

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

На правах рукописи



Маклыгина Юлия Сергеевна

**Разработка спектрально-флуоресцентных методов диагностики и терапии
глубокозалегающих опухолей мозга**

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 – 2019

Оглавление

Оглавление	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
Актуальность диссертационной работы	6
Цель и задачи исследований	10
Научная новизна	11
Практическая значимость работы	11
Положения, выносимые на защиту	12
Достоверность результатов	13
Апробация работы	13
Гранты	16
Благодарности	16
Структура и объем диссертации	17
ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	18
1.1. Канцерогенез опухолей головного мозга	18
1.2. Оптические свойства биологических тканей и тканей мозга	19
1.3. Актуальные методы диагностики и терапии патологий мозга	23
Заключение к главе	25
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	26
2.1 Методы флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии	26
2.2. Исследования накопления фотосенсибилизаторов <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	30
2.3. Исследования фотосенсибилизаторов с разрешением по времени <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	39
2.4. Магнитно-резонансная томография	41

2.5. Позитрон-эмиссионная томография	44
Заключение ко второй главе	46
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА НЕЙРОСИСТЕМЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ И ПРОФИЛАКТИКИ ГЛУБОКОЗАЛЕГАЮЩИХ ОПУХОЛЕЙ МОЗГА	47
3.1. Разработка и результаты экспериментальных исследований внешнего каркаса нейропорта	47
3.2. Разработка и результаты исследования спектрально-флуоресцентных свойств внутренней волоконной части нейропорта	51
3.3. Многосторонний анализ тканей мозга	52
Заключение к третьей главе	68
ГЛАВА 4. СПЕКТРАЛЬНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ ТКАНЕЙ МОЗГА С РАЗРЕШЕНИЕМ ПО ВРЕМЕНИ	69
4.1. Зависимость спектрально-флуоресцентных свойств биологических тканей от их биохимических особенностей	69
4.2. Зависимость спектрально-флуоресцентных характеристик фотосенсибилизаторов при взаимодействии с клетками различного фенотипа	73
Заключение к четвертой главе	77
ГЛАВА 5. НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ПОВЫШЕНИЮ ГЛУБИНЫ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ГЛУБОКОЗАЛЕГАЮЩИЕ И МЕТАСТАТИЧЕСКИЕ ОЧАГИ ОПУХОЛЕЙ МОЗГА	78
5.1. Результаты исследования спектрально-флуоресцентных свойств фотосенсибилизаторов в нано-форме	78
5.2. Результаты исследования спектрально-флуоресцентных свойств фотосенсибилизаторов дальнего красного и ближнего инфракрасного спектральных диапазонов	85
5.3. Новый подход возбуждения фотосенсибилизатора излучением Вавилова-Черенкова. Расчет радиуса действия	93

5.4. Результаты исследования эффективности возбуждения фотосенсибилизаторов внутриклеточным источником – излучением Вавилова-Черенкова	98
Заключение к пятой главе	105
ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ	107
СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	109
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	111

1. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

2PE – двухфотонное возбуждение (2 photon excitation)

AlPc – фталоцианин алюминия

nAlPc – наночастицы фталоцианина алюминия

Bch – бактериохлорин

nBch – наночастицы бактериохлорина

LSM – лазерная сканирующая микроскопия (Laser Scanning Microscopy)

NDD – неконфокальный детектор (non-descanned detector)

TAM – опухоль-ассоциированные макрофаги (Tumor-associated macrophages) THP-1 – культура клеток моноцитов человека

FLIM – флуоресцентная время-разрешенная микроскопия (fluorescence lifetime imaging)

БИК – ближний инфракрасный

ВЧ –Вавилова-Черенкова (излучение)

Глиома С6 – культура клеток опухоли мозга крысы

ДК – дальний красный

МРТ – магниторезонансная томография

ПЭТ – позитрон-эмиссионная томография

ФД – флуоресцентная диагностика

ФДТ – фотодинамическая терапия

ФС – фотосенсибилизатор

ЦНС – центральная нервная система

2. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность диссертационной работы

По данным Всемирной Организации Здравоохранения смертность от опухолей мозга составляет около 3% от общей смертности по причине злокачественных новообразований. Статистика нейроонкологических заболеваний свидетельствует о наибольшей распространенности низкодифференцированных глиом (40-45%). Наиболее агрессивная из них характеризуется быстрым неконтролируемым ростом, высокой степенью инвазии и частотой рецидивирования, а также отсутствием четких диагностических критериев динамики патологического процесса. Особенности протекания опухолевого процесса данного генеза обуславливают среднюю выживаемость пациентов, которая составляет около года с момента постановки диагноза. В настоящее время общим принципом лечения больных с глиальными опухолями головного мозга является комплексный подход, включающий хирургическое лечение, лучевую и химиотерапию. Другие методы, включая иммунокорректирующую терапию и разрабатываемую в некоторых клиниках специфическую противоопухолевую иммунотерапию, не являются стандартом и находятся на стадии клинических исследований. Несмотря на совершенствование методик хирургического вмешательства и повышение технической оснащенности клинических подразделений, выполняющих послеоперационные лучевую и химиотерапию, значимого улучшения результатов комбинированного лечения злокачественных глиом не наблюдается. Медиана выживания пациентов с мультиформной глиобластомой не преодолевает порог в 14 мес. Высокая летальность обусловлена множеством факторов, одним из которых является глубокая инвазивность мультиформной глиобластомы. В связи с характерным инфильтративным ростом данного типа опухоли, ключевым недостатком хирургического вмешательства является отсутствие возможности тотального удаления глубоко залегающих опухолей (ГЗО), что является одной из основных причин рецидивирования заболевания. Стоит отметить, что в настоящее время существуют имплантаты, которые устанавливаются в ложе опухоли после ее резекции

[1]. Данный вид терапии основан на пролонгированном действии химиотерапевтического препарата, который постепенно высвобождается из имплантата и, воздействуя на оставшиеся после хирургического вмешательства опухолевые клетки, препятствует рецидивированию. Такой вид терапии опухолей головного мозга является максимально эффективным из ныне существующих [1], однако некоторые типы глиом являются устойчивыми к химио- и радиотерапии, что не позволяет данному методу быть универсальным. Злокачественные глиомы головного мозга известны тем, что вторгаются и распространяются вдоль каналов белого вещества и кровеносных сосудов. Особую сложность представляет определение границ первичных внутримозговых опухолей, что обусловлено особенностями их инфильтративного роста вдоль нервных волокон и сосудов. Недавние исследования группы американских ученых показали, что клетки глиомы С6 массово мигрируют направленно вдоль полимерных нановолокон, покрытых питательной средой [2]. Кроме того, ученым удалось значительно снизить внутричерепной объем опухоли за счет имплантации волоконных структур внутрь черепной коробки и внешнего воздействия химиопрепарата на основе циклоаминового геля. На основании полученных данных представляется перспективным создание таких условий, когда резидуальные клетки опухоли будут пролиферировать в заданном направлении. В качестве системы, задающей направление роста опухоли, перспективно использование оптических волокон, структурно имитирующих каналы белого вещества и кровеносные сосуды. Осуществление контроля роста опухоли и, при необходимости, деструктивного воздействия на патологические ткани представляется наиболее эффективным за счет оптоволоконной внутренней структуры имплантата. Методы лазерной спектроскопии для анализа состояния и функций тканей мозга в области имплантации обладают такими преимуществами, как высокая скорость обработки информации и возможность оценки широкого спектра физиологических и морфологических параметров. Они позволяют установить однозначное соответствие быстрых функциональных изменений в тканях и регистрируемых спектров поглощения, флуоресценции или обратного диффузного рассеяния. Форма и интенсивность регистрируемых спектров обусловлены как веществами, изначально присущими

нервным тканям и клеткам, так и контрастирующими маркерами, вводимыми извне, что позволяет выявить глубокие метаболические и структурные перестройки, имеющие место при развитии патологий мозга [3].

Наиболее широко используемыми для анализа состояния тканей мозга эндогенными флуорофорами являются коферменты никотинамидадениндинуклеатид (окисленная, НАД⁺, NAD⁺ и восстановленная НАДН, NADH формы) и флавинадениндинуклеотид (ФАД, FAD) [4]. Кофермент NAD⁺ (NADH) — клеточный мембранно-связанный мультимолекулярный ферментный комплекс, локализующийся на плазматической мембране и в некоторых органеллах, задействован главным образом в окислительно-восстановительных реакциях. Особенно обогащены этим ферментом опухолевые клетки, что связано с повышенным уровнем гликолиза. В свою очередь фагоцитарные клетки, такие как макрофаги, обогащены FAD — коферментом, также принимающим участие в окислительно-восстановительных биохимических процессах. Уже доказана способность макрофагов изменять свой фенотип в зависимости от микроокружения и, тем самым, влиять на развитие опухолевого процесса, что делает решение задачи распознавания клеток в строме опухоли по фенотипу перспективным для разработки новых персонализированных подходов в диагностике и терапии онкологических заболеваний [5].

Одной из методик идентификации опухолевых клеток и опухоль-ассоциированных макрофагов (tumor-associated macrophages, TAM) в тканях является использование эндогенной флуоресценции NADH и FAD с их количественным определением методами флуоресцентной время-разрешенной лазерной микроскопии (fluorescence lifetime imaging microscopy, FLIM).

Однако, для прицельного эффективного фототерапевтического воздействия необходимым условием является введение экзогенных флуорофоров [6]. Использование поглощающих и флуоресцентных маркеров, чувствительных к различным процессам, происходящим в тканях мозга на клеточном и субклеточном уровне, а также методов их доставки к целевым участкам мозга или его функциональным структурам, обеспечивает высокоспецифичный анализ метаболизма и функциональной активности тканей и клеток мозга. Немало

преимуществ имеют оптические методы и в терапии различных патологий мозга благодаря возможности селективного воздействия на измененные ткани, содержащие контрастирующее вещество, чувствительное к излучению с определенными длинами волн, приводящего к фотохимическим, фототермическим и фотобиологическим реакциям в тканях. Способность клеток различной морфологии по-разному накапливать фотосенсибилизаторы (ФС) открывает возможность их оптической неинвазивной дифференциации и дезактивации под действием излучения в полосу поглощения фотосенсибилизатора эндогенной и экзогенной природы. Именно ТАМ способны накапливать фотосенсибилизаторы в несколько раз больше, чем опухолевые клетки — до 9 раз [7], что связано с различиями в наборе эффекторных молекул, метаболизме и фагоцитозе.

Кроме того, использование нанокомпозитов, флуоресцирующих в дальней красной и ближней инфракрасной (ИК) области спектра и обладающих фототоксическим действием, открывает новые возможности для диагностики и терапии ГЗО. Однако, обширное метастазирование глиом вглубь мягкой мозговой ткани серьезно осложняет возможность тотальной деструкции метастатических очагов на значительном удалении от первичной опухоли при помощи лазерного излучения, что обусловлено эффектом его поглощения биотканью [8]. В этой связи использование излучения Вавилова-Черенкова, возникающего при распаде радиофармпрепаратов (РФП), в качестве источника возбуждения фотосенсибилизатора «изнутри» является перспективной задачей для реализации комплексного подхода к терапии опухолей головного мозга [9].

Таким образом, перспективным является многосторонний подход к решению проблемы диагностики, лечения и профилактики ГЗО, включающий:

- 1.Использование системы, основное свойство которой состоит в том, чтобы направить рост клеток глиомы, локализованных в области, прилегающей к месту удаленной опухоли, вдоль волокон по направлению к проксимальной части волоконно-оптического имплантата (нейропорт) с целью их регистрации по сигналу фотолюминесценции.
- 2.Использование фотосенсибилизаторов ближнего ИК диапазона, в том числе в наноформе, для увеличения глубины диагностики и фотодинамической терапии (ФДТ).

3. Использование время-разрешенной спектроскопии для идентификации клеточного состава в области зондирования по фенотипу для прогноза развития опухолевого процесса.

4. Использование излучения Вавилова-Черенкова для терапевтического воздействия «изнутри», позволяющего в режиме неинвазивного мониторинга осуществлять контроль и профилактику рецидивирования патологического процесса в том числе в глубоких зонах мозга, что является предпосылкой для развития новых медицинских персонализированных подходов и увеличения продолжительности жизни онкологических пациентов.

Цель и задачи исследований

Целью данной работы являлась разработка спектрально-флуоресцентных методов оценки состояния опухолей мозга экспериментальных животных для создания новых медицинских технологий диагностики, терапии и профилактики глубоко залегающих опухолей мозга.

Для достижения поставленной цели требовалось решить следующие задачи:

1. Разработать волоконно-оптический нейрокомплекс для исследования состояния экспериментальных опухолей головного мозга с прицельной оценкой эффективности регистрации флуоресцентного сигнала из ГЗО и ложа опухоли, после хирургического удаления основного очага.
2. Исследовать клеточный состав опухолевой ткани, различающейся по фенотипу и степени активности иммунокомпетентных клеток (микроглий), с помощью время-разрешенной спектроскопии с оценкой времени жизни флуоресценции эндогенных и экзогенных флуорофоров в условиях *in vivo*.
3. Апробировать новые фотосенсибилизаторы, в том числе в нано-форме, дальнего красного и ближнего ИК диапазонов с оценкой глубины зондирования биологических тканей.
4. Исследовать эффективность возбуждения фотосенсибилизатора 5-АЛК-индуцированного протопорфирина IX (ПпIX) в опухолевых тканях с

использованием излучения Вавилова-Черенкова, возникающего при введении радиофармпрепарата фтордезоксиглюкозы (ФДГ).

Научная новизна

Результаты, изложенные в диссертационной работе, имеют фундаментальное и прикладное значение и могут быть использованы для создания новых подходов и методов многофункциональной волоконно-оптической визуализации глубоких зон мозга, а также для терапии ГЗО.

1. Предложен и реализован новый подход к диагностике и терапии ГЗО головного мозга на экспериментальных животных, заключающийся в применении волоконно-оптического нейропорта, имплантируемого в ткань мозга, позволяющего отслеживать состояние опухолевого процесса по спектрально-флуоресцентным характеристикам и, в случае необходимости, разрушать раковые клетки и ТАМ.
2. Исследованы спектрально-флуоресцентные свойства новых ИК фотосенсибилизаторов бактериохлоринового ряда в молекулярной и нано-форме. Обнаружено наличие чувствительности наночастиц к микроокружению, выражающееся в изменении их спектрально-флуоресцентных свойств.
3. Разработан и реализован новый подход к оценке состояния опухолевого процесса головного мозга по изменению времени жизни флуоресценции ферментов дыхательной цепи клеток головного мозга и макрофагов.
4. Предложен новый подход к лечению ГЗО методом фотодинамической терапии с использованием излучения Вавилова-Черенкова, возникающего при попадании в опухоль радиофармпрепарата (фтордезоксиглюкоза) совместно с 5-АЛК-индуцированным протопорфирином IX, являющимся акцептором излучения и фотосенсибилизатором, обладающим фотодинамическим эффектом.

Практическая значимость.

1. Результаты работы по созданию нейропорта позволят продлить жизнь пациентам с глиобластомами мозга высокой степени злокачественности.
2. Результаты работы по использованию излучения Вавилова-Черенкова в качестве источника света для реализации фотодинамических реакций в клетках

ГЗО не только головного мозга, но и других труднодоступных опухолей создают предпосылки для разработки новых медицинских технологий.

3. Результаты исследований по время-разрешенной спектроскопии позволяют идентифицировать фенотип макрофагов и оценивать эффективность лечения опухолей различной локализации, на базе чего может быть создан новый класс диагностических приборов.

4. Результаты исследования нового ИК ФС создают предпосылки для фототераностики опухолей большего размера и опухолей, находящихся на большей глубине, чем при использовании ФС нынешнего поколения.

Положения, выносимые на защиту

1. Разработанный нейропорт позволяет проводить мониторинг содержания флуорофоров и структурных изменений биотканей в ложе опухоли.

2. Установлен факт изменения времени жизни флуоресценции ФС (5-АЛК индуцированного ПпIX) в опухоль-ассоциированных макрофагах глиомы С6 при фотодинамическом воздействии ($\lambda_{ex} = 635$ нм, доза 300 Дж/см²), что свидетельствует о метаболических изменениях в опухоли.

3. Изначально фотонеактивные нанокристаллы ФС (фталоцианин алюминия, бактериохлорин) при взаимодействии с поверхностными молекулами гидроксиапатита приобретают способность к флуоресценции (при возбуждении $\lambda_{ex} = 632.8$ нм и $\lambda_{ex} = 532$ нм, соответственно), что позволяет при необходимости ускорить процесс биоинтеграции имплантата путем локального фотодинамического воздействия.

4. Показана эффективность деструкции раковых клеток глиомы С6 при последовательном внутривенном введении ФС (5-АЛК-индуцированного ПпIX, 10 мг/кг) и РФП (ФДГ, 5-10 мКи) с временным промежутком в 2 часа за счет возбуждения ФС излучением Вавилова-Черенкова.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов обусловлена использованием современных методов

экспериментального исследования и научного оборудования, которое верифицируется в соответствии с международными стандартами обеспечения единства измерений и единообразием средств измерений, а также сопоставлением полученных результатов с данными, опубликованными в ведущих научных российских и зарубежных журналах и выводами других исследователей.

Апробация работы

Материалы диссертации были представлены 23 доклада на 12 международных и всероссийских конференциях, в том числе: Advanced microscopy meeting “Super resolution in different dimensions”; SPIE ECBO; Laser Optics 2016; International Conference on Lasers; Applications and Technologies (LAT 2016); IV, V, VI Всероссийская конференция “Фотодинамическая терапия и фотодиагностика”; SPIE Optical systems design; International Conference on Laser Optics ICLO 2018 и др.

Основные результаты диссертации опубликованы в 13 печатных работах, входящих в перечень ВАК, из них 11 индексируемых в базе данных Scopus и 5 в базе данных Web of Science.

Основные доклады по теме диссертации:

1. Advanced microscopy meeting “Super resolution in different dimensions” Lomonosov Moscow State University, Moscow, 02.06.2015-03.06.2015; The investigation of intracellular accumulation of bacteriochlorin by laser microscope and spectrum analyzer.
2. SPIE ECBO Munich, Germany, 21.06.2015-25.06.2015; Metal nanoparticles of different shapes influence on optical properties of multilayered biological tissues.
3. V Международная конференция по фотонике и информационной оптике МИФИ, Москва, Россия, 03.02.2016-05.02.2016; Разработка волоконно-оптических нейропортов для диагностики и профилактики рецидивов глиобластом.
4. The 17th International Conference “Laser Optics 2016” Санкт-Петербург, Россия, 27.06.2016-01.07.2016; The development of fiber-optic scaffold for the glioblastoma diagnosis and prevention.
5. International Conference on Lasers, Applications and Technologies (LAT 2016), Minsk, Belorussia, 26.09.2016-30.09.2016; Development of fiber-optic scaffold for the

glioblastoma diagnosis and prevention coating.

6. International Conference on Lasers, Applications and Technologies (LAT 2016), Minsk, Belorussia, 26.09.2016 - 30.09.2016; Depth independent Cerenkov radiation mediated therapy with 5-ALA photosensitizer.

7. International Conference on Lasers, Applications and Technologies (LAT 2016), Minsk, Belorussia, 26.09.2016- 30.09.2016; Spectral luminescent properties of bacteriochlorin and aluminum phthalocyanine nanoparticles as hydroxyapatite implant surface coating.

8. International Conference on Lasers, Applications and Technologies (LAT 2016), Minsk, Belorussia, 26.09.2016-30.09.2016; Spectral fluorescence method of bacteriochlorin accumulation dynamic estimation in mice skin with superficial wound Staphylococcus infection coating.

9. VI Международная конференция «Современные проблемы физики и технологий» МИФИ, Москва, Россия, 17.04.2017-21.04.2017; Spectral-luminescent properties of of bacteriochlorin and aluminum phthalocyanine nanoparticles as a surface coating of osteoplastic hydroxyapatite based materials “Collapan”.

10. VI Международная конференция «Современные проблемы физики и технологий» МИФИ, Москва, Россия, 01.02.2017-03.02.2017; Исследование молекулярных нанокристаллов бактериохлорина в качестве агентов для проведения гипертермической терапии злокачественных новообразований.

11. V Международная конференция «Современные проблемы физики и технологий» МИФИ, Москва, Россия, 03.02.2016-05.02.2016; Бактериохлорин в роли ИК-фотосенсибилизатора для диагностики и терапии глубокозалегающих опухолей мозга.

12. IV Всероссийская конференция “Актуальные вопросы фотодинамической терапии и фотодиагностики” Санкт-Петербург, Россия, 25.09.2015-26.07.2015; Исследование внутриклеточного распределения бактериохлорина в ближнем ИК-диапазоне спектра.

13. IV Всероссийская конференция “Актуальные вопросы фотодинамической терапии и фотодиагностики” Санкт-Петербург, Россия, 25.09.2015-26.09.2015;

Оценка возможности использования кристаллических наночастиц бактериохлорина для локальной гипертермической терапии.

14. V Всероссийская конференция “Фотодинамическая терапия и фотодиагностика” Москва, Россия, 15.09.2016-16.09.2016; Спектрально-люминесцентные свойства наночастиц бактериохлорина и фталоцианина алюминия в качестве поверхностного покрытия имплантатов на основе гидроксиапатита.

15. V Всероссийская конференция “Фотодинамическая терапия и фотодиагностика” Москва, Россия, 15.09.2016-16.09.2016; Разработка нейропорта для терапии и профилактики глиом головного мозга.

16. VI Всероссийская конференция “Фотодинамическая терапия и фотодиагностика” Ростов-на-Дону, Россия, 14.09.2017-16.09.2017; Использование излучения Вавилова-Черенкова для деструкции клеток глиомы С6 крысы при сочетанном воздействии ФДГ и 5-АЛК индуцированного протопорфирина IX.

17. VI Всероссийская конференция “Фотодинамическая терапия и фотодиагностика” Ростов-на-Дону, Россия, 14.09.2017-16.09.2017; Нейрокомплекс для перманентной фототераностики глубокозалегающих опухолей мозга.

18. 2-й международный симпозиум «Инженерно-физические технологии биомедицины» МИФИ, Москва, Россия, 10.10.2017-14.10.2017; PET radiotracers as the Cerenkov radiation sources induced photodynamic therapy.

19. 2-й международный симпозиум «Инженерно-физические технологии биомедицины» МИФИ, Москва, Россия, 10.10.2017-14.10.2017; Spectral-optical properties of nutrition coated optical fibers for glioma cells growth orientation.

20. 2-й международный симпозиум «Инженерно-физические технологии биомедицины» МИФИ, Москва, Россия, 10.10.2017-14.10.2017; Modern instrumental and methodological approaches brain tumors theranostics.

21. SPIE Optical systems design, Frankfurt, Germany, 14.05.2018-17.05.2018 Optical fiber neurosystem for deep-lying brain tumors phototheranostics.

22. 18th International Conference on Laser Optics ICLO 2018 ICLO 2018, Saint Petersburg, Russia, 04.06.2018-08.06.2018; TAM identification by fluorescence lifetime

on different models.

23. 18th International Conference on Laser Optics ICLO 2018 ICLO 2018, Saint Petersburg, Russia, 04.06.2018-08.06.2018; Spectral properties comparative analysis of normal and tumor brain tissues in the visible and near infrared optical ranges.

Гранты

Работа частично поддержана Советом по грантам Президента Российской Федерации на право получения стипендии Президента Российской Федерации молодым ученым и аспирантам (Конкурс СП-2018) «Нейропорт для лечения и профилактики опухолей головного мозга» в 2018 г.

Благодарности

Автор благодарит своего научного руководителя Лощенова Виктора Борисовича за неоценимую помощь на всех этапах работы над диссертацией, за чуткое руководство и возможность выполнения работы в лаборатории. Автор выражает благодарность всем сотрудникам Лаборатории лазерной биоспектроскопии за полезные дискуссии и дружескую поддержку. Особая благодарность Анастасии Рябовой и Дарье Поминовой за профессиональные советы и помощь в реализации исследований на биологических структурах, Игорю Романишкину за помощь в измерении времени жизни флуоресценции, Александру Бородкину за помощь в решении инженерных вопросов, а также Гаухар Юсубалиевой за профессиональную помощь в работе с лабораторными животными. Отдельную благодарность хотелось бы выразить Екатерине Ахлюстиной, Алине Шаровой, Алексею Скобельцину, Дмитрию Яковлеву за активное участие в проведении исследовательских поисковых работ и анализе экспериментальных данных. Особую признательность автор выражает Лукьянцу Евгению Антоновичу за предоставление материала для исследований и активное участие в обсуждении научных результатов.

Структура и объем диссертации

Работа состоит из введения, пяти глав, заключения и списка литературы. Общий объем диссертации - 121 страниц, включая 59 рисунков и список литературы из 94 наименований.

3. ГЛАВА 1. АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

В данной главе приведен обзор литературы по существующим методам анализа состояния и функций мозга. Особенное внимание уделено рассмотрению оптических свойств биологических тканей, в частности тканей мозга. Показана актуальность и перспективность лазерно-спектроскопических методов в исследованиях патологий мозга.

1.1. Канцерогенез опухолей головного мозга

Канцерогенез – это сложный многофакторный процесс накопления мутаций и других изменений, который приводит к нарушению основных функций клеток и отсутствию регуляции пролиферации, дифференцировки, апоптоза, функционирования факторов специфического и неспецифического противоопухолевого иммунитета. Для больных с глиобластомой со сниженной продолжительностью жизни характерна сверх экспрессия рецептора к эпидермальному фактору роста (EGFR), что коррелирует с высоким индексом пролиферации. Гиперэкспрессия EGFR в большинстве случаев обусловлена амплификацией гена (35-70% случаев). В свою очередь матричные металлопротеиназы являются важнейшими элементами в биологии глиобластомы, которые обуславливают способность опухоли проникать в окружающую паренхиму мозга и провоцировать неоангиогенез. Также одним из основных свойств металлопротеиназ является способность разлагать межклеточный матрикс, что вызывает миграцию и инвазию эндотелиальных и опухолевых клеток. В клеточных линиях глиобластомы человека активируются различные металлопротеиназы, в частности избыточная их экспрессия обнаружена на сосудистой сети опухоли, что обуславливает их значительную роль в ангиогенезе. Существенную роль играет иммунодепрессия. Большое разнообразие злокачественных новообразований нервной ткани, связано с фенотипическим своеобразием клеток (около 15 типов) способных к злокачественной трансформации. Наиболее часто первичные опухоли возникают из

предшественников глии – астроцитов, эпендимоцитов, олигодендроцитов. Глиальные опухоли мозга составляют 40% всех опухолей центральной нервной системы. Заболеваемость злокачественными глиомами составляет 5-8 случаев на 100 000 населения. Глиобластома - это первичная опухоль, которая наиболее распространена и наиболее злокачественна. Частота выявления этой опухоли составляет около 12-16% среди внутричерепных новообразований, 40% среди всех первичных опухолей головного мозга и 80% всех первичных новообразований центральной нервной системы с высокой степенью злокачественности [11]. Для глиобластом характерна высокая смертность, при этом средняя продолжительность жизни больных составляет до 1 года – 68%, до 2 лет – 24%, до 3 лет – 4%. У 60-90% больных возникают локальные рецидивы (в пределах 2 см от первичной опухоли). Ограниченные возможности хирургии и резистентность опухолей глиального происхождения к лучевой и химиотерапии делают проблему диагностики и терапии данного заболевания наиболее актуальной. Общий принцип лечения больных с глиальными опухолями головного мозга подразумевают комплексный подход. Текущим стандартом лечения является максимально возможная и безопасная хирургическая резекция с последующей комбинацией лучевой, химио, иммуно- терапией [12-17]. Для диагностики глиом головного мозга применяют компьютерную томографию и позитронно-эмиссионную томографию. Обладая различными техническими возможностями, диагностические методы дополняют друг друга, позволяя детализировать картину канцерогенеза. МРТ позволяет эффективно оценить особенности распространения и направления роста опухоли, или рецидивирования [18]. ПЭТ, КТ позволяет оценить гистобиологические качества опухоли. Ангиография выявляет патологическую сосудистую сеть.

1.2. Оптические свойства биологических тканей и тканей мозга

Биологические ткани представляют собой поглощающую неоднородную среду. На границе раздела воздуха и биообъекта часть падающего излучения - отражается, что обусловлено разницей в показателях преломления ($n_{\text{возд}} < n_{\text{био}}$), а часть проходит внутрь. Однако многокомпонентность и структурная неоднородность биологических тканей обуславливают локальные различия в

показателе преломления, что в свою очередь приводит к рассеянию излучения в объеме. Рассеяние обусловлено вариациями показателя преломления в микроскопических и макроскопических областях, тогда как поглощение — электронными переходами и возбуждением, связанными с колебательными и вращательными процессами в атоме. Также стоит отметить, что значительная часть излучения претерпевает обратное рассеяние. Злокачественные новообразования в свою очередь отличаются неупорядоченностью и хаотичностью, что приводит к изменению относительного показателя преломления патологических тканей и соответственно к изменению характера рассеяния.

Таким образом, биоткани можно разделить на два класса: сильно рассеивающие и слабо рассеивающие. К первому классу оптически мутных сред относятся кожа, кровь, сосуды, мышцы, мозг и др.. Распространение излучения в них может быть описано моделью многократного рассеяния излучения в неоднородной среде с поглощением. К прозрачным средам стоит отнести ткани глаза (хрусталик, роговица), распространение излучения в которых, можно описать моделью однократного рассеяния в упорядоченной среде с поглощающими центрами.

За счет многократного рассеяния и поглощения лазерный пучок уширяется и затухает при распространении в биоткани. Поглощенный свет в свою очередь преобразуется в тепло, переизлучается в виде флуоресценции, а также тратится на фотобиохимические реакции. Спектр поглощения определяется типом доминирующих поглощающих центров и содержанием воды в биоткани.

На рисунке 1 представлена схема возможных процессов взаимодействия лазерного излучения с фотосенсибилизированной биологической тканью.

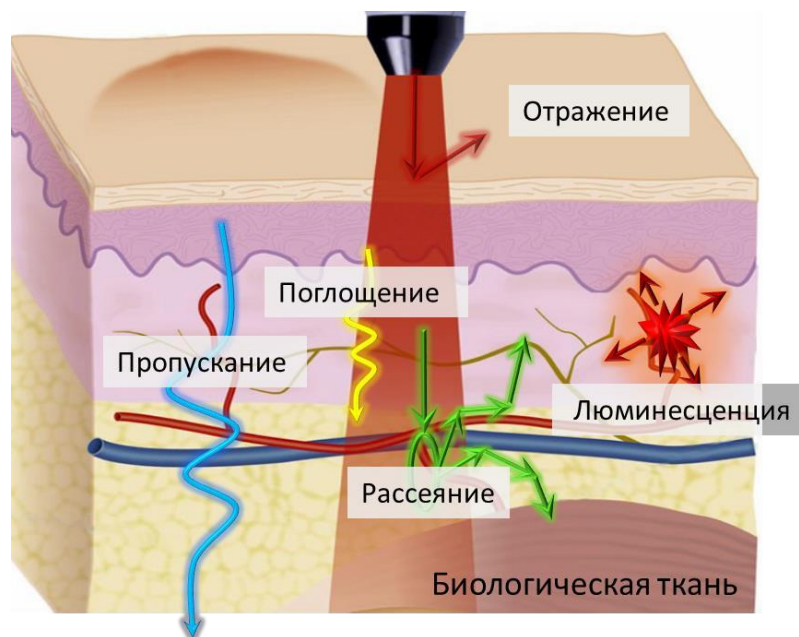


Рисунок 1. Схематическое изображение вероятностных процессов взаимодействия излучения с биологической тканью

Характер взаимодействия оптического излучения с биологическими тканями определяется его проникающей способностью. Коэффициент поглощения излучения биотканью, α , следовательно, и глубина проникновения, зависят от длины волны источника возбуждающего излучения. Оптимальная для ФД и ФДТ длина волны поглощения, флуоресценции и рассеяния биоткани находится в области оптического окна прозрачности биологической ткани 690 – 1050 нм. Из рисунка 2 видно, что в зоне диагностического окна прозрачности поглощение биологической ткани минимально, что обеспечивает высокую проникающую способность излучения соответствующих длин волн. Вне диапазона оптической прозрачности биоткани глубина проникновения ограничена поглощением длинноволнового излучения водой, как одной из основных составляющих биоткани, и поглощением коротковолновых составляющих видимого излучения различными хромофорами (белки, дезоксирибонуклеиновая кислота, оксигемоглобин, гемоглобин, меланин). Существование окна прозрачности является благоприятным фактором развития оптической диагностики.

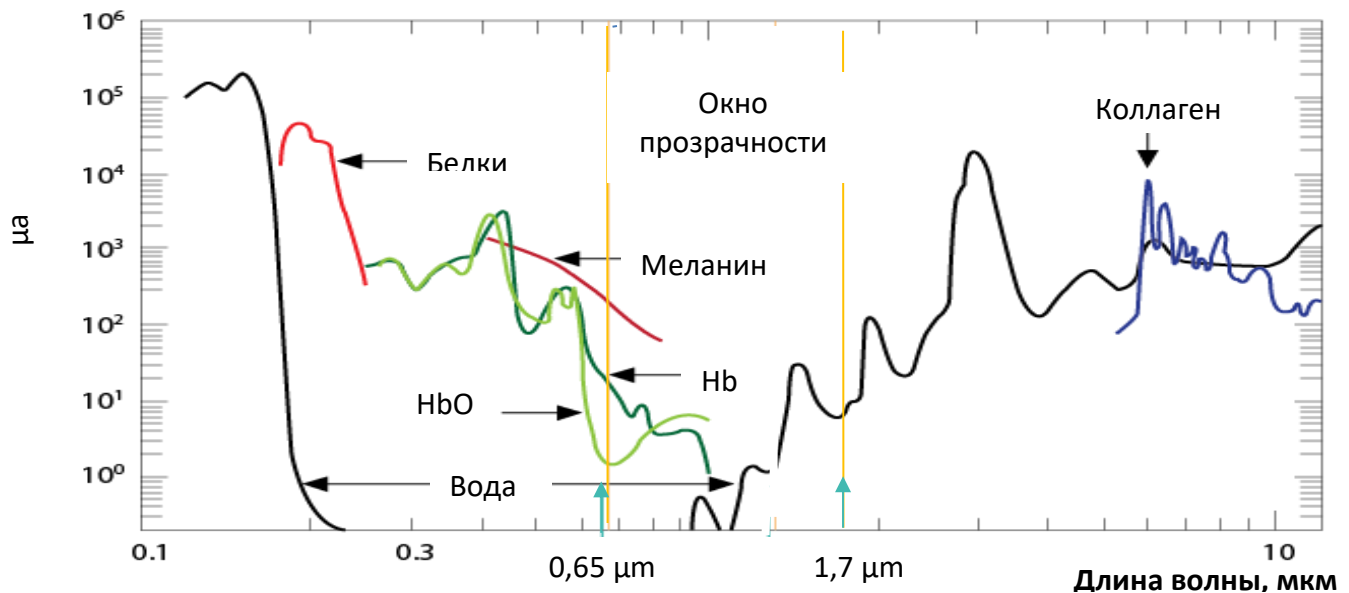


Рисунок 2. *Спектральные характеристики отдельных составляющих биологической ткани. Спектральное окно прозрачности.*

Поскольку максимальную глубину проникновения в биоткань имеет излучение длин волн области оптической прозрачности биоткани, где собственное поглощение несенсибилизированной ткани минимально, то соответственно, наибольшую глубину фотодинамического воздействия могут обеспечить ФС с длиной волны спектрального максимума в дальнем красном 660 - 740 нм и БИК диапазонах 740-1400 нм. Таким образом, глубина проникновения излучения в биоткань может быть увеличена с 3-6 мм до 10-20 мм. Применение соединений, флуоресценция которых возбуждается в данных оптических диапазонах позволит анализировать более глубокие слои биоткани, что очень важно при диагностике заболеваний с глубокой локализацией. Поэтому в последние годы ведется направленный поиск новых ФС с улучшенными свойствами: наличием интенсивной полосы поглощения в дальней красной и БИК областях спектра.

