

*на правах рукописи*

Демина Полина Андреевна

**КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕР-МОДИФИЦИРОВАННЫХ  
НАНОЧАСТИЦ С АНТИСТОКСОВОЙ ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЕЙ ДЛЯ  
ПРИМЕНЕНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ**

Специальность 1.5.6. – Биотехнология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

**Москва-2024**

Работа выполнена в лаборатории полимеров для биологии отдела биоматериалов и бионанотехнологий Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

**Научный руководитель:**

Доктор химических наук, г.н.с. **Генералова Алла Николаевна**

**Официальные оппоненты:**

**Еремин Сергей Александрович**, доктор химических наук, профессор, ведущий научный сотрудник кафедры химической энзимологии химического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

**Орлов Алексей Владимирович**, кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории «Биофотоника» Центра естественно-научных исследований, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр «Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук» (ИОФ РАН).

**Ведущая организация**

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева» (РХТУ им. Д. И. Менделеева).

Защита состоится «5» июня 2024 г. в 11 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и на сайте института [www.ibch.ru](http://www.ibch.ru)

Автореферат разослан «       » \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета  
доктор физико-математических наук



В.А. Олейников

## ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Активное развитие бионанотехнологии привело к разработке наноматериалов с заданными свойствами, которые имеют большой потенциал для применения в различных областях биомедицины, а именно в диагностике и терапии социально значимых заболеваний, восстановлении утраченных тканей с использованием методов тканевой инженерии. Особое место среди широкого класса наноматериалов занимают флуоресцентные неорганические наночастицы благодаря возможности проводить высокочувствительный и селективный анализ с использованием биосенсоров, высококонтрастную визуализацию клеток и биологических тканей, инициировать фотохимические реакции, локализуемые в целевой области, под действием света. Однако их успешное применение существенно зависит не только от материала наночастиц, но и от физико-химических свойств (размера частиц, поверхностного заряда, коллоидной стабильности), что определяет их взаимодействие с биологическими структурами, биораспределение и эффективность использования. Поэтому ключевым фактором является модификация поверхности наночастиц биосовместимыми соединениями, что позволяет получать конструкции, сочетающие свойства исходных наночастиц и материалов-модификаторов для применения в биомедицине.

Особое место занимают наночастицы с антистоксовой фотолюминесценцией (АН), у которых длина волны возбуждения лежит в ближнем ИК-диапазоне спектра и попадает в, так называемое, «окно прозрачности» биоткани. Уникальные оптические свойства, химическая и фотостабильность, отсутствие автофлуоресценции и цитотоксичности АН определяют возможность создания мультифункциональных конструкций, имеющих большой потенциал для визуализации и терапии солидных опухолей в условиях *in vivo*, а наличие линий фотолюминесценции в УФ- и видимом диапазоне спектра позволяет активировать фотоинициаторы, запускающие радикальный процесс сшивки макрономеров для формирования полимерных конструкций, востребованных в тканевой инженерии. Несмотря на все преимущества АН, особенности их синтеза определяют необходимость проведения функционализации поверхности биосовместимыми соединениями. В качестве модификаторов поверхности хорошо себя зарекомендовали полимеры, которые не только предохраняют фотолюминесцентные свойства наночастиц от действия окружающей среды, но и предоставляют возможность предсказать биораспределение модифицированных наночастиц в организме, обеспечить дополнительную функциональность, например, для введения фармпрепаратов или

фоточувствительных компонентов, способность реагировать на внешние стимулы и т.д.

Поэтому актуальной задачей является получение multifункциональных конструкций на основе одного типа наночастиц для решения проблем визуализации, терапии и тканевой инженерии. Единый метод синтеза и приборный парк для характеристики, фотовозбуждения и детектирования наночастиц, схожие условия и подходы к их модификации и биофункционализации открывают возможность постановки новых научных задач, значительно упрощают и повышают эффективность работы.

**Цель исследования:** Создание конструкций на основе полимер-модифицированных наночастиц с антистоксовой фотолюминесценцией для визуализации, терапии и тканевой инженерии.

#### **Задачи исследования**

1. Разработать подходы к гидрофилизации поверхности наночастиц со структурой активное кристаллическое ядро/инертная кристаллическая оболочка  $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}\text{Tm}^{3+}/\text{NaYF}_4$ , необходимые для получения коллоидно-устойчивых дисперсий функционализированных наночастиц, что позволит проводить модификацию биосовместимыми полимерами.

2. Модифицировать поверхность АН коломиновой кислотой для получения наноконструкций, способных длительное время циркулировать в кровотоке и, как следствие, эффективно накапливаться в патологически измененных тканях.

3. Разработать подходы к получению multifункциональных конструкций на основе агрегатов полимерных мицелл с включенными наночастицами для одновременной визуализации, химио- и фототермической терапии солидных опухолей.

4. Разработать систему на основе АН для инициирования реакции радикальной полимеризации диакрилата полиэтиленгликоля и реакции сшивки винилсодержащих гиалуроновой кислоты/желатина под действием света из ближнего ИК-диапазона спектра.

5. Провести *in vitro* и *in vivo* исследования разработанных конструкций для подтверждения их функциональности в задачах визуализации, терапии и тканевой инженерии.

#### **Научная новизна исследования**

В рамках настоящей работы были продемонстрированы подходы к гидрофилизации поверхности АН  $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}\text{Tm}^{3+}/\text{NaYF}_4$ , стабилизированных олеиновой кислотой, для получения агрегативно-устойчивых дисперсий. Это определило возможность получения различных

мультифункциональных конструкций на основе одного типа наночастиц для решения проблем визуализации, терапии и тканевой инженерии.

Поверхность гидрофильных наночастиц была функционализована коломиновой кислотой как за счет ковалентных, так и нековалентных взаимодействий. Такой подход позволил получить новые биосовместимые конструкции, способные в 3 раза дольше циркулировать в кровотоке по сравнению с наночастицами, модифицированными полиэтиленгликолем, наиболее успешно используемым полимером-модификатором поверхности наноагентов для биомедицинских применений.

Разработаны подходы к получению новых многофункциональных конструкции на основе агрегатов полимерных мицелл с АН. Конструкции содержали лекарственный препарат доксорубин и были модифицированы термочувствительным полимером (поли-N-винилкапролактамом), что обеспечило условия для управляемого высвобождения фармпрепарата под действием внешнего светового стимула. Для эффективности терапевтического действия поверхность конструкций была декорирована наночастицами серебра *in situ*. Перитуморальное введение разработанных конструкций с последующим однократным облучением светом с длиной волны 975 нм обеспечило торможение роста ксенографта аденокарциномы молочной железы SK-BR-3.

Показано, что под действием света из ближнего ИК-диапазона спектра возможно инициирование реакции полимеризации диакрилата полиэтиленгликоля как у поверхности АН, так и в объеме фотоотверждаемой композиции, содержащей АН. Для реализации фотоиндуцируемой реакции сшивки модифицированной гиалуроновой кислоты и желатина была разработана новая фотоиницирующая система на основе АН, растворимого или нерастворимого в воде фотоинициатора и диакрилата полиэтиленгликоля. Диакрилат полиэтиленгликоля выступает в качестве адаптера для повышения совместимости всех компонентов инициирующей системы, позволяет включать гидрофобные наночастицы, растворимые/нерастворимые в воде фотоинициаторы, что значительно расширяет возможности полимеризации под действием ближнего ИК-света, востребованной в тканевой инженерии.

**Теоретическая и практическая значимость исследования**  
Полученные конструкции на основе АН и биосовместимых полимеров являются нетоксичными и имеют значительный потенциал для применения в диагностике патологически измененных тканей. Модификация поверхности наночастиц коломиновой кислотой приводит к трехкратному увеличению времени циркуляции в кровотоке при системном введении по сравнению со

временем циркуляции АН, модифицированных полиэтиленгликолем. Это определяет повышенное накопление АН за счет пассивного механизма доставки в таких патологически измененных тканях, как солидная опухоль и воспаление. Созданные наноконструкции являются универсальным инструментом для оценки эффективности накопления нанопрепаратов в системе микроциркуляции, проникновения через капилляры в окружающие ткани, скорости кровотока в режиме реального времени, что может быть использовано в качестве независимого маркера, определяющего течение заболевания.

Одновременная реализация диагностической и химио-/фототермической терапевтической функций в конструкциях на основе агрегатов полимерных мицелл с АН позволяет рассматривать их в качестве противоопухолевого нанопрепарата, активируемого излучением из «окна прозрачности» биологической ткани. Использование разработанных конструкций может потенциально снизить устойчивость к противораковым препаратам и системную токсичность за счет местного действия.

