. – T. 123. – №. 4. – C. 702-708.
23. Zhang X. F., Xu H. J. Influence of halogenation and aggregation on photosensitizing properties of zinc phthalocyanine (ZnPC) // *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions.* – 1993. – T. 89. – №. 18. – C. 3347-3351.
24. Knör G. Synthesis and Solution Spectral Properties of Antimony (III) Phthalocyanine and Dihydroxoantimony (V) Phthalocyanine Complexes // *Inorganic Chemistry.* – 1996. – T. 35. – №. 26. – C. 7916-7918.
25. Pelliccioli A. P. et al. Synthesis and excited state dynamics of  $\mu$ -oxo group IV metal phthalocyanine dimers: a laser photoexcitation study // *The Journal of Physical Chemistry A.* – 2001. – T. 105. – №. 10. – C. 1757-1766.
26. Vincett P. S., Voigt E. M., Rieckhoff K. E. Phosphorescence and fluorescence of phthalocyanines // *The Journal of Chemical Physics.* – 1971. – T. 55. – №. 8. – C. 4131-4140.
27. Howe L., Zhang J. Z. Ultrafast studies of excited-state dynamics of phthalocyanine and zinc phthalocyanine tetrasulfonate in solution // *The Journal of Physical Chemistry A.* – 1997. – T. 101. – №. 18. – C. 3207-3213.
28. Beeby A. et al. The effect of solvent deuteration on the photophysics of sulphonated aluminium phthalocyanine // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* – 1992. – T. 16. – №. 1. – C. 73-81.
29. Bishop S. M. et al. The preparation and photophysical measurements of perdeutero zinc phthalocyanine // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry.* – 1995. – T. 90. – №. 1. – C. 39-44.
30. Gouterman M., Holten D., Lieberman E. Porphyrins XXXV. Exciton coupling in  $\mu$ -oxo Scandium dimers // *Chemical Physics.* – 1977. – T. 25. – №. 1. – C. 139-153.
31. G.L. Sylvain, W.E. Thomas. Photophysics of lithium phthalocyanines and their radicals. // *The Journal of Physical Chemistry*, 1993, 97(14), P. 3551-3554. Gilat S. L., Ebbesen T. W. Photophysics of lithium phthalocyanines and their radicals // *The Journal of Physical Chemistry.* – 1993. – T. 97. – №. 14. – C. 3551-3554.
32. Von Tappeiner H. Uber die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O // *Raab Muench Med Wochenschr.* – 1900. – T. 47. – №. 5..
33. Krasnovsky A. A. Primary mechanisms of photoactivation of molecular oxygen. History of development and the modern status of research // *Biochemistry (Moscow).* – 2007. – T. 72. – №. 10. – C. 1065-1080.

34. Красновский А. А. Фотодинамическая регуляция биологических процессов: первичные механизмы //Проблемы регуляции в биологических системах/Под общей ред. АБ Рубина.– М.-Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика. – 2006. – С. 223-254.
35. Castano A. P., Demidova T. N., Hamblin M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization //Photodiagnosis and photodynamic therapy. – 2004. – Т. 1. – №. 4. – С. 279-293.
36. Kimel S. et al. Singlet oxygen generation of porphyrins, chlorins, and phthalocyanines //Photochemistry and photobiology. – 1989. – Т. 50. – №. 2. – С. 175-183.
37. DeRosa M. C., Crutchley R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications //Coordination Chemistry Reviews. – 2002. – Т. 233. – С. 351-371.
38. Clennan E. L. New mechanistic and synthetic aspects of singlet oxygen chemistry //Tetrahedron. – 2000. – Т. 56. – №. 47. – С. 9151-9179.
39. Ryabova A. V., Strattonnikov A. A., Loshchenov V. B. Laser spectroscopy technique for estimating the efficiency of photosensitizers in biological media //Quantum Electronics. – 2006. – Т. 36. – №. 6. – С. 562.
40. B.R. Kaafarani. Discotic liquid crystals for opto-electronic applications. // Chemistry of Materials, 2010, 23(3), P. 378-396. Kaafarani B. R. Discotic liquid crystals for opto-electronic applications //Chemistry of Materials. – 2010. – Т. 23. – №. 3. – С. 378-396.
41. Dougherty T. J. et al. Photodynamic therapy //JNCI: Journal of the National Cancer Institute. – 1998. – Т. 90. – №. 12. – С. 889-905.