1.3 Актуальные методы диагностики и терапии патологий ЦНС

Статистика свидетельствует о том, что число больных с заболеваниями центральной и периферической нервной системы год от года по всему миру неуклонно растет. Сама по себе нервная система представляет сложную целостную структуру, которая обеспечивает регуляцию деятельности всех систем организма. Основу этой сложной разветвленной структуры составляет центральная нервная система (ЦНС), образованная головным и спинным мозгом. ЦНС связана со всеми органами и тканями через периферическую нервную систему (ПНС), которая в свою очередь состоит из черепных и спинальных нервов, а также нервов и сплетений вегетативной нервной системы. Ткани нервной системы образуют два вида клеток: нейроны, которые в зависимости от их типа формируют отростки различной формы, и глиальные клетки, которые в зависимости от их типа различаются по форме и по происхождению. Такая сложная структурная организация нервной системы предусматривает широкий спектр возникающих патологий. Наиболее значимыми в силу своей большей распространенности среди населения остаются заболевания травматологического и онкологического характера. Среди заболеваний ЦНС одно из ведущих мест по своему распространению занимают опухоли мозга. Заболеваемость первичными опухолями головного мозга составляет 10.9-12.8 на 100 тыс. населения, при этом 60% опухолей относится к глиальным, а 80% из них являются злокачественными. При этом в течение последних 10-20 лет повсеместно наблюдается тенденция неуклонного роста заболеваемости первичными и метастатическими опухолями головного мозга. До настоящего времени основным методом лечения глиом головного мозга остается хирургическое вмешательство, направленное на удаление злокачественно переродившихся тканей максимально допустимое в пределах функционально обоснованных границ. Хирургическое удаление опухоли требует соблюдения принципа минимизации хирургической травмы, максимального сохранения смежных мозговых структур, что, в конечном счете, должно обеспечивать улучшенное качество жизни пациентов. Таким образом, хирургическое лечение, лучевая и химиотерапия выступают в роли основных тактик лечения у данной категории больных. Необходимо заметить, что рецидивы

данного типа опухоли возникают практически у всех больных независимо от тактики первоначального лечения, поскольку способов предупреждения метастатического поражения мозга еще не разработано. Быстрый рост первичных и метастатических глиом, вызывает неврологические нарушения, обусловленные поражением структур головного мозга, что ведет к ранней инвалидизации и высокой смертности. Выживаемость пациентов с такого рода диагнозом в среднем составляет менее 6 месяцев. Ввиду отсутствия альтернативных методик, приводящих к частичному или полному контролю над патологическими процессами в клетках головного мозга, показателем результативности лечения является уровень качества жизни больного. Таким образом, неуклонный и повсеместный рост показателей заболеваемости, ранняя инвалидизация и высокая смертность активного, работоспособного населения, а также неудовлетворительные результаты стандартного комбинированного лечения (оперативное лечение плюс лучевая терапия), побудили к поиску возможности повышения эффективности лечения опухолей головного мозга за счет разработки новых комбинированных методов, что и обусловило актуальность настоящего исследования. Злокачественные глиомы головного мозга известны тем, что вторгаются и распространяются вдоль каналов белого вещества и вдоль кровеносных сосудов [19-21]. На основании этого наблюдения в рамках данной работы предполагается создать «направляющие рельсы» для опухоли, которые представляют собой оптические волокна, структурно имитирующие каналы белого вещества и кровеносные сосуды, чтобы направить рост локализованных внутри раковых клеток – наружу: от места первичной локализации опухоли в более доступное место вне коры головного мозга для последующего оказания внешнего губительного для раковых клеток воздействия [19-24]. Несмотря на использование биосовместимых материалов для создания имплантов, не исключена воспалительная реакция со стороны иммунной системы, что также необходимо исследовать. Поэтому наряду с созданием унифицированного импланта с пористой внутренней структурой наиболее значимой задачей, является осуществление мониторинга направленного роста клеток и своевременного внешнего воздействия губительного для раковых клеток. Мониторинг процессов клеточного роста

заключается в обнаружении методом флуоресцентной спектроскопии участков с повышенной интенсивностью флуоресценции, вызванной повышенной концентрацией молекул накапливающегося фотосенсибилизатора в клетках глиомы. Однако специфика работы с отделами центральной и периферической нервной системы требует минимизации размеров спектроскопического зонда. Мониторинг в свою очередь дает наблюдателю довольно полное представление о процессах, происходящих в зондируемой области. В случае со злокачественной глиомой переориентация направления роста раковых клеток из внутричерепной области первичной опухоли во внешнюю часть головного мозга, доступную для эффективного фотодинамического воздействия, необходима для снижения скорости ее распространения в глубокие слои мозга, а также для осуществления своевременного направленного терапевтического воздействия на злокачественные клетки.

Заключение к главе

По вопросам диагностики и терапии опухолей мозга опубликовано большое количество работ. Ввиду неизлечимости заболевания с низкой медианой выживаемости пациентов поиск новых методов актуален во всем мире. Работы ведутся в самых различных направлениях от биохимии до биофизики. Однако наиболее перспективными ввиду радио- и химио- устойчивости опухолей мозга являются физические методы воздействия, которые не вызывают привыкания и провоцируют быстрый локальный ответ организма. Несмотря на значительное развитие подходов к терапии глиом головного мозга, в том числе посредством имплантатов, большинство сведений необходимых для понимания процессов, лежащих в основе прогрессирования опухоли, остаются мало изученными. Оптимизация фотофизических параметров разрабатываемого имплантата с целью терапии и профилактики патологических новообразований мозга по-прежнему остается важной задачей, при этом может значительно повысить их качество и открыть новые возможности для их применения.

4. ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данная глава посвящена подробному рассмотрению материалов и методов исследования: описаны устройства и принцип работы оборудования, а также экспериментальные биологические модели, которые использовались в работе. Обоснован выбор методов и моделей исследования, описан ход экспериментальных работ. Наряду с рассмотрением контрольных методик исследования (МРТ, ПЭТ) особое внимание уделено методам оптической спектроскопии для анализа состояния и функций мозга, которые обладают значительными преимуществами перед другими методами, используемыми в нейрохирургии и нейроонкологии. Одним из важных преимуществ является высокая скорость обработки информации. Не менее важен и широкий спектр физиологических и морфологических параметров, доступных для анализа методами оптической спектроскопии. Они обеспечивают значительную корреляцию регистрируемого сигнала - поглощения, флуоресценции или различных видов рассеяния, обусловленных как веществами, изначально присутствующими нервным тканям и клеткам, так и контрастирующими маркерами, вводимыми извне - от малых и быстрых функциональных изменений, а также проявляют сильную корреляцию с глубокими метаболическими и структурными перестройками, имеющими место при развитии патологий мозга.

2.1 Методы флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии

На сегодняшний день при радикальном и паллиативном лечении онкологических заболеваний различного генеза значительной эффективностью обладают современные физические методы тераностики: флуоресцентная диагностика (ФД) и фотодинамическая терапия (ФДТ). ФД и ФДТ отличаются малой инвазивностью, избирательностью и возможностью многократного повторного воздействия на патологически измененные ткани, отсутствием тяжелых системных и местных осложнений, хорошим косметическим эффектом [24-32].

В основе механизма ФД и ФДТ лежит взаимодействие фотосенсибилизатора (ФС), лазерного излучения и молекулярного кислорода, содержащегося в биоткани. В качестве источника возбуждения ФС эффективным является лазерное излучение высокой интенсивности и монохроматичности.

В целях фототерапии предварительно в организм пациента вводится ФС (внутривенно, аппликационно или перорально), который характеризуется селективным накоплением в патологических тканях по сравнению со здоровыми, что связано с особенностями ангиогенеза в области новообразования. После чего патологическая биоткань подвергается воздействию лазерного излучения определенной длины волны, соответствующей пику поглощения введенного в организм ФС. При поглощении излучения ФС переходит в синглетное возбужденное состояние (рис. 3). Обратный переход в основное состояние происходит при испускании флуоресценции, характеризующейся короткими временами жизни порядка 10 нс. Часть энергии возбуждения переходит на долгоживущий триплетный уровень, переход с которого в основное состояние (фосфоресценция) запрещен правилами отбора и характеризуется длительным временем жизни ($10^{-2} - 10^{-4}$ сек, в зависимости от наличия тушителей в микроокружении). В присутствии молекулярного кислорода, в тканях и клетках, энергия с триплетного состояния ФС может быть передана на молекулярный кислород, который возбуждается из триплетного состояния в синглетное. Синглетный кислород является активной формой кислорода и окисляет биологические молекулы, находящиеся в ближайшем микроокружении (так называемое химическое тушение). Также синглетный кислород может окислить и саму молекулу ФС (фотобличинг). В результате процесса окисления происходит разрушение (фотодеструкция) ФС.

Таким образом, при воздействии лазерного излучения на сенсибилизированные ткани (ФДТ) происходит образование активных форм кислорода. Высокоактивный кислород приводит к повреждению жизненно важных клеточных структур и как следствие разрушению патологических сенсибилизированных клеток. В результате фотодеструкции гибнут аномально измененные ткани в ходе некроза/апоптоза, в то время как здоровые ткани остаются

не фоточувствительны.

Важным преимуществом спектроскопического анализа тканей является возможность получения информации о динамике различных биологических процессов в режиме реального времени. При ФД по интенсивности флуоресцентного сигнала отслеживается степень накопления ФС в зоне интереса, что позволяет обнаружить и точно установить границы распространения патологического процесса, подобрать оптимальные параметры для проведения сеанса ФДТ и оценить эффективность терапии после сеанса.

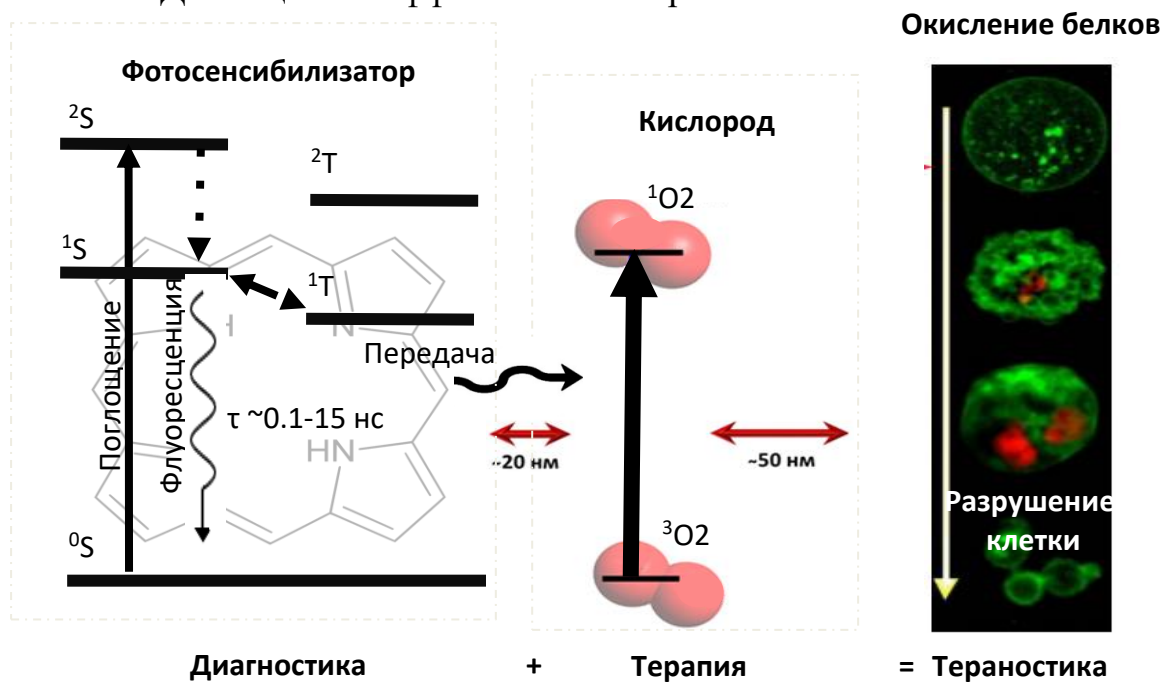


Рисунок 3. Механизм ФДТ и ФД. Энергетическая диаграмма.

- 1) $^0S + h\nu \rightarrow ^1S$ – поглощение света, переход ФС в возбужденное синглетное состояние.
- 2) $^1S \rightarrow ^3S$ – переход ФС в триплетное состояние.
- 3) $^3S + O_2 \rightarrow ^0P + ^1O_2$ – передача энергии ФС молекулярному кислороду, которая приводит к возвращению ФС в основное состояние и к появлению активной формы синглетного кислорода.

Механизмы фотодеструкции опухоли при ФДТ в значительной мере зависят от основных параметров лазерного излучения: плотности мощности и дозы облучения, а также от уровня накопления ФС.

Выбор длины волны источника лазерного излучения осуществляется в соответствии со спектральными характеристиками используемого ФС. Лазерные источники излучения обладают рядом положительных свойств: когерентность, монохроматичность и коллимация, благоприятных для проведения ФД и ФДТ. Для возбуждения ФС при проведении ФД и ФДТ используются различные лазерные системы с соответствующими характеристиками (длина волны излучения, мощность, диаметр и расходимость пучка, режим генерации). В роли таких систем могут быть использованы лазеры на красителях с накачкой аргоновым лазером, на парах золота, на красителях с накачкой лазером на парах меди, на красителях с накачкой эксимерным лазером, твердотельные лазеры с удвоенной частотой излучения и др.

Длительность светового воздействия при ФДТ рассчитывается исходя из заданной, эмпирически подобранной эффективной дозы световой энергии E_s в Дж. В зависимости от клинической формы, структуры и локализации опухоли эта доза составляет от 50 до 600 Дж при площади светового пятна 1 см².

Решающим параметром деструкции опухоли при фотодинамическом воздействии является плотность мощности светового излучения P_s , измеряемая в Вт/см². Плотность мощности P_s рассчитывается путем деления величины мощности излучения на выходе световода (оптоволоконна) P , определяемой измерителем мощности, на площадь поля облучения S , то есть светового пятна:

$$P_s = P / S \quad (1)$$

где P_s – плотность мощности излучения (Вт/см²), P – мощность излучения на выходе световода (Вт), S – площадь светового пучка (см²).

При проведении ФДТ в клинических условиях плотность доза облучения излучения подбирается в зависимости от характера и локализации патологического образования, составляет ~200÷400 мВт/см².

Длительность облучения t в секундах определяется путем деления заданной величины плотности (дозы) световой энергии E_s в Дж/см², которую необходимо подвести к опухоли, на рассчитанную плотность мощности светового излучения P_s в Вт/см²:

$$t = E_s / P_s.$$

2.2 Исследования накопления фотосенсибилизаторов *in vitro* и *in vivo*

Исследования накопления ФС в условиях *in vivo* были проведены с помощью лазерного спектроанализатора с применением ФС: фталоцианина алюминия и мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина(далее бактериохлорина) в нано-форме, 5-АЛК индуцированного ПпIX и бактриохлорина в молекулярной форме.

В данной работе объектом интереса явились ФС дальнего красного и ближнего ИК диапазона в нано-форме: фталоцианин алюминия (nAlPc), бактериохлорина (nVch). Методика приготовления коллоидных растворов была идентичной с той лишь разницей какое исходное вещество было использовано. Исходный материал для приготовления наночастиц, поликристаллический порошок AlPc и Vch, был получен от ФГУП ГНЦ "НИОПИК". Химическая формула AlPc представлена на рисунке 4. AlPc относится к семейству фталоцианинов, тетраазатетрабензопорфиринов, высших гетероциклических соединений, состоящих из изоиндольных колец, соединённых между собой через sp^2 -гибридизованный атом азота, структурно родственный порфиринам) Комплексы фталоцианинов с переходными металлами используются в качестве красителей и пигментов.

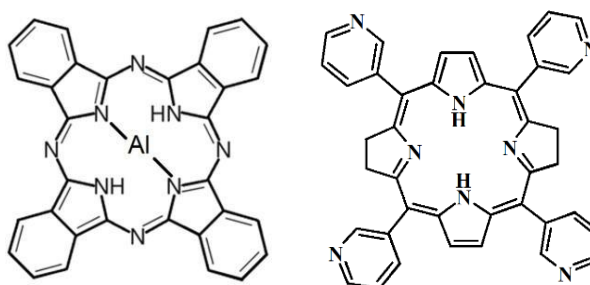


Рисунок 4. Схематическое изображение строения молекулы фталоцианина алюминия и мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина

бактериохлорина

В ходе исследования был приготовлен водный коллоидный раствор молекулярных нанокристаллов AlPc и Bch. В процессе подготовки к эксперименту поликристаллический порошок добавляли в дистиллированную воду до получения концентрации 1 мг/мл. Полученную суспензию подвергали диспергированию в ультразвуковом гомогенизаторе Bandelin SONOPLUS HD2070. При помощи многоугольного спектрометра динамического рассеяния света Photocor Complex (Россия) было установлено, что средний диаметр частиц в водном коллоиде составил 220÷240 нм (рис. 5). Спектрометр динамического рассеяния света измеряет гидродинамический радиус, который существенно зависит от ряда параметров: дзета-потенциала наночастицы, ее формы, температуры и вязкости окружающей среды. В связи с этим, полученные значения используются как ориентировочные.

Важно отметить, что полученные коллоиды нанокристаллов ФС не проявляли флуоресцентных свойств (рис. 6).

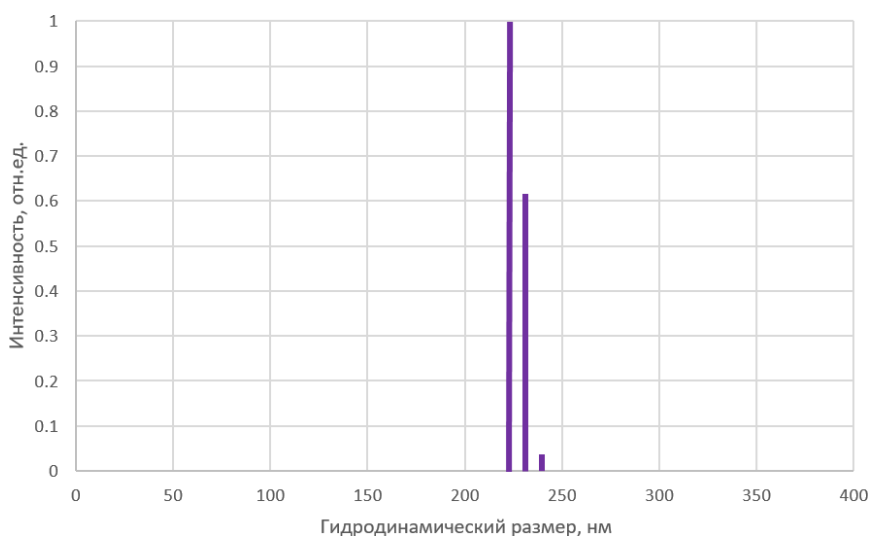


Рисунок 5. Спектр распределения по размерам наночастиц в водном коллоидном растворе. Спектр нормирован на интенсивность рассеяния света наночастицами.

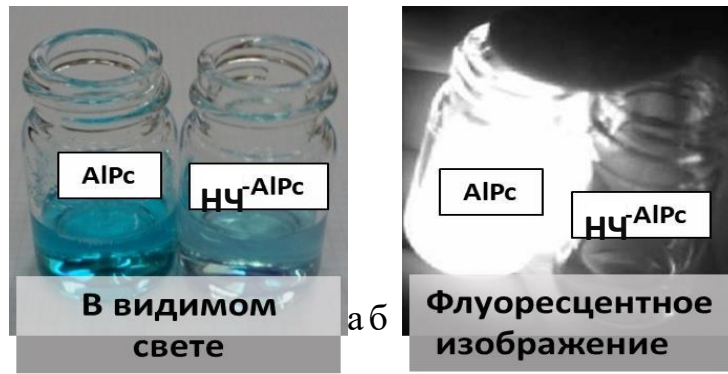


Рисунок 6. Раствор молекулярного AlPc и водный коллоид наноформы AlPc (nAlPc). Цветное (а) и флуоресцентное (б) изображение.

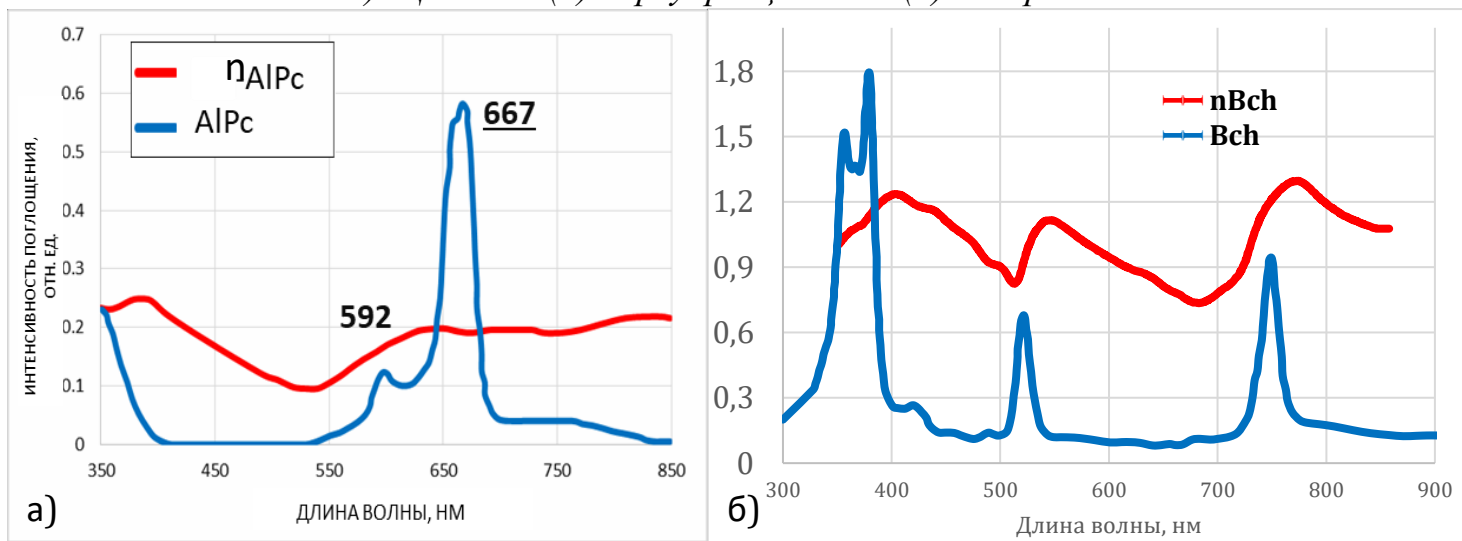


Рисунок 7. Спектры поглощения водного коллоида nAlPc и молекулярного раствора AlPc и б) Bch.

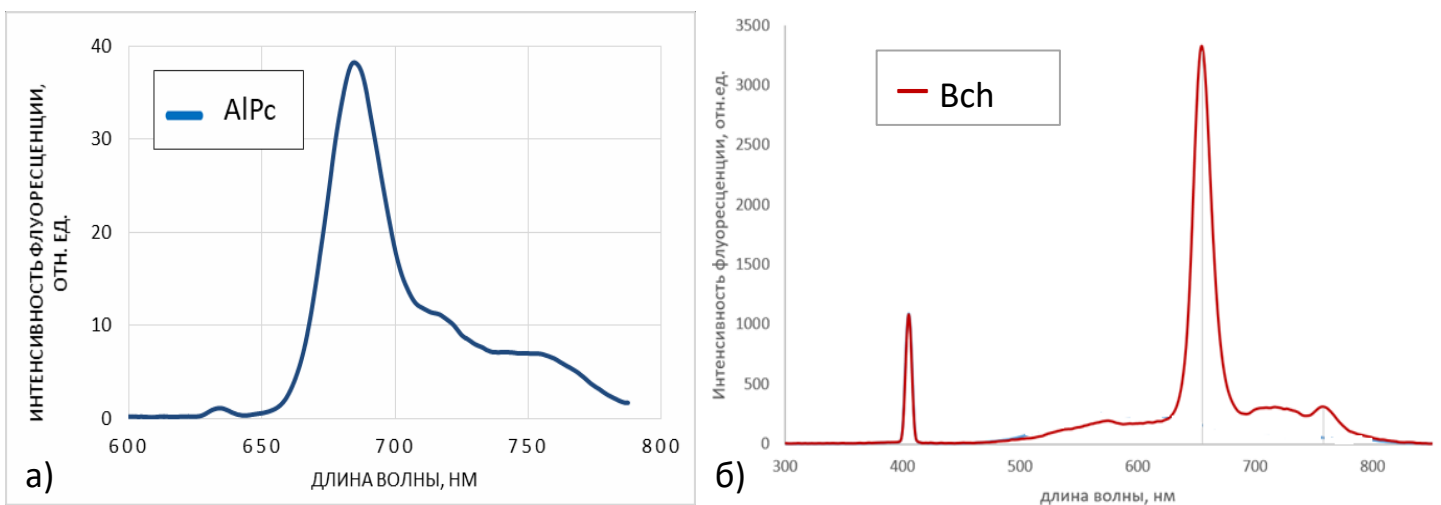


Рисунок 8. Спектр флуоресценции молекулярного раствора AlPc, $\lambda_{ex}=632.8$ нм и Bch $\lambda_{ex}=405$ нм

Кристаллические НЧ не флуоресцируют, но могут быть использованы в качестве «индикатора» патологического процесса, поскольку под воздействием внешних факторов начинают проявлять свойства свободных молекул АІРс и Vch соответственно. Рассмотрим на примере nАІРс возможный механизм возникновения флуоресценции в патологически измененной биоткани, микрофлора и ответ иммунной системы которой отличаются от оных для здоровой биоткани.

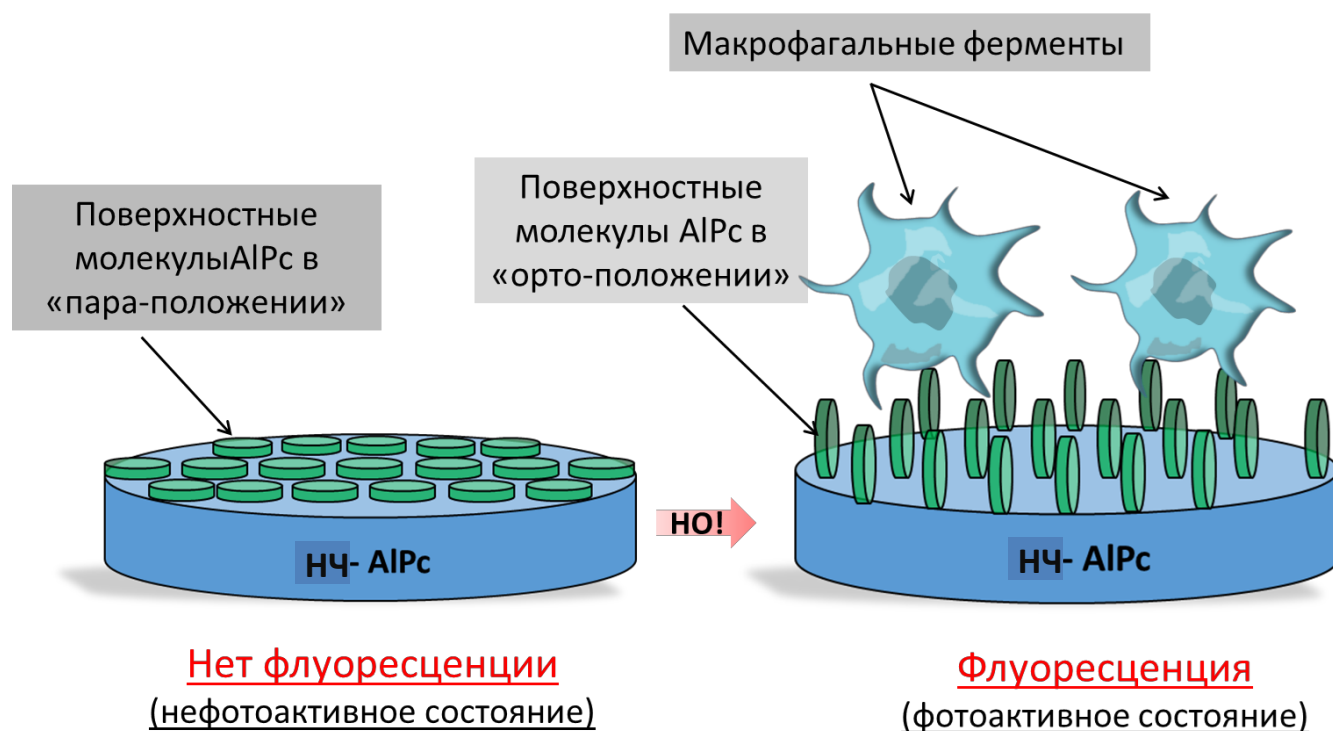


Рисунок 9. Модель перехода поверхностных молекул АІРс из пара- в орто-положение относительно плоскости кристаллической НЧ-АІРс.

Наиболее вероятным механизмом возникновения флуоресценции, является переход поверхностных молекул наночастиц АІРс из пара-положения в орто-положение вследствие воздействия макрофагальных ферментов как показано на рисунке 9, из-за чего у НЧ-АІРс происходит появление флуоресцентных и фотоактивных свойств. Снижение интенсивности флуоресценции НЧ-АІРс после светового воздействия может объясняться разрушением связей между поверхностными молекулами АІРс и макрофагальными ферментами, которые и перевели поверхностные молекулы АІРс в орто-положение, вследствие чего

поверхностные молекулы AlPc вновь переходят в пара-положение и флуоресцентные и фотоактивные свойства НЧ-AlPc исчезают.

Перспективность использования исследуемых НЧ ФС AlPc обусловлена рядом его преимуществ:

- Имеет пики поглощения и флуоресценции в дальней красной области спектра, что позволяет добиться увеличения глубины фотодинамического воздействия на патологические ткани.
- Может проявлять себя в качестве «индикатора» патологического процесса, обладая способностью к фотоактивации в условиях взаимодействия с патологическими агентами.
- Тропность препарата к опухолевым тканям может быть увеличена за счет использования наноразмерных частиц диаметром 100÷220 нм.

В данной работе ФС AlPc и Vch использовался при их исследовании спектрально-оптических свойств в контакте с имплантатом на основе гидроксиапатита (материала, повторяющего костную ткань). ФС AlPc также использовался для исследования разработанного нейропорта на модели фантома мягкой мозговой ткани и в процессе изучения внутренней волоконно-оптической структуры имплантата *in vitro*.

Эффективным эндогенно формируемым фотодинамическим агентом, получившим широкое применение в клинической практике для лечения и диагностики онкологических заболеваний (в особенности, глиом высокой степени злокачественности), является протопорфирин IX, индуцированный 5-аминолевулиновой кислотой (5-АЛК индуцированный ПП IX) [43-44]. 5-АЛК разрешен для клинического применения в России и все параметры ФС регламентированы [45]. Роль ФС играет ПП IX, который является промежуточным продуктом цепочки реакций синтеза гема из 5-АЛК. 5-АЛК индуцированный ПП IX характеризуется высокой флуоресцентной контрастностью и повышенным накоплением в некоторых видах быстро пролиферирующих тканей, характеризующихся нехваткой феррохелатазы. Из-за нехватки фермента феррохелатазы в опухолевых клетках в сравнении с нормальными клетками

происходит накопление ПП IX и его распространение не только внутри клетки, но и в межклеточное пространство. ПП IX накапливается и сохраняется в значительном количестве в опухоли в течение нескольких часов, в то время как в нормальных клетках он быстро превращается в фотонеактивный порфирин под действием феррохелатазы.

Таким образом, в данной работе предварительные исследования нейротарта с внутренней волоконно-оптической структурой *in vivo* проводили с использованием препарата Аласенс®, синтезированного ГНЦ «НИОПИК» на модели экспериментальных животных с индуцированной глиомой С6. Стерильный водный раствор ФС для аппликации, концентрацией $c = 100$ мг/кг, был приготовлен за час до использования путем растворения необходимого количества порошка Аласенс® в 5%-м стерильном растворе гидрокарбоната натрия.

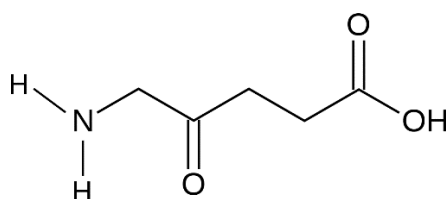


Рисунок 10. Структурная формула 5-АЛК.

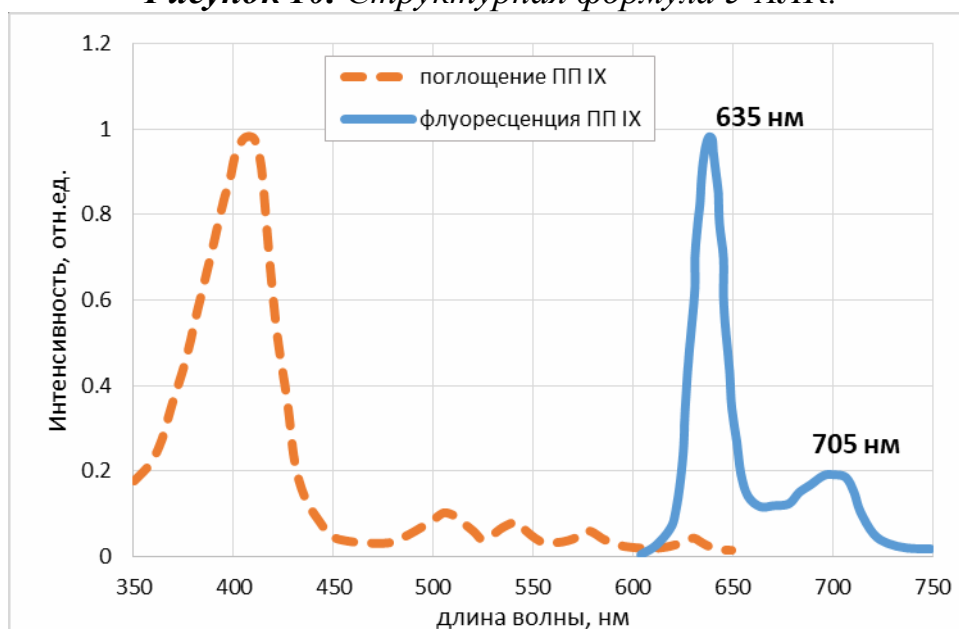


Рисунок 11. Спектр поглощения и флуоресценции 5-АЛК индуцированного ПП IX.

Для определения спектров флуоресценции исследуемых образцов была собрана экспериментальная установка (рис.12) на базе следующих модулей:

- Волоконно-оптический спектроанализатор ЛЭСА-01-БИОСПЕК [31];
- Компьютер с программным обеспечением;
- Лазер с фильтрами и системой ввода в оптическое волокно в качестве источника света для возбуждения флуоресценции (Источник излучения подбирается в соответствии со спектром поглощения исследуемого вещества).

-Y-образный волоконно- оптический диагностический зонд, включающий в себя приемные и облучающие волокна.



Рисунок 12. Схема экспериментальных исследований работы нейросистемы на лабораторных животных в совокупности с волоконно-оптическим анализатором ЛЭСА-01-БИОСПЕК. (1) Компьютер с программным обеспечением, (2) спектроанализатор, (3) лазерный источник.

Излучение лазерного источника (3) поступает на входной торец диагностического волокна и подается на исследуемый образец. Оптический путь фотонов в биоткани имеет траекторию формы «банана» к приемному волокну, соединенному со спектрометром, после чего, сигнал со спектрометра поступает на ПК (1) и обрабатывается программой UnoMomento.

Структура оптического волокна, используемого для доставки излучения от источника света до образца, а также от образца до спектроанализатора позволяет минимизировать потери излучения при рассеянии.

Спектроанализатор ЛЭСА-01-БИОСПЕК, имеющий спектральный диапазон измерений 400-1100 нм, сопровождается программным обеспечением, позволяющим рассчитывать спектр флуоресценции исследуемых образцов с нормировкой на аппаратную функцию, полученную на основании спектра калиброванного источника света.

Исследования накопления ФС в условиях *in vitro* были проведены на клеточных культурах с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа.