Разработанная система для инициирования полимеризации значительно увеличивает количество доступных комбинаций фотоинициаторов и мономеров, фотоотверждаемых под действием ближнего ИК-излучения. С использованием новой фотоиницирующей системы может быть реализовано фотоотверждение под действием света из «окна прозрачности» биологической ткани, что исключает фотоповреждение живых клеток и позволяет формировать трехмерные гидрогелевые структуры в условиях *in situ*. Кроме того, полученные результаты позволяют сформулировать требования к системе наночастица/молекула фотоинициатора, необходимые для управления скоростью полимеризации и пространственным разрешением технологии ИК-индуцированной полимеризации с использованием АН.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Для модификации поверхности гидрофобных АН коломиновой кислотой использован двухстадийный подход, включающий гидрофилизацию при участии полиэтиленimina и функционализацию коломиновой кислотой как за счет ковалентных, так и нековалентных взаимодействий. Этот подход обеспечивает получение наноконструкций, способных к длительной циркуляции в кровотоке.

2. Агрегаты полимерных мицелл с АН, покрытые термочувствительным полимером (поли-N-винилкапролактамом), наполненные доксорубицином и декорированные наночастицами серебра, могут быть использованы для флуоресцентной визуализации,

комбинированной химио- и фототермической терапии солидной опухоли при активации светом из ближнего ИК-диапазона спектра.

3. В зависимости от состава фотоотверждаемой композиции, содержащей АН, могут быть получены как наноконструкции, на поверхности которых сформировано полимерное покрытие контролируемой толщины из диакрилата полиэтиленгликоля, так и трехмерные полимерные конструкции из того же олигомера в процессе полимеризации под действием света ближнего ИК-диапазона спектра.

4. Конструкции на основе винилсодержащих гиалуроновой кислоты и желатина получены в процессе реакции сшивки под действием ближнего ИК-излучения с использованием иницирующей системы, состоящей из гидрофобных АН, растворимого или нерастворимого в воде фотоинициатора и диакрилата полиэтиленгликоля.

**Личный вклад автора.** Автор принимал активное участие в постановке задач и планировании, разработке наноконструкций на основе АН и коломиновой кислоты для биовизуализации, а также конструкций для одновременной визуализации и совмещенной химио- и фототермической терапии солидной опухоли на основе агрегатов полимерных мицелл с АН. Разработал систему фотоиницирования для полимеризации под действием света из ближнего ИК-диапазона спектра на основе АН, диакрилата полиэтиленгликоля и фотоинициатора и исследовал свойства разработанных конструкций, а также полимерных конструкций, полученных при лазерной 3D печати, как из синтетического полимера диакрилата полиэтиленгликоля, так и из модифицированных природных полимеров – гиалуроновой кислоты и желатина, Получал характеристики разработанных конструкций с использованием широкого спектра физико-химических методов, участвовал в *in vitro* и *in vivo* исследованиях, а также в обсуждении и оформлении полученных результатов.

**Апробация работы.** Результаты диссертации получили квалифицированную апробацию на всероссийских и международных конференциях: XXIX, XXX, XXXI, XXXII Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2017, 2018, 2019, 2020), международной конференции Sechenov International Biomedical Summit (Москва, 2018), 43-й международной конференции FEBS Congress, Biochemistry Forever (Прага, 2018), 13-й международной конференции HBSM-2018 «Hole Burning, Single Molecule, and Related Spectroscopies: Science and Applications» (Суздаль, 2018), международной конференции S3IC 2019, 2020 «Single Molecule Sensors and NanoSystems International Conference (Мюнхен, 2019, Барселона, 2020),

19-й международной конференции ICLO-2020 «International Conference Laser Optics» (Санкт-Петербург, 2020), 8-й всероссийской Каргинской конференции «Полимеры-2020», 8-й и 9-й международной конференции Saint Peterburg OPEN International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures (Санкт-Петербург, 2021, 2022).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 23 научных работы, в том числе 10 статей в рецензируемых научных отечественных и зарубежных журналах, рекомендованных ВАК, 13 тезисов к докладам на российских и международных конференциях.

**Объём и структура работы.** Диссертационная работа изложена на 127 страницах, содержит 51 рисунок, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 185 источников.



## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Наночастицы с антистоксовой фотолюминесценцией (АН)

Наночастицы с антистоксовой фотолюминесценцией (АН) рассматриваются, как многообещающая наноплатформа для создания многофункциональных наноконструкций для диагностики и терапии благодаря уникальным физико-химическим свойствам. Способность АН поглощать свет ближнего ИК-диапазона спектра и конвертировать его в УФ- и видимое излучение делает их мощным инструментом в *in vitro* и *in vivo* исследованиях (Рис. 1а,б).

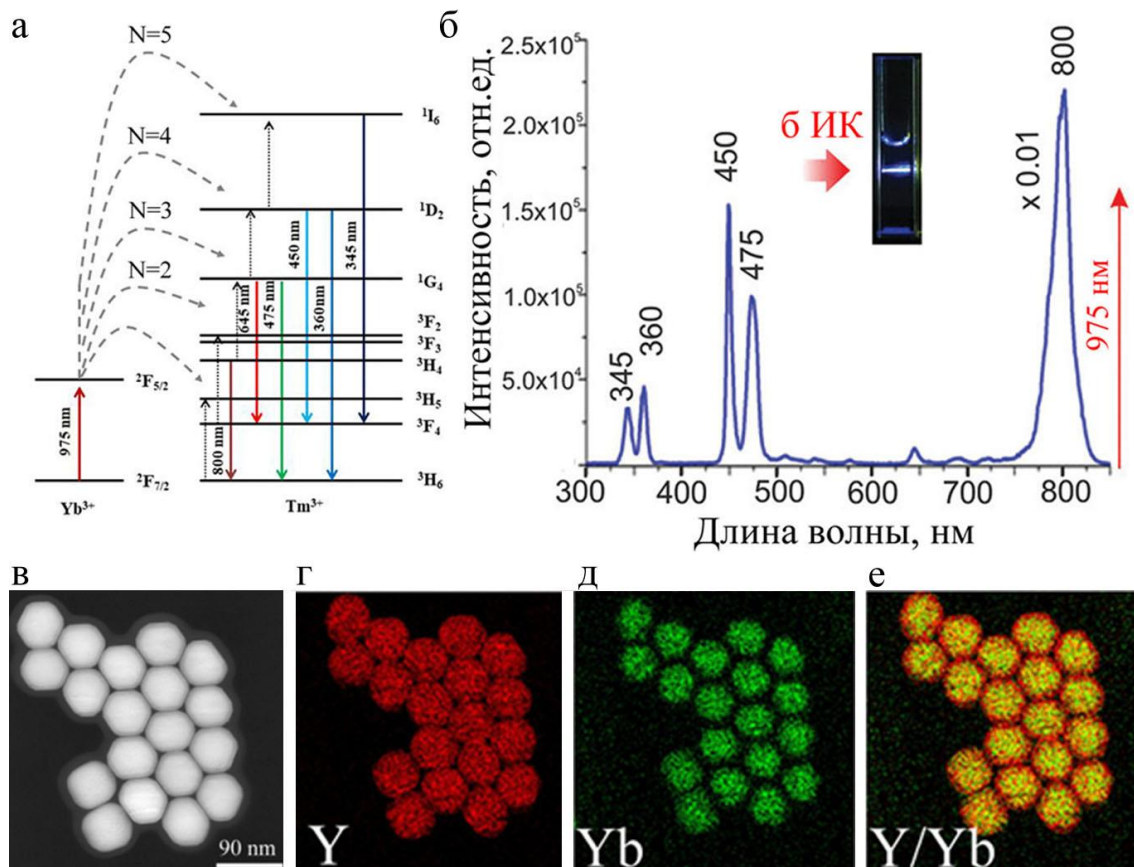


Рисунок 1. а) Энергетическая диаграмма  $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}\text{Tm}^{3+}/\text{NaYF}_4$ . б) Спектр фотолюминесценции АН при возбуждении на длине волны 975 нм с плотностью мощности 50 Вт/см<sup>2</sup>; в) Темнопольное ПРЭМ изображение с z-контрастом  $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}@/\text{NaYF}_4$  со структурой ядро/оболочка. Карты распределения элементов г) Y, д) Yb и е) Y/Yb в АН.

АН со структурой ядро/инертная оболочка  $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}\text{Tm}^{3+}/\text{NaYF}_4$  были получены методом термического разложения трифторацетатов редкоземельных элементов в среде высококипящих органических растворителей и стабилизированы олеиновой кислотой. Были синтезированы монодисперсные наночастицы различного размера (28, 60 и 90 нм), имеющие гексагональную структуру. Элементный состав синтезированных АН подтвержден методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) (Рис.1в-е).

## **Модификация поверхности АН коломиновой кислотой**

Гидрофобные свойства поверхности синтезированных АН требуют разработки подходов к их гидрофилизации и биоадаптации для применения наноконструкций на основе АН в биологических исследованиях. Существует большое разнообразие методов получения биосовместимых наноконструкций, основанных на модификации поверхности АН полимерами. Для визуализации различных патологий модифицированные АН не должны быстро распознаваться иммунной системой и неспецифически взаимодействовать с компонентами крови, поскольку это может приводить к быстрому выведению из кровотока и сказываться на эффективности накопления. В настоящее время наиболее перспективной считается модификация поверхности АН полиэтиленгликолем (ПЭГ), который зарекомендовал себя как «золотой стандарт» среди полимеров-модификаторов. Однако для ПЭГ-модифицированных наноконструкций характерна иммуногенность, что снижает эффективность применения наночастиц в биомедицине. В качестве альтернативы ПЭГ, как полимера-модификатора поверхности, могут быть использованы природные полимеры, например, коломиновая кислота (КолК) - биосовместимое, неиммуногенное соединение, деградирующее в условиях живого организма до нетоксичных продуктов под действием нейраминидаз.