42. Allison R. R., Mota H. C., Sibata C. H. Clinical PD/PDT in North America: an historical review //Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2004. – Т. 1. – №. 4. – С. 263-277.
43. Allison R. R. et al. Photosensitizers in clinical PDT //Photodiagnosis and photodynamic therapy. – 2004. – Т. 1. – №. 1. – С. 27-42.
44. Leanne B J. et al. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitizers //Metal-based drugs. – 2008. – Т. 2008.
45. Macdonald I. J., Dougherty T. J. Basic principles of photodynamic therapy //Journal of Porphyrins and Phthalocyanines. – 2001. – Т. 5. – №. 02. – С. 105-129.
46. Rück A., Steiner R. Basic reaction mechanisms of hydrophilic and lipophilic photosensitizers in photodynamic tumour treatment //Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies. – 1998. – Т. 7. – №. 6. – С. 503-509.
47. Konan Y. N., Gurny R., Allemann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy //Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2002. – Т. 66. – №. 2. – С. 89-106. Lim C. K. et al. Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of cancer. //Cancer letters. 2013, 334(2), P. 176-187.
48. Patito I. A., Rothmann C., Malik Z. Nuclear transport of photosensitizers during photosensitization and oxidative stress //Biology of the Cell. – 2001. – Т. 93. – №. 5. – С. 285-291.
49. Dummin H., Cernay T., Zimmermann H. W. Selective photosensitization of mitochondria in HeLa cells by cationic Zn (II) phthalocyanines with lipophilic side-chains //Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 1997. – Т. 37. – №. 3. – С. 219-229.
50. Malatesti N. et al. Synthesis and in vitro investigation of cationic 5, 15-diphenyl porphyrin-monoantibody conjugates as targeted photodynamic sensitizers //International journal of oncology. – 2006. – Т. 28. – №. 6. – С. 1561-1569.

51. Staneloudi C. et al. Development and characterization of novel photosensitizer: scFv conjugates for use in photodynamic therapy of cancer //Immunology. – 2007. – T. 120. – №. 4. – C. 512-517.
52. Prasad P. N. Polymer science and technology for new generation photonics and biophotonics //Current Opinion in Solid State and Materials Science. – 2004. – T. 8. – №. 1. – C. 11-19.
53. Jain K. K. Recent advances in nanooncology //Technology in cancer research & treatment. – 2008. – T. 7. – №. 1. – C. 1-13.
54. Allison R. R. et al. Bio-nanotechnology and photodynamic therapy—state of the art review //Photodiagnosis and photodynamic therapy. – 2008. – T. 5. – №. 1. – C. 19-28.
55. Oddos-Marcel L. et al. Electronic states and relaxation dynamics of silicon phthalocyanine dimers //The Journal of Physical Chemistry. – 1996. – T. 100. – №. 29. – C. 11850-11856.
56. Pelliccioli A. P. et al. Synthesis and excited state dynamics of  $\mu$ -oxo group IV metal phthalocyanine dimers: a laser photoexcitation study //The Journal of Physical Chemistry A. – 2001. – T. 105. – №. 10. – C. 1757-1766.
57. Germain A., Ebbesen T. W. Picosecond photophysics of lutetium bis-phthalocyanines //Chemical physics letters. – 1992. – T. 199. – №. 6. – C. 585-589.
58. Ern J. et al. Femtosecond study of exciton transport dynamics in (phthalocyaninato) polysiloxane //The Journal of Physical Chemistry A. – 1999. – T. 103. – №. 14. – C. 2446-2450.
59. Markovitsi D. et al. Laser induced triplet excitons in the columnar phases of an octasubstituted metal free phthalocyanine //Journal of the American Chemical Society. – 1988. – T. 110. – №. 6. – C. 2001-2002.
60. Markovitsi D., Lécuyer I. Laser-induced triplet excitons in the columnar phases of an octasubstituted zinc phthalocyanine //Chemical physics letters. – 1988. – T. 149. – №. 3. – C. 330-333.
61. Markovitsi D., Lecuyer I., Simon J. One-dimensional triplet energy migration in columnar liquid crystals of octasubstituted phthalocyanines. // The Journal of Physical Chemistry. 1991, 95(9), P. 3620-3626.
62. Markovitsi D., Lecuyer I., Simon J. One-dimensional triplet energy migration in columnar liquid crystals of octasubstituted phthalocyanines //The Journal of Physical Chemistry. – 1991. – T. 95. – №. 9. – C. 3620-3626.