Визуализация и спектроскопическое исследование внутренней волоконно-оптической структуры имплантата *in vitro* проводились методом флуоресцентной микроскопии с использованием лазерного сканирующего инвертированного конфокального микроскопа LSM-710 (Carl Zeiss). Метод конфокальной лазерной сканирующей микроскопии обладает значительным контрастом и пространственным разрешением по сравнению с классической световой микроскопией, что достигается при помощи точечной диафрагмы (пинхола), размещённой в плоскости изображения и ограничивающей поток фонового рассеянного света, излучаемого не из фокальной плоскости объектива. Поскольку на образце регистрируется только одна флуоресцирующая точка, то для формирования двумерного или трехмерного изображения требуется растровое сканирование образца. Во время сканирования лазерный пучок перемещается по

образцу в горизонтальной плоскости с использованием одного или нескольких зеркал с управляемым углом наклона.

Для получения изображения с двухмерного объекта, находящегося в фокальной плоскости конфокальный лазерный микроскоп выполняет следующие три группы действий:

- Полинейное сканирование образца сфокусированным лазерным лучом, отражаемым по осям X и Y принимаемым гальванометрическими сканнерами.
- Попиксельный прием флуоресцентного излучения деталей исследуемого образца посредством фотоумножителя (ФЭУ).
- Цифрование информации, содержащейся в сигнале ФЭУ (для отображения данных попиксельно переносятся с цифровой матрицы на экран монитора)

Объектив микроскопа используется для фокусировки лазера, где тот в свою очередь возбуждает флуоресценцию образца. Флуоресцентное излучение собирается объективом и перенаправляется в приемник посредством дихроического расщепителя луча. Интересующая длина волн флуоресцентного излучения задается с помощью фильтра излучения, который ставится на пути возбуждающей лазерной линии. Точечная диафрагма находится перед приемником на плоскости, соответствующей фокальной плоскости объектива. Свет, исходящий из плоскостей выше и ниже фокальной при попадании в точечное отверстие оказывается несфокусированным и, соответственно, не влияет на получаемое изображение. Конфокальный микроскоп имеет разрешение σ и ограничено оно дифракционным пределом:

$$\sigma = \frac{\lambda}{\pi(NA)} \quad (6)$$

где λ — длина волны излучения, $(NA) = n \sin \alpha$ — числовая апертура объектива, n — показатель преломления среды между образцом и объективом, α — половина угла, который «захватывает» объектив. В видимом диапазоне разрешение составляет ~ 250 нм ($NA=1,45$, $n=1,51$). Для возбуждения флуоресценции образцов в систему микроскопа предустановлены лазеры с заранее отъюстированными световодами

(Pigtail-coupled). Возбуждение в видимом диапазоне осуществляется посредством следующих источников излучения: Ar-лазер (458, 488, 514 нм) 25 мВт; DPSS-лазер (561 нм) 20 мВт; HeNe-лазер (633 нм) 5 мВт. Также возможно сочетание LSM 710 с короткоимпульсным фемтосекундным инфракрасным лазером с перестраиваемым диапазоном (800 - 1500 нм) для мультифотонного возбуждения флуоресценции.

2.3 Исследования накопления фотосенсибилизатора с разрешением по времени *in vitro* и *in vivo*

Исследование внутриклеточного распределения фотосенсибилизатора *in vitro*

Внутриклеточное распределение фотосенсибилизатора было проведено с использованием клеточной линии человеческих моноцитов THP-1 и крысиной линии опухоли головного мозга глиома С6. За день до исследования клетки были посеяны на 35 мм чашки Петри с тонким стеклянным дном (0.17 мм), предварительно обработанным 0.1% раствором желатина. Клетки культивировались в среде RPMI 1640, содержащей 10% сыворотки крови молодых телят FBS. В день исследования, раствор или водный коллоид ФС инкубировали с клетками в течение от 2 до 24 часов при температуре 37°C. Микроскопические изображения клеток были получены с помощью микроскопа LSM-710-NLO (Carl Zeiss, Германия), при возбуждении фемтосекундным лазером Chameleon Ultra II (80 МГц, 140 фс, длина волны 980 нм, Coherent Inc., USA).

Оценка времени жизни флуоресценции с использованием лазерного сканирующего микроскопа

В работе использован метод регистрации времени жизни флуоресценции ФС с помощью FLIM приставки лазерного сканирующего микроскопа, позволяющий оценивать распределение времени жизни в каждой точке исследуемого образца. Реальная локализация (область накопления) и спектр флуоресценции ФС или эндогенного флуорофора оценивается путем анализа изображения, полученного с помощью флуоресцентной микроскопии. Исследования кинетических

характеристик флуоресценции проводили с помощью лазерного сканирующего микроскопа LSM-710-NLO (Carl Zeiss, Germany). Возбуждение проводили фемтосекундным импульсным лазером Chameleon Ultra II (80 МГц, длительность импульса 140 фс, диапазон длин волн 690–1060 нм, Coherent Inc., USA), длина волны 980 нм. Изображения получали при следующих режимах сканирования: 20× объектив, размер сканируемой области 400×400 мкм, разрешение 1024×1024 пикселей, скорость сканирования 1.27–3.15 мкс/пиксель. Полное время получения изображения 18.7 с. Средняя плотность мощности, измеренная с помощью измерителя мощности Coherent (USA) на уровне расположения образца составляла 5.42 мВт, на сканирующее пятно, размером 10 мкм, приходилась плотность мощности 7 кВт/см².

Оценка времени жизни флуоресценции с использованием стрик-камеры

Для исследования кинетики фотолюминесценции ФС ранее был разработан измерительный комплекс, основанный на стрик-камере с пикосекундным временным разрешением (15 пс) Hamamatsu C10627-13, сопряженной с волоконно-оптическим спектрометром. Для возбуждения использовали полупроводниковый лазер Hamamatsu с длительностью импульса 67 пс и с длиной волны 637 нм. В процессе измерений использовали метод времякоррелированного счета единичных фотонов. Фотолюминесценция, возбужденная в образце лазерным источником, собирается в оптическое волокно и далее попадает в монохроматор. Излучение, прошедшее монохроматор, 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 потоку электронов прикладывается переменное поле, перпендикулярное направлению их движения, осуществляющее развертку по времени. После развертки электроны попадают на микроканальную пластину, после чего сигнал регистрируется CCD камерой и передается на компьютер, где происходит математическая обработка полученного спектра тушения флуоресценции с целью получения информации о времени жизни флуоресценции

и о распределении числа фотонов зарегистрированных стрик-камерой между компонентами времени жизни.

2.4 Магнитно-резонансная томография

Магнитно-резонансная томография (МРТ) является способом визуализации при исследовании внутренних органов и тканей с использованием явления ядерного магнитного резонанса. Метод ядерного магнитного резонанса позволяет изучать внутренние органы на базе оценки содержания водорода в тканях, а также особенностей их магнитных свойств, связанных с нахождением в окружении разных атомов и молекул. Метод МРТ основан на измерении электромагнитного отклика некоторых атомных ядер (например, ядер водорода) при возбуждении их определённым сочетанием электромагнитных волн в постоянном магнитном поле высокой напряжённости.

Водородное ядро присутствует в молекулах воды, и, следовательно, во всех тканях организма. Ядро водорода состоит из одного протона, который обладает магнитным моментом (спином) и меняет свою пространственную ориентацию в мощном магнитном поле, а также при воздействии дополнительных полей, называемых градиентными, и внешних радиочастотных импульсов, подаваемых на специфической для протона при данном магнитном поле резонансной частоте.

Во внешнем магнитном поле магнитный момент протона будет либо сонаправлен, либо противоположно направлен магнитному полю. При воздействии на исследуемую область электромагнитным излучением определённой частоты часть протонов поменяют свой магнитный момент на противоположный, а потом вернуться в исходное положение. При этом система сбора данных томографа регистрирует выделение энергии во время релаксации предварительно возбужденных протонов.

Атомы водорода мягких тканей дольше выстраивают свой спин в изначальное положение по сравнению с плотными тканями. За счет разности в детектируемых энергетических сигналах возможно получать подробные изображения тканей тела (в особенности, мягких тканей, таких как мышцы и мозг).

Установка МРТ включает в себя следующие элементы: магнит; градиентные катушки; приемник радиоимпульсов; передатчик (генератор) радиоимпульсов; фарадеевский экран; источник питания, охлаждающая система; система обработки данных. Для получения магнитного резонанса необходимо однородное, постоянное и стабильное магнитное поле, которое генерирует магнит. Величина напряженности поля измеряется в Теслах и является основной характеристикой мощности установки.

Градиентные катушки создают однородное линейное и управляемое изменение поля в конкретном направлении. Главное значение катушек заключается в создании изображения за счет добавления к общему однородному магнитному полю градиентного магнитного возмущения, что обеспечивает локализацию ЯМР-сигнала и точное соотношение полученных данных и исследуемой области. Градиент обеспечивает выборочное возбуждение протонов в нужной области. От мощности и скорости действия катушек зависит быстродействие, отношение сигнал/шум, разрешающая способность томографа.

Для возбуждения ядер используют радиочастотный (РЧ) импульс с частотой, близкой к ларморовой. РЧ-колебания и импульсы формируются передатчиком, а необходимая частота колебаний создается синтезатором частоты, сигнал с которого впоследствии модулируется для создания требуемой для РЧ-возбуждения формы импульса, которая в свою очередь влияет на контраст получаемого изображения.

В качестве приемника в томографах используется высокочувствительный малошумящий усилитель сигнала, который работает в области сверхвысоких и высоких частот. Снимаемый ЯМР-сигнал с амплитудой несколько микровольт в приемнике усиливается от 500 до 1000 раз, после чего преобразуется из высокой частоты (МГц) в низкую (кГц).

РЧ-катушки необходимы для создания переменного магнитного поля, которое поворачивает суммарную намагниченность в импульсной последовательности. В большинстве магнитов основное поле направлено вдоль отверстия магнита, поэтому катушка создает переменное магнитное поле, которое перпендикулярно отверстию.

Полученный сигнал должен быть преобразован в цифровой код, который является удобным для обработки на компьютере. Такая оцифровка выполняется с помощью аналого-цифрового преобразователя.

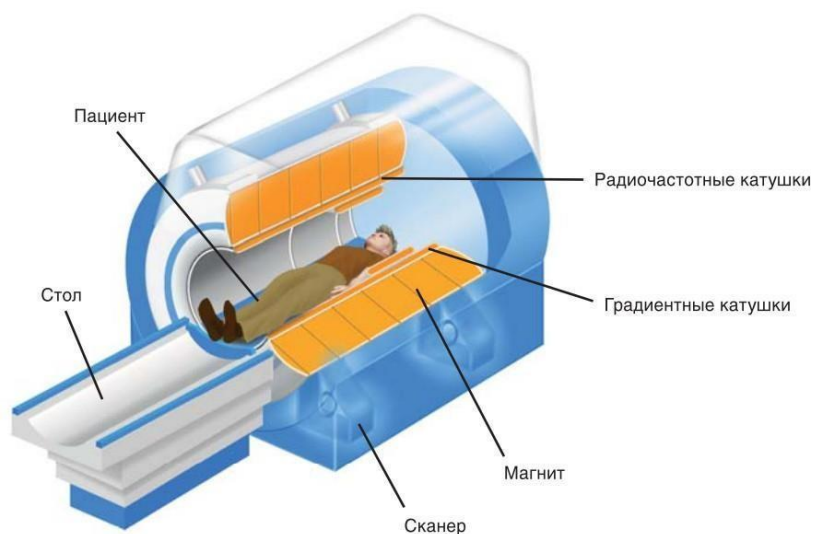


Рисунок 13. Схематическое изображение МРТ-сканера

В данной работе МРТ является методом контрольного анализа биосовместимости и биоинертности разработанного оптического нейропорта. Кроме того, визуализация и контроль роста опухоли, внутричерепное поведение нейропорта в контакте с опухолью, и оценка эффективности проведенной фототерапии посредством разработанного нейропорта осуществлялись с помощью 7 Тл - биоспектротомографа BioSpec 70/30 USR (Bruker, Германия).

2.5 Позитронно-эмиссионная томография

Позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) – это диагностический метод ядерной медицины, который основан на применении радиофармпрепаратов (РФП), меченных короткоживущими позитрон-излучающими радионуклидами. РФП могут быть включены в состав биологических веществ, которые принимают участие в метаболизме, в результате чего ПЭТ позволяет оценить процессы, происходящие в отдельных органах, тканях и организме в целом. Наиболее распространенным в онкологии, в силу высокого потребления глюкозы опухолями, является препарат дезоксиглюкоза (ФДГ), меченый радиоактивным изотопом фтора ^{18}F . Фтордезоксиглюкоза (ФДГ) является аналогом глюкозы на нескольких этапах метаболизма. Однако отличительной особенностью ФДГ является то, что ее метаболизм прекращается преждевременно, в результате чего продукт накапливается в тканях. Благодаря своей высокой интенсивности накопления в злокачественных новообразованиях, ^{18}F –ФДГ позволяет оценить степень злокачественности эффективность противоопухолевого лечения, распространенность опухолевого процесса.

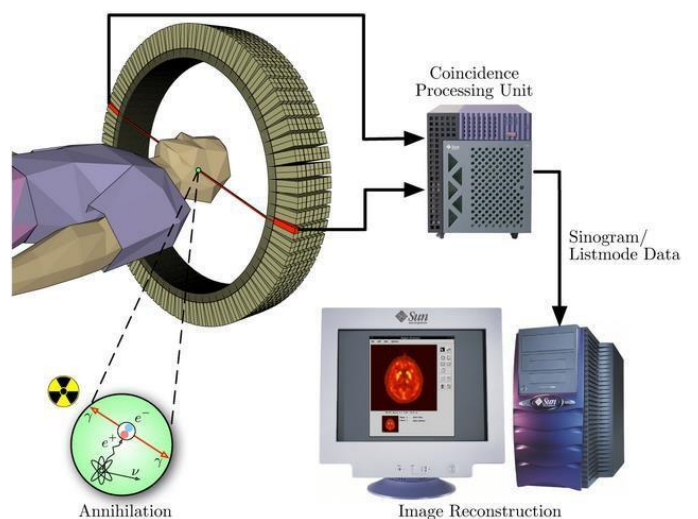


Рисунок 14. Схематическое изображение ПЭТ-сканера

Принцип работы ПЭТ основан на распаде радиоактивных атомов, испускающих позитроны. В случае с ФДГ распад претерпевает радиоактивный ^{18}F ($T=109$ мин), испуская позитрон β^+ , ввиду своей нестабильности и избыточного числа протонов. В результате позитронной эмиссии ядро стабилизируется путем

превращения протона в нейтрон, при этом атомное число уменьшается на единицу. Испущенный ядром позитрон имеет некоторое расстояние свободного пробега, которое он проходит до столкновения с электроном близлежащего атома. В результате столкновения позитрона с электроном образуется атом позитрония. Однако в зависимости от расположения спинов электрона и позитрона возникают атомы орто – и пара- позитрония. Время жизни этих атомов различно, однако ПЭТ не чувствительна к этому и в данном приближении они распадаются «мгновенно». При распаде позитрония происходит аннигиляция электрона и позитрона, в результате чего рождаются два гамма-кванта с энергией 511 КэВ каждый и с противоположно направленными векторами движения, почти на 180 градусов друг от друга. В сущности гамма-кванты легко выходят за пределы биологической ткани, в которой рождаются и регистрируются внешними детекторами. Противоположно направленные гамма-лучи (полученные в результате аннигиляции) регистрируются детекторами и называются линией совпадения. Изображения на томографе формируются в результате сбора данных и реконструкции пространственного распределения зонда по линиям совпадения, что позволяет получить карту интенсивности радиоактивного распада внутри биологических тканей. Анализ полученных изображений позволяет выявить области повышенной или пониженной концентрации позитронного зонда, что в конечном итоге свидетельствует об отклонениях в функционировании отдельных органов и тканей. Таким образом, в процессе исследования РФП вводится внутривенно пациенту, после чего изотоп попадает в кровяное русло, где циркулирует и достигает различных органов в различные моменты времени. В момент аннигиляции томограф регистрирует локализацию изотопа и его концентрацию по событиям, произошедшем на линиях совпадения. В свою очередь пространственное и временное распределение РФП зависит от биохимической и физиологической реакций исследуемого органа на присутствие препарата. Таким образом, в ходе исследования решается обратная задача – определение пространственного распределения источников излучения по пространственному распределению интенсивности гамма-поля. В случае наличия центров аномального поглощения зонда, осуществляется анализ локализации очагов, а именно находятся

все три пространственные координаты, рассчитываются размеры и форма очагов.

Заключение ко второй главе

Таким образом, в данной главе были отражены все методики, которые использовались в работе для анализа тех или иных свойств, тем самым осуществляя многосторонний анализ процессов. МРТ и ПЭТ являлись при этом контрольными методами, что доказывало точность оптических технологий. В частности, большое внимание было уделено описанию используемых в работе флуорофоров, которые являлись впоследствии индикаторами состояния биологической ткани как *in vitro*, так и *in vivo*.

5. ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА НЕЙРОСИСТЕМЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ И ПРОФИЛАКТИКИ ГЛУБОКОЗАЛЕГАЮЩИХ ОПУХОЛЕЙ МОЗГА

В данной содержится описание процесса и результаты разработки системы для внутричерепной имплантации с целью терапии и предотвращения рецидивирования глиом головного мозга. Оптоволоконная система должна выполнять роль структуры, способствующей и задающей направление распространению структурно-функциональных единиц нервной системы, а также роль порта для доставки препарата (фотосенсибилизатор в молекулярной и нано-формах) и лазерного излучения с целью осуществления мониторинга процессов, проведения регулярной флуоресцентной диагностики и своевременной фотодинамической терапии зондируемой области. Основная функция разработанной системы состоит в том, чтобы направить рост клеток глиомы, локализованных в области, прилегающей к месту удаленной опухоли, вдоль волокон по направлению к проксимальной части волоконно-оптического имплантата (нейропорт) с целью их регистрации по сигналу фотолюминесценции и последующей их деструкции в результате фотодинамического воздействия. Разработанная оптоволоконная система имеет следующие составные части: внешний каркас, многофункциональную внутреннюю структуру, созданную на базе пористых оптических волокон, покрытых питательной средой, которая содержит наночастицы ФС. Ввиду многокомпонентности системы процесс разработки и исследования был поэтапным – ход которого представлен ниже.

3.1. Разработка и результаты экспериментальных исследований внешнего каркаса нейропорта

В ходе работы были разработаны и апробированы на экспериментальных животных различные конструкции внешнего каркаса нейропортов, изготовленные из различных биосовместимых материалов. Полые имплантаты различных конструкций были предварительно спроектированы и адаптированы под размеры оптоволоконного диагностического зонда и анатомическую модель

черепной коробки экспериментальных животных (Рис.15).

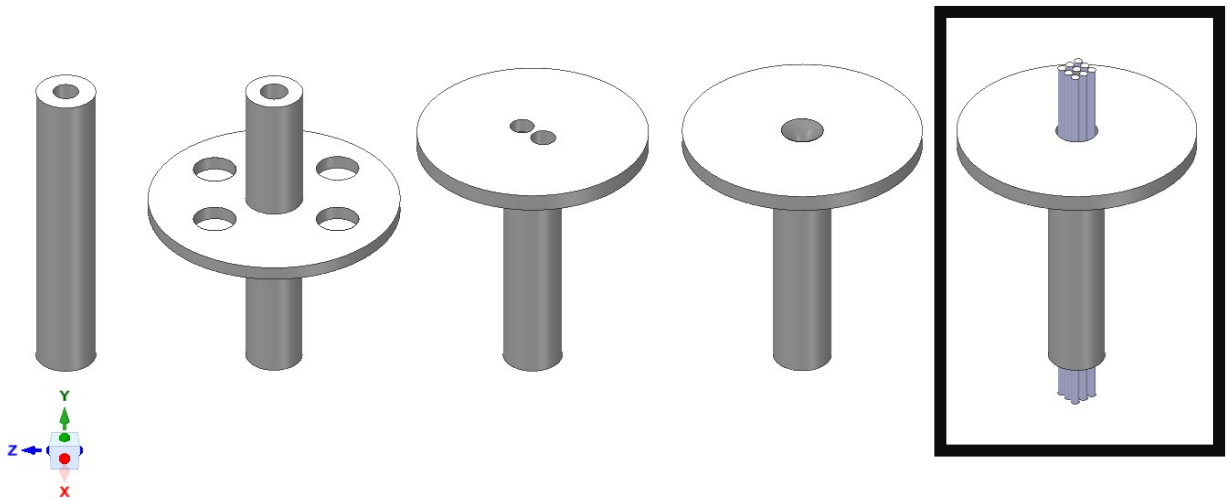


Рисунок 15. Схематическое изображение эволюции конструкции нейропорта. Выделен образец итоговой конструкции нейропорта, перспективный в качестве конечной разработки.

В ходе работы был изучен процесс биоинтеграции имплантатов, изготовленных из различных перспективных биосовместимых материалов: гидроксиапатит, сапфир и полимерный материал (рис. 16). Все виды нейропортов из различных материалов обладали оптимальной геометрией для целей исследования глубокозалегающих тканей мозга с цилиндрическим основанием ($D_{out} = 3$ мм, $h = 5$ мм) и расширением одного из торцов для фиксации в черепной коробке.



Рисунок 16. Имплантаты а) гидроксиапатитные; б) сапфировые в) биополимерные.

Гидроксиапатит является одним из наиболее биосовместимых материалов благодаря его химическому и физическому сходству с минеральными компонентами человеческой костной ткани. Пористая структура гидроксиапатита способна гарантировать прочное сцепление имплантата с костной тканью; поры обеспечивают механическую блокировку, приводящую к твердой фиксации материала. При этом костная ткань характеризуется эффективным естественным прорастанием в пористые структуры, за счет чего прочность и устойчивость имплантата увеличивается. Характеристики гидроксиапатита позволяют рассматривать его в качестве перспективного материала для создания нейропортов с внутричерепным интегрированием, позволяющих обеспечить локальный доступ к мозговой ткани. Имплантат на основе гидроксиапатита был синтезирован научно-исследовательской группой в Индии под руководством профессора Balla Vamsi Krishna [48]. Морской коралл, получаемый из мадрепоровых кораллов, был преобразован в гидроксиапатит в процессе гидротермического обмена. Нарезанные кораллы тщательно промывали с использованием дважды дистиллированной воды для удаления растворимых солей. После суточного просушивания при температуре 60°C кораллы очищали при помощи ультразвукового воздействия в ацетоне в течение 15 минут с последующим просушиванием при 70°C. Высушенные образцы подвергали обжигу при температуре 900° С в течение 2 часов для выделения карбоната кальция и удаления других органических соединений и примесей.

Сапфир также является материалом, перспективным для создания нейропортов. Он обладает механической прочностью, инертностью к биологическим тканям, в том числе, биосовместимостью с тканями мозга [49], в сочетании с оптической прозрачностью в широком диапазоне длин волн (коэффициент пропускания синтетического сапфира 0.17-6.5 μm) [50]. Каркас сапфирового нейропорта был получен исследовательской группой Института физики твердого тела РАН (Черноголовка, Россия) путем выращивания сапфировых капилляров по методу EFG/Степанова [51] с минимальной финишной механической обработкой.

С помощью 3D печати на 3D-принтере CubeX была реализована конструкция нейрпорта на основе PLA-пластика. PLA-пластик является биосовместимым, термопластичным алифатическим полиэфиром, структурная единица которого - молочная кислота. Натуральное природное сырье в составе PLA-пластика позволяет без угрозы для здоровья человека применять его для различных целей.



Рисунок 17. МРТ-снимки головного мозга крысы в режиме T2 на 5-е сутки после имплантации конструкций, изготовленных из различных перспективных биосовместимых материалов а) гидроксиапатит, б) сапфир, в) полимер PLA.

Стрелками отмечены проблемные области в процессе биоинтеграции имплантата.

Для проведения исследования процесса биоинтеграции каркаса разрабатываемого имплантата была проведена серия экспериментов на половозрелых самках крыс Вистар массой 200-220г. Хирургический процесс имплантации нейрпорта в мозговую часть черепа животных осуществлялся под кетаминным наркозом (2 мг/кг массы тела). Конструкции нейрпортов закреплялись подкожно на черепной коробке экспериментальных животных и служили в качестве порта, обеспечивающего постоянный доступ в ложе новообразования. В рамках исследования оптимальных физических характеристик комплекса и вопросов биосовместимости нейрпортов был произведен МРТ-контроль состояния лабораторных животных в послеимплантационный период. Серия экспериментов позволила выявить оптимальные свойства и природу материала для изготовления нейрпорта. По результатам МРТ отсутствие обширных абсцессов и отторжения имплантатов было установлено в случаях имплантации полимерных конструкций (рис. 17).

Успешная апробация позволила установить оптимальные свойства и внешние размеры мозговых имплантатов для экспериментальных животных: полимер PLA $d=3\text{ mm}$, $h=5\text{ mm}$. Стоит отметить, что конструкции на основе биосовместимого материала PLA были реализованы при помощи 3D печати, что позволяет с легкостью варьировать размеры имплантатов.

Таким образом, была установлена оптимальная конструкция имплантата, которая обеспечила наиболее выгодные условия для проведения ФД и ФДТ (рис.17в).

3.2. Разработка и результаты исследования спектрально-флуоресцентных свойств внутренней волоконной части нейропорта

Конфигурация нейропорта с внутренней волоконно-оптической структурой и биополимерным каркасом была признана оптимальной и наиболее перспективной в отношении реализации предполагаемых задач. Проведенный МРТ анализ мозга лабораторных крыс выявил отсутствие воспалительных реакций в области имплантации (рис. 18). Случаев отторжения имплантата также выявлено не было, что позволяет считать химические и физические характеристики данного комплекса оптимальными и доказывает перспективность дальнейших исследований.

Система из девяти кремниевых волокон с плоскими торцами (длиной 10 мм и диаметром 200 мкм) лежит в основе разработанной конструкции нейропорта. Полимерные волокна диаметром были частично освобождены от первичного защитно-упрочняющего покрытия с целью обеспечения равномерного выхода излучения из волокна по периметру нейропорта. Затем, оптоволокна помещались в осевое отверстие имплантата и фиксировались биосовместимым клеевым раствором. После чего, торцы волокон подвергались шлифовке и обтирке зачищенных концов мягким материалом для получения ровной, хорошо обработанной торцевой поверхности.

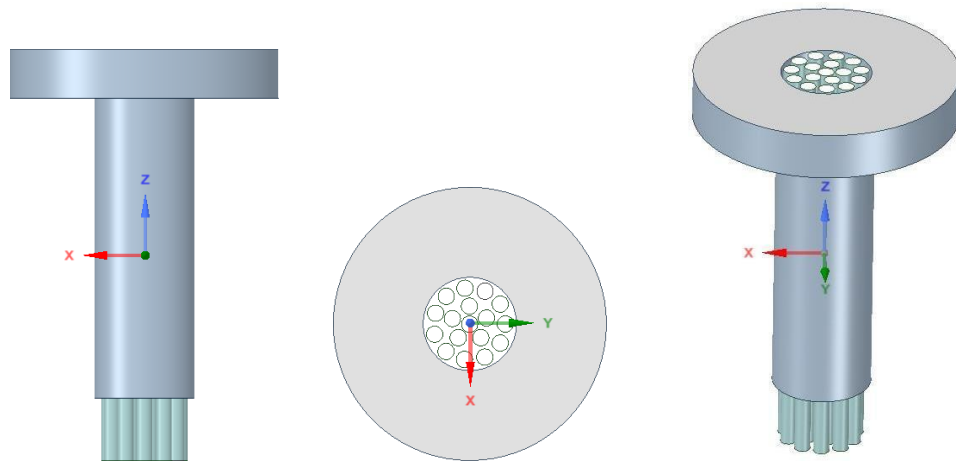


Рисунок 18. Модель оптимального нейропорта с внутренней волоконно-оптической структурой, спроектированная в среде ANSYS: Spaceclaim.

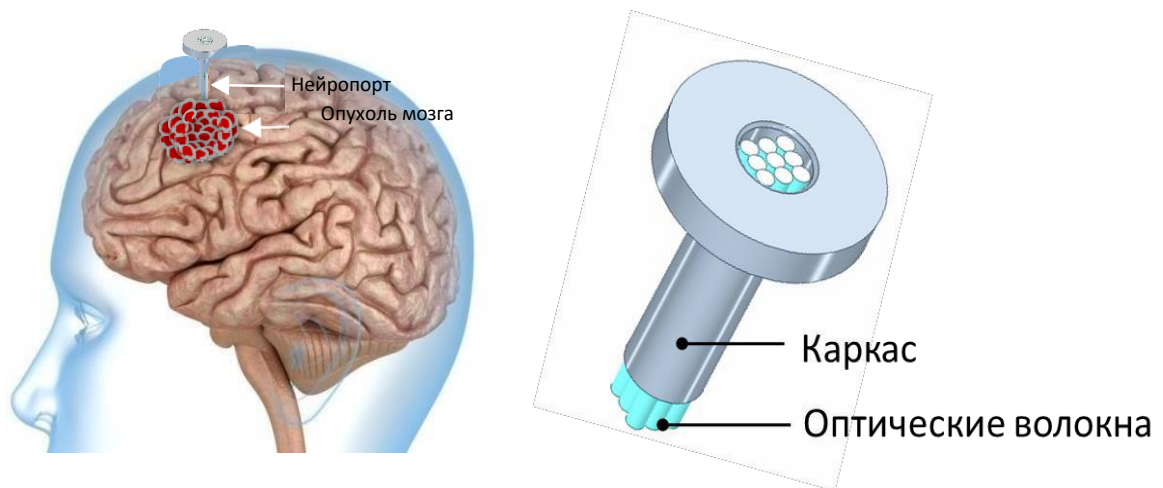


Рисунок 19. Схематическое изображение внутричерепной имплантации нейропорта. Оптимальная конструкция нейросистемы с внутренней оптоволоконной структурой.

3.3. Многосторонний анализ тканей мозга

Исследования на оптических фантомах

В рамках исследований предварительные оценки спектрально-флуоресцентных свойств нейропорта проводились на модельном образце фантоматкани головного мозга, состав которого был установлен посредством серии экспериментов.

Для приготовления фантома мягкой мозговой ткани необходимы рассеивающая и поглощающая среда. В качестве рассеивателя была использована

жировая эмульсия 20%-ый Lipofundin®. В качестве поглотителя выступала дистиллированная вода.

Подходящая концентрация жировой эмульсии в водном растворе подбиралась посредством сравнительного анализа образцов 1-3% жировой эмульсии с гомогенным мозгом мышей BALB/c. Экспериментальные образцы мозговой ткани и жировой эмульсии помещались между покровных стекол и плотно фиксировались, создавая слой толщиной 125 мкм. Дальнейшее исследование спектроскопических свойств образцов проводилось с помощью двулучевого спектрофотометра Hitachi U-3400. Образец мышинной мозговой ткани помещался в главный канал спектрофотометра, в то время как образец с жировой эмульсией располагали в канал сравнения для вычитания рассеяния с целью получения истинного сигнала поглощения. Спектры поглощения были получены в оптическом диапазоне 350-900 нм.

Изучение свойств разработанного оптического нейропорта проводились на фантоме с подобранной концентрацией, воспроизводящей оптические свойства ткани мозга. С целью сравнительного анализа проводимости излучения оптическими волокнами, внутренняя структура одного из образцов нейропорта была покрыта слоем среды 3% гидрогеля. Гидрогель-образующий состав компонентов включает в себя белки (коллаген и желатин) и полисахариды (крахмал и агароза).

Спектроскопические свойства разработанных нейропортов были изучены при помощи ФС АІРс. Молекулярный раствор АІРс концентрацией $c=0.1$ мг/мл был получен посредством растворения необходимого количества порошка АІРс в полярном растворителе диметилсульфоксид (ДМСО). Полученный раствор АІРс был добавлен в фантом подобранной концентрации для имитации условий взаимодействия опухолевых клеток с НЧ ФС *in vivo*. Последующие исследования разработанного нейропорта проводились методом ФД с использованием спектрометра LESA-01-BIOSPEC. Флуоресценция возбуждалась лазерным источником с плотностью мощности ~ 100 мВт / см² и на длине волны $\lambda = 632.8$ nm, что соответствует пику поглощения препарата.



Рисунок 20. а) Фантом мягкой ткани головного мозга (2.5% жировая эмульсия);
 б) Фантом мягкой ткани головного мозга (2.5% жировая эмульсия) с добавлением молекулярного раствора AlPc.

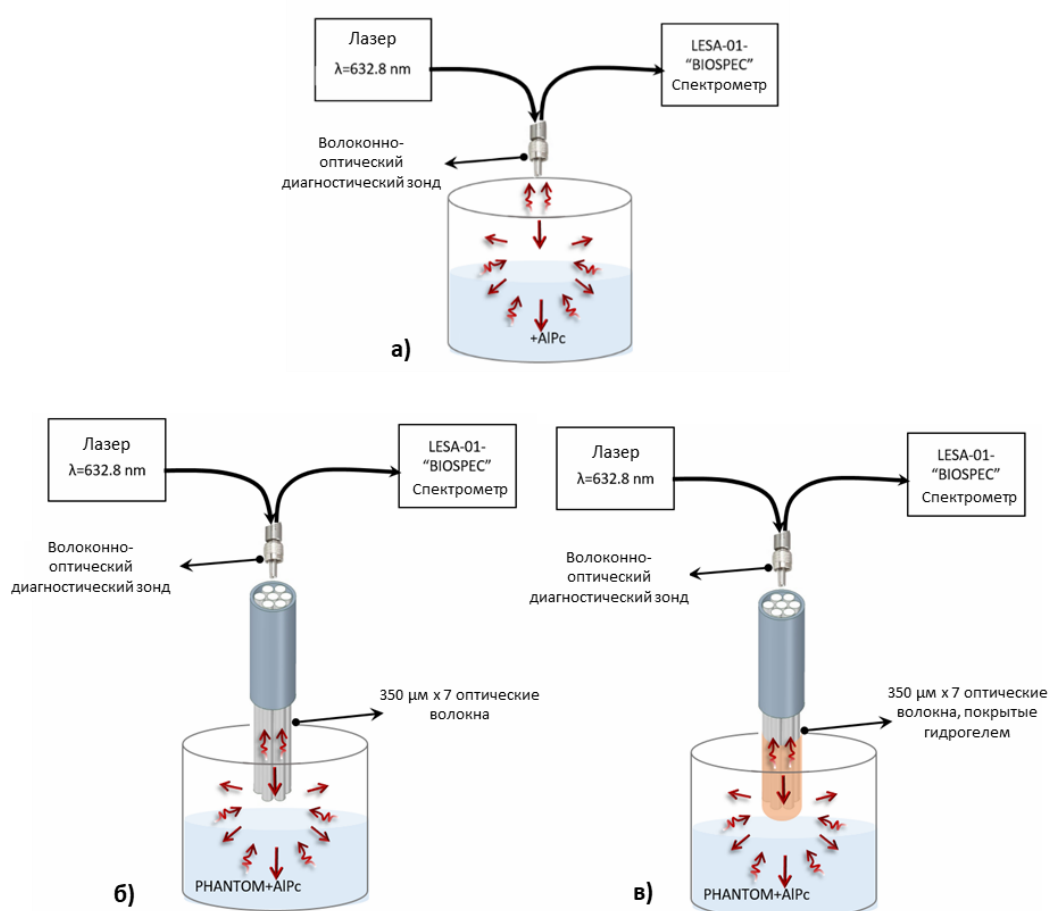


Рисунок 21. Схема эксперимента в режиме ФД. а) Прямое измерение флуоресценции «в контакте» с модельным образцом (фантом мягкой мозговой ткани с AlPc); б) измерение флуоресценции модельного образца через нейропорт; в) измерение флуоресценции модельного образца через нейропорт с гидрогелевым покрытием внутренней волоконно-оптической структуры.