Для модификации поверхности АН коломиновой кислотой были разработаны подходы, позволяющие получать биосовместимые гидрофильные формы АН. Наноконструкции АН-КолК получали в два этапа. На первом этапе поверхность АН гидрофилизировали при участии полиэтиленimina (ПЭИ) (Рис.2а). Полученные АН-ПЭИ характеризовались коллоидной устойчивостью, положительным зарядом поверхности (дзета-потенциал +42 мВ), а также содержали аминокислотные группы, экспонированные в водную среду.

На втором этапе проводили модификацию поверхности АН КолК: 1) за счет электростатических взаимодействий между положительно заряженными АН-ПЭИ и отрицательно заряженной КолК (Рис. 2б) и 2) путем формирования ковалентной связи между аминокислотными группами ПЭИ и карбоксильными группами КолК (Рис. 2в). Полученные АН-КолК(+/-) имели отрицательный дзета-потенциал поверхности (-29 мВ) и характеризовались высокой коллоидной стабильностью. Методом динамического рассеяния света было установлено, что для полученных проб характерно узкое распределение по размерам ( $108 \pm 8$  нм). Из данных, представленных на крио-ПЭМ изображениях, видно, что на поверхности АН-КолК(+/-) формируется полимерное покрытие большей толщины (Рис. 2д) по сравнению с АН-ПЭИ

(Рис. 2г). АН, модифицированные КолК путем формирования ковалентной связи (АН-КолК-КДИ), были коллоидно-стабильны и характеризовались отрицательным дзета-потенциалом поверхности (-31 мВ) и узким распределением по размерам ( $122 \pm 9$  нм). По полученным крио-ПЭМ изображениям был зарегистрирован прирост толщины полимерного покрытия для АН-КолК-КДИ по сравнению с АН-ПЭИ (Рис. 2е).

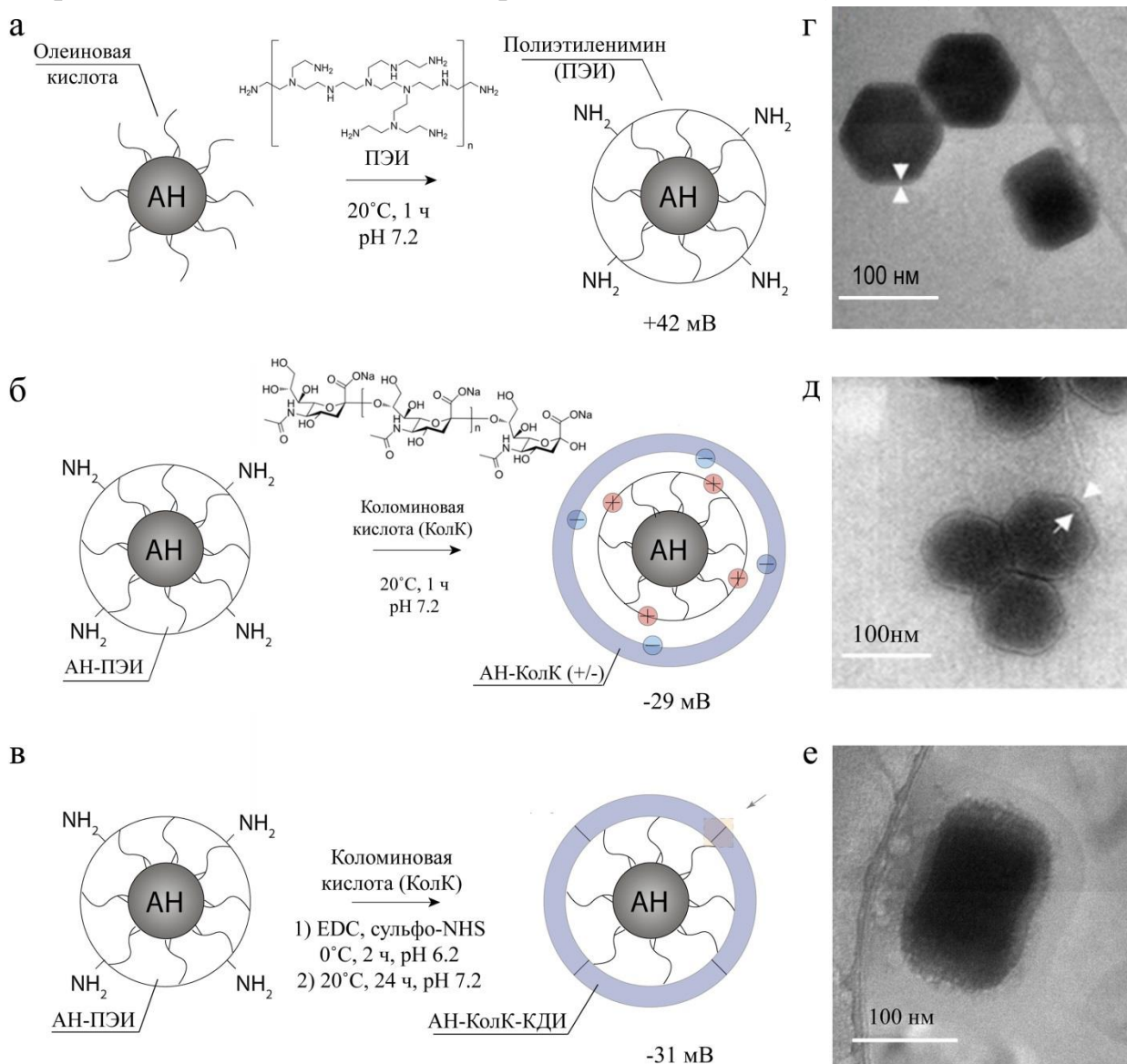


Рисунок 2. Схема модификации поверхности а) АН ПЭИ; б) АН-ПЭИ КолК(+/-) за счет электростатических взаимодействий и в) АН-ПЭИ КолК-КДИ за счет формирования ковалентной связи. Крио-ПЭМ изображения полимерного слоя на поверхности г) АН-ПЭИ; д) АН-КолК(+/-) и е) АН-КолК-КДИ.

### Исследование АН-КолК в условиях *in vitro*

Флуоресцентная визуализация с использованием наноконструкций на основе АН имеет большое значение для медико-биологических исследований, поскольку позволяет проводить раннюю малоинвазивную диагностику патологически измененных тканей.

Для исследования токсического эффекта АН-КолК в сравнении с АН-ПЭГ была проведена оценка жизнеспособности фибробластов кожи человека VJ-5ta с использованием МТТ-теста (Рис. 3а). По полученным данным можно сделать вывод, что, несмотря на присутствие в составе наноконструкций ПЭИ, который по литературным данным проявляет цитотоксичность, выживаемость фибробластов после инкубации с АН-КолК(+/-) и АН-КолК-КДИ оценивается на уровне 90-100%.

Исследование накопления наноконструкций АН-КолК в клетках проводили с использованием проточной цитометрии. Был разработан метод включения родамина Б в полимерную оболочку на поверхности АН, что позволило регистрировать накопление АН в клетках при возбуждении стандартным источником излучения (530 нм) по флуоресценции на длине волны 580 нм. Уровень клеточного поглощения АН-КолК оценивали на трех линиях клеток: макрофагах мыши (RAW 264.7), моноцитах человека (THP-1) и клетках аденокарциномы легких человека (A-549).

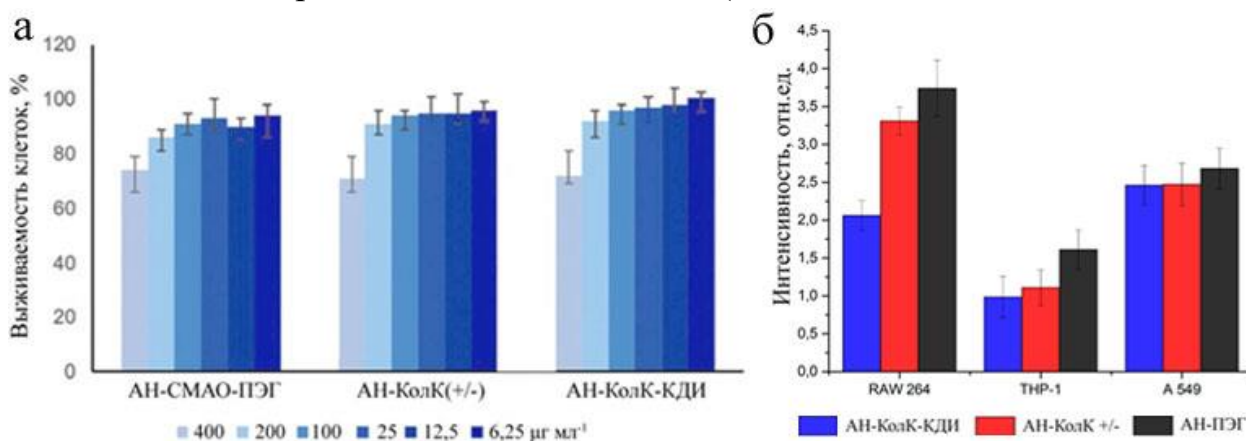


Рисунок 3. а) Жизнеспособность фибробластов VJ-5ta (hTERT) после 24-часовой инкубации с наноконструкциями АН-ПЭГ, АН-КолК(+/-), АН-КолК-КДИ. МТТ-тест. б) Нормированный флуоресцентный сигнал от накопленных в клетках наноконструкций АН-КолК (+/-), АН-КолК-КДИ, АН-ПЭГ. Данные получены методом проточной цитометрии для клеточных линий RAW 264.7, THP-1, A549 после их инкубации в течение 60 мин с наноконструкциями, мечеными родамином Б.