63. Orti E., Bredas J. L. Theoretical approach to the electronic structure of phthalocyanine: From the molecule to the crystal //Synthetic Metals. – 1989. – T. 29. – №. 2-3. – C. 115-122.
64. Homborg H. et al. Lithiumphthalocyanine: Darstellung und Charakterisierung der monoklinen und tetragonalen Modifikationen von LiPc (1-) und der Halogenaddukte LiPc (1-) X (X= Cl, Br, I) //Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie. – 1985. – T. 527. – №. 8. – C. 45-61.
65. Peumans P., Uchida S., Forrest S. R. Efficient bulk heterojunction photovoltaic cells using small-molecular-weight organic thin films //Nature. – 2003. – T. 425. – №. 6954. – C. 158.
66. Horowitz G. et al. Organic field-effect transistors //Advanced materials. – 1998. – T. 10. – №. 5. – C. 365-377.
67. Shirk J. S. et al. Effect of axial substitution on the optical limiting properties of indium phthalocyanines //The Journal of Physical Chemistry A. – 2000. – T. 104. – №. 7. – C. 1438-1449.
68. Huang Q. et al. Covalently bound hole-injecting nanostructures. Systematics of molecular architecture, thickness, saturation, and electron-blocking characteristics on organic light-emitting

- diode luminance, turn-on voltage, and quantum efficiency //Journal of the American Chemical Society. – 2005. – T. 127. – №. 29. – C. 10227-10242.
69. He J. et al. Modified phthalocyanines for efficient near-IR sensitization of nanostructured TiO<sub>2</sub> electrode //Journal of the American Chemical Society. – 2002. – T. 124. – №. 17. – C. 4922-4932.
  70. Ishikawa N. et al. Lanthanide double-decker complexes functioning as magnets at the single-molecular level //Journal of the American Chemical Society. – 2003. – T. 125. – №. 29. – C. 8694-8695.
  71. De La Torre G. et al. Role of structural factors in the nonlinear optical properties of phthalocyanines and related compounds //Chemical Reviews. – 2004. – T. 104. – №. 9. – C. 3723-3750.
  72. Sorokin A. B. Phthalocyanine metal complexes in catalysis //Chemical reviews. – 2013. – T. 113. – №. 10. – C. 8152-8191.
  73. Capobianchi A. et al. Electrochromism in sandwich-type diphtalocyanines: electrochemical and spectroscopic behaviour of bis (phthalocyaninato) titanium (IV)(Ti (Pc) 2) film //Synthetic metals. – 1995. – T. 75. – №. 1. – C. 37-42.
  74. Rella R. et al. Applications in gas-sensing devices of a new macrocyclic copper complex //Sensors and Actuators B: Chemical. – 1997. – T. 42. – №. 1. – C. 53-58.
  75. Law K. Y. Organic photoconductive materials: recent trends and developments //Chemical Reviews. – 1993. – T. 93. – №. 1. – C. 449-486.
  76. Dini D., Barthel M., Hanack M. Phthalocyanines as active materials for optical limiting //European Journal of Organic Chemistry. – 2001. – T. 2001. – №. 20. – C. 3759-3769.
  77. Gilmartin M. A. T. et al. Voltammetric and photoelectron spectral elucidation of the electrocatalytic oxidation of hydrogen peroxide at screen-printed carbon electrodes chemically modified with cobalt phthalocyanine //Electroanalysis. – 1995. – T. 7. – №. 6. – C. 547-555.
  78. Mansuripur M. et al. Static tester for characterization of phase-change, dye-polymer, and magneto-optical media for optical data storage //Applied optics. – 1999. – T. 38. – №. 34. – C. 7095-7104.
  79. Vasseur K. et al. Structural evolution of evaporated lead phthalocyanine thin films for near-infrared sensitive solar cells //Chemistry of Materials. – 2010. – T. 23. – №. 3. – C. 886-895.
  80. Sibata M. N., Tedesco A. C., Marchetti J. M. Photophysicals and photochemicals studies of zinc (II) phthalocyanine in long time circulation micelles for photodynamic therapy use //European journal of pharmaceutical sciences. – 2004. – T. 23. – №. 2. – C. 131-138.
  81. Mondal D., Bera S. Porphyrins and phthalocyanines: promising molecules for light-triggered antibacterial nanoparticles //Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology. – 2014. – T. 5. – №. 3. – C. 033002.
  82. Saka E. T. et al. Photophysical, photochemical and aggregation behavior of novel peripherally tetra-substituted phthalocyanine derivatives //Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. – 2012. – T. 241. – C. 67-78.