Оптические свойства ткани оказывают влияние как на диагностическое, так и на терапевтическое применение света. Следовательно, определение оптических свойств ткани является основным шагом к проведению точных диагностических измерений и последующей терапии. Ряд экспериментов, посвященных оценке абсорбционных свойств ткани головного мозга, был проведен с использованием 1-3% жировой эмульсии с шагом 0,5%. Было обнаружено, что фантомная модель 2,5% -ной жировой эмульсии является наиболее подходящей для воспроизведения оптических свойств реальной ткани головного мозга. Фантом подобного состава позволяет компенсировать рассеяние при измерении поглощения реального образца мозговой ткани. Таким образом, полученный спектр поглощения мозговой ткани имеет максимум на длинах волн 453 нм (спектральная полоса *Соре*), 560 нм (что соответствует дезоксигенированной форме гемоглобина, содержащейся в ткани головного мозга) и 840 нм (что соответствует области поглощения липидов).

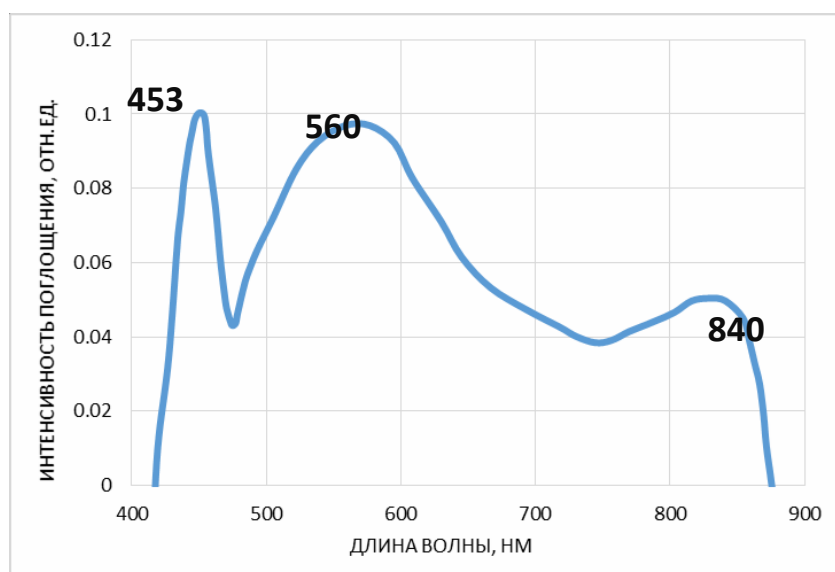


Рисунок 22. Спектр поглощения мозговой ткани мыши.

Спектрально-оптические свойства нейропорта были исследованы на 2,5% образце жировой эмульсии с добавлением АІРс. Во время регистрации флуоресцентного сигнала посредством волоконно-оптического нейропорта было зарегистрировано небольшое снижение интенсивности (15%), что связано с оптическими потерями на стыке диагностического зонда и нейропорта (рис. 23). После покрытия поверхности оптоволоконной структуры нейропорта гидрогелем наблюдалось незначительное снижение интенсивности флуоресцентного сигнала (рис. 23). Таким образом, разработанный нейропорт на основе оптических волокон, покрытых гидрогелевым соединением, способствует получению флуоресцентного сигнала с высокой точностью, сравнимого с прямым измерением «в контакте» с тканью. Максимум на длине волны $\lambda=632,8$ нм соответствует обратному сигналу рассеянного лазерного излучения, а пик на длине волны $\lambda=682$ нм коррелирует с флуоресценцией АІРс.

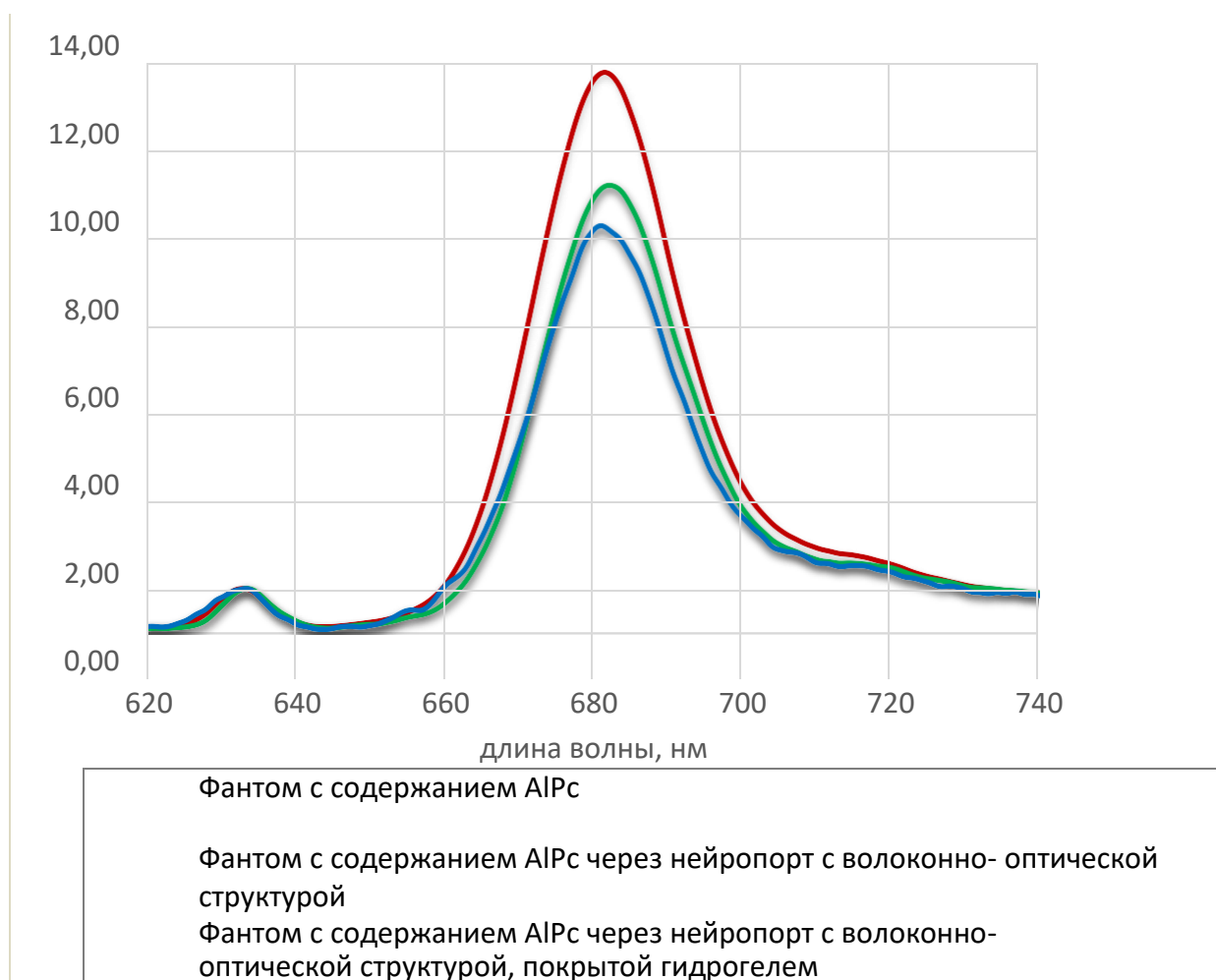


Рисунок 23. Спектр флуоресценции модельного образца: фантома мягкой мозговой ткани (2.5% жировая эмульсия) с содержанием ФС АІР, полученный

при: ●) прямое измерение через диагностический зонд; ●) через волоконно-оптический нейропорт; ●) через нейропорт с волоконно-оптической структурой, покрытой гидрогелем. Спектры нормированы на линию лазерного излучения ($\lambda_{ex}=632.8 \text{ nm}$).

Исследования на клеточных культурах

Оптические кремниевые волокна длиной 10 мм и диаметром 200 мкм были очищены от первичной защитно-упрочняющей оболочки и стерилизованы посредством автоклавирования (121 ° C, 20 мин). Затем было подготовлено три экспериментальных образца. Волокна для первого образца покрывали 3% гидрогелем, для другого - коллоидным гидрогелем nAIPc (3% гидрогелем с добавлением коллоидного раствора nAIPc концентрацией $c=10 \text{ мг/л}$), волокна для третьего образца оставляли без покрытия. Для проведения исследования направленного роста клеток вдоль структуры оптических волокон *in vitro* использовали культуру клеток опухоли мозга крысы глиома С6. Клетки поддерживали субкультивированием в среде RPMI. Затем клетки снимали с поверхности пластиковых культуральных флаконов с помощью трипсина. Опухолевые клетки инкубировали с различными образцами внутренней волоконно-оптической структуры в течение трех суток в плоскодонных культуральных панелях при 37°C. Визуализация образцов осуществлялась методом флуоресцентной микроскопии с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM-710 (Carl Zeiss). Сигнал автофлуоресценции клеток глиомы С6 регистрировался при возбуждении на длине волны $\lambda=488 \text{ нм}$, флуоресценция nAIPc возбуждалась на длине волны $\lambda=632.8 \text{ нм}$. Важно отметить, что гидрогель и коллоидный гидрогель в свободной форме не флуоресцируют при воздействии на длине волны 632.8 нм. Однако, как будет продемонстрировано далее в данной работе, во время инфильтрации клеток глиомы С6 в коллоидный гидрогель, nAIPc вовлекаются в метаболический процесс клеток и активируются.

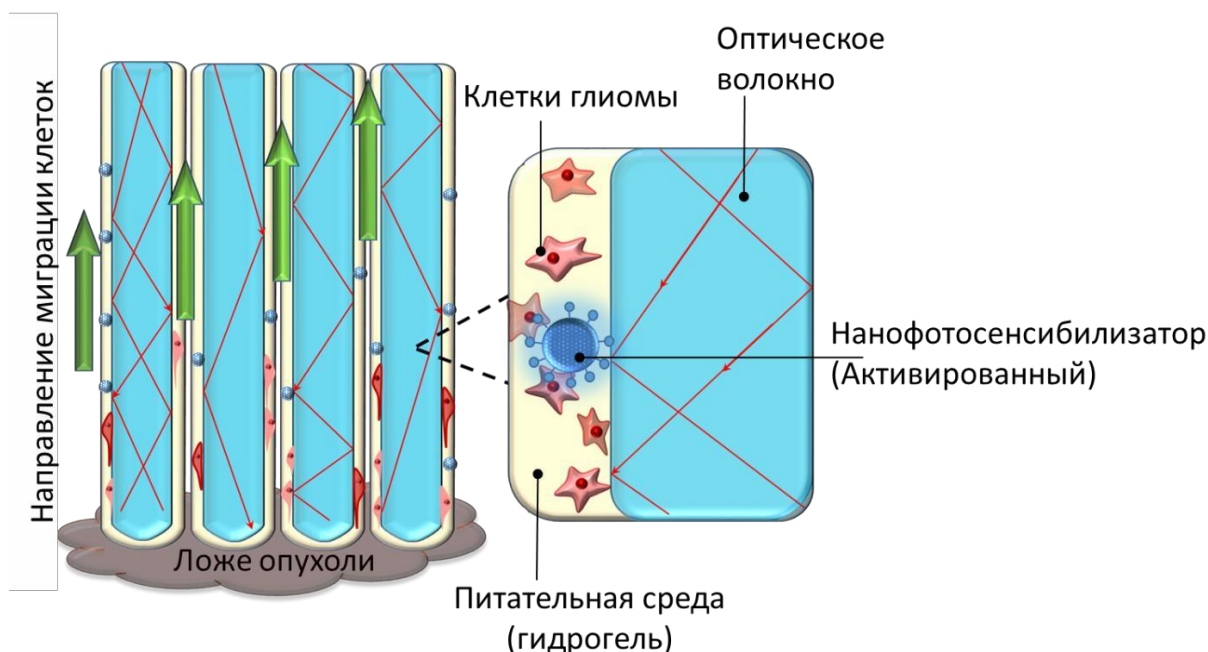


Рисунок 24. Схема внутренней волоконно-оптической структуры нейропорта с гидрогелевым покрытием, содержащим НЧ ФС. Процесс взаимодействия с опухолевыми клетками.

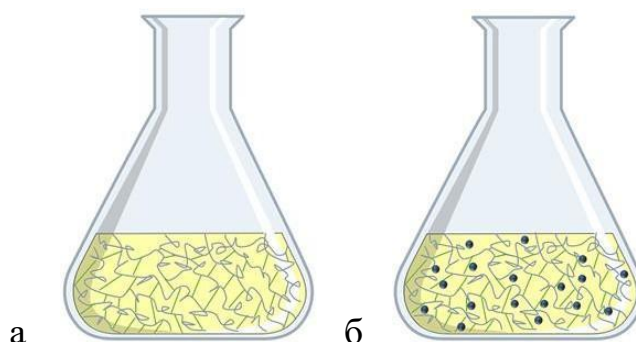


Рисунок 25. Структуры полимерных цепочек а) гидрогеля; б) коллоидного гидрогеля с nAIPs.

С применением лазерной сканирующей конфокальной микроскопии были визуализированы процессы роста клеток злокачественной глиомы С6 вдоль оптических волокон, которые в планах будут составлять внутреннюю структуру мозгового имплантата. Исследования *in vitro* показали, что клетки злокачественной глиомы формируют вокруг оптических волокон агломераты, а также образуют крепления и пролиферируют вдоль волоконных структур (рис. 26). Полученные результаты дают основания полагать, что в условиях *in vivo* может быть реализован подход направленного роста клеток злокачественной глиомы из внутрочерепной области, вглубь разрабатываемого в рамках исследования имплантата, с

последующим фотодинамическим воздействием, приводящим к гибели клеток.

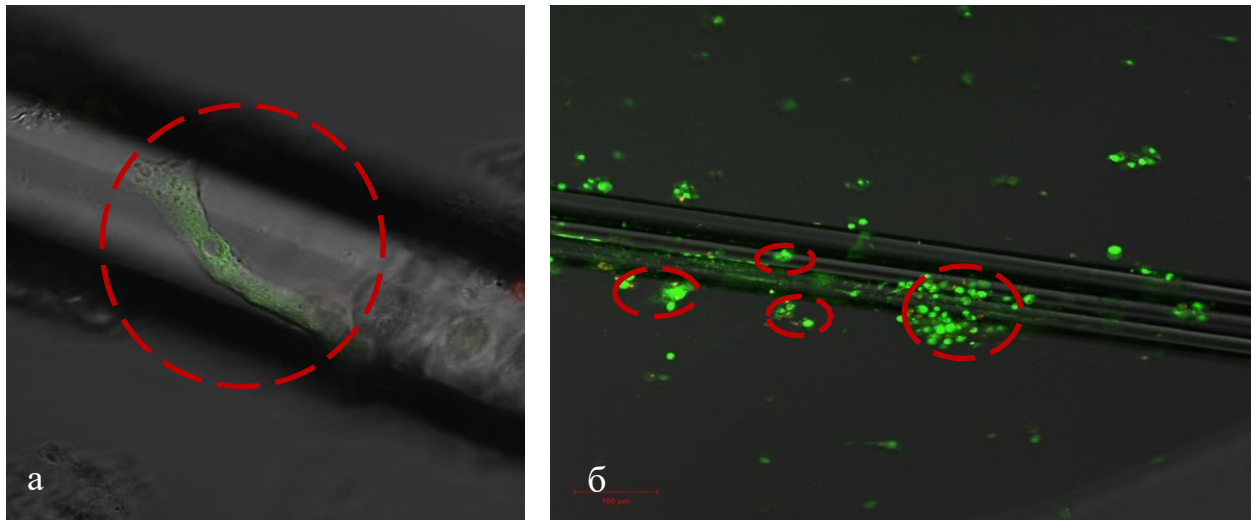


Рисунок 26. Флуоресцентные изображения роста вдоль оптического волокна а) единичной клетки глиомы С6 (выделенная область, х63); б) скопления клеток глиомы С6 (выделенная область, х20).

Во время микроскопического исследования образцов было продемонстрировано, что клетки глиомы С6 инфильтрируют локально в гидрогелевую матрицу поверхностного покрытия оптических волокон (рис. 27). Никаких признаков токсичности со стороны волокон или гидрогеля в отношении клеток не наблюдалось. Было показано, что клетки глиомы захватывают НЧ АІРс из коллоидного гидрогеля во время пролиферации, что подтверждается спектроскопически наличием флуоресцентного сигнала ФС внутри клетки (рис. 28). Следует дополнительно отметить, что свободная форма НЧ АІРс не является фотоактивной, тогда как в условиях взаимодействия с патологическими клетками НЧ АІРс приобретают флуоресцентные свойства молекулярного раствора АІРс. Таким образом, накопленные опухолевыми клетками НЧ ФС могут служить в качестве индикаторов патологических процессов. Обнаружение опухолевых клеток может быть осуществлено по наличию флуоресцентного сигнала, соответствующего фотоактивированным НЧ АІРс ($\lambda_{em} = 682 \text{ нм}$).

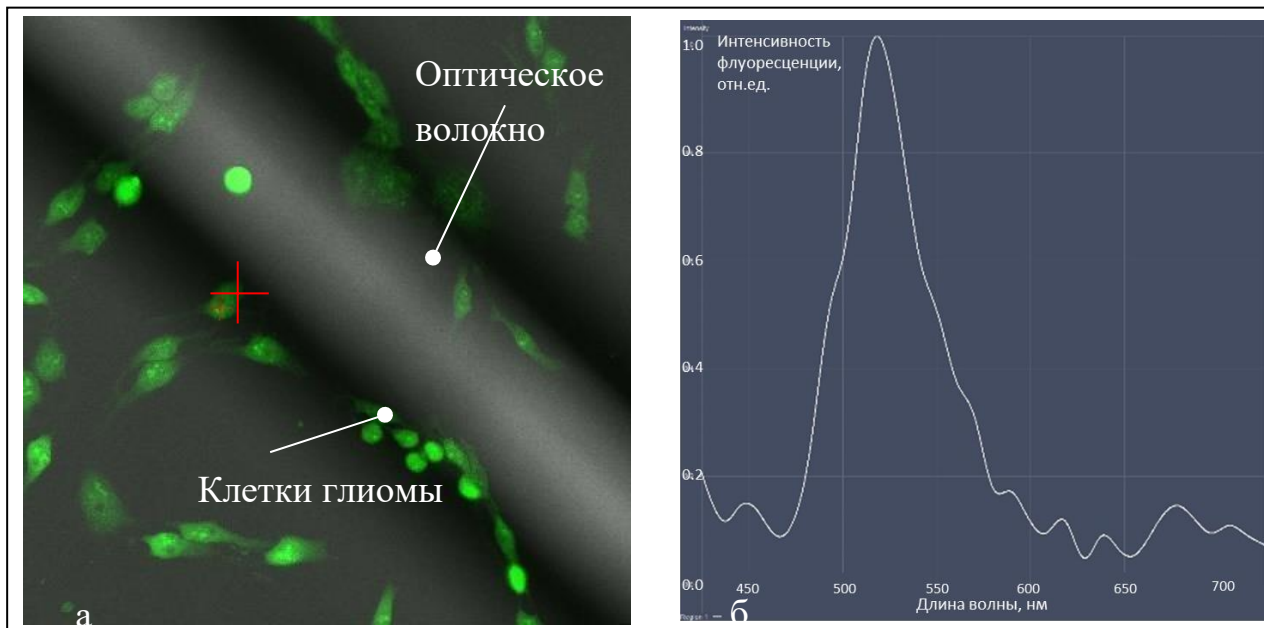


Рисунок 27. Флуоресцентное изображение, показывающее локальную инфильтрацию клеток глиомы С6 в гидрогелевый матрикс вдоль оптических волокон с покрытием. а) Клетки глиомы С6 (зеленая автофлуоресценция, $\lambda_{ex}=488$ нм, $\times 63$); б) Спектр автофлуоресценции клеток глиомы С6 ($\lambda_{ex}=488$ нм, $\lambda_{em}=520$ нм).

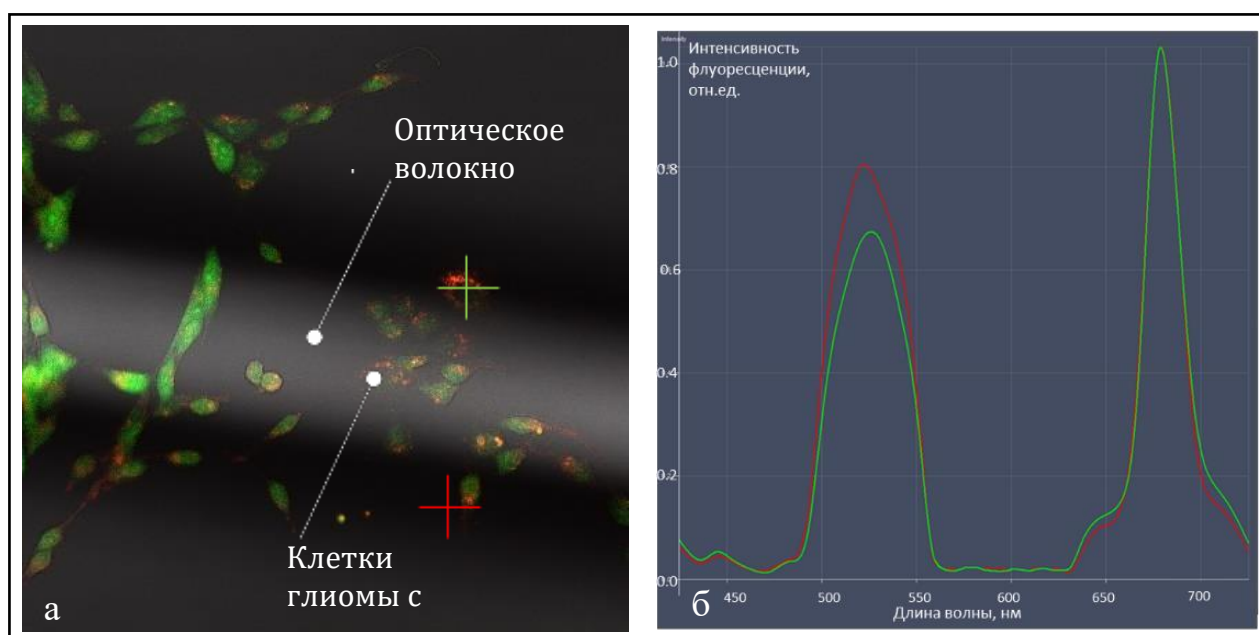


Рисунок 28. Флуоресцентное изображение, показывающее локальную инфильтрацию клеток глиомы С6 в коллоидный гидрогелевый матрикс, содержащий НЧ ФС АІРс вдоль оптических волокон с покрытием. а) Клетки глиомы С6 (зеленая автофлуоресценция, $\lambda_{ex}=488$ нм; красная – флуоресценция НЧ АІРс, $\lambda_{ex}=633$ нм, $\times 63$); б) Спектр флуоресценции

внутреннего пространства клеток глиомы С6 (автофлуоресценция клеток; $\lambda_{ex}=488$ нм, $\lambda_{em}=520$ нм; флуоресценция НЧ АІРС: $\lambda_{ex}=633$ нм, $\lambda_{em}=682$ нм).

Исследования на экспериментальных животных

ФД и ФДТ являются перспективными физическими методами, нацеленными на успешную фототераностику опухолей головного мозга при помощи разработанных волоконно-оптических нейропортов. Существуют различные типы ФС и различные методы их введения. Однако, в случае предлагаемого подхода перспективным представляется локальное введение препарата. А именно, покрытие имплантируемой в ложе опухоли внутренней волоконно-оптической структуры нейропорта коллоидным гидрогелем, содержащим НЧ ФС АІРС. Предложенные наночастицы отличаются изменением их спектроскопического поведения при взаимодействии с биоконпонентами патологической природы *in vivo*, так что первоначально не фотоактивные наночастицы приобретают способность флуоресцировать. Предложенная технология позволит осуществлять локальную доставку препарата в ложе новообразования, проводить ФД посредством регистрации флуоресценции фотоактивированных НЧ ФС и вызывать последующую деструкцию патологических клеток методом ФДТ. Данный подход является перспективным с точки зрения экспериментальных исследований.

Однако, с целью потенциального внедрения разработанной конструкции оптического имплантата в клиническую практику, исследования *in vivo* спектрально-оптических свойств нейропорта с внутренней волоконно-оптической структурой в данной работе проводились с использованием разрешенного для клинического применения ФС 5-АЛК индуцированный ПП ІХ. Ранее 5-АЛК индуцированный ПП ІХ продемонстрировал высокий фотодинамический эффект в отношении диагностики и терапии онкологий различной локализации. Таким образом, в рамках исследования была проведена серия экспериментов на половозрелых самках крыс Вистар массой 200-220г в начале эксперимента, у которых моделировали мультиформную глиобластому путем стереотаксической имплантации $5 \cdot 10^5$ клеток глиобластомы линии С6 в область стриатума [51].

Полимерные конструкции имплантатов с внутренней волоконно-оптической структурой закреплялись подкожно на черепной коробке экспериментальных животных таким образом, чтобы волоконно-оптическое основание имплантата находилось в ложе опухоли. Динамическую магнитно-резонансную томографию (МРТ) головного мозга крыс проводили еженедельно, начиная с 5-х суток после моделирования глиобластомы, на томографе («BioSpec 70/30» Bruker, Германия) с постоянным магнитным полем 7 Тл.

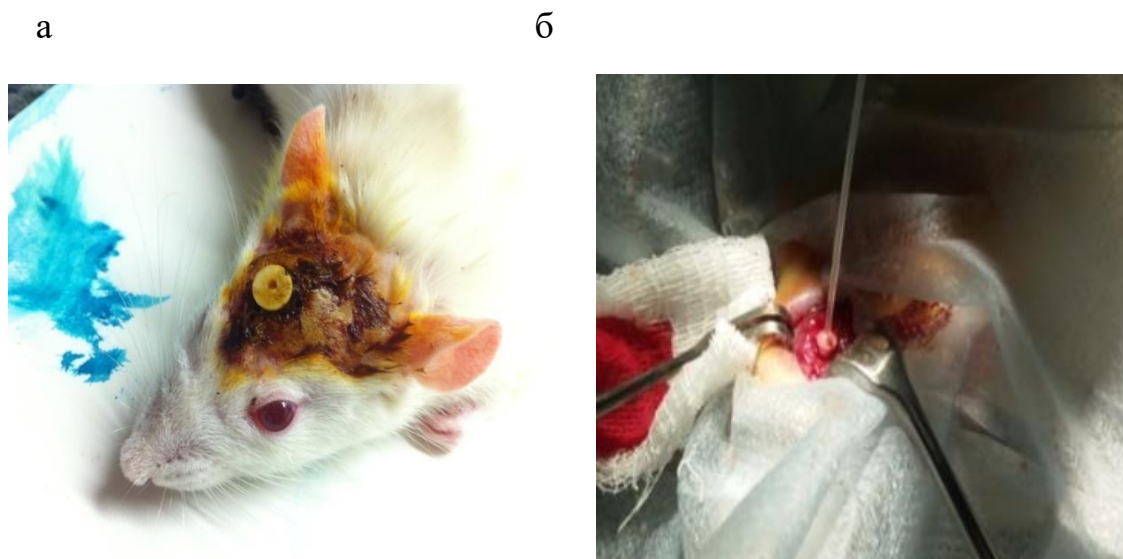


Рисунок 29. а) Крепление нейропорта на черепной коробке экспериментального животного; б) проведение ФД ($\lambda_{ex}=632.8$ нм).

Рисунок 25 иллюстрирует предполагаемые условия применения разработанного нейропорта (ФД и ФДТ). Диагностические и терапевтические зонды предназначены для доставки лазерного излучения через волоконно-оптическую структуру нейропорта в ложе опухоли.

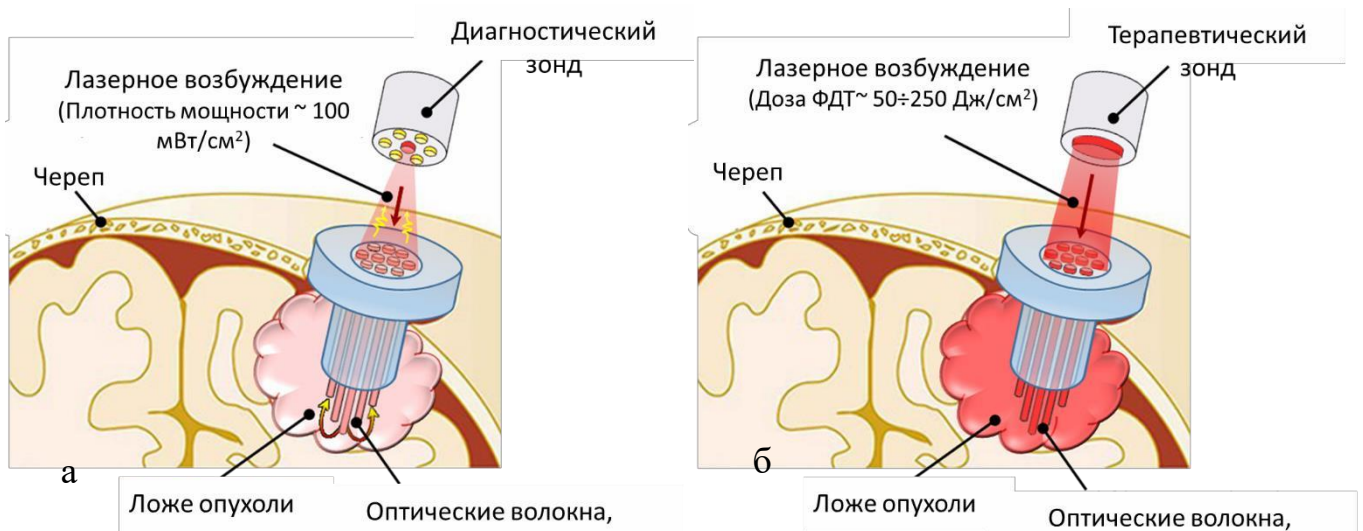


Рисунок 30. Модель проведения а) ФД; б) ФДТ опухоли мозга при помощи нейропорта с внутренней волоконно-оптической структурой. Рекомендуемые параметры лазерного излучения для проведения ФД: плотность мощности ~ 100 мВт/см², $\lambda_{ex}=632.8$ нм; для проведения ФДТ: доза облучения $\sim 50\div 200$ мВт/см², $\lambda_{ex}=675$ нм.

Доставка ФС в ложе опухоли осуществлялась посредством внутривенного введения препарата в хвостовую вену экспериментальных животных. В качестве ФС был использован 5-АЛК индуцированный ПП IX.

Спектрометр LESA-01-BIOSPEC в сочетании с уникальным программным обеспечением использовался для проведения ФД зондируемой области и контроля накопления препарата с помощью разработанного нейропорта. Диагностика осуществлялась при помощи волоконно-оптического диагностического зонда с излучающим и шестью приемными волокнами, соединенными с лазерным источником и спектрометром, соответственно (рис. 31). Благодаря специфической структуре выстроенных в линию приемных волокон, диагностический зонд позволяет получать спектральную информацию об объекте исследования с высокой точностью. В процессе ФД для возбуждения флуоресценции ФС использовался HeNe лазер с $\lambda_{ex}=632.8$ нм, плотностью мощности ~ 100 мВт/см² и мощностью $\sim 4\div 6$ мВт на выходе из волокна. Доза облучения во время проведения

сеанса ФДТ ($\lambda_{ex}=675 \text{ нм}$) составила 300 Дж/см^2 .

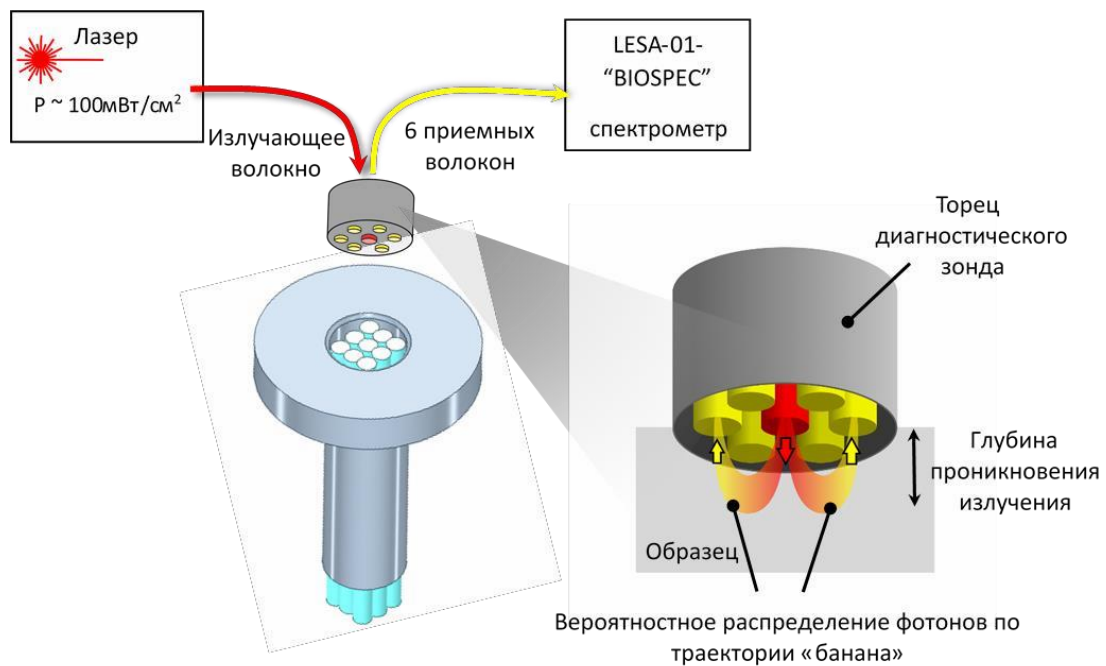


Рисунок 31. Схема экспериментальной установки для проведения сеанса ФД с использованием спектрометра LESA-01-BIOSPEC. Излучающее волокно отмечено красным цветом, приемные-желтым.

Разработанные оптические нейрпорты с внутренней волоконно-оптической структурой устанавливались в ложе опухоли экспериментальных животных и служили в качестве порта для локальной доставки лазерного излучения, что позволило осуществлять контроль состояния экспериментальных животных после имплантации с помощью ФД до и после проведения ФДТ. Контрольным методом эффективности проведенной терапии также являлся МРТ анализ. Во время исследования проводился мониторинг динамики накопления эндогенного ФС 5-АЛК индуцированного ПП IX в опухолевых клетках после внутривенного введения препарата экспериментальным животным с индуцированной глиомой С6. Максимум накопления 5-АЛК индуцированного ПП IX в области новообразования наблюдался спустя 3 часа после внутривенного введения ФС, что подтверждается интенсивностью флуоресцентного сигнала, зарегистрированного посредством разработанного оптического нейрпорта. Возбуждение флуоресценции осуществлялось лазерным источником на длине волны $\lambda_{ex}=632,8 \text{ нм}$ с плотностью

мощности ~ 100 мВт/см². Детектирование оптического сигнала осуществлялось в спектральном диапазоне от 600 до 750 нм, куда попадает рассеянный лазерный пик возбуждения, использующийся для нормировки спектров. Это позволяет количественно оценивать содержание ФС в ткани.

Вне зоны патологии, принятой за норму, накопления препарата не наблюдалось, что подтверждается отсутствием ярко выраженного флуоресцентного сигнала. Спектры флуоресценции области новообразования имеют два основных максимума, один из которых соответствует АЛК-индуцированному ПП IX ($\lambda=705$ нм), другой - фотопродуктам ПП IX ($\lambda=670$ нм) (рис.32). Следовательно, в патологических клетках наблюдается активное накопление ФС и его частичная фотодеградация с образованием фотопродуктов.