Для наноконструкций АН-КолК наблюдалась меньшая степень захвата клетками по сравнению с АН-ПЭГ для всех исследованных линий. Эти результаты демонстрируют большой потенциал использования КолК в качестве биосовместимого полимера-модификатора поверхности АН и подтверждают способность колониновой кислоты «скрывать» АН от поглощения клетками в *in vitro* исследованиях.

### Исследование АН-КолК в условиях *in vivo*

Время циркуляции наноконструкций на основе АН и колониновой кислоты в кровотоке определяет степень накопления наноконструкций в

патологически измененных тканях за счет пассивного механизма доставки. Оценку времени циркуляции в кровотоке мышей Balb/c проводили для АН-КолК(+/-) и АН-КолК-КДИ в сравнении с АН-ПЭГ. После системного введения дисперсии наноконструкций проводили забор образцов крови мыши через определенные временные промежутки. Количество АН подсчитывали по изображениям, полученным с использованием разработанного во ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН флуоресцентного микроскопа (Рис. 4а). Возбуждающее излучение из ближней ИК-области спектра и эмиссия, попадающие в «окно прозрачности» биоткани, позволили регистрировать сигнал флуоресценции от отдельных наноконструкций в сильно рассеивающей среде (образцах крови) и подсчитать количество АН в момент отбора пробы.

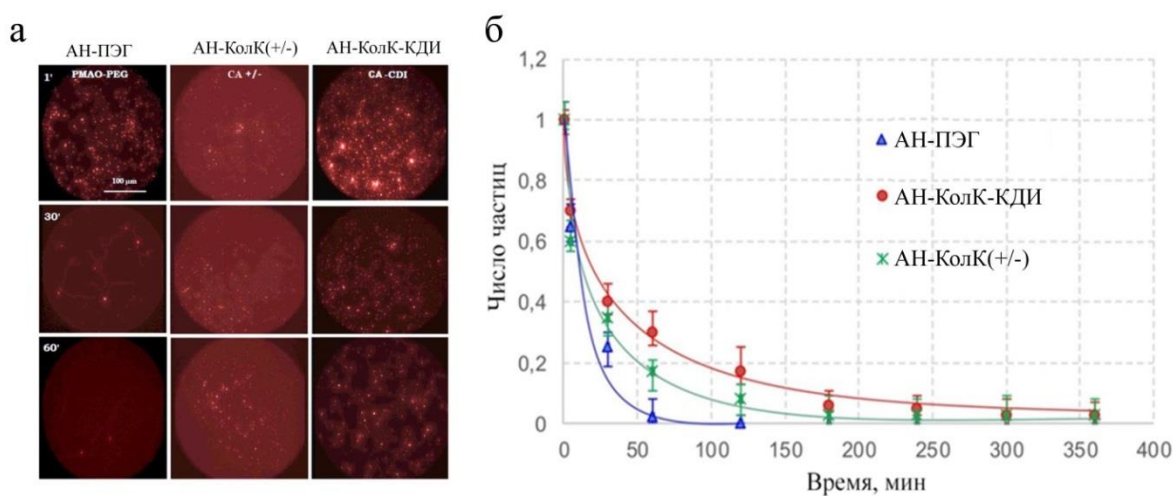


Рисунок 4. а) Флуоресцентное изображение АН-КолК (+/-), АН-КолК-КДИ, АН-ПЭГ в образцах крови при возбуждении 975 нм. б) Нормированная зависимость количества АН-КолК(+/-), АН-КолК-КДИ, АН-ПЭГ от времени циркуляции в кровотоке.

Наноконструкции АН-КолК продемонстрировали длительное время циркуляции в кровотоке малых животных (мышей), которое в 3 раза превышало время циркуляции АН-ПЭГ (Рис. 4б). Таким образом, для наноконструкций АН-КолК(+/-) и АН-КолК-КДИ характерно отсутствие цитотоксичности и длительное время циркуляции в кровотоке, что необходимо для их успешного использования для биовизуализации таких патологически измененных тканей, как область воспаления или солидная опухоль.

Накопление наноконструкций АН-КолК в патологически измененных тканях происходило за счет пассивного механизма доставки, связанного с нарушением сосудистой системы и отсутствием лимфодренажа. После системного введения максимум сигнала фотолюминесценции был достигнут через 1 час в солидной опухоли (на модели перевитой карциномы легкого Льюиса (LLC)) (Рис. 5а). В области воспаления максимум

фотолюминесцентного сигнала был зарегистрирован через 12 часов после системного введения (Рис. 5б). Модель воспаления была получена путем подкожной имплантации коллагеновой губки, пропитанной неполным адьювантом Фрейнда, что вызывает неспецифический иммунный ответ и локальное развитие воспаления.

Фотолюминесценция АН в «окне прозрачности» биологической ткани позволяет реализовать прижизненную визуализацию распределения наноконструкций на основе АН в системе микроциркуляции и проникновения в окружающие ткани, а также оценить скорость движения в режиме реального времени (Рис. 5в).

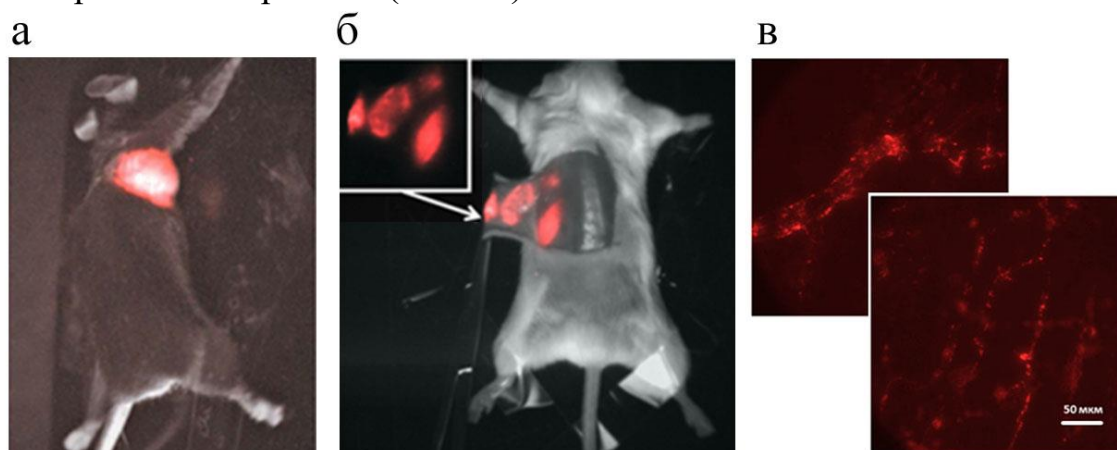


Рисунок 5. Эпилюминесцентные изображения мыши Balb/c а) с перевитой опухолью карциномы легкого Льюиса и б) с вскрытой областью воспаления, маркированные АН-КолК-КДИ через 1 ч и 12 ч после введения дисперсии, соответственно; г) флуоресцентная визуализация макро- и микро- кровеносных сосудов в воспалительных тканях с помощью АН при возбуждении лазером 975 нм.

Интенсивный сигнал фотолюминесценции при возбуждении светом на длине волны 975 нм наблюдался как в больших, так и в малых кровеносных сосудах воспалительной ткани, окружающей коллагеновый матрикс (Рис. 5в). Разработка подходов к визуализации сосудистого русла представляет интерес для оценки развития заболевания.

Таким образом, предложенные методы модификации поверхности АН колониновой кислотой за счет формирования ковалентной или нековалентной связи позволяют получать коллоидно-устойчивые водные дисперсии АН. Наноконструкции характеризуются отсутствием клеточной токсичности и длительным временем циркуляции в кровотоке. Продемонстрировано, что АН-КолК могут быть использованы для прижизненной высококонтрастной визуализации патологически измененных тканей (солидной опухоли и области воспаления).