  83. Bench B. A. et al. Introduction of bulky perfluoroalkyl groups at the periphery of zinc perfluorophthalocyanine: chemical, structural, electronic, and preliminary photophysical and biological effects //Angewandte Chemie. – 2002. – T. 114. – №. 5. – C. 773-776.
  84. Usuda J. et al. Domain-dependent photodamage to Bcl-2 A membrane anchorage region is needed to form the target of phthalocyanine photosensitization //Journal of Biological Chemistry. – 2003. – T. 278. – №. 3. – C. 2021-2029.

85. Liu J. Y. et al. Synthesis, characterization, and in vitro photodynamic activity of novel amphiphilic zinc (II) phthalocyanines bearing oxyethylene-rich substituents //Metal-based drugs. – 2008. – T. 2008.
86. Dumoulin F. et al. Synthetic pathways to water-soluble phthalocyanines and close analogs //Coordination Chemistry Reviews. – 2010. – T. 254. – №. 23-24. – C. 2792-2847.
87. Lucky S. S., Soo K. C., Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy //Chemical Reviews. – 2015. – T. 115. – №. 4. – C. 1990-2042.
88. Srivatsan A. et al. Porphyrin-based photosensitizers and the corresponding multifunctional nanoplatfoms for cancer-imaging and phototherapy //Journal of Porphyrins and Phthalocyanines. – 2015. – T. 19. – №. 01n03. – C. 109-134.
89. Lim C. K. et al. Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of cancer //Cancer letters. – 2013. – T. 334. – №. 2. – C. 176-187.
90. Mehraban N., Freeman H. S. Developments in PDT sensitizers for increased selectivity and singlet oxygen production //Materials. – 2015. – T. 8. – №. 7. – C. 4421-4456.
91. Maeda H., Nakamura H., Fang J. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo //Advanced drug delivery reviews. – 2013. – T. 65. – №. 1. – C. 71-79.
92. Saka E. T. et al. Photophysical, photochemical and aggregation behavior of novel peripherally tetra-substituted phthalocyanine derivatives //Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. – 2012. – T. 241. – C. 67-78.
93. O'Connor A. E., Gallagher W. M., Byrne A. T. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy //Photochemistry and photobiology. – 2009. – T. 85. – №. 5. – C. 1053-1074.
94. Ribeiro A. P. D. et al. Antimicrobial photodynamic therapy against pathogenic bacterial suspensions and biofilms using chloro-aluminum phthalocyanine encapsulated in nanoemulsions //Lasers in medical science. – 2015. – T. 30. – №. 2. – C. 549-559.
95. Muehlmann L. A. et al. Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells //Journal of nanobiotechnology. – 2015. – T. 13. – №. 1. – C. 36.
96. de Paula L. B. et al. Combination of hyperthermia and photodynamic therapy on mesenchymal stem cell line treated with chloroaluminum phthalocyanine magnetic-nanoemulsion //Journal of Magnetism and Magnetic Materials. – 2015. – T. 380. – C. 372-376.
97. Rocha M. S. T. et al. Aluminum-chloride-phthalocyanine encapsulated in liposomes: activity against naturally occurring dog breast cancer cells //Journal of biomedical nanotechnology. – 2012. – T. 8. – №. 2. – C. 251-257.
98. St Denis T. G., Hamblin M. R. Synthesis, bioanalysis and biodistribution of photosensitizer conjugates for photodynamic therapy //Bioanalysis. – 2013. – T. 5. – №. 9. – C. 1099-1114.
99. Vilsinski B. H. et al. Formulation of Aluminum Chloride Phthalocyanine in Pluronic™ P-123 and F-127 Block Copolymer Micelles: Photophysical properties and Photodynamic Inactivation of Microorganisms //Photochemistry and photobiology. – 2015. – T. 91. – №. 3. – C. 518-525.
100. Muehlmann L. A. et al. Aluminum-phthalocyanine chloride associated to poly (methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy //International journal of nanomedicine. – 2014. – T. 9. – C. 1199.

101. Wang J. et al. Aluminum phthalocyanine and gold nanorod conjugates: The combination of photodynamic therapy and photothermal therapy to kill cancer cells // *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*. – 2012. – Т. 16. – №. 07n08. – С. 802-808.
102. Pan X. et al. Enhancement of the photokilling effect of aluminum phthalocyanine in photodynamic therapy by conjugating with nitrogen-doped TiO<sub>2</sub> nanoparticles // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2015. – Т. 130. – С. 292-298.