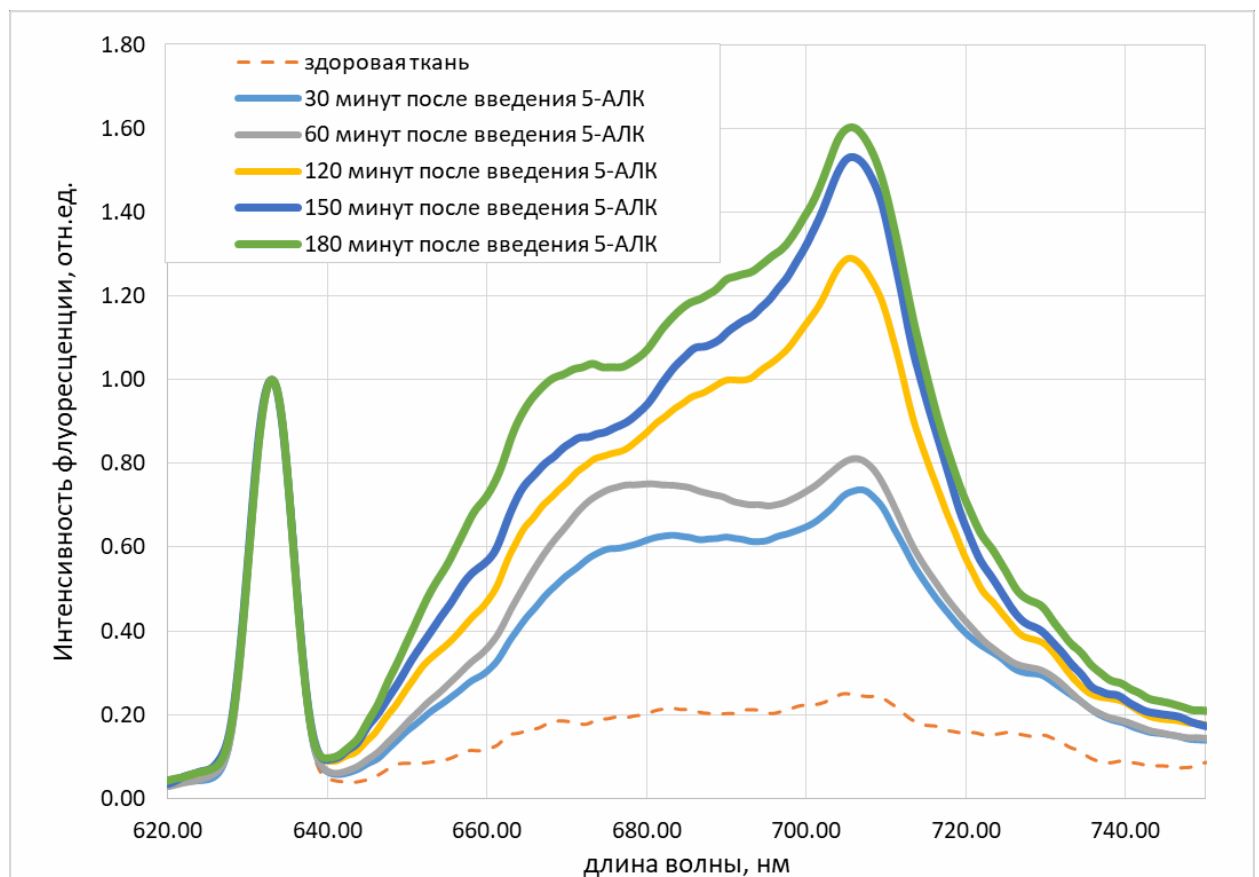


Рисунок 32. Динамика накопления 5-АЛК индуцированного ПП IX в опухоли головного мозга экспериментальных животных. Спектры флуоресценции нормированы на линию лазерного излучения ($\lambda_{ex}=632.8$ нм).

Сеанс ФДТ проводился в момент достижения максимального накопления ФС в опухолевой ткани. Световая доза во время ФДТ при облучении на длине волны $\lambda_{ex}=675$ нм составила 300 Дж/см^2 . Спектроскопический неинвазивный анализ после проведения сеанса ФДТ показал снижение интенсивности сигнала флуоресценции АЛК-индуцированного ПП IX. Наблюдаемое снижение концентрации ФС после проведения сеанса ФДТ в области патологии объясняется частичным разрушением молекул ФС и частичной его трансформацией в другие фотовосстановленные формы (получившие в литературе название фотопродукты) под действием излучения длины волны, соответствующей пику его поглощения. Таким образом, наблюдается прямая корреляция между фотобличингом препарата и достижением фотодинамического эффекта.



Рисунок 33. Проведение сеанса ФДТ экспериментальным животным с индуцированной глиомой С6 посредством доставки излучения через имплантированный оптический нейропорт с внутренней волоконно-оптической структурой.

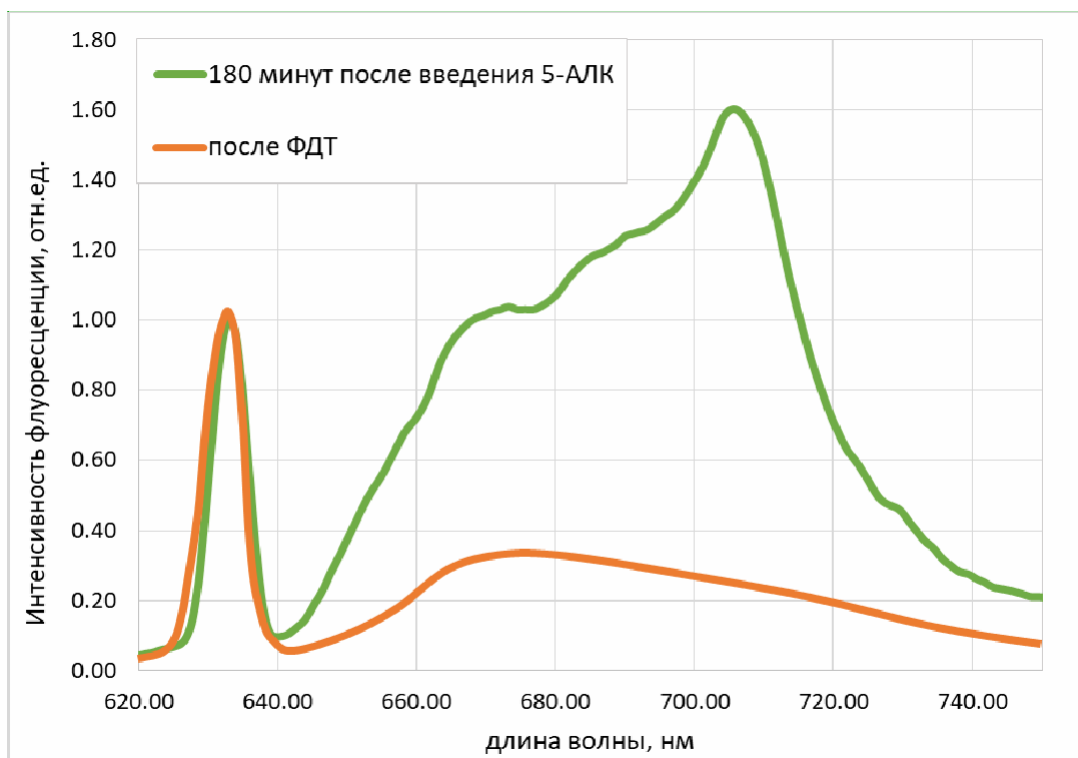


Рисунок 34. Спектр флуоресценции 5-АЛК индуцированного ПП IX до ФДТ и после. Спектры флуоресценции нормированы на линию лазерного излучения ($\lambda_{ex}=632.8 \text{ nm}$).

В результате проведенной ФДТ был достигнут желаемый терапевтический эффект, что подтверждается не только результатами ФД (рис.34), но и методом контрольного МРТ анализа (рис.35)

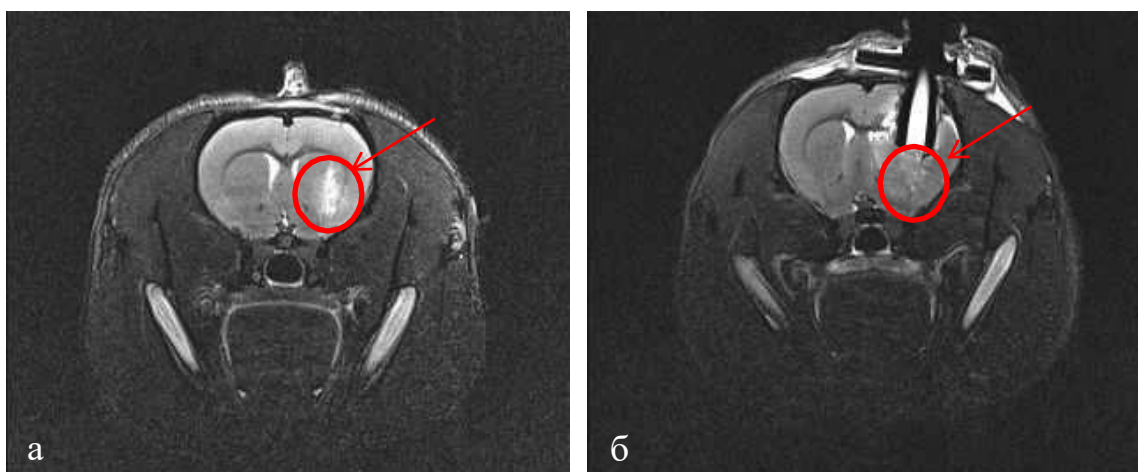


Рисунок 35. МРТ-снимки головного мозга крысы в режиме T2 а) до имплантации и терапии, б) МРТ-снимки головного мозга крысы после имплантации и ФДТ с 5-АЛК индуцированным ПП IX, $\lambda_{ex}=675 \text{ nm}$. Стрелкой показано место локализации опухоли.

Заключение к третьей главе

Разработан и апробирован новый комплексный подход к проведению флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии глубокозалегающих и метастазирующих опухолей мозга. Была отработана технология создания оптоволоконной системы, имеющей многофункциональную внутреннюю структуру, созданную на базе пористых оптических волокон, которая выполняет роль структуры, способствующей и задающей направление распространению структурно-функциональных единиц нервной системы. Разработанная оптоволоконная система была оптимизирована в соответствии с изученными спектрально-флуоресцентными свойствами внутренней волоконной структуры, которая выполняет роль порта для доставки препарата (ФС) и лазерного излучения с целью осуществления мониторинга процессов, проведения регулярной флуоресцентной диагностики и своевременной фотодинамической терапии зондируемой области.

6. ГЛАВА 4. СПЕКТРАЛЬНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ ТКАНЕЙ МОЗГА С РАЗРЕШЕНИЕМ ПО ВРЕМЕНИ

Данная глава содержит описание апробированного нового подхода к оценке состояния тканей, различающихся по фенотипу и степени активности иммунокомпетентных клеток в ней с применением фотосенсибилизаторов и время-разрешенных методов анализа их флуоресценции. Основное внимание уделено обнаружению различий между опухолевыми клетками и опухоль-ассоциированными макрофагами (ТАМ) спектроскопическими и микроскопическими методами по флуоресцентному сигналу коферментов NADH и FAD (которым обогащены макрофаги), а также по разнице в накоплении и флуоресцентном сигнале ФС (накопление которого в несколько раз больше в макрофагах). Получены результаты исследования кинетики фотолюминесценции коферментов NADH и FAD, а также фотосенсибилизатора с применением двух различных техник: время-разрешенной спектроскопии и время-разрешенной флуоресцентной микроскопии (FLIM). Время-разрешенный спектроскопический анализ времени жизни флуоресценции ФС был проведен на половозрелых самках крыс индуцированной опухолью головного мозга глиомой С6 в условиях *in vivo*. В качестве ФС в работе использовали 5-АЛК индуцированный ПпIX (пр-во ГНЦ «НИОПИК»), которой широко применяется в клинической практике для эффективного проведения флуоресцентной диагностики и ФДТ.

4.1 Зависимость спектрально-флуоресцентных свойств биологических тканей от их биохимических особенностей

Известно, что большинство опухолевых клеток получают энергию не так, как здоровые в первую очередь из-за отличий в процессе гликолиза. Опухолевые клетки получают энергию за счет быстрого анаэробного гликолиза с образованием молочной кислоты, в то время как в нормальных клетках происходит медленный гликолиз в присутствии кислорода путем медленных ферментативных реакций с образованием двух молекул АТФ.

В связи с этим были проведены исследования с целью обнаружения различий между опухолевыми клетками и иммунокомпетентными клетками, в частности опухоль-ассоциированными макрофагами (ТАМ) по флуоресцентному сигналу коферментов НАДН и FAD (которым обогащены макрофаги), а также по разнице в накоплении.

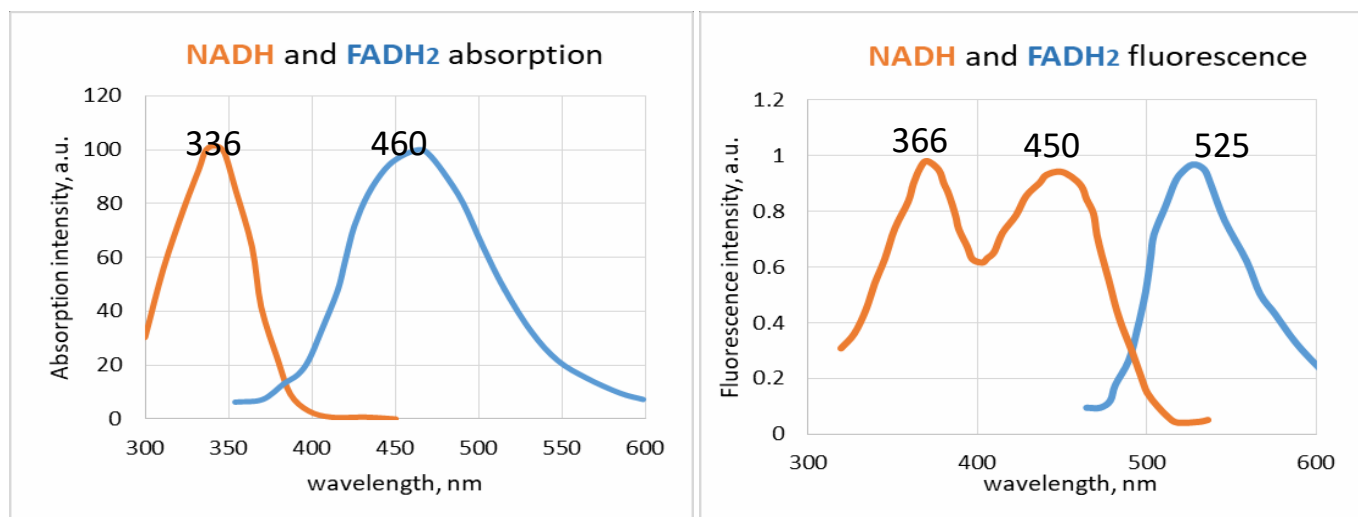


Рисунок 36. Спектры поглощения и флуоресценции коферментов НАДН и ФАДН₂

Если в клетке имеется кислород, то НАДН из гликолиза направляется в митохондрию (челночные системы), на процессы окислительного фосфорилирования, и там его окисление приносит дивиденды в виде 2,5 молей АТФ. Образовавшийся в гликолизе пируват в аэробных условиях превращается в ПВК-дегидрогеназном комплексе в ацетил-S-КоА, при этом образуется 1 молекула НАДН. Ацетил-SКоА вовлекается в ЦТК и, окисляясь, дает 3 молекулы НАДН, 1 молекулу ФАДН₂, 1 молекулу ГТФ. Молекулы НАДН и ФАДН₂ движутся в дыхательную цепь, где при их окислении в сумме образуется 9 молекул АТФ. В целом при сгорании одной ацетогруппы в ЦТК образуется 10 молекул АТФ.

В анаэробном же процессе пировиноградная кислота восстанавливается до молочной кислоты (лактата), поэтому в микробиологии анаэробный гликолиз называют молочнокислым брожением. Лактат является метаболическим тупиком и далее ни во что не превращается, единственная возможность утилизировать лактат – это окислить его обратно в пируват.

Многие клетки организма способны к анаэробному окислению глюкозы. Для эритроцитов он является единственным источником энергии. Клетки скелетной мускулатуры за счет бескислородного расщепления глюкозы способны выполнять мощную, быструю, интенсивную работу, как, например, бег на короткие дистанции, напряжение в силовых видах спорта. Вне физических нагрузок бескислородное окисление глюкозы в клетках усиливается при гипоксии – при различного рода анемиях, при нарушении кровообращения в тканях независимо от причины.

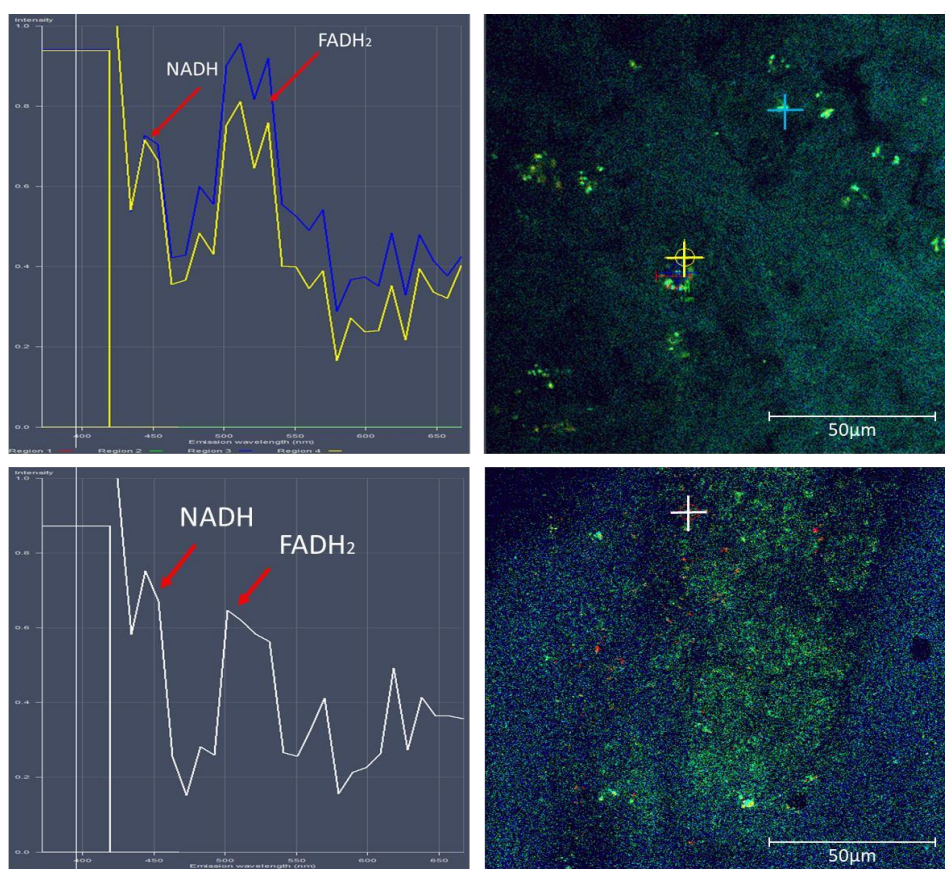


Рисунок 37. Флуоресцентное изображение, охарактеризованное спектральным разложением сигнала в отдельных флуоресцирующих центрах.

Экспериментальные образцы в виде криосрезов были получены от экспериментальных животных: а) опухоль-ассоциированные макрофаги и б) опухолевые клетки.

ФАД, НАДН и НАДН₂ являются важными элементами клеточного

метаболизма, а также эндогенными флуорофорами, за счёт которых можно производить дифференциацию клеток (рис. 36). Флуоресценция данных коферментов зависит от их формы и состояния [52].

Опухолевые клетки содержат значительное количество связанного НАДН, имеющего долгое время жизни флуоресценции, в то время как иммунокомпетентные клетки (в частности, макрофаги) содержат большое количество ФАД. На основании данных свойств и происходила визуализация макрофагов в опухоли *in vivo*. В результате исследования кинетики фотолюминесценции коферментов NADH и FAD, с применением время-разрешенной флуоресцентной микроскопии (FLIM) было обнаружено, что в отдельных крупных скоплениях клеток, по-видимому макрофагах, превалируют процессы окислительного фосфорилирования (запасание энергии в виде АТФ) над процессом гликолиза, что приводит к снижению уровня НАДН и возрастанию уровня ФАДН₂. В опухолевых клетках, которые составляют большинство в поле зрения на рисунке 37 происходят обратные процессы преобразования энергии и гликолиз превалирует над реакциями окислительного фосфорилирования, в результате чего обнаруживается рост уровня НАДН и снижение уровня ФАДН₂, что в целом согласуется с теорией окислительных процессов. С помощью FLIM визуализации была произведена оценка времени жизни флуоресценции коферментов: опухолевые клетки, содержащие значительное количество связанного НАДН, имеют долгое время жизни флуоресценции, в то время как иммунокомпетентные клетки (в частности, макрофаги) содержащие большое количество ФАД, показали короткое время жизни флуоресценции кофермента (рис. 38). На основании данных свойств и происходила визуализация макрофагов в опухоли.



Рисунок 38. FLIM изображение, характеризующее распределение времени жизни флуоресценции экзогенных флуорофоров в ткани головного мозга на границе опухоли глиомы С6 и нормальной ткани.

4.2 Зависимость спектрально-флуоресцентных характеристик фотосенсибилизаторов при взаимодействии с клетками различного фенотипа

Время-разрешенный спектроскопический анализ времени жизни флуоресценции ФС был проведен на половозрелых самках крыс с индуцированной опухолью головного мозга глиомой С6 в условиях *in vivo*. В качестве ФС в работе использовали 5-АЛК индуцированный ПпIX (пр-во ГНЦ «НИОПИК»), которой широко применяется в клинической практике для эффективного проведения флуоресцентной диагностики и ФДТ. 5-АЛК вводили экспериментальным животным в хвостовую вену в дозе 10 мг/кг под общей анестезией. Контроль уровня накопления ПпIX в норме и в опухоли *in vivo* производился с помощью волоконного спектрометра ЛЭСА-01-Биоспек (рис. 39 а). В результате в момент максимального накопления ($t = 3$ ч) было произведено фотодинамическое воздействие лазерным излучением ($\lambda = 650$ нм, доза 200 Дж/см²). Контроль времени жизни флуоресценции ФС до и после ФДТ (но при повторном введении препарата 5-АЛК) осуществлялся с помощью измерительного комплекса, основанном на стрик-камере с пикосекундным временным разрешением, сопряженной с волоконнооптическим спектрометром. В процессе измерения использовали метод

времякоррелированного счета фотонов.

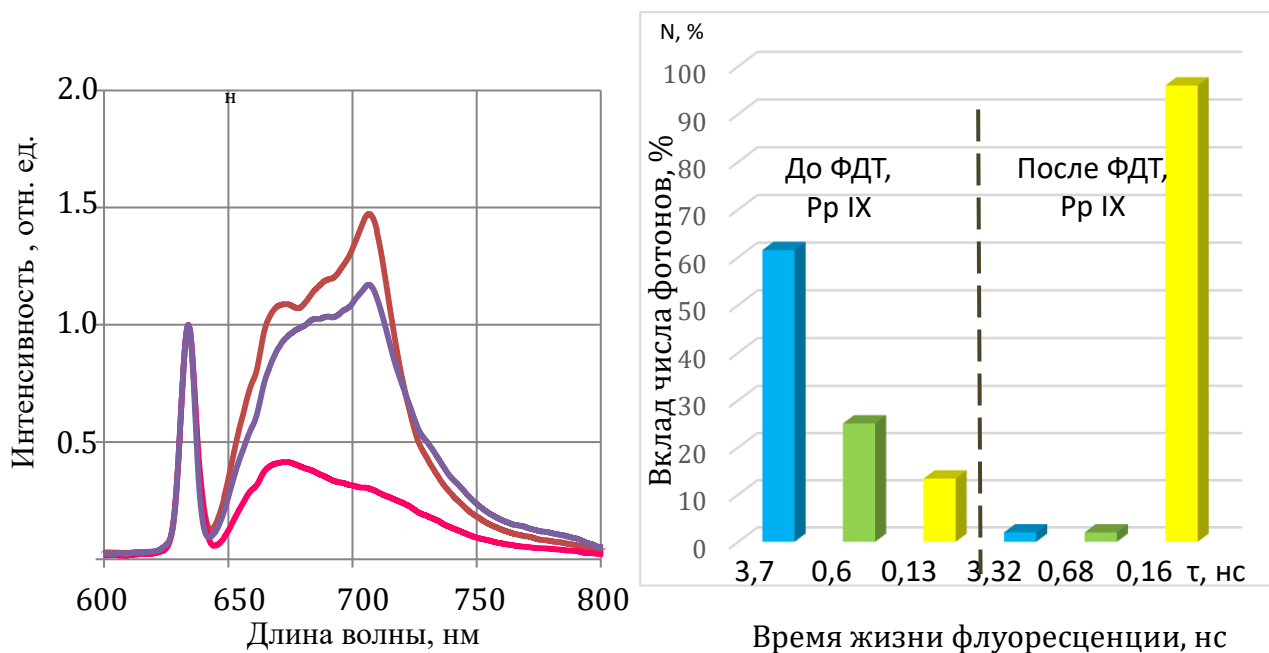


Рисунок 39. а) Спектры флуоресценции РрIX, характеризующие накопление ФС в опухоли мозга крысы (глиома С6) – до ФДТ, – после ФДТ, – после ФДТ при повторном введении ФС б) Результаты время-разрешенного спектроскопического анализа времени жизни флуоресценции РрIX в опухоли мозга крысы, представленные в виде гистограммы распределения вклада от различных компонент времени жизни флуоресценции.

В результате в момент максимального накопления ($t = 3\text{ч}$) было произведено фотодинамическое воздействие лазерным излучением ($\lambda=650\text{ нм}$, доза 200 Дж/см^2). Контроль времени жизни флуоресценции ФС до и после ФДТ (но при повторном введении препарата 5-АЛК) осуществлялся с помощью измерительного комплекса, основанном на стрик-камере с пикосекундным временным разрешением, сопряженной с волоконно-оптическим спектрометром [53]. В процессе измерения использовали метод время-коррелированного счета фотонов. Таким образом, были получены результаты изменения кинетики люминесценции РрIX в условиях *in vivo* на экспериментальных животных с индуцированной опухолью мозга глиомой С6. Было установлено наличие 3^x различных компонент, характерных для времени жизни флуоресценции РрIX, однако вклад (число фотонов флуоресценции) каждой компоненты сильно зависел от биологического микроокружения и от фенотипа клеток, с которыми флуорофор вступает во взаимодействие. Кроме того, было

установлено, что в результате ФДТ и как следствие в результате изменения метаболических процессов внутри клеток, происходит изменение вклада в кинетику флуоресценции различных временных компонент, при том, что сами времена жизни флуоресценции не меняются (рис. 39б, 41б) [54-55]. На основании полученных результатов сделан вывод о наличии в опухоли составляющих, также активно накапливающих ФС, но при этом иначе взаимодействующих с ним. На роль таких агентов в первую очередь претендуют иммунокомпетентные клетки, а именно макрофаги благодаря своей повышенной способности к накоплению ФС. Это предположение было проверено путем анализа криосрезов опухоли методом конфокальной и время-разрешенной флуоресцентной микроскопии (рис. 40а). В результате были обнаружены центры флуоресценции с временами жизни, соответствующие по своим значениям, полученным ранее в условиях *in vivo* (рис. 40б). Локализация и морфология клеток свидетельствовало об их иммунной природе. Близкое соседство с опухолью дает основание считать их опухоль-ассоциированными макрофагами. Таким образом, оценка клеточного состава ткани в режиме неинвазивного мониторинга, сделает возможной селективную дезактивацию патологических клеток (в том числе иммунных), что значительно повысит эффективность противоопухолевой терапии [56-70]. Особенную роль в подобных исследованиях может выполнять разработанный нейропорт. Комплексный подход при оценке состояния ложа опухоли с использованием многофункциональной нейросистемы позволит проводить анализ клеточного состава опухолевой ткани на значительной глубине в режиме постоянного мониторинга, что внесет значительный прогресс в эффективность терапии ГЗО.

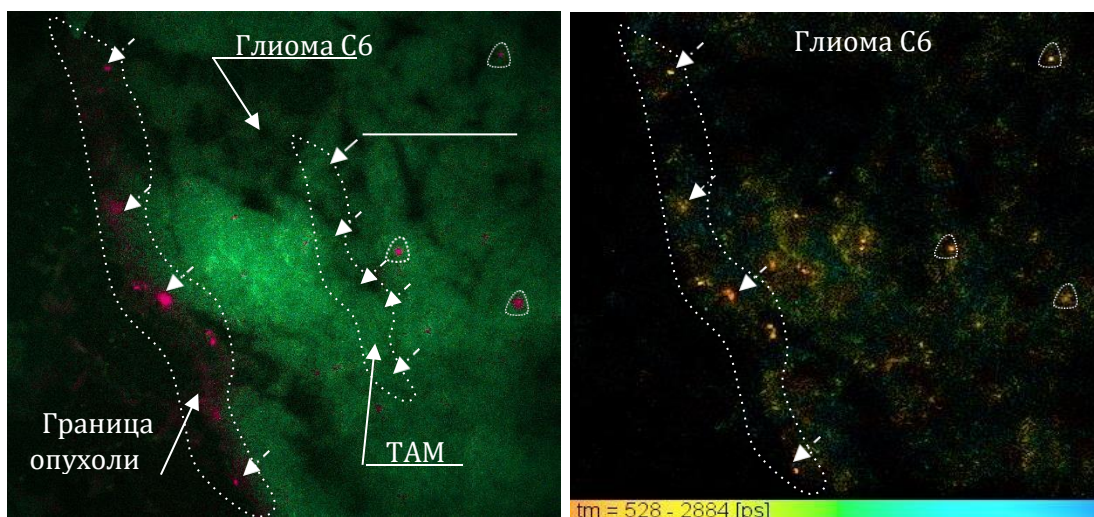


Рисунок 40. а) Флуоресцентное изображение центров накопления PrIX, полученное с криосрезов мозга крысы на границе опухолевой и нормальной ткани методом конфокальной микроскопии (20х увеличение), б) Изображение пространственного распределения времен жизни флуоресценции, полученное с криосрезов мозга крысы на границе опухолевой и нормальной ткани методом FLIM (20х увеличение).

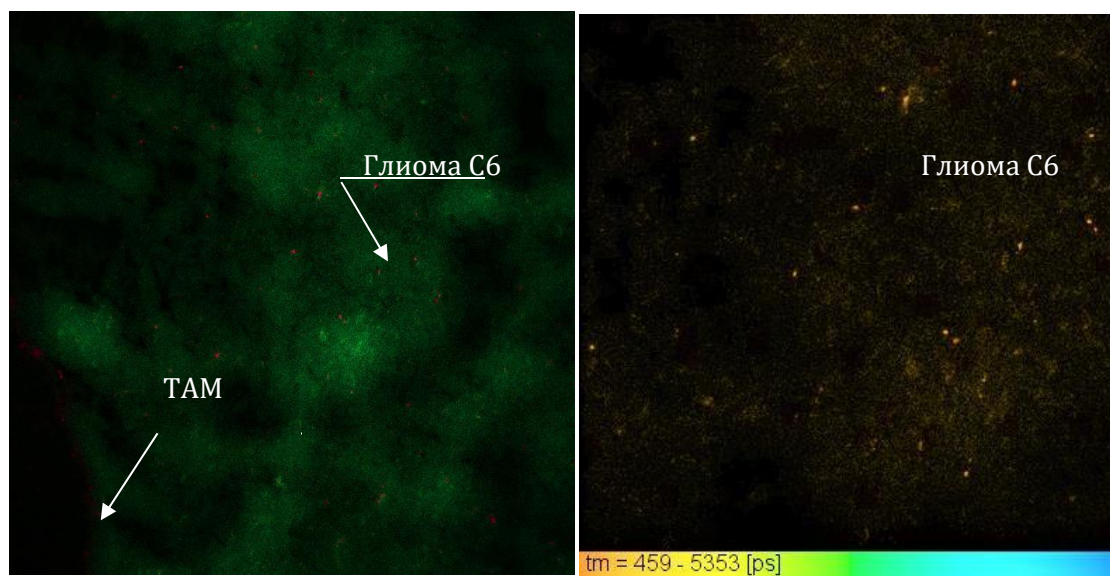


Рисунок 41. а) Флуоресцентное изображение центров накопления PrIX, полученное с криосрезов мозга крысы после ФДТ на границе опухолевой и нормальной ткани методом конфокальной микроскопии (20х увеличение), б) Изображение пространственного распределения времен жизни флуоресценции, полученное с криосрезов мозга крысы после ФДТ на границе опухолевой и нормальной ткани методом FLIM (20х увеличение).

Заключение к четвертой главе

В ходе исследования было показано, что на основе измерений времени жизни флуоресценции, причем как интегральной, так и локальной ее характеристики, можно судить о метаболической активности и отдельных клеток, и о составе целого участка ткани. На базе этого подхода были получены спектральные, временные характеристики флуоресценции флуорофоров (как эндогенных, так и ФС), взаимодействующих с опухоль-ассоциированными макрофагами (ТАМ). В этой связи перспективной представляется методика анализа клеточного состава опухоли *in vivo*, в частности оценки такого важного параметра, как количественное содержание ТАМ в опухолевой ткани, которые в свою очередь активно влияют на прогрессию опухоли. Было показано, что фотодинамическое воздействие меняет метаболическую активность тканей, вероятно приводит к разрушению ТАМ, накопивших ФС, что является несомненно важным фактором на пути у новым подходам противоопухолевой терапии [71-90].

7. ГЛАВА 5. НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ПОВЫШЕНИЮ ГЛУБИНЫ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ГЛУБОКОЗАЛЕГАЮЩИЕ И МЕТАСТАТИЧЕСКИЕ ОЧАГИ ОПУХОЛЕЙ МОЗГА

Несмотря на то, что разработанная нейрооптическая система обеспечивает постоянный доступ вглубь мозга, а именно в ложе опухоли, воздействие лазерного излучения (ФД и ФДТ) может распространяться на ткани, которые находятся в радиусе максимум 1-2 см, при условии использования ФС дальнего красного и ближнего ИК спектральных диапазонов. Наряду с направленным исследованием фотосенсибилизаторов с интенсивной полосой поглощения в дальней красной и ближней инфракрасной областях спектра были проведены исследования новых молекулярных нанокристаллов на основе органических молекул производных уже известных фотосенсибилизаторов. Однако глубокая инвазивность злокачественных глиом и обширное метастазирование вглубь мягкой мозговой ткани исключают возможность эффективной диагностики и тотальной деструкции метастатических очагов на значительном расстоянии от первичной опухоли при помощи лазерного излучения, что обусловлено эффектом его поглощения биотканью. В связи с этим был апробирован еще один подход, направленный на преодоление ограничений проникновения излучения в глубину ткани, с применением независимого источника излучения для возбуждения ФС – излучения Вавилова-Черенкова. Целью данного исследования стала оценка возможности терапии индуцированной опухоли мозга крысы путем возбуждения ФС альтернативным источником – излучением Вавилова-Черенкова, которое возникает вследствие позитронного бета-распада радионуклида, входящего в состав радифармпрепаратов (РФП).

5.1 Результаты исследования спектрально-флуоресцентных свойств фотосенсибилизаторов в наноформе

Для изучения динамики накопления фотосенсибилизаторов в пористой структуре гидроксиапатита, составляющего имплант, был проведен ряд экспериментальных исследований. Процесс биоинтеграции импланта был

смоделирован в условиях *in vitro* следующим образом:

1 этап: были изучены спектрально-люминесцентные свойства наночастиц при взаимодействии с поверхностными молекулами гидроксиапатита с учетом того, что свободные нанокристаллы в водном коллоиде не обладают способностью к люминесценции;

2 этап: были изучены спектрально-люминесцентные свойства наночастиц в условиях взаимодействия поверхности имплантата (гидроксиапатит с поверхностным слоем наночастиц ФС) с полярным растворителем диметилсульфоксидом (ДМСО), что имитировало процесс взаимодействия с биоконпонентами (иммунокомпетентными клетками, бактерии и пр. в условиях *in vivo*);

3 этап: были изучены спектрально-люминесцентные свойства после вымывания полярного растворителя с поверхности пористой структуры имплантата путем водного диспергирования в ультразвуковом гомогенизаторе, чтобы исключить возможность его вымывания со временем.

Результаты поэтапного воздействия на поверхность имплантата представлены в виде спектров люминесценции на рис. 42 и рис. 43 для образцов с поверхностным покрытием nVch и nPcAl, соответственно.