## Многофункциональные конструкции на основе АН, термочувствительного полимера, доксорубина и наночастиц серебра

В работе был разработан подход к получению многофункциональных конструкций на основе агрегатов полимерных мицелл с включенными АН для одновременной визуализации, химио- и фототермической терапии солидных опухолей. Для этого были получены агрегаты мицелл СМАО с АН (Рис. 6а), модифицированные термочувствительным полимером поли-N-винилкапролактамом (ПВК). На первом этапе формирования агрегатов мицелл СМАО с включенными АН проходило взаимодействие октадеценового фрагмента СМАО и олеиновой кислоты на поверхности АН в органическом растворителе. После перевода в воду и удаления органического растворителя проходила самосборка СМАО в агрегаты мицелл с включенными АН. На втором этапе к дисперсии агрегатов мицелл добавляли сшивающий агент (гексаметилендиамин) для получения сшитой структуры полимерного слоя на поверхности АН-СМАО.

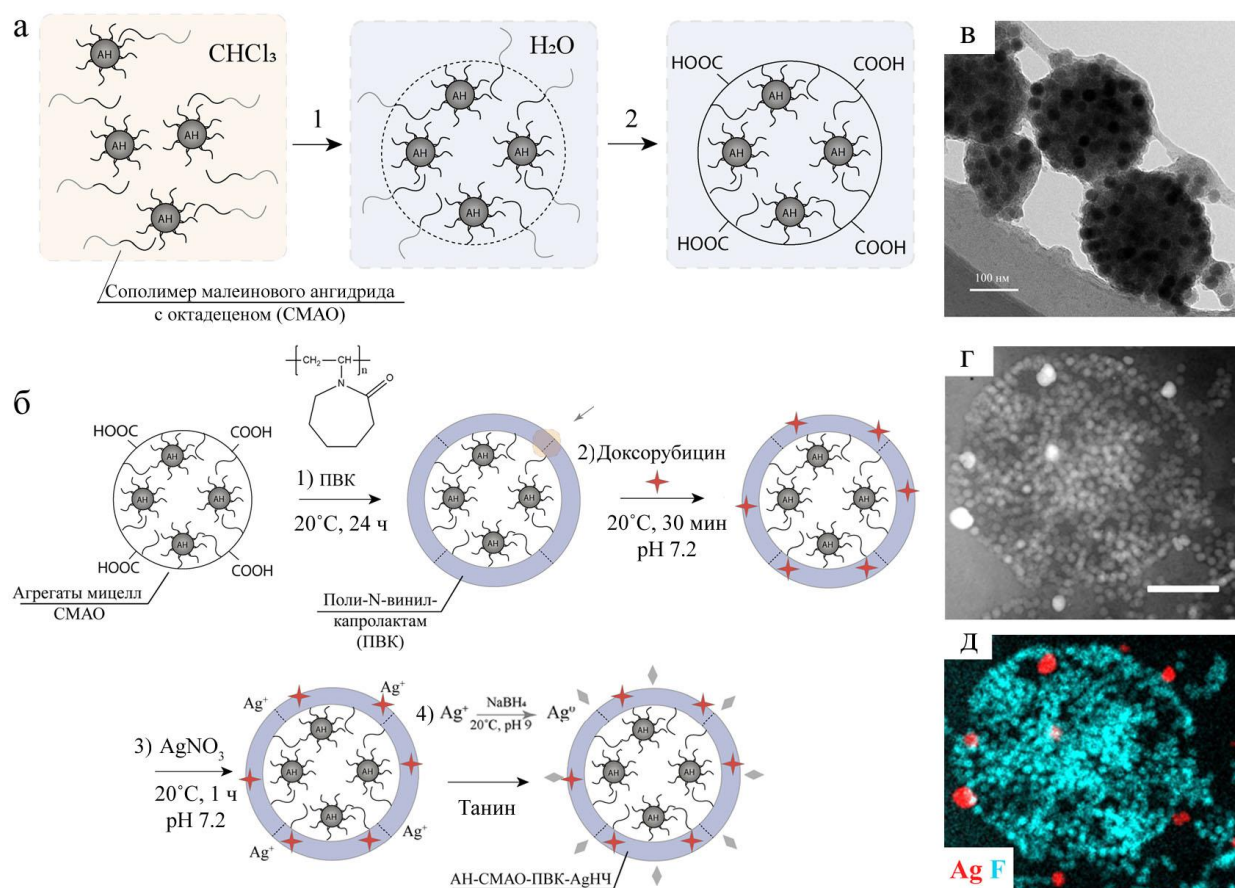


Рисунок 6. Схематическое изображение а) формирования агрегатов мицелл СМАО и включения в них АН. б) модификация поверхности АН-СМАО термочувствительным полимером ПВК, введение терапевтического агента (доксорубина) и формирование Аг НЧ *in situ*. в) ПЭМ-изображение АН-СМАО. г) Темнопольное ПРЭМ изображение с z-контрастом АН-СМАО-ПВК-АгНЧ и д) карта распределения элементов Ag и F в образце, масштаб 200 нм.

ПВК при повышении температуры до нижней критической температуры растворения (НКТР, 32–34°C) способен к обратимому конформационному переходу от клубка к глобуле, что обеспечивает контролируемое высвобождение лекарственного препарата. Формирование комплекса ПВК с АН-СМАО происходило в результате образования водородной связи между С=О амидных групп ПВК и карбоксильными группами СМАО (Рис. 6б,в). Изменение дзета-потенциала поверхности конструкций с -33 мВ (АН-СМАО) до -6 мВ (АН-СМАО-ПВК) свидетельствует об успешной модификации.

Термочувствительные свойства АН-СМАО-ПВК были подтверждены по изменению гидродинамического диаметра при увеличении температуры от 28 до 42°C (Рис. 7а). Нагревание дисперсии АН-СМАО-ПВК до температуры выше НКТР приводило к резкому уменьшению размера конструкций, что связано с изменением конформации ПВК и разрушением ассоциатов с водой. Таким образом, разработанные конструкции могут быть использованы для контролируемого высвобождения лекарств при повышении температуры.

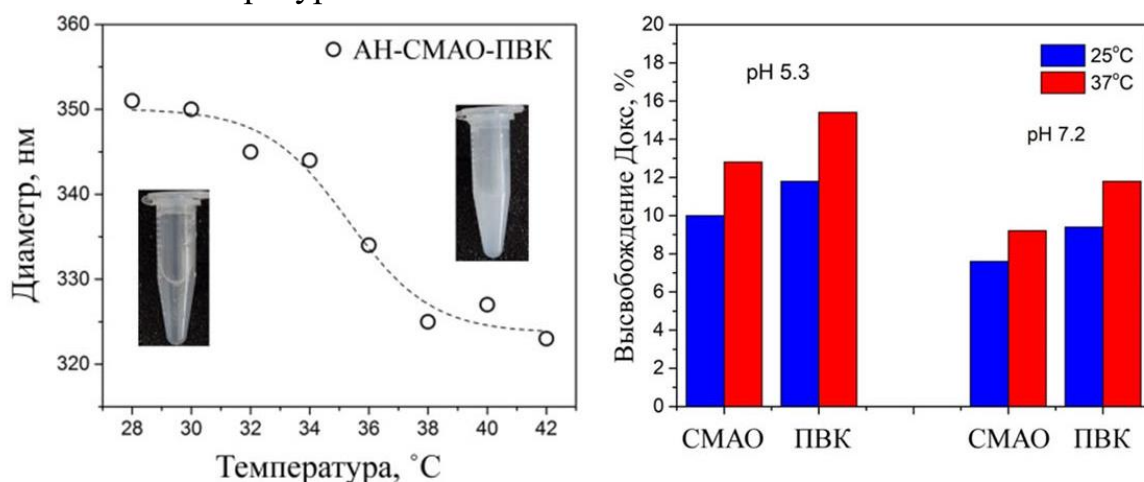


Рисунок 7. а) Зависимость гидродинамического диаметра наноконструкций АН-СМАО-ПВК от температуры. Данные получены методом динамического рассеяния света. б) Высвобождение Докс из АН-СМАО и АН-СМАО-ПВК при различной температуре (25 и 37°C) и значениях pH (5.3 и 7.2).

В работе был разработан подход к созданию конструкций АН-СМАО-ПВК, содержащих доксорубин (Докс), исследованы закономерности введения и высвобождения лекарственного препарата. Концентрация Докс в составе конструкций на основе АН была определена спектрофотометрически и составила 0.32 мг Докс в расчете на 1 мг АН-СМАО, а концентрация Докс, инкапсулированного в комплекс АН-СМАО-ПВК, была ниже (0.21 мг в расчете на 1 мг наночастиц). Снижение емкости АН-СМАО-ПВК, по-видимому, вызвано уменьшением количества свободных карбоксильных



групп СМАО, часть из которых участвует в формировании водородных связей с ПВК, а часть электростатически взаимодействует с Докс.

Исследование высвобождения Докс из комплексов АН-СМАО-ПВК проводили в кислой (рН 5.3) и нейтральной (рН 7.2) средах при 25°C и 37°C (Рис. 76). АН-СМАО-ПВК обладали большей степенью высвобождения Докс при повышении температуры по сравнению с АН-СМАО. Выход лекарственного препарата из АН-СМАО-ПВК при 37°C в кислой среде (рН 5.3) был почти в 2 раза выше, чем при рН 7.2 и той же температуре (Рис. 76). Это особенно важно при доставке лекарственного препарата в солидную опухоль, имеющую в отличие от нормальной ткани кислый рН. Полученные результаты демонстрируют не только термо-, но и рН-зависимый характер высвобождения лекарств из многофункциональных конструкций АН-СМАО-ПВК, что можно использовать для проведения контролируемой местной химиотерапии с минимальными побочными эффектами.