103. Taratula O. et al. Dendrimer-encapsulated naphthalocyanine as a single agent-based theranostic nanoplatform for near-infrared fluorescence imaging and combinatorial anticancer phototherapy // *Nanoscale*. – 2015. – Т. 7. – №. 9. – С. 3888-3902.
104. Breymayer J. et al. Fluorescence investigation of the detachment of aluminum phthalocyanine molecules from aluminum phthalocyanine nanoparticles in monocytes/macrophages and skin cells and their localization in monocytes/macrophages // *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. – 2014. – Т. 11. – №. 3. – С. 380-390.
105. Sekkat N. et al. Like a bolt from the blue: phthalocyanines in biomedical optics // *Molecules*. – 2011. – Т. 17. – №. 1. – С. 98-144.
106. Chang K. Y., Lee Y. D. Ring-opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone initiated by the antitumor agent doxifluridine // *Acta biomaterialia*. – 2009. – Т. 5. – №. 4. – С. 1075-1081.
107. Allen T. M., Cullis P. R. Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications // *Advanced drug delivery reviews*. – 2013. – Т. 65. – №. 1. – С. 36-48.
108. Calori I. R., Tedesco A. C. Lipid vesicles loading aluminum phthalocyanine chloride: formulation properties and disaggregation upon intracellular delivery // *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. – 2016. – Т. 160. – С. 240-247.
109. Asem H. et al. Development and biodistribution of a theranostic aluminum phthalocyanine nanophotosensitizer // *Photodiagnosis and photodynamic therapy*. – 2016. – Т. 13. – С. 48-57.
110. de Paula C. S. et al. Chloroaluminium phthalocyanine polymeric nanoparticles as photosensitisers: photophysical and physicochemical characterisation, release and phototoxicity in vitro // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2013. – Т. 49. – №. 3. – С. 371-381.
111. Bian Y., Jiang J. Recent Advances in Phthalocyanine-Based Functional Molecular Materials // *50 Years of Structure and Bonding—The Anniversary Volume*. – Springer, Cham, 2015. – С. 159-199.
112. Патент РФ № 1506357, 10.09.1987. Способ определения уровня оксигенации слизистой оболочки органа // Патент России № 2122745. 1987. / Кузин М.И. Заводнов В.Я. Кораблин С.Н., Лощенов В.Б.
113. Патент РФ № 2185103, 29.03.2000. Способ определения фотодинамической активности in vitro // Патент России № 2185103. 2000. / Лощенов В.Б., Харнас С.С., Прохоров А.М., Меерович Г.А., Гладских О.П., Пальцев М.А., Стратонников А.А.
114. Стратонников А. А. и др. Использование спектроскопии обратного диффузного отражения света для мониторинга состояния тканей при фотодинамической терапии // *Квантовая электроника*. – 2006. – Т. 36. – №. 12. – С. 1103-1110.
115. Ю. Е. Ефремова, Г. Н. Соболева, Е. Р. Андреева, Ю. А. Карпов, Э. М. Тарарак. Фотодинамическая терапия при сердечно-сосудистой патологии // *Атмосфера. Новости кардиологии*. – 2010. – №2-3. – С. 15-18.
116. Лукьянец Е. А. Новые сенсibilizаторы для фотодинамической терапии // *Российский химический журнал*. – 1998. – Т. 42. – №. 5. – С. 9-16.

117. Рябова А. В., Стратонников А. А., Лощенов В. Б. Лазерно-спектроскопический метод оценки эффективности фотосенсибилизаторов в биологических средах //Квантовая электроника. – 2006. – Т. 36. – №. 6. – С. 562-568.
118. Vladojevic M. et al. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis //Osteoarthritis and cartilage. – 2010. – Т. 18. – №. 1. – С. 24-33.
119. Hill C. L. et al. Knee effusions, popliteal cysts, and synovial thickening: association with knee pain in osteoarthritis //The Journal of rheumatology. – 2001. – Т. 28. – №. 6. – С. 1330-1337.
120. Fransen M., McCONNELL S. Land-based exercise for osteoarthritis of the knee: a metaanalysis of randomized controlled trials //The Journal of rheumatology. – 2009. – Т. 36. – №. 6. – С. 1109-1117.
121. Guccione A. A. et al. The effects of specific medical conditions on the functional limitations of elders in the Framingham Study //American journal of public health. – 1994. – Т. 84. – №. 3. – С. 351-358.
122. Boesen M. et al. Osteoarthritis year in review 2016: imaging //Osteoarthritis and cartilage. – 2017. – Т. 25. – №. 2. – С. 216-226.