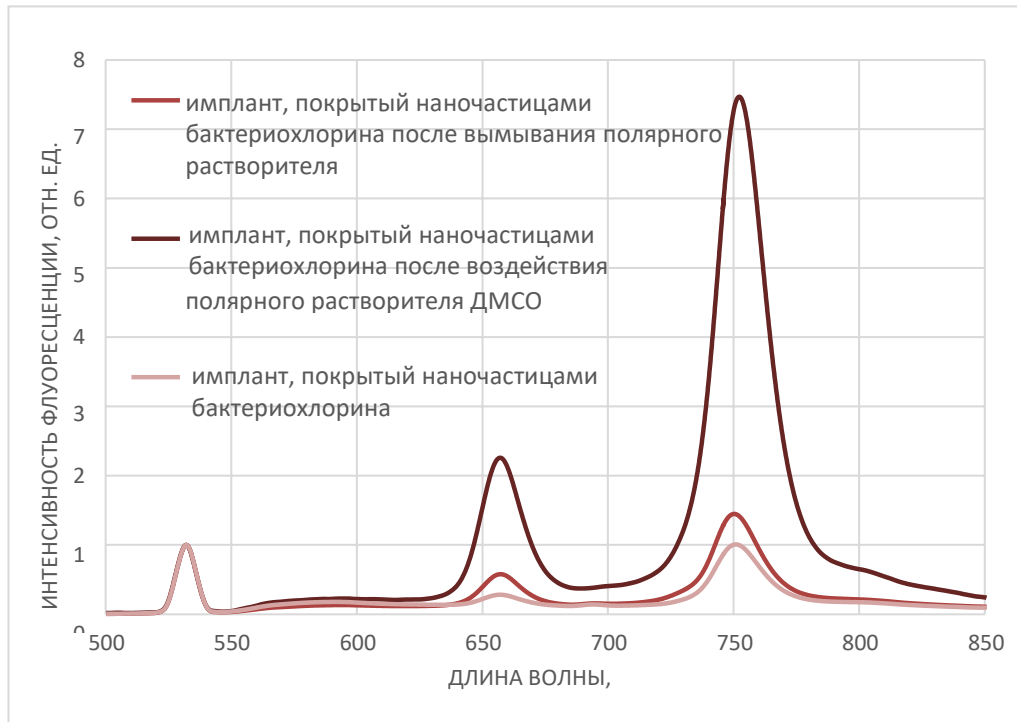


Рисунок 42. Спектр люминесценции имплантата на основе гидроксиапатита, покрытого наночастицами бактериохлорина при различных условиях ($\lambda_{ex} = 532$ нм)

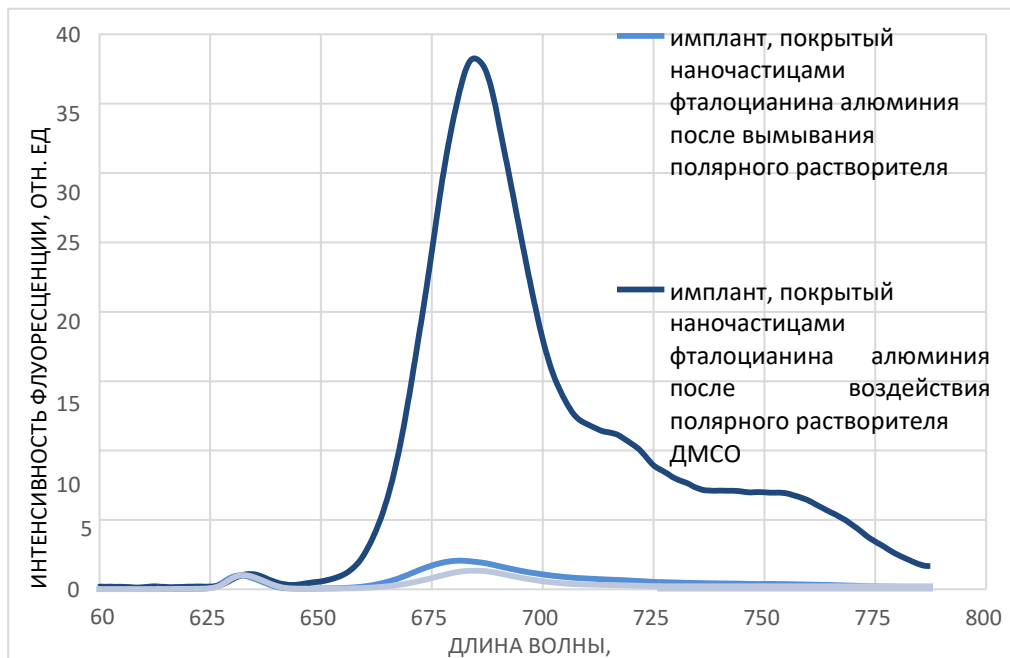


Рисунок 43. Спектр люминесценции имплантата на основе гидроксиапатита, покрытого наночастицами фталоцианина алюминия при различных условиях ($\lambda_{ex} = 632.8$ нм)

Анализ спектров люминесценции и динамики пика люминесценции при различных условиях для обоих типов кристаллических наночастиц (бактериохлорина и фталоцианина алюминия) показывает, что изначально не обладающие фотоактивностью нанокристаллы ФС, при взаимодействии с поверхностными молекулами гидроксиапатита изменяют свои спектроскопические свойства и приобретают способность к люминесценции. Подобное явление вероятно можно объяснить взаимодействием поверхностных молекул наночастиц со сложной и неоднородной поверхностной структурой гидроксиапатита. В зависимости от локализации в пористой структуре гидроксиапатита и ближайшего окружения нанокристаллов ФС, их поверхностные молекулы могут "лежать", принимая пара-положение относительно поверхности наночастицы, или "вставать", принимая орто-положение, удерживаясь на поверхности и проявляя спектроскопические свойства раствора ФС, которые продемонстрированы в условиях взаимодействия поверхности имплантата с ДМСО.

Таким образом, процесс активации кристаллических наночастиц ФС подтверждается резким возрастанием интенсивности сигнала фотолюминесценции (рис. 42-43) при взаимодействии с полярным растворителем, что позволило имитировать процесс взаимодействия имплантата с поверхностным слоем наночастиц ФС с биоконпонентами *in vivo*.

В ходе исследования также было установлено, что поверхностные молекулы наночастиц ФС имеют достаточно сильное взаимодействие с поверхностной структурой гидроксиапатита, поскольку даже путем водного диспергирования не удалось добиться вымывания нанокристаллов из пористой структуры имплантата, что подтверждает наличие сигнала люминесценции для обоих типов наночастиц после 3-го этапа воздействия (рис. 42-43).

В ходе работы также было проведено исследование временной динамики спектров люминесценции поверхности имплантата на основе гидроксиапатита, покрытого наночастицами ФС. Анализ динамики во времени спектров люминесценции для обоих типов кристаллических наночастиц (nVch и nPcAl) показал, что изначально фотонеактивные нанокристаллы ФС при взаимодействии с поверхностными молекулами гидроксиапатита приобретают способность к люминесценции, однако интенсивность пика люминесценции изменяется во времени под воздействием возбуждающего лазерного излучения соответствующей длины волны (nVch: $\lambda_{ex} = 532$ нм, nPcAl: $\lambda_{ex} = 632.8$ нм).

Спектр люминесценции поверхности импланта на основе гидроксиапатита, покрытого nVch, при возбуждении лазерным излучением ($\lambda_{ex} = 532$ нм) имеет два пика люминесценции: $\lambda_{em} = 758$ нм и $\lambda_{em} = 654$ нм. При постоянном непрерывном воздействии возбуждающего лазерного излучения интенсивность пиков люминесценции изменяется во времени, причем интенсивность сигнала люминесценции пика, соответствующего $\lambda_{em} = 654$ нм, со временем возрастает, в то время как интенсивность сигнала люминесценции пика, соответствующего $\lambda_{em} = 758$ нм, со временем уменьшается (рис. 44).

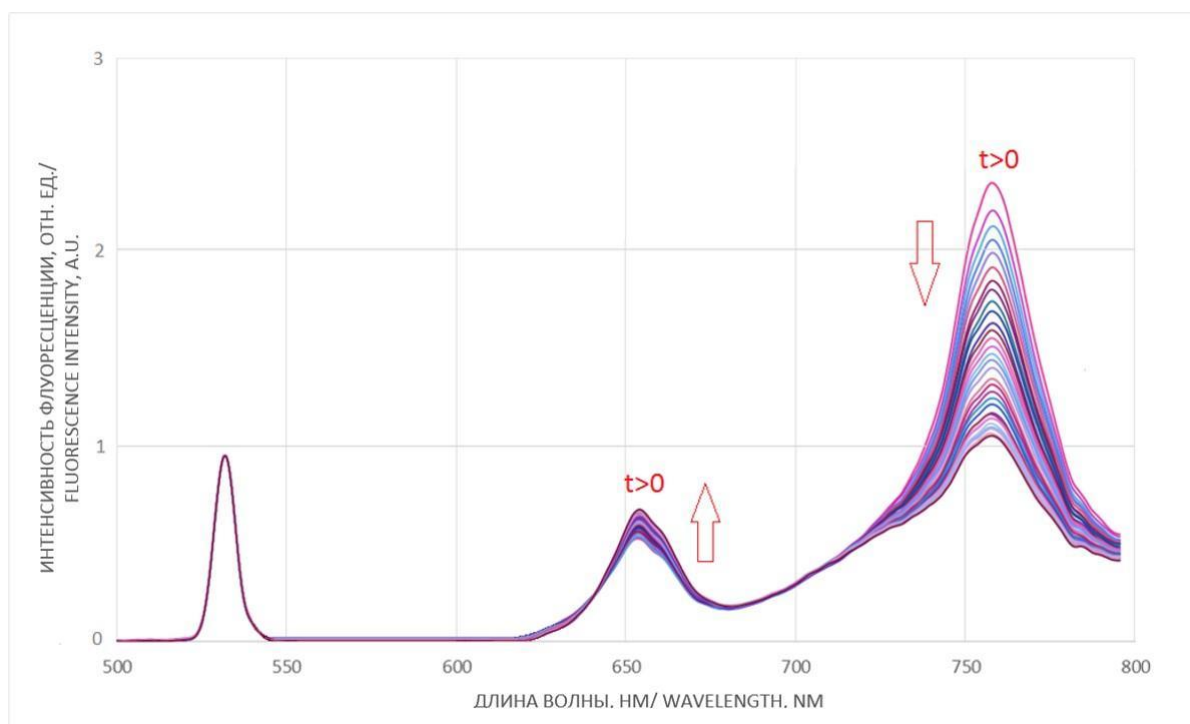


Рисунок 44. Динамика изменения во времени спектра люминесценции имплантата на основе гидроксиапатита, покрытого наночастицами бактериохлорина ($\lambda_{ex} = 532$ нм)

По-видимому, в зависимости от длительности воздействия, что соответствует изменению уровня сообщаемой системе энергии, поверхностные молекулы изменяют свое положение относительно друг друга и поверхностной структуры гидроксиапатита, проявляя спектроскопические свойства раствора бактериохлорина ($\lambda_{em} = 758$ нм) или хлорина ($\lambda_{em} = 654$ нм).

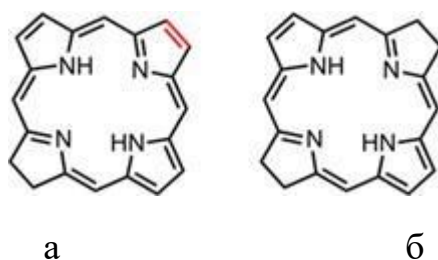


Рисунок 45. Химическая формула: а – хлорина; б – бактериохлорина

Необходимо отметить обратимость данного процесса, что свидетельствует о невозможности структурного изменения самой молекулы фотосенсибилизатора, а именно образования самостоятельной молекулы хлорина. Из рис. 45 видно, что различие в структуре между молекулами бактериохлорина и хлорина состоит в наличии еще одной двойной связи в структурной формуле хлорина. Поэтому, вероятно, под действием возбуждающего лазерного излучения может происходить взаимодействие двух близлежащих молекул бактериохлорина путем образования общей временной двойной связи между ними, которая разрушается в отсутствии возбуждающего излучения. В таком случае одна из молекул может проявлять спектроскопические свойства молекулы хлорина. На основании полученных результатов сделан вывод, что наночастицы бактериохлорина взаимодействуют как попарно между собой, так и со сложной пористой структурой гидроксиапатита. В зависимости от характера и силы взаимодействия, а также локализации и окружения наночастиц, они могут принимать различное положение относительно друг друга и поверхностной структуры гидроксиапатита, изменяя при этом спектроскопические свойства, но не претерпевая необратимых изменений структуры молекулы.

На рис. 46 приведена динамика спектра люминесценции поверхности

импланта на основе гидроксиапатита, покрытого nPcAl. Спектр люминесценции поверхности имплантата на основе гидроксиапатита, покрытого nPcAl, при возбуждении лазерным излучением $\lambda_{ex} = 632.8$ нм имеет пик люминесценции $\lambda_{em} = 682$ нм. При постоянном непрерывном воздействии возбуждающего лазерного излучения в течение некоторого промежутка времени интенсивность пика люминесценции уменьшается во времени.

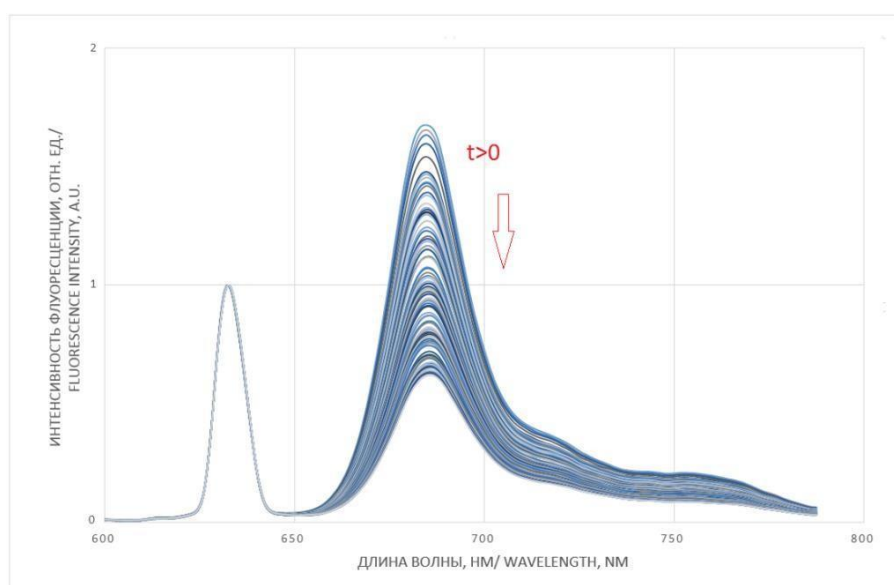


Рисунок 46. Динамика во времени спектра люминесценции импланта на основе гидроксиапатита, покрытого наночастицами фталоцианина алюминия ($\lambda_{ex} = 632.8$ нм)

По-видимому, также как в случае с nVch, в процессе облучения поверхностные молекулы изменяют свое положение относительно друг друга и поверхностной структуры гидроксиапатита, что приводит к спектральным изменениям. Необходимо отметить обратимость данного процесса, что свидетельствует об отсутствии структурного изменения самой молекулы нанофотосенсибилизатора или выгорания красителя.

Проведенный анализ динамики во времени спектров люминесценции для обоих типов кристаллических наночастиц показал, что изначально фотонеактивные нанокристаллы ФС при взаимодействии с поверхностными молекулами гидроксиапатита приобретают способность к люминесценции, однако интенсивность пика люминесценции изменяется во времени под воздействием

возбуждающего лазерного излучения. На основе проведенных исследований был сделан вывод о том, что наночастицы ФС взаимодействуют как между собой, так и со сложной пористой структурой импланта. В зависимости от характера и силы взаимодействия, а также локализации и собственного окружения наночастиц они могут принимать различное положение относительно друг друга и поверхностной структуры гидроксиапатита, изменяя спектроскопические свойства. Структура молекул при этом не претерпевает необратимых изменений.

В ходе работы была доказана возможность активации наночастиц бактериохлорина и фталоцианина алюминия, которая оценивалась по уровню сигнала фотолюминесценции в режиме контрольного исследования. Также было установлено наличие сильного взаимодействия между поверхностными молекулами нанокристаллов фотосенсибилизаторов и поверхностной структурой гидроксиапатита, что в дальнейшем исключит возможность вымывания поверхностного слоя наночастиц.

5.2 Результаты исследования спектрально-флуоресцентных свойств фотосенсибилизаторов дальнего красного и ближнего инфракрасного спектральных диапазонов

В ходе исследований по внутриклеточному распределению коллоида наночастиц *мезо*-тетра(3-пиридил)бактериохлорина для культур клеток HeLa и ТНР-1 были выявлены некоторые различия.

Так, спустя 2 ч после инкубации коллоида наночастиц с раковыми клетками HeLa (концентрация раствора *мезо*-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клеточной суспензии 10 мг/л), цитоплазматическая мембрана и отдельные внутриклеточные органеллы проявляли интенсивную флуоресценцию, соответствующую спектру флуоресценции раствора *мезо*-тетра(3-пиридил)бактериохлорина с максимумом на 752 нм. Микроскопические изображения клеток HeLa с центрами интенсивной флуоресценции *мезо*-тетра(3-пиридил)бактериохлорина представлены на рис. 47, а спектр флуоресценции в области с интенсивной флуоресценцией – на рис. 48.

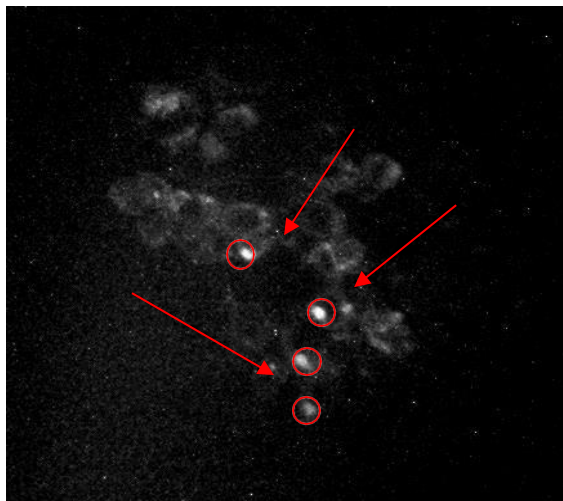


Рисунок 47. Микроскопическое изображение (60-кратное увеличение) очагов флуоресценции, вызванной повышенной локальной концентрацией растворенного мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина внутри органелл клеток HeLa, полученное при возбуждении лазерным излучением ($\lambda=510,6$ нм)

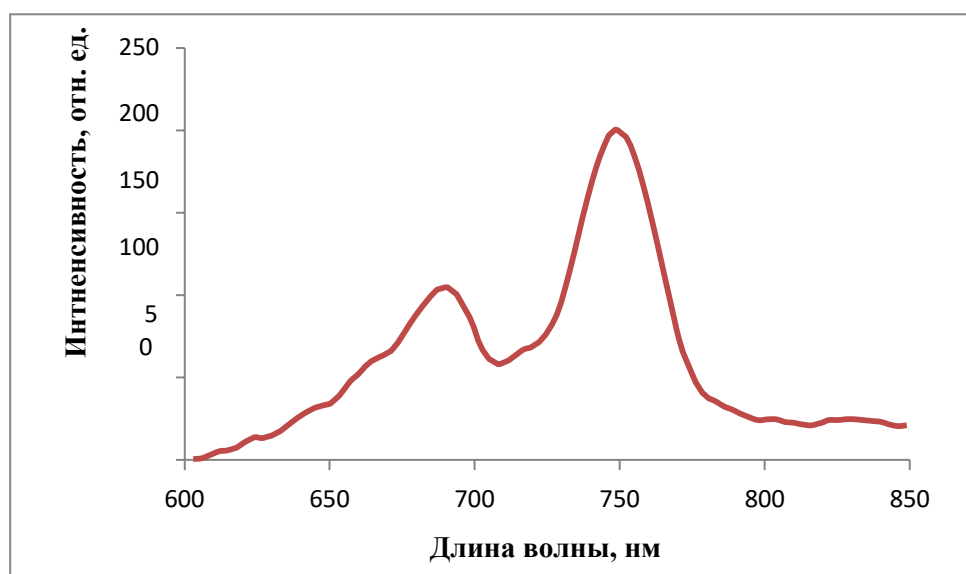


Рисунок 48. Спектр флуоресценции молекулярного раствора мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клеточной среде HeLa при возбуждении лазерным излучением ($\lambda=510,6$ нм) (•)

Клетки иммунной системы ТНР-1

После инкубации коллоида наночастиц с клетками иммунной системы (концентрация раствора мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клеточной суспензии 10 мг/л) спустя 2 ч сигнала флуоресценции, соответствующего раствору мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина, зарегистрировано не было. Однако при

дополнительном лазерном освещении с длиной волны 510,6 нм наблюдалось возникновение флуоресценции с максимумом на длине волны 760 нм. Этот эффект вероятно можно объяснить трансформацией кристаллических наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина на границе клеток благодаря поглощению энергии лазерного излучения, вследствие чего отдельные молекулы мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина приобрели способность к флуоресценции (рис. 49-50).

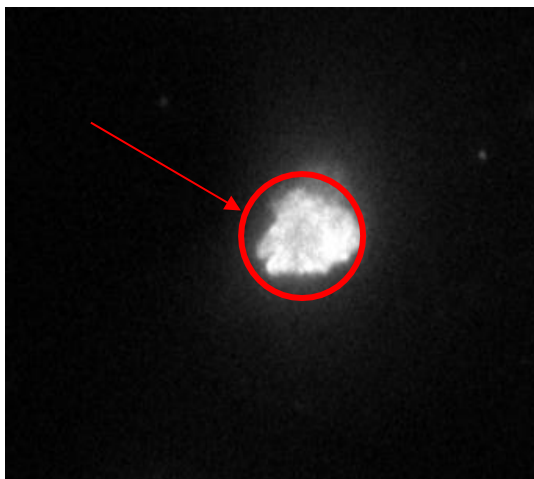


Рисунок 49. Микроскопическое изображение (60-кратное увеличение) флуоресценции, вызванной повышенной внутриклеточной концентрацией кристаллических наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина, полученное при возбуждении лазерным излучением ($\lambda=510,6$ нм)

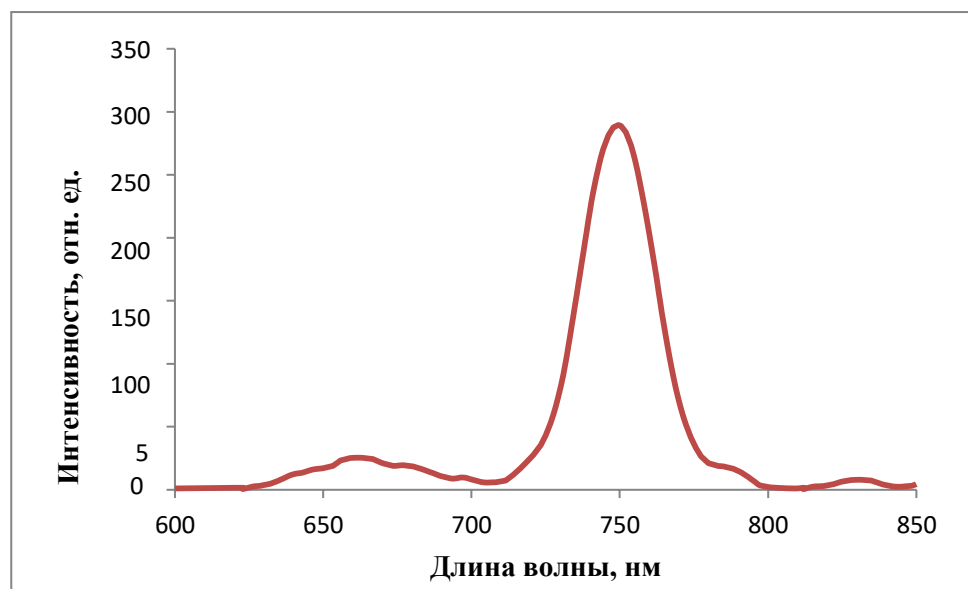


Рисунок 50. Спектр флуоресценции коллоидного раствора наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клеточной среде макрофагов при возбуждении лазерным излучением ($\lambda=510,6$ нм) (•)

В ходе работы была изучена динамика накопления и взаимодействия с клетками иммунной системы водного коллоидного раствора наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина, в частности проведена оценка изменения интенсивности флуоресценции изучаемого препарата при взаимодействии с клетками (концентрация раствора наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клеточной суспензии 5 мг/л).

С помощью конфокальной микроскопии были проведены исследования внутриклеточного распределения наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клетках иммунной системы – моноцитах человека ТНР-1. Полученное микроскопическое изображение внутриклеточного распределения коллоидного раствора наночастиц демонстрирует диффузное распределение мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина внутри цитоплазмы клеток исследуемых клеточных структур (рис. 51).

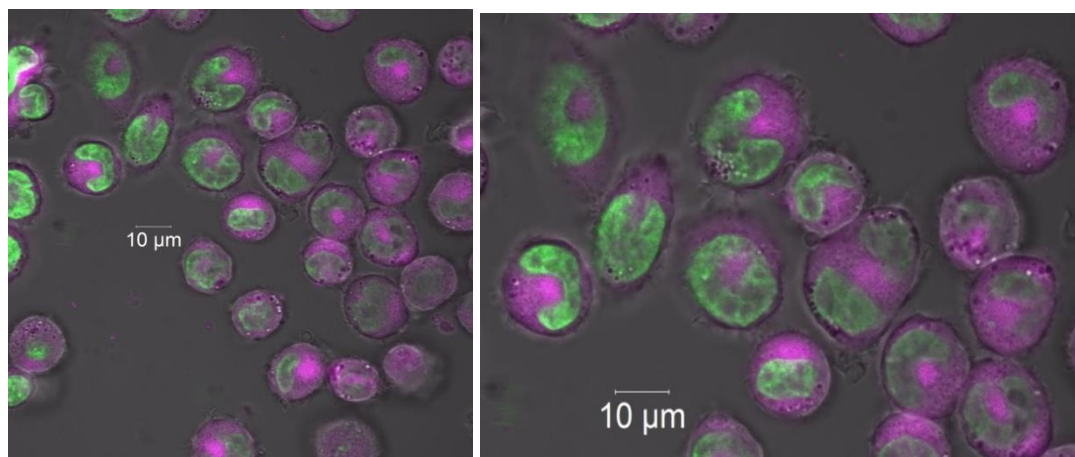


Рисунок 51. Внутриклеточное распределение наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клетках иммунной системы – моноцитах человека *THP-1*

Клетки злокачественной глиомы С6

С помощью конфокальной микроскопии были проведены исследования внутриклеточного распределения наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в раковых клетках опухоли мозга мыши – глиоме С6 (концентрация раствора наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клеточной суспензии 5 мг/л). Полученное микроскопическое изображение внутриклеточного распределения коллоидного раствора наночастиц демонстрирует диффузное распределение бактериохлорина внутри цитоплазмы клеток исследуемых клеточных структур (рис. 52).

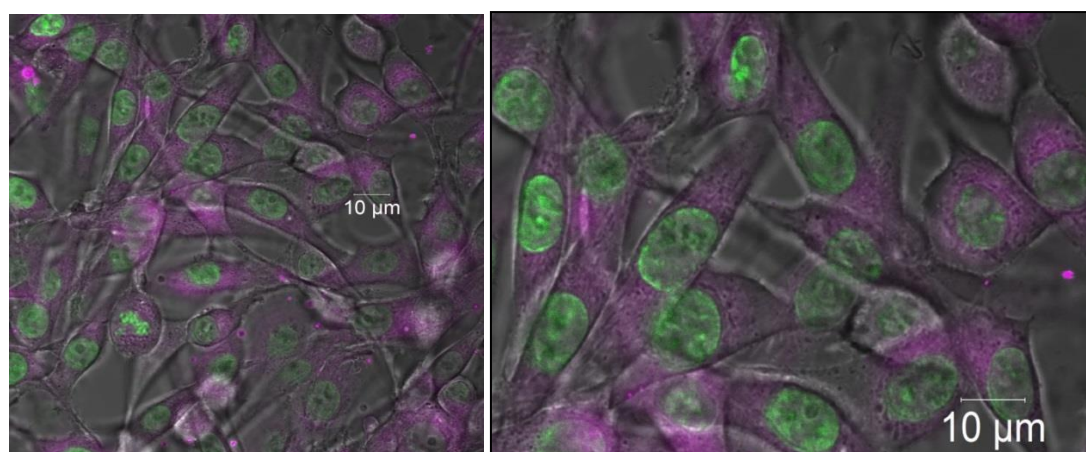


Рисунок 52. Внутриклеточное распределение наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в раковых клетках опухоли мозга мыши – глиомы С6

Как уже было сказано ранее, в зависимости от ближайшего окружения поверхностные молекулы исследуемого вещества могут иметь различную пространственную ориентацию или положение, которые можно обозначить как орто- и пароположения. Взаимодействие наночастиц с мембраной и органеллами клеток происходит за счет поверхностных молекул, конфигурация которых зависит от силы этого взаимодействия с клетками. Таким образом, поверхностные молекулы наночастиц могут удерживаться на поверхности или отрываться от наночастицы, оставляя отдельные молекулы в виде мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина или хлорина Еб в контакте с клеточными структурами. В зависимости от того какое именно положение приняли поверхностные молекулы при контакте с клетками исследуемый препарат проявляет спектроскопические свойства молекулы мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина или хлорина Еб.

Для оценки флуоресцентного сигнала молекул хлорина использовали спектральный диапазон 633-691 нм, а для оценки флуоресцентного сигнала молекул мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина – спектральный диапазон 691-758 нм (рис. 53).

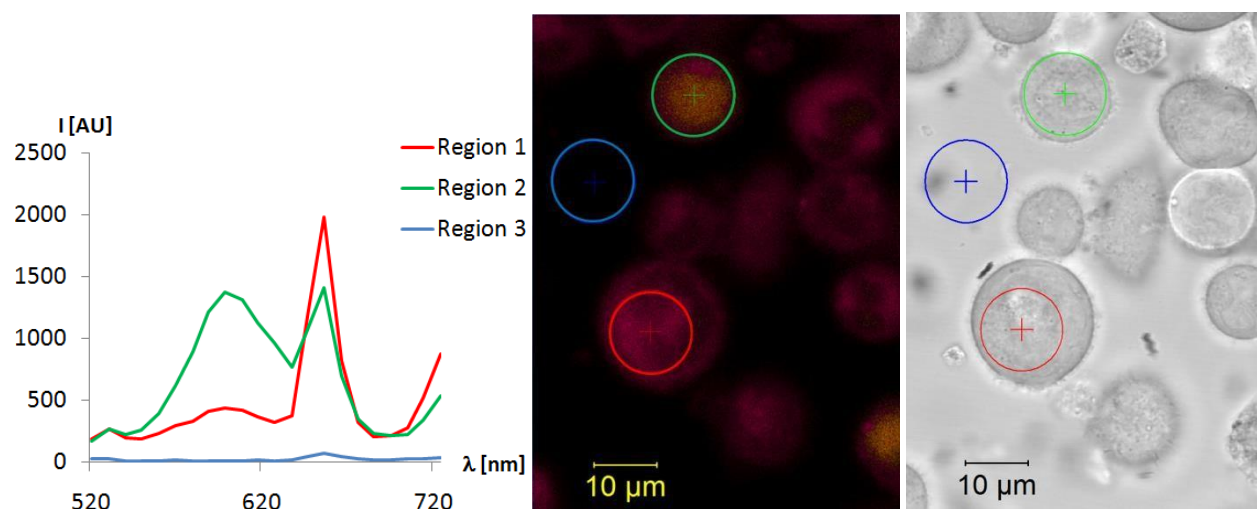


Рис. 53. Флуоресцентное микроскопическое изображение (в центре) получено со спектральным разрешением при возбуждении лазером 514 нм. Спектры флуоресценции (слева) соответствуют выделенным областям: 1 - клетка, накопившая мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин, 2 - клетка, накопившая мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорин, обладающая повышенным уровнем автофлуоресценции в области 600 нм, 3 - фоновое свечение культуральной среды.

Справа - изображение клеток в проходящем свете.

Экспериментальная оценка изменения интенсивности флуоресценции наночастиц *мезо*-тетра(3-пиридил)бактериохлорина (концентрация раствора наночастиц *мезо*-тетра(3-пиридил)бактериохлорина в клеточной суспензии 5 мг/л) при взаимодействии с клетками иммунной системы (моноцитами человека THP-1) и раковыми клетками опухоли мозга мыши (глиомой С6) показала, что интенсивность флуоресценции молекул со спектроскопическими свойствами хлорина выше интенсивности флуоресценции молекул бактериохлорина. Полученная временная зависимость позволяет сделать вывод о том, что интенсивность флуоресценции наночастиц меняется во времени в средах с различными культурами клеток по-разному (рис. 54). Так, в экспериментах с клетками глиомы головного мозга мыши было установлено, что интенсивность флуоресцентного сигнала поверхностно-активных молекул наночастиц, которые приняли положение, отличающееся спектроскопическими свойствами, характерными для молекулы хлорина, со временем изменяется слабо и в течение 24 ч был зафиксирован незначительный рост интенсивности сигнала. Интенсивность флуоресценции молекул бактериохлорина меняется со временем так, что можно выделить период разгорания флуоресценции в течение первых 5 ч инкубации и период выведения по прошествии 5 ч (5-24 ч) после начала инкубации с клетками глиомы С6 (рис. 54а). Эксперименты с клетками иммунной системы показали, что и для молекул хлорина, и для молекул *мезо*-тетра(3-пиридил)бактериохлорина характерны период разгорания флуоресценции в течение первых 5 ч инкубации с клетками и период выгорания при инкубации препарата с клетками более 5 ч (5-24 ч) (рис. 54б).