При проведении фототермической терапии под действием ближнего ИК-излучения (975 нм) нагрев наноконструкций происходит в результате резонансного поглощения света АН. Сечение поглощения ионов  $Yb^{3+}$  достаточно, чтобы вызвать локальный перегрев, что оказывает токсическое действие на клетки и ткани. Для увеличения скорости нагрева АН-СМАО-ПВК были декорированы Ag НЧ. Формирование Ag НЧ на поверхности конструкций *in situ* происходило за счет координации ионов серебра с атомами, имеющими неподеленную пару электронов (O, N), и их последующим восстановлением (Рис. 6б). Успешное декорирование поверхности Ag НЧ было подтверждено ПЭМ-изображениями (Рис. 6г) и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопией (Рис. 6д).

### **Исследование конструкций АН-СМАО-ПВК в условиях *in vitro***

Цитотоксическое действие конструкций АН-СМАО-ПВК, а также конструкций, содержащих только химиотерапевтический препарат Докс (АН-СМАО-ПВК-Докс), только наночастицы серебра (АН-СМАО-ПВК-AgНЧ) или комбинацию Докс и AgНЧ (АН-СМАО-ПВК-Докс-AgНЧ) было исследовано с помощью МТТ-теста на линии клеток аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3 после инкубации в течение 24 и 72 ч (Рис. 8).

Было установлено, что АН-СМАО-ПВК обладали низкой токсичностью. Однако введение в состав конструкции Докс и/или Ag НЧ резко повышало их токсичность. АН-СМАО-ПВК-Ag и АН-СМАО-ПВК-Докс-Ag были токсичны уже после 24-часов инкубации, что объясняется собственной токсичностью Ag НЧ. Конструкции АН-СМАО-ПВК-Докс проявляли наибольшую токсичность только через 72 ч инкубации с

клетками, что связано с постепенным высвобождением Докс, приводящим к цитостатическому действию.

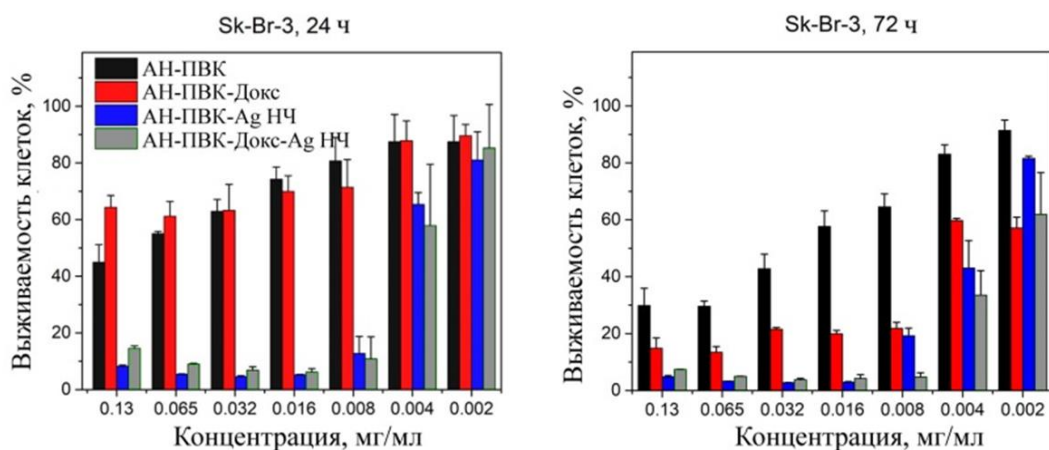


Рисунок 8. Выживаемость клеток аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3 при инкубации с наноконструкциями AN-PVK, AN-PVK-Докс, AN-PVK-Докс-Ag НЧ в течение 24 и 72 ч, МТТ-тест.

### Исследование конструкций AN-CMAO-PVK в условиях *in vivo*

Разработанные конструкции AN-CMAO-PVK были исследованы в условиях *in vivo* для проведения одновременной визуализации и терапии солидной опухоли аденокарциномы молочной железы SK-BR-3, перевитой иммунодефицитным мышам Balb/c Nude. Локальный нагрев солидных опухолей излучением с длиной волны 975 нм в сканирующем режиме осуществляли через 24 ч после перитуморального введения конструкций. Обработку импульсным излучением (975 нм) проводили до тех пор, пока разница температур опухоли и необработанной биоткани не достигала 4°C (Рис. 9а). Скорость нагрева биоткани зависела от типа введенных конструкций и была наибольшей для конструкций, содержащих наночастицы серебра (AN-CMAO-PVK-AgНЧ и AN-CMAO-PVK-Докс-AgНЧ).

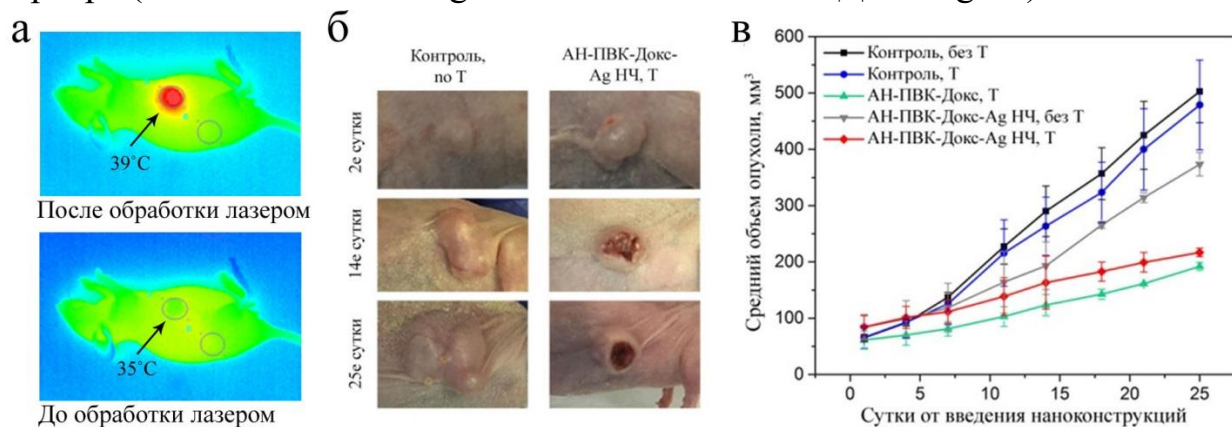


Рисунок 9 а) Температурные карты мышей до и после обработки ближним ИК-излучением на длине волны 975 нм, демонстрирующие нагрев опухоли. б) Серия фотографий области опухоли SK-BR-3 контрольной и экспериментальной групп после терапии. в) Торможение скорости роста опухоли аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 после введения наноконструкций и терапии в сравнении с контролем.

Продемонстрировано, что обработка излучением ближнего ИК-диапазона спектра может повысить эффективность терапии с использованием конструкций АН-СМАО-ПВК-Докс и АН-СМАО-ПВК-Докс-AgНЧ. На 25-й день наблюдения объемы подкожного ксенотрансплантата аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 и показатели скорости роста опухоли в группах, которым вводили АН-СМАО-ПВК-Докс и АН-СМАО-ПВК-Докс-AgНЧ, были достоверно ниже соответствующих значений в контроле. Наибольшая эффективность терапии с высоким уровнем торможения роста опухоли была достигнута для групп, которым вводили конструкции, содержащие либо Докс, либо Докс-AgНЧ.

Таким образом, разработаны конструкции на основе агрегатов мицелл СМАО с АН, модифицированные поли-N-винилкапролактаном и содержащие Докс и Ag НЧ, которые позволяют проводить одновременно визуализацию, химио- и фототермическую терапию под действием света ближнего ИК-диапазона спектра. Включение в состав конструкций Докс и Ag НЧ приводит к увеличению цитотоксичности конструкций, что продемонстрировано в условиях *in vitro* на линии клеток SK-BR-3. Перитуморальное введение конструкций АН-СМАО-ПВК-Докс-AgНЧ показало возможность пятикратного снижения скорости роста опухоли после однократного облучения светом ближнего ИК-диапазона спектра.

### **Разработка системы для инициирования ИК-полимеризации фотоотверждаемых композиций, содержащих АН**

Трехмерное фотоотверждение композиций, содержащих АН, под действием ближнего ИК-излучения – новая технология, основанная на люминесцентных свойствах АН. Этот процесс аналогичен технологии двухфотонной фотополимеризации, но лишен таких его недостатков, как длительное время фотоотверждения и использование дорогостоящих лазеров высокой мощности. Использование ближнего ИК-излучения для инициирования реакции фотополимеризации решает вопрос фотоотверждения непосредственно в объеме сильно рассеивающих свет композиций с высокой скоростью и достаточным пространственным разрешением. Нелинейный характер процесса апконверсии позволяет локализовать область фотолюминесценции в вокселе, где происходит процесс фотоотверждения, и облегчает печать сложных трехмерных объектов в режиме непрерывного сканирования. В этом процессе требуется значительно меньшие мощности возбуждающего излучения, чем в случае двухфотонной фотополимеризации.