123. Cicuttini F. M., Wluka A. E. Osteoarthritis: is OA a mechanical or systemic disease? //Nature Reviews Rheumatology. – 2014. – Т. 10. – №. 9. – С. 515.
124. Favero M. et al. Early knee osteoarthritis //RMD open. – 2015. – Т. 1. – №. Suppl 1. – С. e000062.
125. Bannuru R. R. et al. Therapeutic trajectory of hyaluronic acid versus corticosteroids in the treatment of knee osteoarthritis: A systematic review and meta-analysis //Arthritis Care & Research. – 2009. – Т. 61. – №. 12. – С. 1704-1711.
126. American Academy of Orthopaedic Surgeons 2016. URL: <http://www.aaos.org/CustomTemplates/Content.aspx?id=6396&ssopc=1>, 2016 (accessed 28.04.2016).
127. American College of Rheumatology Arthritis Care & Research. URL: <http://www.rheumatology.org/Practice-Quality/Clinical-Support/Clinical-Practice-Guidelines/Osteoarthritis>, 2016 (accessed 28.04.2016).
128. The European League Against Rheumatism (EULAR). URL: [http://www.eular.org/recommendations\\_management.cfm](http://www.eular.org/recommendations_management.cfm), 2016 (accessed 28.04.2016).
129. McAlindon T. E. et al. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis //Osteoarthritis and cartilage. – 2014. – Т. 22. – №. 3. – С. 363-388.
130. Wade G. J. Rethinking the model of osteoarthritis: a clinical viewpoint //The Journal of the American Osteopathic Association. – 2011. – Т. 111. – №. 11. – С. 631-637.
131. Abrahamsen B., Grove E. L., Vestergaard P. Nationwide registry-based analysis of cardiovascular risk factors and adverse outcomes in patients treated with strontium ranelate //Osteoporosis International. – 2014. – Т. 25. – №. 2. – С. 757-762.
132. Hendrich C. et al. Experimental photodynamic laser therapy for rheumatoid arthritis with a second generation photosensitizer //Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy. – 2000. – Т. 8. – №. 3. – С. 190-194.
133. Beischer A. D. et al. Synovial ablation in a rabbit rheumatoid arthritis model using photodynamic therapy //ANZ journal of surgery. – 2002. – Т. 72. – №. 7. – С. 517-522.
134. Zharova T. A. et al. Gonarthritits photodynamic therapy with chlorin e6 derivatives //Photodiagnosis and photodynamic therapy. – 2016. – Т. 15. – С. 88-93.

135. Васильченко С.Ю., Волкова А.И., Коровин С.Б., Лощенов В.Б., Синяева М.Л., Мамедов Ад.А., Лукьянец Е.А., Кузьмин С.Г. Рос. биотерапевтический ж., 2006, т. 5, № 2.
136. Butler K. S. et al. Development of antibody-tagged nanoparticles for detection of transplant rejection using biomagnetic sensors //Cell transplantation. – 2013. – Т. 22. – №. 10. – С. 1943-1954.
137. Dillman J. R. et al. Imaging of pancreas transplants: postoperative findings with clinical correlation //Journal of computer assisted tomography. – 2009. – Т. 33. – №. 4. – С. 609-617.
138. Galante N. Z. et al. Acute rejection is a risk factor for long-term survival in a single-center analysis of 1544 renal transplants //Transplantation proceedings. – Elsevier, 2002. – Т. 34. – №. 2. – С. 508-513.
139. Gwinner W. Renal transplant rejection markers //World journal of urology. – 2007. – Т. 25. – №. 5. – С. 445.
140. Рябова А.В. Рябова А.В. Комбинированный спектроскопический метод анализа эффективности сенсбилизаторов в биологических объектах: дисс. канд. физ.-мат. наук. ИОФ РАН, Москваб 2006.
141. Kholodtsova M. N. et al. Scattered and fluorescent photon track reconstruction in a biological tissue //International Journal of Photoenergy. – 2014. – Т. 2014.
142. Antunes E. et al. The synthesis and characterisation of magnetic nanoparticles and their interaction with a zinc phthalocyanine //Inorganic Chemistry Communications. – 2013. – Т. 29. – С. 60-64.
143. Wang Wang L., Jacques S. L. Hybrid model of Monte Carlo simulation and diffusion theory for light reflectance by turbid media //JOSA A. – 1993. – Т. 10. – №. 8. – С. 1746-1752.