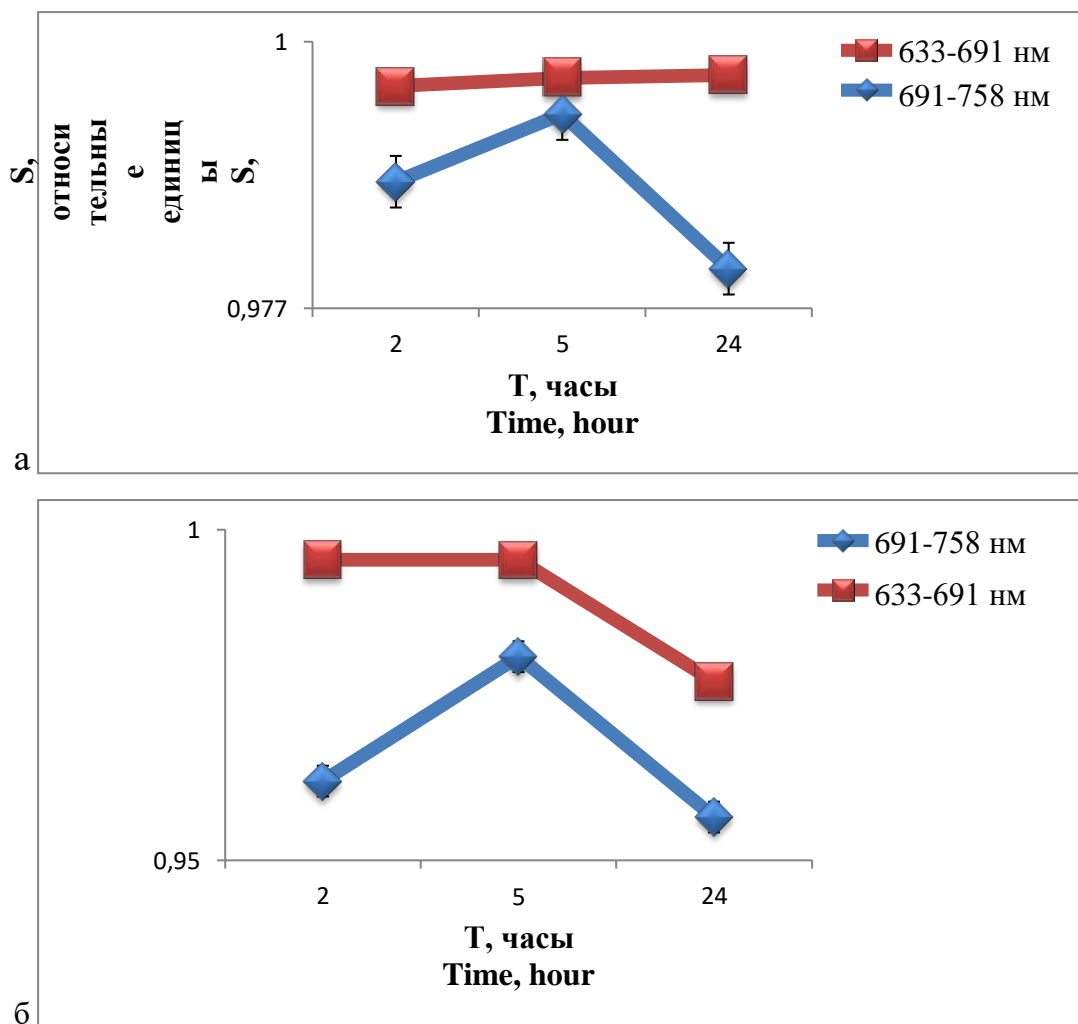


Рис. 54. *Временная зависимость интенсивности сигнала флуоресценции поверхностно активных молекул наночастиц мезо-тетра(3-пиридил)бактериохлорина:*

а – в клетках глиомы С6

б – в клетках иммунной системы – моноцитах человека ТНР-1

(•) 633-691 нм: флуоресцентный сигнал, соответствующий поверхностно активным молекулам, которые имеют спектроскопические свойства молекулы хлорина

(•) 691-758 нм: флуоресцентный сигнал, соответствующий поверхностно активным молекулам, которые имеют спектроскопические свойства молекулы бактериохлорина

Взаимодействие молекулярных нанокристаллов *мезо*-тетра(3-пиридил)бактериохлорина с клетками приводит к появлению спектра флуоресценции, характерного для раствора бактериохлорина. Водный коллоид нанокристаллов *мезо*-тетра(3-пиридил)бактериохлорина, изначально не являясь фототоксичным, в условиях клеточного окружения демонстрирует свойства фотосенсибилизатора ближнего инфракрасного диапазона. С помощью конфокальной микроскопии продемонстрировано диффузное распределение бактериохлорина внутри цитоплазмы клеток исследуемых клеточных структур. Продemonстрировано, что исследованный *мезо*-тетра(3-пиридил)бактериохлорин является перспективным соединением для создания препарата на основе его молекулярных нанокристаллов для использования в качестве терапевтического агента с большой глубиной фотодинамического воздействия.

5.3. Новый подход возбуждения фотосенсибилизатора излучением Вавилова-Черенкова. Расчет радиуса действия.

Облучение тканей лазерным излучением с длиной волны, соответствующей полосе поглощения введенного препарата, приводит к возбуждению селективно накопившегося ФС, который передает энергию возбуждения присутствующему в тканях молекулярному кислороду, переводя его в химически активное состояние, что провоцирует фотохимические реакции, приводящие к повреждению структур биомолекул, а впоследствии и к гибели пораженных клеток. Однако глубокая инвазивность злокачественных глиом и обширное метастазирование вглубь мягкой мозговой ткани исключает возможность тотальной деструкции раковых клеток при помощи лазерного излучения, что обуславливается весомой долей его поглощения биотканью. Таким образом, инновационной моделью для возбуждения фотосенсибилизатора (ФС) может служить независимый источник излучения. В качестве такого независимого излучения в рамках данной работы исследовалось излучение Вавилова-Черенкова (ВЧ), которое возникает при позитронном бета-

распаде радионуклида, входящего в состав радиофармпрепарата (РФП). Выбор подходящего РФП позволяет изучать методом позитронной эмиссионной томографии (ПЭТ) метаболизм и транспорт веществ в организме, отслеживая распределение в организме биологически активных соединений, меченных позитрон-излучающими радиоизотопами. ПЭТ является диагностическим методом ядерной медицины, который основан на регистрации пары гамма-квантов, возникающих при аннигиляции позитронов с электронами.

При использовании в качестве фотосенсибилизатора 5-АЛК, из которой клетки синтезируют ФС ПпIX, для флуоресцентной интраоперационной диагностики, достигается более чем 5-кратная [91-92] контрастность накопления ПпIX в опухоли по сравнению с нормальной корой. Данный механизм основан на способности клеток глиомы к повышенному накоплению в присутствии экзогенной 5-аминолевулиновой кислоты ПпIX в митохондриях патологических клеток, который в интактных тканях быстро превращается в фотонеактивный гем под действием феррохелатазы, активность которой повышена в здоровых тканях. Однако стоит отметить, что в зависимости от степени малигнизации и типа опухоли головного мозга имеют различную тенденцию к накоплению 5-АЛК индуцированного ПпIX.

В качестве РФП в работе использовалось соединение 2-фтор-2-дезоксид-глюкоза (ФДГ), которое является биологическим эквивалентом глюкозы: активно поглощается раковыми клетками и также в результате гликолиза локализуется в митохондриях патологических клеток. Исследования ПЭТ с применением этого препарата позволяет визуализировать патологические очаги: локализацию опухоли и наличие метастазов. Фтор-18 обладает оптимальными характеристиками для использования: наиболее удобным периодом полураспада ($T_{1/2}=109,8$ мин.) и наименьшей энергией излучения, т.е. позволяет получать ПЭТ-изображения высокой контрастности при низкой дозовой нагрузке на пациентов. Молекула ФДГ содержит радиоактивный (позитрон-излучающий) нуклид фтор-18, вследствие распада которого возникает излучение ВЧ, которое необходимо для возбуждения ФС. ФДГ

вводится животному в вену в момент максимального уровня накопления ФС в опухоли (в случае ПпIX - через 2 часа после внутривенного введения 5-АЛК), доза препарата в растворе эквивалентна 5—10 мКи, после чего препарат распределяется по всему организму. Исследования ПЭТ с применением этого препарата позволяет визуализировать патологические очаги: локализацию опухоли и наличие метастазов. Таким образом, высокая тропность ФС (5-АЛК индуцированного ПпIX) и РФП (ФДГ) к опухоли при последовательном их внутривенном введении в организм обуславливает накопление препаратов непосредственно в пределах одной органеллы, а именно пределах митохондрий патологических клеток, что в конечном счете обуславливает высокую вероятность эффективного взаимодействия препаратов непосредственно в раковых клетках, индуцируя фотодинамический эффект и разрушение патологического очага. В этой связи были проведены оценочные расчеты радиуса взаимодействия ключевых элементов цепи механизма фотодинамической терапии.

За счет хаотического движения атомов и молекул становится возможным явление переноса энергии. В свою очередь явление ферстервского переноса энергии обеспечивает условия для измерения времени жизни флуоресценции макромолекул путем детектирования и дальнейшего анализа динамики процессов их взаимодействия с микроокружением. Основная идея состоит в том, что событие поглощения лазерного излучения ($\tau \sim 10^{-15}$ с), можно считать мгновенным относительно события излучательной релаксации, сопровождающейся флуоресценцией ($\tau \sim 10^{-8}$ с) [93]. В этой связи спектр поглощения играет роль интегральной усредненной характеристики отдельных актов поглощения в отдельных флуорофорах, оставаясь при этом нечувствительным к молекулярной динамике единичных молекул. Однако в свою очередь излучательные переходы, которые сопровождаются, в частности флуоресценцией, происходят в значительно более длительный промежуток времени $\tau \sim 10^{-8}$ с. Способность флуорофоров оставаться в возбужденном

состоянии на протяжении длительного времени дает возможность оценить взаимодействие с микроокружением путем оценки кинетики затухания флуоресценции. В присутствии молекулярного кислорода энергия возбужденного триплетного состояния флуорофора безызлучательно переходит на кислород, что переводит его из основного триплетного состояния в возбужденное синглетное состояние. Коэффициент диффузии кислорода $D \sim 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$. В свою очередь в соответствии с соотношением Эйнштейна-Смолуховского

$$\langle dx^2 \rangle = 2D\tau,$$

где D – коэффициент диффузии, τ – время жизни уровня, с которым происходит взаимодействие, x – ферстеровский радиус взаимодействия [94].

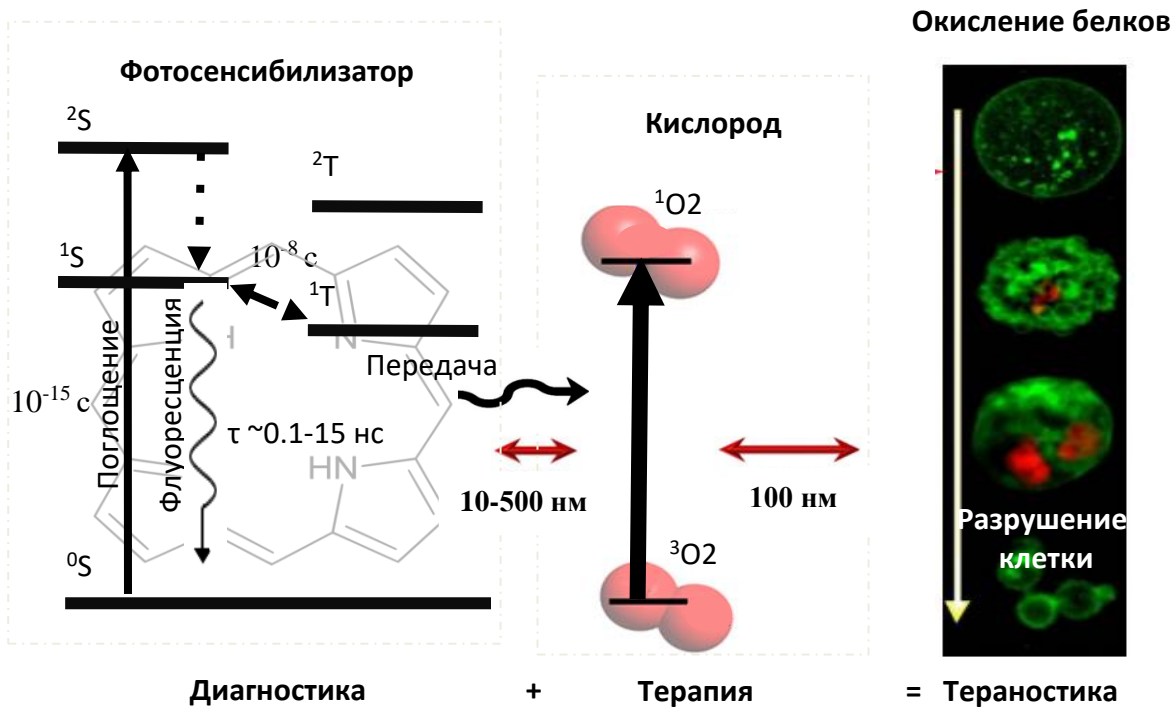


Рисунок 55. Диаграмма Яблонского, отражающая процессы поглощения, флуоресценции, переноса энергии применительно к ФДТ

Возвращаясь к диаграмме Яблонского применительно к механизму фотодинамической терапии, рассмотрим подробнее процесс

безызлучательного переноса энергии с возбужденного триплетного уровня (1T) фотосенсибилизатора на молекулярный кислород, что переводит его тем самым в возбужденное состояние, а именно, обеспечивая переход из основного триплетного состояния 3O_2 в возбужденное синглетное состояние кислорода 1O_2 . Стоит отметить, что в конечном счете взаимодействие происходит между двумя триплетными уровнями: фотосенсибилизатора (1T) и молекулярного кислорода (3O_2). Таким образом, для расчета радиуса взаимодействия фотосенсибилизатора с кислородом необходимо учитывать время жизни триплетного уровня молекулярного кислорода. Зная коэффициент диффузии кислорода $D \sim 2,5 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2/\text{с}$ и ввиду того, что рассматриваемое взаимодействие осуществляет молекулярный кислород в триплетном состоянии, время жизни которого составляет $\tau \sim 5 \cdot 10^{-6} \text{ с}$, то в соответствии с соотношением Эйнштейна-Смолуховского ферстеровский радиус взаимодействия может достигать 500 нм ($\langle r^2 \rangle = 2D\tau$).

В основе фотодинамической терапии лежит механизм цитотоксического действия, который реализуется за счет окисления белков путем переноса энергии с возбужденного уровня синглетного кислорода на жизненно важные молекулярные структуры клетки, тем самым разрушая их. Время жизни возбужденного синглетного состояния кислорода составляет $2-3 \cdot 10^{-6} \text{ с}$ [94]. Оценка радиуса цитотоксического действия синглетного кислорода по соотношению Эйнштейна-Смолуховского позволяет установить $x \sim 100 \text{ нм}$ ($\langle r^2 \rangle = 2D\tau$).

Поскольку интенсивность излучения точечного источника убывает с расстоянием $\sim r^{-3}$, то основной задачей для эффективного возбуждения ФС является подбор препаратов (РФП и ФС) таким образом, чтобы в результате их локализация была в пределах одной органеллы. Данное предположение было доказано экспериментально. Выбор в качестве фотосенсибилизатора

препарата сосудистого типа (хлорин Е6) на фоне использования препарата ФДГ, который накапливается непосредственно в патологических клетках, позволил продемонстрировать отсутствие цитотоксического эффекта в тканях опухоли и выводящих органах ввиду отсутствия возбуждения ФС излучением ВЧ. Причиной послужило значительное расстояние между донором (ФДГ) и акцептором (ФС) излучения > 5 мкм, поскольку в случае накопления препаратов в различных структурах опухолевой ткани (а именно: в опухолевых клетках - ФДГ, в сосудистой сети опухоли - ФС) минимальным расстоянием между ними станет линейный размер единичной клетки $\sim 5-10$ мкм. Экспериментальный подбор препаратов показал, что можно говорить об эффективной деструкции клеток-мишеней в случае расположения препаратов в пределах одной органеллы в пределах ~ 2 мкм. Подобранные фотосенсибилизатор (5 АЛК) и радиофармпрепарат (ФДГ) в соответствии с их метаболической активностью, которые в конечном итоге локализуются в митохондриях, то есть в пределах 2 мкм, продемонстрировали значительный фотодинамический эффект в области максимального накопления обоих препаратов.

5.4. Результаты исследования эффективности возбуждения фотосенсибилизаторов излучением Вавилова- Черенкова

Контроль уровня накопления ПпIXв норме (мышца) и в опухоли *in vivo* производился с помощью волоконного спектрометра ЛЭСА-01-Биоспек. Исследование уровня накопления ПпIX было проведено для двух различных случаев: при внутривенном введении 5-АЛК и при последовательном, с интервалом в 2 часа, внутривенном введении 5-АЛК и ФДГ соответственно (рис. 56). Динамика биораспределения радиофармпрепарата ФДГ *in vivo* регистрировалась с помощью ПЭТ-сканера и было зафиксировано максимальное накопление ФДГ в опухоли спустя 60 мин после начала ПЭТ-исследования (рис.57).

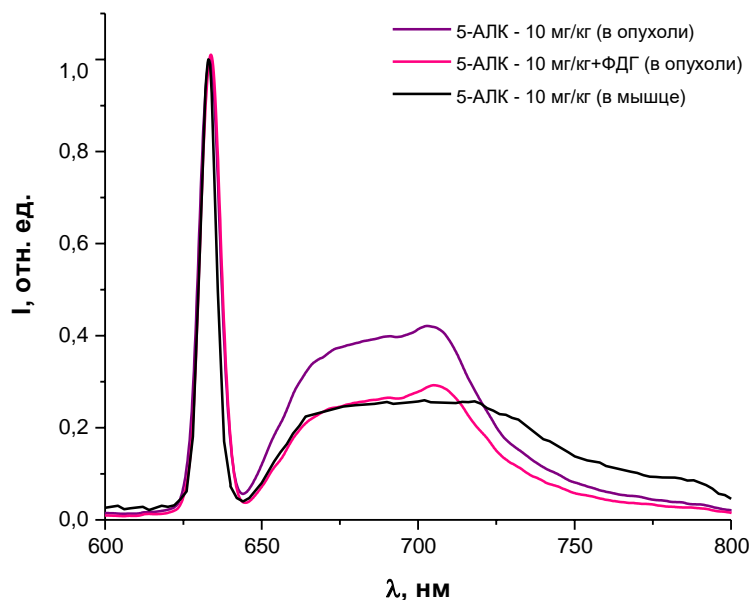


Рисунок 56. Спектры флуоресценции препарата ПпIX в мышце после внутривенного введения 5-АЛК; в опухоли ($\lambda_{ex} = 632.8$ нм) в случае внутривенного введения 5-АЛК, в случае последовательного внутривенного введения 5-АЛК и ФДГ.

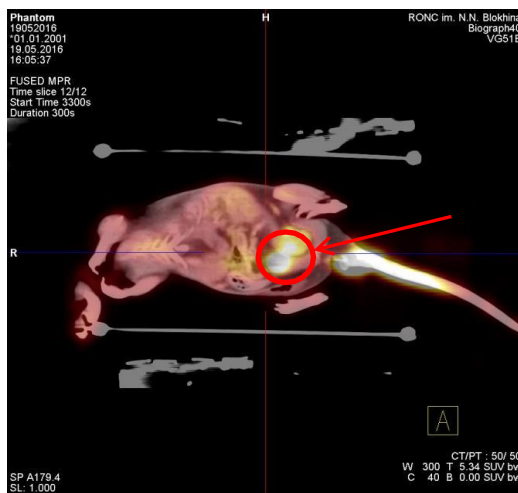


Рисунок 57. Биораспределение ФДГ *in vivo* через 60 мин после его внутривенного введения. Изображение получено с помощью ПЭТ-сканера.

Гистологический анализ криосрезов опухоли, полученных от экспериментальных животных при введении 5-АЛК без ФДГ, показал наличие в срезе активно пролиферирующих клеток глиомы С6. Большинство злокачественных клеток сохранили свою жизнеспособность, что подтверждается сплошным окрашиванием АО без окрашивания PI (зеленый цвет на изображении) (рис. 58). Гистологический анализ криосрезов опухоли, полученных от экспериментальных животных,

подверженных последовательному внутривенному введению двух препаратов: 5-АЛК и ФДГ, показал наличие процессов селективного разрушения пролиферирующих клеток глиомы С6. В срезах были обнаружены ярко выраженные некротических зоны, которые занимали примерно 20-30% от всего объема опухоли, что подтверждается окрашиванием части клеток PI (красный цвет на изображении) (рис. 58). Однако стоит заметить, что часть злокачественных клеток сохранили свою жизнеспособность, о чем свидетельствует отсутствие тотального окрашивания PI (рис. 57б).

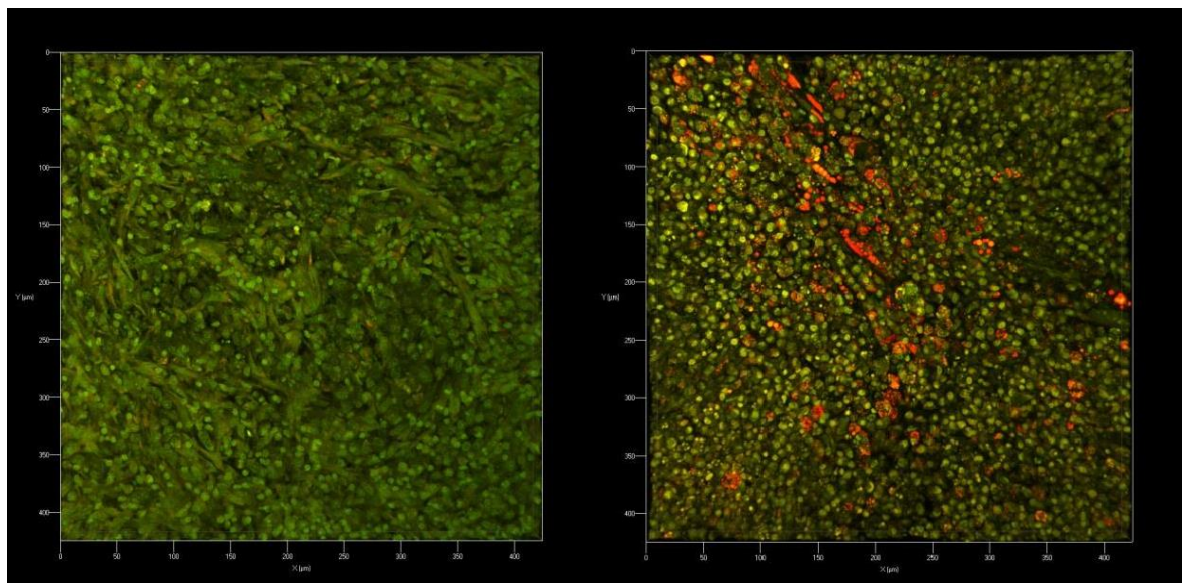
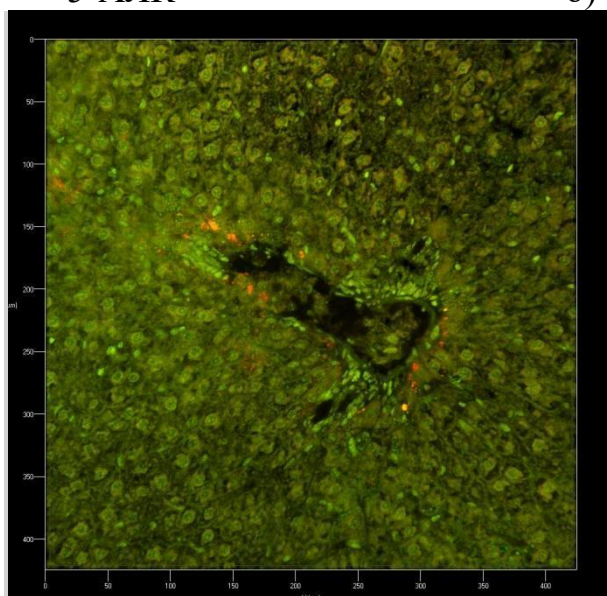


Рисунок 58. 3D-реконструкция флуоресцентных изображений криосрезов опухоли глиомы С6 окрашенных АО (зеленый цвет - изображение живых клеток) и PI (красный цвет - изображение погибших клеток), полученные от экспериментальных животных: а) в случае внутривенного введения 5-АЛК; б) в случае последовательного внутривенного введения 5-АЛК и ФДГ.

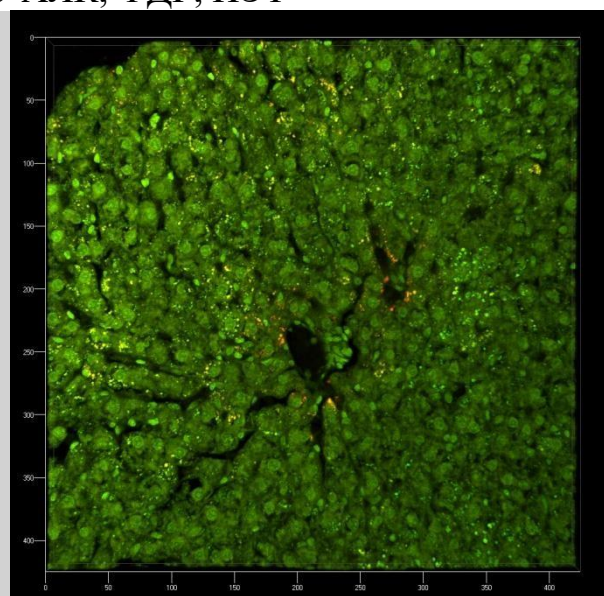
Гистологический анализ криосрезов выводящих органов (печень, почка, селезенка, легкие, сердце, мышца рядом с опухолью), полученных от экспериментальных животных, подверженных введению только 5-АЛК, а также последовательному внутривенному введению двух препаратов: 5-АЛК и ФДГ, не выявил различий между органами животных из разных групп.

В качестве наглядного результата представлены изображения 3D-реконструкции флуоресцентных изображений криосрезов выводящих органов, окрашенных АО и РІ, полученные от экспериментальных животных: в случае внутривенного введения 5-АЛК и в случае последовательного внутривенного введения 5-АЛК и ФДГ. Результаты анализа изображений показали: клетки тканей всех исследуемых органов сохранили свою жизнеспособность в обоих случаях, что подтверждается сплошным окрашиванием АО без окрашивания РІ (зеленый цвет на изображении) (рис 59). Полученные результаты отсутствия деструкции в тканях выводящих органов позволяют сделать вывод о наличии выраженной селективной деструкции злокачественных клеток под действием ФДГ.

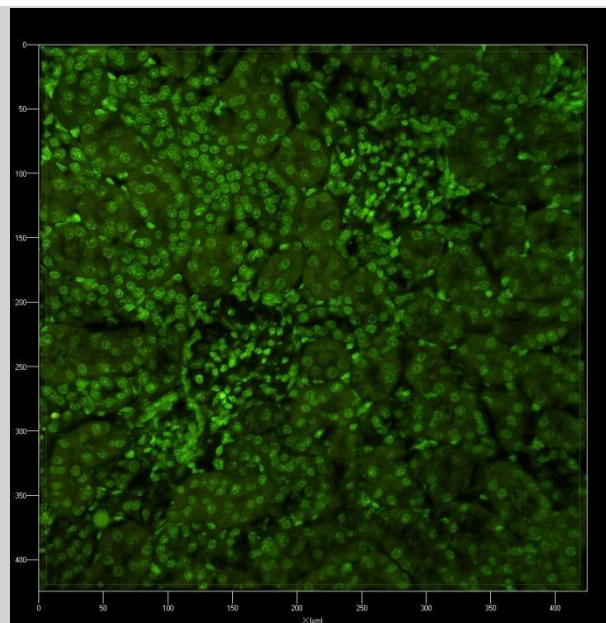
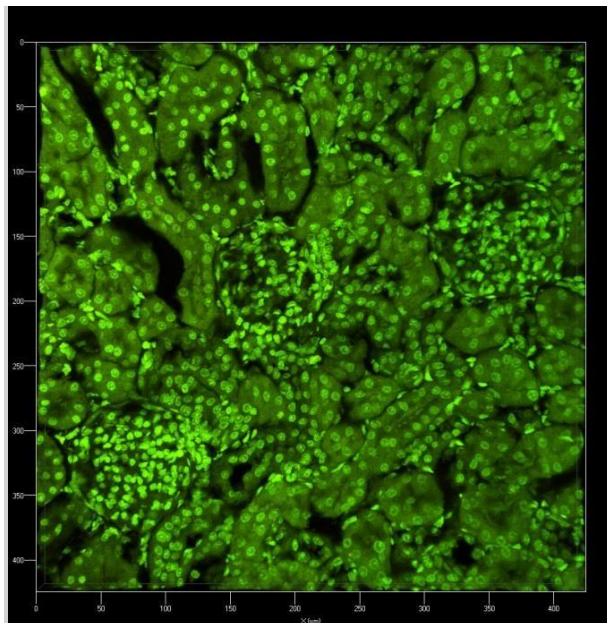
а) 5-АЛК



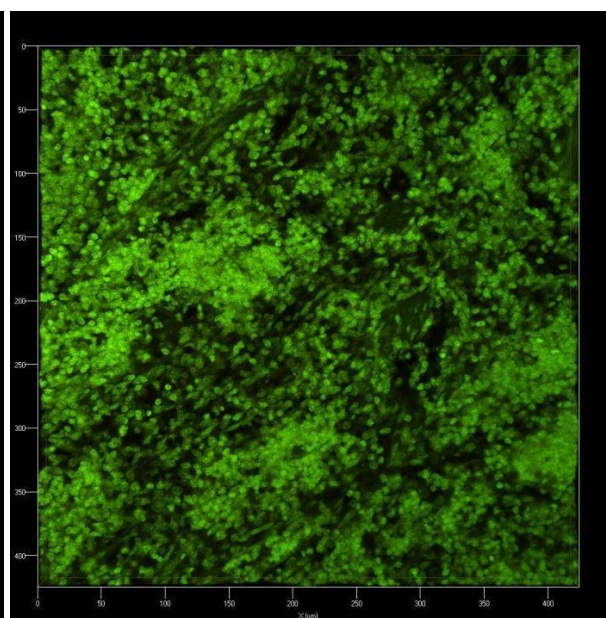
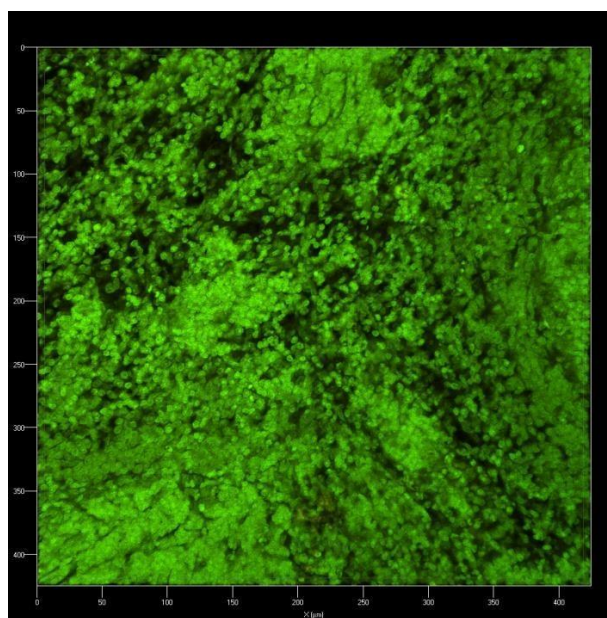
б) 5-АЛК, ФДГ, ПЭТ



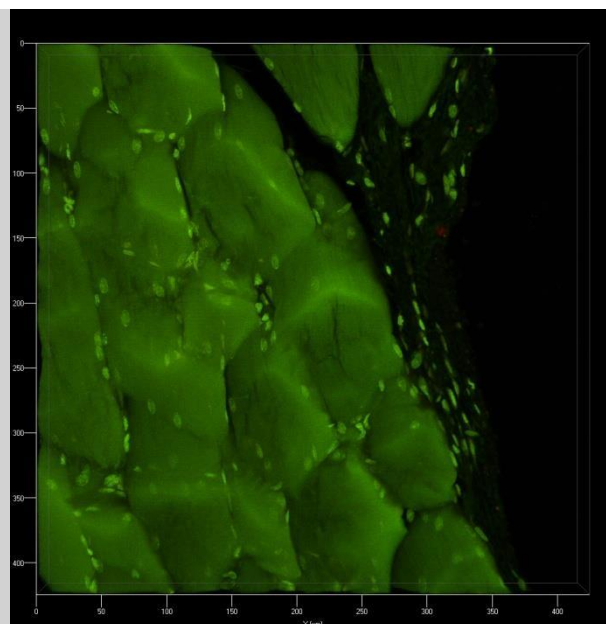
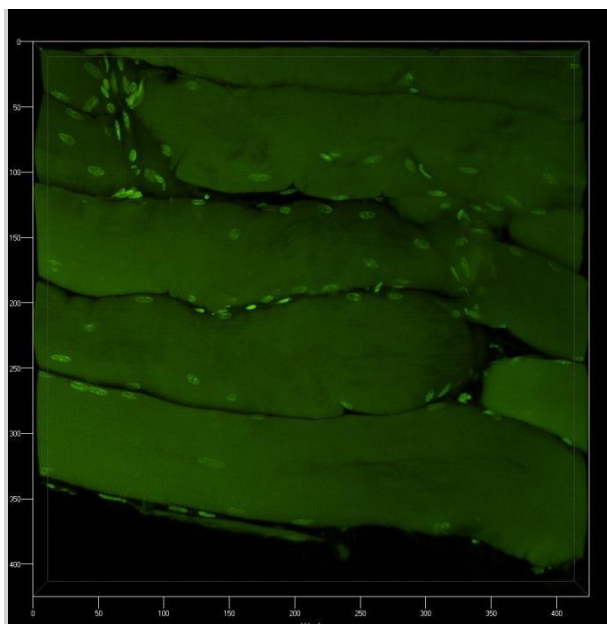
печень



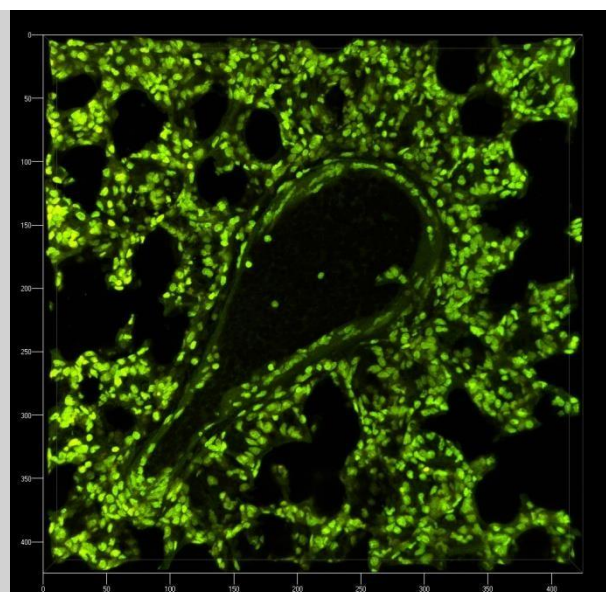
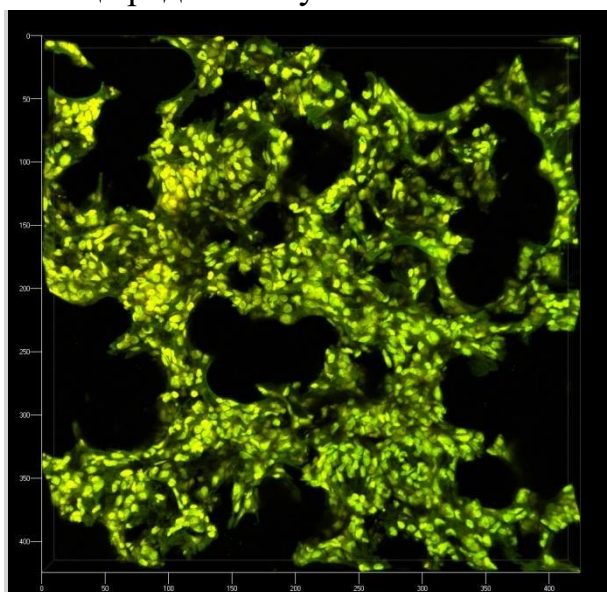
Почка



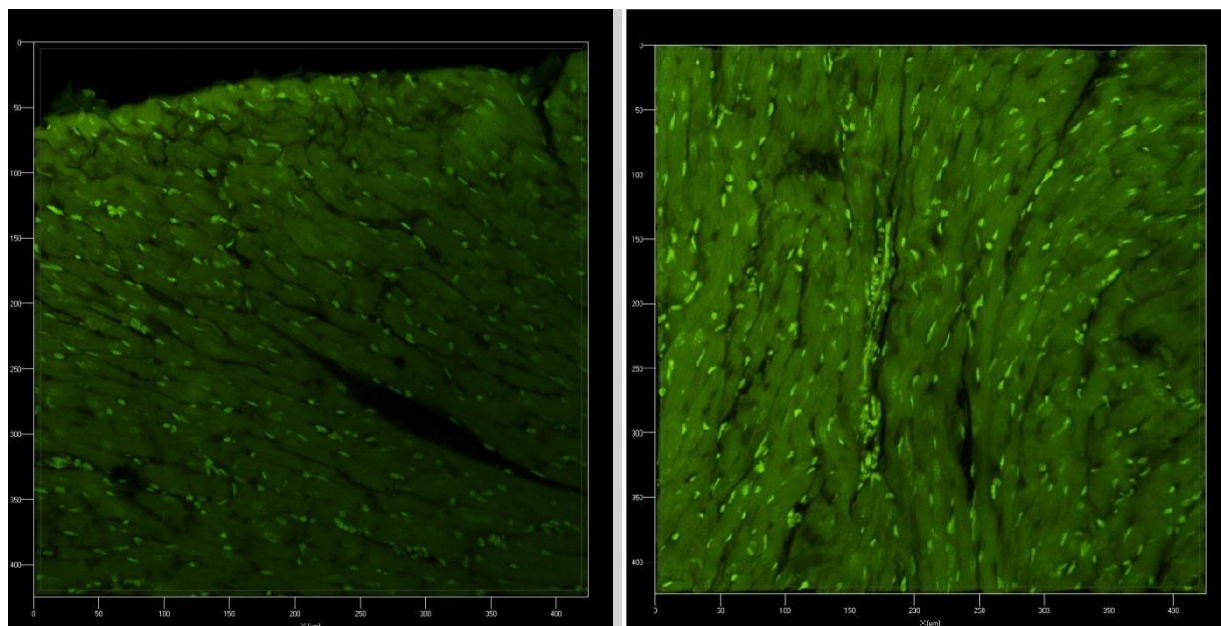
селезенка



мышца рядом с опухолью



легкие



сердце

Рисунок 59. 3D-реконструкция флуоресцентных изображений криосрезов внутренних органов, окрашенных АО (зеленый цвет - изображение живых клеток) и PI (красный цвет - изображение погибших клеток), полученные от экспериментальных животных: а) в случае внутривенного введения 5-АЛК; б) в случае последовательного внутривенного введения 5-АЛК и ФДГ.