Ключевым компонентом фотоотверждаемой композиции (ФОК) является наноконструкция АН/фотоинициатор. Количество доступных

комбинаций фотоинициаторов и мономеров, фотоотверждаемых под действием ближнего ИК-излучения ограничено требованиями к биосовместимости ФОК. Поэтому была разработана система фотоиницирования реакции полимеризации под действием ближнего ИК-излучения на основе гидрофобных АН, растворимого или нерастворимого в воде ФИ и диакрилата полиэтиленгликоля (ПЭГ-ДА, Рис. 10а). ПЭГ-ДА является адаптером, который повышает совместимость всех компонентов ФОК, позволяя включать в систему гидрофобные АН и водорастворимые/нерастворимые фотоинициаторы, и расширяя спектр ФОК для биомедицинских приложений.

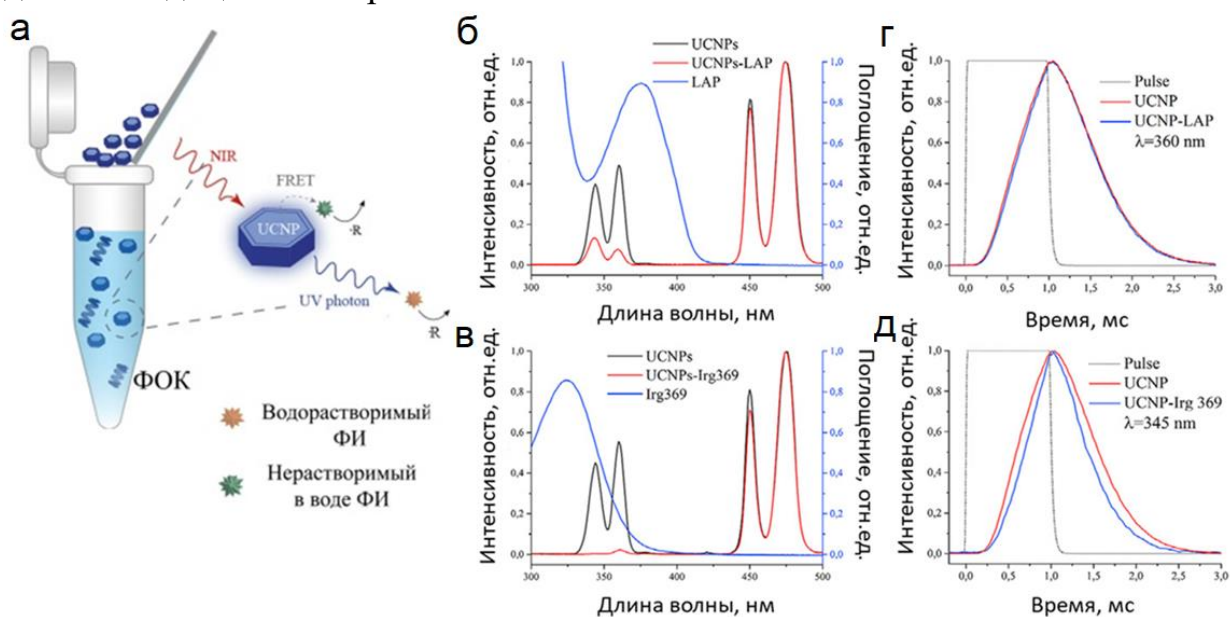


Рисунок 10. а) Схематическое изображение получения системы фотоиницирования на основе гидрофобных АН, растворимого/нерастворимого в воде фотоинициатора и ПЭГ-ДА для полимеризации под действием света из ближнего ИК-диапазона спектра. б) Спектр эмиссии АН (черная линия), наноконструкции АН-ПЭГ-ДА-LAP (красная линия) при возбуждении 975 нм, спектр поглощения LAP (синяя линия). в) Спектр эмиссии АН (черная линия), наноконструкции АН-ПЭГ-ДА-Irgacure369 (красная линия) при возбуждении на длине волны 975 нм, спектр поглощения Irgacure369 (синяя линия). г) Кинетика фотолюминесценции АН на длине волны 360 нм при импульсном возбуждении в ближнем ИК-диапазоне (красная линия АН, синяя линия АН-LAP). д) Кинетика фотолюминесценции АН на длине волны 345 нм при импульсном возбуждении в ближнем ИК-диапазоне (красная линия АН, синяя линия АН-Irgacure 369). Временной профиль возбуждающих импульсов длительностью 1 мс на длине волны 975 нм показан черными линиями. Спектры нормированы.

Фотоотверждение под действием света из ближнего ИК-диапазона спектра возможно при условии перекрытия спектра поглощения ФИ и эмиссии АН (Рис. 10б,в), а также резонансного переноса энергии с АН на молекулу фотоинициатора. Для определения механизма резонансного переноса энергии для двух систем: 1) АН-ПЭГ-ДА-LAP (растворимого в воде ФИ) и 2) АН-ПЭГ-ДА-Irgacure 369 (нерастворимого в воде ФИ) было

исследовано время жизни фотолюминесценции АН на длине волны 345 и 360 нм. В случае АН-ПЭГ-ДА-LAP не было зарегистрировано каких-либо существенных изменений в кинетике фотолюминесценции, что позволило предположить, что резонансный перенос энергии осуществляется по механизму люминесцентного резонансного переноса энергии (LRET) (Рис. 10г). В случае нерастворимого в воде Irgacure 369 и гидрофобных АН перенос энергии осуществляется по механизму Ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET), что подтверждает резкое изменение кинетики фотолюминесценции ионов  $Tm^{3+}$  (Рис. 10д).

Для тканевой инженерии особый интерес представляют полимерные конструкции на основе природных полимеров благодаря их высокой биосовместимости, биоразлагаемости и отсутствию токсичности. Гиалуроновая кислота (ГК) и желатин (Жел) были предварительно модифицированы глицидилметакрилатом (ГМА) для введения винильных групп в состав полимерной цепи, что позволило провести реакцию радикальной сшивки полимеров. Получены две ФОК: АН/ПЭГ-ДА/LAP/Жел-ГМА и АН/ПЭГ-ДА/Irgacure369/ГК-ГМА. Разработанная система фотоинициирования на основе АН позволила провести фотоотверждение природных макромономеров с использованием как растворимого, так и нерастворимого в воде фотоинициатора (Рис. 11б-г). Такой подход значительно упростил процедуру подготовки ФОК, исключив стадию гидрофилизации АН и расширив спектр доступных фотоинициаторов для фотоотверждения винилсодержащих гиалуроновой кислоты и желатина.

Полимерные конструкции, представленные на рисунке 11б,в,г, были получены непосредственно в объеме фотоотверждаемой композиции в реакции радикальной сшивки модифицированных природных полимеров под действием света ближнего ИК-диапазона спектра. После фотоотверждения полимерные конструкции были тщательно промыты в избытке воды и обладали видимой синей фотолюминесценцией при облучении светом из ближнего ИК-диапазона спектра (Рис. 11б,г). Предложенный подход позволяет изготавливать полимерные конструкции со сложной архитектурой, примеры которых, в виде пчелы и цилиндра, полученные из ФОК АН/ПЭГ-ДА/ LAP/Жел-ГМА, представлены на рисунке 11в,г. Стоит отметить, что скорость формирования полимерных конструкций выше из ФОК, содержащей желатин, чем из ФОК с гиалуроновой кислотой, высокая вязкость которой, вероятно, является причиной более низкой скорости полимеризации.

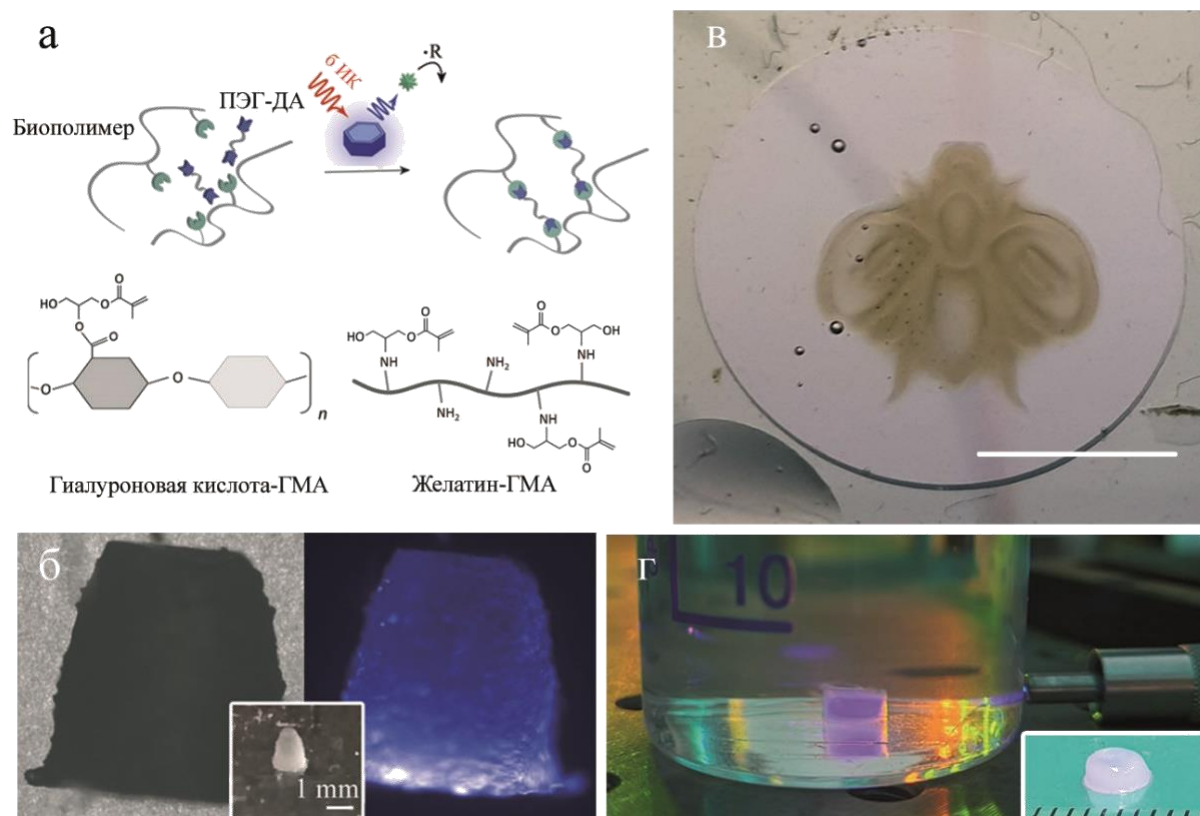


Рисунок 11. а) Схематическое изображение реакции сшивки природного полимера в процессе ИК-индуцированной полимеризации. б) Оптическое светопольное и флуоресцентное изображение сшитой структуры ГК-ГМА, полученной при облучении ФОК ближним ИК-излучением. На вставке: макрофотография 3D-структуры. в) Фотография готовой полимерной структуры из Жел-ГМА в виде пчелы. Масштабная линейка 5 мм. г) Фотография полимерной структуры в виде цилиндра из Жел-ГМА в воде при возбуждении ближним ИК-излучением и фотография готовой полимерной структуры. Масштабная линейка 1 мм.

Таким образом, использование АН в ФОК позволяет инициировать реакцию полимеризации под действием низкоэнергетического глубоко проникающего ближнего ИК-излучения. Это увеличивает глубину, на которую распространяется процесс фотоотверждения, исключает влияние сильно рассеивающей среды и повреждение клеток при фотопечати. Разработанная система фотоиницирования на основе гидрофобных АН, растворимого или нерастворимого в воде фотоинициатора и диакрилата полиэтиленгликоля расширяет спектр фотоотверждаемых композиций, подходящих для биомедицинских применений, и может служить инструментом для создания разнообразных ФОК на основе природных полимеров, даже высокогидрофильных, при условии, что возможно проведение полимераналогичной реакции с введением винильной группы.

## ВЫВОДЫ

1. Оптимизированы подходы к гидрофилизации поверхности АН, которые позволяют получать мультифункциональные конструкции на основе одного типа наночастиц для решения проблем визуализации, терапии и тканевой инженерии.

2. Предложенные методы модификации поверхности АН коломиновой кислотой за счет формирования ковалентной и нековалентной связи позволяют получать коллоидно-устойчивые водные дисперсии АН. Полученные наноконструкции характеризуются низкой неспецифичной адсорбцией белков крови, отсутствием клеточной токсичности и длительным временем циркуляции в кровотоке лабораторных животных (мышей). Показано, что АН-КолК могут быть использованы для прижизненной высококонтрастной визуализации патологически измененных тканей.

3. Конструкции на основе агрегатов мицелл СМАО с АН, модифицированные поли-N-винилкапролактамом и содержащие доксорубин и наночастицы серебра, использованы для одновременной визуализации, химио- и фототермической терапии под действием света ближнего ИК-диапазона спектра. Включение в состав конструкций доксорубина и наночастиц серебра приводит к увеличению цитотоксичности конструкций, что продемонстрировано в условиях *in vitro* на линиях клеток SK-BR-3, MDA-MB-231, WI-26. Перитуморальное введение конструкций АН-СМАО-ПВК-Докс-АгНЧ обеспечивает пятикратное торможение роста опухоли после однократного облучения светом из ближней ИК-области спектра, что продемонстрировано на модели ксенотрансплантата аденокарциномы молочной железы SK-BR-3.

4. Проведение полимеризации под действием света ближнего ИК-диапазона спектра в фотоотверждаемой композиции с низкой концентрацией наночастиц приводит к получению полимерного слоя из полиэтиленгликоля контролируемой толщины на поверхности наночастиц.

5. Полимерные конструкции из диакрилата полиэтиленгликоля получены с использованием иницирующей системы для полимеризации под действием света ближнего ИК-диапазона спектра, состоящей из гидрофобных АН, растворимого или нерастворимого в воде фотоинициатора и диакрилата полиэтиленгликоля. Полученные полимерные конструкции нетоксичны и имеют сложную морфологию поверхности.

6. С использованием разработанной иницирующей системы получены трехмерные полимерные конструкции из винилсодержащих гиалуроновой кислоты и желатина в результате реакции сшивки под действием света из ближнего ИК-диапазона спектра.

## Список работ, опубликованных по теме диссертации

### Статьи

1. Demina P., Arkharova N., Asharchuk I., Khaydukov K., Karimov D., Rocheva V., Nechaev A., Grigoriev Y., Generalova A., Khaydukov E. Polymerization Assisted by Upconversion Nanoparticles under NIR Light // *Molecules*. – 2019. – Т. 24. – № 13. – С. 2476.
2. Sochilina A. V, Savelyev A. G., Demina P. A., Sizova S. V, Zubov V.P., Khaydukov E. V, Generalova A.N. Quantitative detection of double bonds in hyaluronic acid derivative via permanganate ions reduction // *Measurement Science and Technology*. – 2019. – Т. 30. – №7. – С. 075102.
3. Demina P. A., Sholina N. V., Akasov R. A., Khochenkov D. N., Arkharova N. A., Nechaev A. V., Khaydukov E. V., Generalova A. N. A versatile platform for bioimaging based on colominic acid-decorated upconversion nanoparticles // *Biomaterials science*. – 2020. – Т. 8. – № 16. – С. 4570-4580.
4. Каримов Д. Н., Демина П. А., Кошелев А. В., Рочева В. В., Соковиков А. В., Генералова А. Н., Зубов В. П., Хайдуков Е. В., Ковальчук М. В., Панченко В. Я. Апконвертирующие кристаллические наноматериалы: синтез, фотолюминесцентные свойства и применение // *Российские нанотехнологии*. – 2020. – Т. 15. – № 6. – С. 699-724.
5. Демина П. А., Шолина Н. В., Акасов Р. А., Хоченков Д. А., Нечаев А. В., Балалаева И. В., Хайдуков Е. В., Генералова А. Н., Деев С. М. Нанокристаллы с антистоксовой флуоресценцией, модифицированные полисиаловой кислотой, для визуализации солидных опухолей *in vivo* // *Доклады Российской академии наук. Науки о жизни*. – 2021. – Т. 497. – С. 61.
6. Демина П. А., Хайдуков К. В., Рочева В. В., Акасов Р. А., Генералова А. Н., Хайдуков Е. В. Технология инфракрасной фотополимеризации // *Фотоника*. – 2022. – Т. 16. – № 8. – С. 600.
7. Генералова А. Н., Акасов Р. А., Демина П. А., Хайдуков К. В., Кузьяева В. И., Соловьева Д. О., Мочалов К. Е., Семчишен В. А., Хайдуков Е. В. Миграция энергии в апконвертирующих нанокристаллах // *Вестник РФФИ*. – 2023. – Т. 117. – № 1. – С. 41-56.
8. Demina P. A., Khaydukov K. V., Sochilina A. V., Rocheva V. V., Ivanov A. V., Akasov R. A., Lin Q., Generalova A. N., Khaydukov E. V. Role of energy transfer in a nanoinitiator complex for upconversion-driven polymerization // *Materials Today Advances*. – 2023. – Т. 19. – С. 100388.
9. Demina P. A., Khaydukov K. V., Babayeva G., Varaksa P. O., Atanova A. V., Stepanov M. E., Nikolaeva M. E., Krylov I. V., Evstratova I. I., Pokrovsky V. S., Zhigarkov V. S., Akasov R. A., Egorova T. V., Khaydukov E. V., Generalova A. N. Upconversion Nanoparticles Intercalated in Large Polymer Micelles for Tumor Imaging and Chemo/Photothermal Therapy // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Т. 24. – № 13. – С. 10574.
10. Генералова А. Н., Демина П. А., Акасов Р. А., Хайдуков Е. В. Фотополимеризация в 3D-печати тканеинженерных конструкций для регенеративной медицины // *Успехи химии*. – 2023. – Т. 92. – № 2. – С. RCR5068.