Таким образом, выраженная селективная деструкция злокачественных клеток имела место только в случае с животными, подверженными последовательному внутривенному введению двух препаратов: 5-АЛК и ФДГ. Причиной частичного некроза опухоли стоит считать механизм фото деструкции, индуцированный излучением ВЧ. Однако стоит заметить отсутствие абсолютного фотодинамического эффекта и тотальной гибели опухолевых клеток. Это явление, вероятно, обусловлено тем, что для тотального повреждения клеток необходимо, чтобы оба препарата локализовались в пределах одной клетки и в достаточной концентрации для эффективного взаимодействия: возбуждения ФС посредством излучения ВЧ, индуцированного распадом ФДГ. В данном эксперименте, как показывают спектры люминесценции, концентрация ПпIX оказалась ниже терапевтической дозы, обычно используемой для ФДТ других опухолевых процессов, вероятно, по причине неоптимального выбора опухолевой модели.

Несмотря на то, что ФДГ имеет свойство также накапливаться вне патологии, а именно в выводящих органах, тем не менее терапевтический эффект обнаружен только в области, где ФДГ и ПпIX находятся в непосредственной близости, что сводит к минимуму токсичность метода. Однако это явление требует более детального изучения в последующих экспериментах.

Таким образом, сравнительный гистологический анализ криосрезов опухоли в отсутствии ФДГ (рис.58) и в присутствии ФДГ (рис.58) показывает явное преобладание некротических очагов в последнем случае, что подтверждает наличие фотоиндуцированного взаимодействия между ПпIX и РФП, а также подтверждает селективность исследуемого метода.

В рамках данного исследования был апробирован и реализован новый подход к проведению ФДТ «изнутри». Источником для возбуждения ФС послужило излучение ВЧ, которое возникает вследствие радиоактивного распада нуклида фтор-18. Результаты исследования показали эффективность использования излучения ВЧ для активации ФС ПпIX и наличие выраженного фотодинамического эффекта, обнаруженного путем гистологического анализа криосрезов опухоли. Несмотря на то, что ФДГ накапливается в тканях выводящих органов вне патологии, тем не менее терапевтический эффект обнаружен только в области, где ФДГ и ПпIX находятся в непосредственной близости, что сводит к минимуму токсичность метода. Установленная совместимость исследуемых компонентов означает, что данный подход может оказаться перспективным для фототерапии глубокозалегающих опухолей и метастазов.

Заключение к пятой главе

В ходе работы было показано, что, обеспечивающие наибольшую глубину проникновения излучения, фотосенсибилизаторы активно накапливаются как в иммунокомпетентных клетках (моноциты человека), так и в опухолевых клетках различного генеза, что подтверждает возможность их применения для тераностики онкологических заболеваний. На примере фотосенсибилизаторов – фталоцианина алюминия и бактериохлорина было показано, что в кристаллическом виде такие наночастицы водонерастворимы и нетоксичны, но при контакте с опухолевыми или

иммунными клетками приобретают способность флуоресцировать, становятся фототоксичными. Таким образом, при использовании молекулярных нанокристаллов фотосенсибилизаторов, реализован новый подход применения их в качестве регуляторов активности иммунокомпетентных клеток. Еще одним реализованным новым подходом, нацеленным на увеличение глубины фотодинамического воздействия, явилось исследование эффективности возбуждения ФС излучением В-Ч. Таким образом, была подтверждена возможность проведения ФДТ «изнутри», что открывает новые возможности использования данного метода для глубоко залегающих опухолей и метастазов

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

1. Разработан и апробирован новый комплексный подход к проведению лазерно-индуцированной флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии глубокозалегающих и метастазирующих опухолей мозга с применением волоконно-оптических имплантов (портов).
 - 1.1. Разработана уникальная оптоволоконная система, имеющая многофункциональную внутреннюю структуру, которая выполняет роль порта для доставки препарата (ФС) и лазерного излучения к опухоли головного мозга экспериментальных животных с целью осуществления мониторинга процессов, проведения регулярной флуоресцентной диагностики и своевременной фотодинамической терапии зондируемой области.
 - 1.2. Показана информативность метода время разрешенной лазерной флуоресцентной микроскопии для анализа клеточного состава опухолевой ткани по типу их метаболизма.
 - 1.3. Разработан новый подход к анализу клеточного состава опухолевой ткани, различающегося по фенотипу и степени активности иммунокомпетентных клеток, с применением фотосенсибилизаторов и время- разрешенной лазерной флуоресцентной спектроскопии. Это в свою очередь позволило осуществлять контроль фотодинамического воздействия на клеточные компоненты опухоли, в том числе на иммунокомпетентные клетки.
2. Предложены и реализованы новые подходы к повышению глубины лазерно-индуцированного фотодинамического воздействия и флуоресцентного анализа рецидивирующих и метастатических очагов опухолей мозга.
 - 2.1. Исследованы спектрально-флуоресцентные свойства трех фотосенсибилизаторов дальней красной и ближней инфракрасной области спектра, в их молекулярной и нано-формах в условиях *in vitro* и *vivo*, Определены области их оптимального применения с целью повышения эффективности ФД и ФДТ глубокозалегающих опухолей и метастазов
 - 2.2. Показана эффективность использования в качестве источника возбуждения ФС внутриклеточного источника - излучения Вавилова-Черенкова для

осуществления фотодинамического воздействия «изнутри» с целью снижения вероятности рецидивов опухолей мозга, в частности путем воздействия на труднодоступные для лазерного излучения - метастатические очаги и отдельные единичные опухолевые клетки.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Maklygina Yu.S.**, Borodkin A.V., Loschenov V.B. Laser microscope-spectrum analyzer for studying intracellular accumulation of near infrared emitting photosensitizers in vitro. // BIOMEDICAL PHOTONICS.-2015.–N3.-P.3-9.
2. **Maklygina Yu.S.**, Sharova A.S., Kundu B., Balla V.K., Steiner R., Loschenov V.B. Spectral luminescent properties of bacteriochlorin and aluminum phthalocyanine nanoparticles as hydroxyapatite implant surface coating.// BIOMEDICAL PHOTONICS. -2016. -V. 5. -N2. -P. 4–12.
3. Sharova A. S., **Maklygina YU. S.**, Lisichkin G. V., Mingalev P. G., Loschenov V. B. Nanodiamonds + bacteriochlorin as an infrared photosensitizer for deep-lying tumor diagnostics and therapy//Journal of Physics: Conference Series. -2016. -V. 737 –N1.
4. **Maklygina Y.S.**, Borodkin A.V., Ryabova A.V., Pominova D.V., Makarova E.A., Lukyanets E.A., Loshchenov V.B. Study of subcellular distribution of crystalline meso-tetra(3-pyridyl)bacteriochlorin nanoparticles// Biomedical Photonics -2016; -5(4), -P. 25-34
5. Kholodtsova M.N., **Samsonova I.S. (Maklygina)**, Blondel W., Loschenov V.B. Metal nanoparticles of different shapes influence on optical properties of multilayered biological tissues. // Progress in Biomedical Optics and Imaging – Proceedings of SPIE,-2015, -V 9542, -N 954205.
6. **Маклыгина Ю.С.**, Рябова А. В., Лощенов В. Б., Соколов Е. Н., Невзоров Д. И., Григорьева Е. Ю., Долгушин М.Б., Долгушин Б.И. Использование излучения Вавилова-Черенкова для деструкции клеток глиомы С6 крысы при сочетанном воздействии ФДГ и 5АЛК индуцированного протопорфирина IX. Пилотное экспериментальное исследование// Вестник РОНЦ –2016, - №4, - Т. 27, С. 133-139
7. **Maklygina Yu. S.**, Borodkin A.V., Yusubalieva G. M., Ryabova A.V., Pominova D.V., Lukyanets E.A., Goryainov S. A., Potapov A. A., Chekhonin V.P., Shcherbakov I.A., Loshchenov V.B., The development of neoscaffold for the glioblastoma therapy, Biomedical Photonics, - 2017, 6, № 4. p. 12-18.
8. **Maklygina YS**, Sharova AS, Kundu B, Balla VK, Steiner R, et al. (2016) Photobactericidal Properties of Hydroxyapatite Implant Surface Coating. Bioceram Dev Appl 6:094. doi: 10.4172/2090-5025.1000094
9. Sharova A S, **Maklygina YU S**, Yusubalieva G M, Shikunova I A, Kurlov V N and Loschenov V B Sapphire implant based neuro-complex for deep-lying brain tumors phototheranostics Published under licence by IOP Publishing Ltd Journal of Physics: Conference Series, Volume 945, Number 1, p.1-5, 2018
10. Sharova A S, **Maklygina Yu S**, Romanishkin I D , Yusubalieva G M, Ryabova A V, Chekhonin V P, Loschenov V B Optical fiber neurosystem for deep-lying brain tumors phototheranostics Proc. SPIE 10695, Optical Instrument Science, Technology, and Applications, 106950O (28 May 2018); doi: 10.1117/12.2312027
11. **Maklygina YuS**, Romanishkin ID, Ryabova AV, Yakavec IV, Bolotin L, Loschenov VB. A novel spheroid model for preclinical intercellular nanophotosensitizer-mediated tumor study. Bulletin of RSMU. 2018; (6): 14–20. doi: 10.24075/brsmu.2018.079
12. A. S. Sharova, **Y. S. Maklygina**, A. V. Ryabova and V. B. Loschenov, "Spectral

properties comparative analysis of normal and tumor brain tissues in the visible and near infrared optical ranges," *2018 International Conference Laser Optics (ICLO)*, St. Petersburg, 2018, pp. 497-497. doi: 10.1109/LO.2018.8435632

13. **Y. S. Maklygina**, G. M. Yusubalieva, I. D. Romanishkin, A. V. Ryabova, V. P. Chekhonin and V. B. Loschenov, "TAM identification by fluorescence lifetime on different models," *2018 International Conference Laser Optics (ICLO)*, St. Petersburg, 2018, pp. 538-538. doi: 10.1109/LO.2018.8435696

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ashby LS, Smith KA, Stea B. Gliadel wafer implantation combined with standard radiotherapy and concurrent followed by adjuvant temozolomide for treatment of newly diagnosed high-grade glioma: a systematic literature review. *World J Surg Oncol*. 2016 Aug 24;14(1):225.
2. Jain A, Betancur M, Patel GD, Valmikinathan CM, Mukhatyar VJ, Vakharia A, Pai SB, Brahma B, MacDonald TJ, Bellamkonda RV. Guiding intracortical brain tumour cells to an extracortical cytotoxic hydrogel using aligned polymeric nanofibres *Nat Mater*. 2014 Mar;13(3):308-16
3. M.Loshchenov, P.Zelenkov, A.Potapov, S. Goryajnov, A. Borodkin. Endoscopic fluorescence visualization of 5-ALA photosensitized central nervous system tumors in the neural tissue transparency spectral range. // *Photonics & Lasers in Medicine*. Volume 3, Issue 2 (Apr 2014) Pages 159–170, ISSN (Online) 2193-0643, ISSN (Print) 2193-0635
4. Conklin MW, Provenzano PP, Eliceiri KW, Sullivan R, Keely PJ. Fluorescence lifetime imaging of endogenous fluorophores in histopathology sections reveals differences between normal and tumor epithelium in carcinoma in situ of the breast. *Cell Biochem Biophys* 2009;53(3):145-57.
5. Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci*. 2016 Jan;19(1):20-27.
6. Muller P.J., Wilson B.C. Photodynamic therapy// *Neurooncology. The Essentials*. New York,2000. Ch. 25. P. 249—256
7. Korbelik M, Krosi G. Br Photofrin accumulation in malignant and host cell populations of various tumours. *J Cancer*. 1996 Feb;73(4):506-13.
8. Kotagiri N., Sudlow G.P., Akers W.J., Achilefu S. Breaking the depth dependency of phototherapy with Cerenkov radiation and low-radiance-responsive nanophotosensitizers. // *Nature Nanotechnology*. 2015. 10(4):370-9
9. S.M. Azarin, J. Yi, R.M. Gower, B.A. Aguado, M.E. Sullivan, A.G. Goodman, E.J. Jiang, S.S. Rao, Y. Ren, S.L. Tucker, V. Backman, J.S. Jeruss & L.D Shea. In vivo capture and label-free detection of early metastatic cells. // *Nature Communications*. 2015 6, Article number: 8094
10. Олюшин В.Е., Глиальные опухоли головного мозга: краткий обзор литературы и протокол лечения больных, *Нейрохирургия*, 2005, 4, стр. 41-47
11. Khan L, Soliman H, Sahgal A, Perry J, Xu W, Tsao MN., External beam radiation dose escalation for high grade glioma, *Cochrane Database Syst Rev*, 2016, № CD011475, 8, p.1-55
12. Rostomily, R. C. et al., Multimodality management of recurrent adult malignant

- gliomas: results of a phase II multiagent chemotherapy study and analysis of cytoreductive surgery, *Neurosurgery*, 1994, 35(3), p. 378-388
13. Blumenthal DT, Dvir A, Lossos A, Tzuk-Shina T, Lior T, Limon D, Yust-Katz S, Lokiec A, Ram Z, Ross JS, Ali SM, Yair R, Soussan-Gutman L, Bokstein F., Clinical utility and treatment outcome of comprehensive genomic profiling in high grade glioma patients, *J Neurooncol*, 2016, 130 (1), p.211-219
 14. Wang G, Fu XL, Wang JJ, Guan R, Tang XJ., Novel strategies to discover effective drug targets in metabolic and immune therapy for glioblastoma., *Curr Cancer Drug Targets.*, 2017, 17(1), p. 17-39
 15. Luciano R, Saracino R, Battafarano G, Perrotta A, Manco M, Muraca M, Del Fattore A, Rossi M., New perspectives in glioblastoma: Nanoparticles-based approaches., *Curr Cancer Drug Targets.*, 2017, 17 (3) , p. 1-18
 16. Morrone FB, Gehring MP, Nicoletti NF., Calcium Channels and Associated Receptors in Malignant Brain Tumor Therapy., *Mol Pharmacol.*, 2016, 90(3), p. 403-9
 17. Ashby LS, Smith KA, Stea B., Gliadel wafer implantation combined with standard radiotherapy and concurrent followed by adjuvant temozolomide for treatment of newly diagnosed high-grade glioma: a systematic literature review, *World J Surg Oncol.*, 2016, 24:14(1), p.225
 18. Thompson, E.G. and Sontheimer, H.,A role for ion channels in perivascular glioma invasion, *Eur. Biophys. J.*, 2016, 45(7), p. 635–648
 19. Cuddapah, V.A., Robel, S., Watkins, S. and Sontheimer H.,A neurocentric perspective on glioma invasion, *Nat. Rev. Neurosci.*, 15(7), p. 455–465
 20. Esmaeili, M., Stensjøen, A.L., Berntsen, E.M., Solheim, O. and Reinertsen, I., The Direction of Tumour Growth in Glioblastoma Patients, *Sci. Reports*, 2018, 8 (1199),p. 1-6
 21. Jain A, Betancur M, Patel GD, Valmikinathan CM, Mukhatyar VJ, Vakharia A, Pai SB, Brahma B, MacDonald TJ, Bellamkonda RV., Guiding intracortical brain tumour cells to an extracortical cytotoxic hydrogel using aligned polymeric nanofibers, *Nat Mater.*, 2014,13(3), p. 308-16

22. Bellail, A. C., Hunter, S. B., Brat, D. J., Tan, C. & Van Meir, E. G., Microregionalextracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion, *Int.J. Biochem. Cell Biol.*, 2004, 36, p. 1046-1069
23. Loschenov V.B., Konov V.I., Prokhorov A.M., *Photodynamic Therapy and Fluorescence Diagnostics, Laser Physics*, 2000,10 (6), p. 1188-1207
24. Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R., *Mechanisms in Photodynamic Therapy: Part Two-Cellular Signaling, Cell Metabolism, and Modes of Cell Death // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2005, 2,(1), p.1-23
25. Sroka R., Stepp H., Hennig G., Brittenham G.M., Ruehm A., Lilge L., *Medical laser application: translation into the clinics, Journal of Biomedical Optics*, 2015, 20(6), p. 061110 ,
26. Горяйнов С. А., Потапов А. А., Гольбин Д. А., Зеленков П. В., Кобяков Г. Л., Гаврилов А. Г., Охлопков В. А., Шурхай В. А., Шелеско Е. В., Жуков В. Ю., Лощенов В. Б., Савельева Т. А., Кузьмин С. Г., *Флуоресцентная диагностика и лазерная биоспектроскопия как один из методов мультимодальной нейронавигации в нейрохирургии, Журнал «Вопросы нейрохирургии» имени Н.Н. Бурденко*, 2012; 6, стр. 57-65
27. Потапов А. А., Гаврилов А. Г., Горяйнов С. А., Гольбин Д. А., Зеленков П. В., Кобяков Г. Л., Охлопков В. А., Жуков В. Ю., Шишкина Л. В., Шурхай В. А., Лощенов В. Б., Савельева Т. А., Грачев П. В., Холодцова М. Н., Кузьмин С. Г., Ворожцов Г.Н., *Интраоперационная флуоресцентная диагностика и лазерная спектроскопия в хирургии глиальных опухолей головного мозга». Журнал «Вопросы нейрохирургии» имени Н.Н. Бурденко*, 2012; 5, стр. 3-12.
28. Savelieva T.A., Kalyagina N.A., Kholodtsova M.N., Loschenov V.B., Goryainov S. A., Potapov A.A., *Numerical modelling and in vivo analysis of fluorescent and laser light backscattered from glial brain tumors, Proc. SPIE 8230*, 2012, 82300L
29. Линьков К.Г., Березин А.Н., Лощенов В.Б., *Аппаратура для ФД и ФДТ. Росс.биотерапевт. журнал*, 2004. 3(2), стр. 54
30. Jiro Akimoto, *Photodynamic Therapy for Malignant Brain Tumors, Neurol Med Chir (Tokyo)*, 2016, 56, p. 151–157

31. Michael H. Gold and Mitchel P. Goldman, 5-Aminolevulinic Acid Photodynamic Therapy: Where We Have Been and Where We Are Going, *Dermatol. Surg.*, 2004, 30, p. 1077–1084
32. И. Г. Меерович, М. А. Грин, Г. А. Меерович, и др., Новые фотосенсибилизаторы ближнего инфракрасного диапазоне на основе производных бактериохлорина: предварительные результаты изучения *in vivo*, *Российский биотерапевтический журнал*, 2006, 5(2), стр. 73-73
33. Stranadko E.F., Kuleshov I.Yu., Karakhanov G.I., Photodynamic effects on pathogenic microorganisms (Modern state-of-art in antimicrobial photodynamic therapy), *Las Med.*, 2010, 14(2), p.52-56
34. Санарова Е.В., Ланцова А.В., Дмитриева М.В., Смирнова З.С., Оборотова Н.А. Фотодинамическая терапия-способ повышения селективности и эффективности лечения опухолей, *Российский биотерапевтический журнал*, 2014, 3, стр.109-118
35. Giovana Maria Fioramonti Calixto, Jéssica Bernegossi, Laura Marise de Freitas, Carla Raquel Fontana and MarlusChorilli, Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review, *Molecules*, 2016,21 (342), p.1-18
36. I. V. Pantiushenko, P. G. Rudakovskaya, A. V. Starovoytova, A. A. Mikhaylovskaya, M. A. Abakumov, M. A. Kaplan, A. A. Tsygankov, A. G. Majouga, M. A. Grin, and A. F. Mironov, Development of Bacteriochlorophyll a-Based Near-Infrared Photosensitizers Conjugated to Gold Nanoparticles for Photodynamic Therapy of Cancer, *Biochemistry*, 2015, 80(6), p. 752-762
37. Breymayer J., Rück A., Ryabova A.V., Loschenov V.B., Steiner R.W., Fluorescence Investigation of the Effect of Monocytes/ Macrophages and Skin Cells on Aluminium Phthalocyanine Nanoparticles, *Journal Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2014, 11 (3), p. 380–390
38. Vasilchenko S.Yu., Volkova A.I., Ryabova A.V., Loschenov V.B., Konov V.I., Mamedov A.A., Kuzminand S.G., Lukyanets E.A., Application of aluminum phthalocyanine nanoparticles for fluorescent diagnostics in dentistry and skin autotransplantation. *J. Biophoton.*, 2010, 3(5–6), p. 336–346

39. Yu.S. Maklygina, A.S. Sharova, B. Kundu, V.K. Balla, R. Steiner, V.B. Loschenov, Spectral luminescent properties of bacteriochlorin and aluminum phthalocyanine nanoparticles as hydroxyapatite implant surface coating, *Biomedical photonics*, 2016, 5(2), p. 4–12
40. «БИОСПЕК» [Электронный ресурс], Контроль ФДТ и диагностика, URL: http://www.biospec.ru/_PDT_Control_and_Diagnostics_r.html (дата обращения 06.05.2018)
41. «Фотокор» [Электронный ресурс], Многоугловые спектрометры динамического и статического рассеяния света PhotocorComplex, URL:<http://www.photocor.ru/theory> (дата обращения 01.04.2018)
42. Ivanova-Radkevich V. I., Filonenko E. V., Slovokhodov E. K., Smirnova I. P., Kuznetsova O. M., Lobaeva T. A., Gushchina Yu. Sh., Khadasheva Z. S., Organization of Clinical Trials of Photosensitizer based on 5-Aminolevulinic Acid Hexyl Ester, *Indian Journal of Science and Technology*, 2016, 9(18), p.1-7
43. Filonenko E.V., Kaprin A.D., Raszhivina A.A., Urlova A.N., Nechipai A.M., Fluorescence Diagnostics of Colon Malignant and Premalignant Lesions Using 5-Aminolevulinic Acid, *International Journal of Photoenergy*, 2014, 378673
44. “NIOPIK”. State Scientific Center “NIOPIK”_Alasens. [ONLINE] Available at: http://www.niopik.ru/products/pdt_and_fd/alasense/, [Accessed 31 March 2018]
45. Ma, Z., He, W., Yong, T. and Ramakrishna, S., Grafting of Gelatin on Electrospun Poly(ϵ -caprolactone) Nanofibers to Improve Endothelial Cell Spreading and Proliferation and to Control Cell Orientation, *Tissue eng*, 2005, 11(7/8), p. 1149-1158
46. Imani, R., Emami, S.H., Moshtagh, P.R., Baheiraei N. and Sharifi A.M., Preparation and Characterization of Agarose-Gelatin Blend Hydrogels as a Cell Encapsulation Matrix: An In-Vitro Study, *Journal of Macromolecular Science*, 2012, 51(8), p. 1606-1616
47. Nandi SK, Kundu B, Mukherjee J, Mahato A, Datta S, Balla VK., Converted marine coral hydroxyapatite implants with growth factors: in vivo bone regeneration., *Mater SciEng C Mater Biol Appl.*, 2015, 49, p. 816-23
48. Khan S. P., Auner G. G., Palyvoda O. et al., Biocompatibility assessment of next generation materials for brain implantable microelectrodes, *Materials Letters*, 2011,

65, p. 876–879

49. Kurlov V.N., "Sapphire: Properties, Growth, and Applications" in: Saleem Hashmi (editor-in-chief), *Reference Module in Materials Science and Materials Engineering*. Oxford: Elsevier; 2016, p. 1-11, ISBN: 978-0-12-803581-8, DOI: 10.1016/B978-0-12-803581-8.03681-X
50. Kurlov V.N., Rossolenko S.N., Abrosimov N.V. and Lebbou Kh., "Shaped Crystal Growth" in *Crystal Growth Processes Based on Capillarity Czochralski, Floating Zone, Shaping and Crucible Techniques*, Duffar Th. (Ed.), John Wiley & Sons, 2010, p. 277-354, ISBN-13: 9780-470-71244-3. DOI: 10.1002/9781444320237.ch5
51. Чехонин В.П., Баклашев В.П., Юсубалиева Г. М., Павлов К.А., Ухова О. В., Турина О. И. Моделирование и иммуногистохимический анализ глиомы С6 in vivo. *Клеточные технологии в биологии и медицине*, 2007, 2, стр. 65-73
52. J M Szulczewski, D R. Inman, D Entenberg, S M. Ponik, J Aguirre-Ghiso, J Castracane, J Condeelis, K W Eliceiri, P J Keely, In Vivo Visualization of Stromal Macrophages via label-free FLIM-based metabolite imaging *Scientific Reports* volume 6, Article number: 25086 (2016)
53. 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;5(1):3-8.
54. J.Breymayer, A.Rück, A.V. Ryabova, V.B. Loschenov, R.W. Steiner. Fluorescence Investigation of the Effect of Monocytes/Macrophages and Skin Cells on Aluminium Phthalocyanine Nanoparticles. // *Journal Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. Volume 11, Issue 3, September 2014, Pages 380–390
55. H.-P. Lassalle, M. Wagner, L. Bezdetsny, F. Guillemin, H. Schneckenburger. Fluorescence imaging of Foscan and Foslip in the plasma membrane and in whole cells. // *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology* 92 (2008) 47–53
56. J.Y. Perentes, D.G. Duda, and R.K. Jain. Visualizing anti-tumor immune responses in vivo. // *Dis Model Mech*. 2009. 2(3-4): 107–110. doi: 10.1242/dmm.001842;
57. S. J. Turley, V.Cremasco, J. L. Astarita. Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nature Reviews Immunology*. 2015. 15:669–682. doi:10.1038/nri3902;

58. P. Agostinis, K. Berg, K. A. Cengel et al., "Photodynamic therapy of cancer: an update," *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 61, no. 4, pp. 250–281, 2011.;
59. A. P. Castano, T. N. Demidova, and M. R. Hamblin, "Mechanisms in photodynamic therapy: part three-Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction," *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 2, no. 2, pp. 91–106, 2005;
60. A. Azzouzi, S. Vincendeau, E. Barret, A. Cicco, F. Kleinclauss, H. G. Poel, C. G. Stief, et al. Padeliporfin vascular-targeted photodynamic therapy versus active surveillance in men with low-risk prostate cancer (CLIN1001 PCM301): an open-label, phase 3, randomised controlled trial. // *The Lancet Oncology*. 2017.18(2):181-191. [http://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30661-1](http://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30661-1);
61. S. Mallidi, S. Anbil, S. Lee, D. Manstein, S. Elrington, G. Kositratna, D. Schoenfeld, B. Pogue, S. J. Davis, and T. Hasan. Photosensitizer fluorescence and singlet oxygen luminescence as dosimetric predictors of topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy induced clinical erythema. // *J Biomed Opt.* 2014 Feb; 19(2): 028001. doi: 10.1117/1.JBO.19.2.028001;
62. Shao P, Chapman DW, Moore RB, Zemp RJ. Monitoring photodynamic therapy with photoacoustic microscopy. // *J Biomed Opt.* 2015 Oct;20(10):106012. doi: 10.1117/1.JBO.20.10.106012;
63. M. A. Sirotkina, L. A. Matveev, M. V. Shirmanova, et al. Photodynamic therapy monitoring with optical coherence angiography. // *Scientific Reports* 7, Article number: 41506 (2017) doi:10.1038/srep41506;
64. R. Goldschmidt, V. Kalchenko, A. Scherz. Real time laser speckle imaging monitoring vascular targeted photodynamic therapy. // *Proc. SPIE 10047, Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XXVI*, 100470M (February 8, 2017); doi:10.1117/12.2251971;
65. D. K. Lakouas, D. Huglo, S. Mordona, M. Vermandel. Nuclear medicine for photodynamic therapy in cancer: Planning, monitoring and nuclear PDT. // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2017. V18:236–243. <http://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.03.002>.
66. M. Shams, B. Owczarczak, P. Manderscheid-Kern, D. A. Bellnier, and S. O.

Gollnick, "Development of photodynamic therapy regimens that control primary tumor growth and inhibit secondary disease," *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. 64, no. 3, pp. 287–297, 2015.

67. Jalili A, Makowski M, Switaj T, Nowis D, Wilczynski GM, Wilczek E, Chorazy-Massalska M, Radzikowska A, Maslinski W, Biały L. Effective photoimmunotherapy of murine colon carcinoma induced by the combination of photodynamic therapy and dendritic cells. *Clin Cancer Res*. 2004;10:4498-4508;

68. Saji H, Song W, Furumoto K, Kato H, Engleman EG. Systemic antitumor effect of intratumoral injection of dendritic cells in combination with local photodynamic therapy. *Clin Cancer Res*. 2006;12:2568-2574

69. J. Piette. Signalling pathway activation by photodynamic therapy: NF-kB at the crossroad between oncology and immunology. // *Photochemical & Photobiological Sciences*.14(8), 2015

70. F. Anzengruber, P. Avci, L.F. de Freitas, M.R. Hamblin. T-cell mediated anti-tumor immunity after photodynamic therapy: why does it not always work and how can we improve it? *Photochem Photobiol Sci*. 2015;14(8):1492-509. doi: 10.1039/c4pp00455h.

71. В.П. Чехонин, В.П. Баклаушев, Г.М. Юсубалиева, Н.Е. Волгина, О.И. Гурина. Фундаментальные и прикладные аспекты изучения гематоэнцефалического барьера. // *Вестник Российской Академии медицинских наук*. 2012. Т8:66-78. DOI: <http://dx.doi.org/10.15690/vramn.v67i8.352>. [Chekhonin V.P., Baklaushev V.P., Yusubaliev G.M., Volgina N.E., Gurina O.I. FUNDAMENTAL AND APPLIED ASPECTS OF THE BLOOD-BRAIN BARRIER RESEARCH. *Annals of the Russian academy of medical sciences*. 2012;67(8):66-78. (In Russ.) DOI:10.15690/vramn.v67i8.352]

72. R. Noy, J.W.Pollard. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity*.2014;41(1):49-61. doi: 10.1016/j.immuni.2014.06.010

73. Kitamura T., Qian B.Z., Pollard J.W. Immune cell promotion of metastasis. *Nat Rev Immunol*. 2015;15(2):73-86. doi: 10.1038/nri3789.

74. L. Milas, J. Wike, N. Hinter, J. Volpe and I. Basic, Macrophage content of murine sarcomas and carcinomas: association with tumor growth parameters and tumor

radiocurability, *Cancer Rex*, 47 (1987) 1069-1075.

75. M. Korbelik, G. Kroszl, P.L. Olive and D.J. Chaplin, Distribution of photofrin between tumor cells and tumor associated macrophages, *Brit. J. Cancer*, 64 (1991) 508-512.
76. F. Anatelli, P. Mroz, Q. Liu et al. Macrophage-targeted photosensitizer conjugate delivered by intratumoral injection. // *Molecular Pharmaceutics*, vol. 3, no. 6, pp. 654–664, 2006;
77. M. Korbelik and M. R. Hamblin. The impact of macrophage-cancer cell interaction on the efficacy of photodynamic therapy. // *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 14, no. 8, pp. 1403–1409, 2015.
78. N.Hayashi, H.Kataoka, S. Yano, M. Tanaka, K. Moriwaki, H. Akashi, S. Suzuki, Y. Mori, E. Kubota, S. Tanida, S. Takahashi, T. Joh. A novel photodynamic therapy targeting cancer cells and tumor-associated macrophages. // *Mol Cancer Ther.* 2015;14(2):452-60. doi: 10.1158/1535-7163.
79. A. M. Wen, K. L. Lee, P. Cao, et al. Utilizing viral nanoparticle/dendron hybrid conjugates in photodynamic therapy for dual delivery to macrophages and cancer cells. // *Bioconjugate Chemistry*, vol. 27, no. 5, pp. 1227–1235, 2016.
80. V. Sharma, Sh. Shivalingaiah, Y. Peng, D. Euhus, Z. Gryczynski, and H. Liu. Auto-fluorescence lifetime and light reflectance spectroscopy for breast cancer diagnosis: potential tools for intraoperative margin detection. // *Biomed Opt Express.* 2012; 3(8): 1825–1840.
81. H.-P. Lassalle, M. Wagner, L. Bezdtnay, F. Guillemin, H. Schneckenburger. Fluorescence imaging of FoscanT and Foslip in the plasma membrane and in whole cells. // *J. Photochemistry and Photobiology B: Biology* 92 (2008) 47–53.
82. A.S. Derycke, P.A. de Witte. Liposomes for photodynamic therapy. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (1) (2004) 17–30.
83. T. Okada, S. Takahashi, A. Ishida & H. Ishigame. In vivo multiphoton imaging of immune cell dynamics. // *Eur J Physiol* (2016) 468:1793–1801. DOI 10.1007/s00424-016-1882-x
84. J.Y. Perentes, D.G. Duda, and R.K. Jain. Visualizing anti-tumor immune

- responses in vivo. // *Dis Model Mech.* 2009. 2(3-4): 107–110. doi: 10.1242/dmm.001842
85. A. Schietinger, A. Arina, R.B. Liu, et al. Longitudinal confocal microscopy imaging of solid tumor destruction following adoptive T cell transfer. // *OncoImmunology* 2013. 2:11, e26677. DOI: 10.4161/onci.26677;
86. A.Fernandez and M.Vendrell. Smart fluorescent probes for imaging macrophage activity. // *Chem Soc Rev.* 2016. 45. 1182. DOI: 10.1039/c5cs00567a
87. H.W. Lee, P. Gangadaran, S. Kalimuthu, and B.-C. Ahn. Advances in Molecular Imaging Strategies for In Vivo Tracking of Immune Cells. // *BioMed Research International* 2016, Article ID 1946585, 10 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/1946585>;
88. R.Tavaré, M.N. McCracken, K.A. Zettlitz, et al. Engineered antibody fragments for immuno-PET imaging of endogenous CD8+ T cells in vivo. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014 Jan 21; 111(3): 1108–1113. doi: 10.1073/pnas.1316922111;
89. Axelsson J., Davis S.C., Gladstone D.J., Pogue B.W. Cerenkov emission induced by external beam radiation stimulates molecular fluorescence. // *MedPhys.*2011. 38(7):4127-32;
90. Entract G.M., Bryden F., Domarkas J., Savoie H., Allott L., Archibald S.J., Cawthorne C., Boyle R.W. Development of PDT/PET Theranostics: Synthesis and Biological Evaluation of an (18)F-Radiolabeled Water-Soluble Porphyrin. // *MolPharm.* 2015. 12(12):4414-23.
91. Stepp H., Beck T., Pongratz T., Meinel T., Kreth F.W., Tonn J.Ch., Stummer W.J. ALA and malignant glioma: fluorescence-guided resection and photodynamic treatment. // *Environ PatholToxicolOncol.* 2007. 26(2):157-64
92. S. Collaud, A. Juzeniene, J. Moan and N. Lange. On the Selectivity of 5-Aminolevulinic Acid-Induced Protoporphyrin IX Formation. // *Curr. Med. Chem. Anti-CancerAgents*, 2004, 4, 301-316 301
93. M S.C. Foley, A Beeby, A W. Parker, S M. Bishop, D Phillips, Excited triplet state photophysics of the sulphonated aluminium phthalocyanines bound to human serum albumin, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, Volume 38, Issue 1, 1997, Pages 10-17, [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(96\)07434-9](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(96)07434-9)

94. Principles of Fluorescence Spectroscopy Joseph R. Lakowicz, p. 11