

На правах рукописи



**Шилягина
Наталья Юрьевна**

**Исследование тетраарилтетрацианопорфиразинов в качестве
потенциальных фотосенсибилизаторов для фотодинамической
терапии и флуоресцентной диагностики**

03.01.02 — биофизика

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Воронеж – 2014

Работа выполнена в ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского»

Научный руководитель:

кандидат биологических наук
Балалаева Ирина Владимировна

Официальные оппоненты:

Узденский Анатолий Борисович,
доктор биологических наук, профессор;
ФГАОУ ВО «Южный федеральный университет», Академия биологии и биотехнологии, главный научный сотрудник

Булгакова Наталья Николаевна,
кандидат физико-математических наук, доцент; ФГБУН Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук, Научно-образовательный центр, руководитель

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Защита диссертации состоится 18 декабря 2014 года в 15-00 часов на заседании диссертационного совета Д. 212.038.03 на базе Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Воронежский государственный университет» по адресу: 394006, г. Воронеж, Университетская пл., 1, аудитория 59.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке Воронежского государственного университета и на сайте <http://www.science.vsu.ru>.

Автореферат разослан

2014 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук,
профессор



Грабович Маргарита Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

Флуоресцентная диагностика (ФД) и фотодинамическая терапия (ФДТ) являются современными, интенсивно развивающимися методами диагностики и лечения злокачественных новообразований. Метод ФДТ основан на избирательном накоплении в опухолевой ткани фотосенсибилизатора, способного при локальном воздействии света с длиной волны, соответствующей его максимуму поглощения, генерировать цитотоксические агенты, вызывающие гибель опухолевых клеток (Chen et al., 2002; Moan et al., 2003; Узденский, 2010).

Опыт применения первых фотосенсибилизаторов в клинической практике позволил сформулировать требования к «идеальному» фотосенсибилизатору, включающие биологические, фотодинамические и химико-технологические критерии. Прежде всего, это однородность и воспроизводимость химического состава; низкая темновая токсичность; высокая селективность накопления в опухолях и быстрое выведение из нормальных тканей; поглощение в «оптическом окне» прозрачности биологических тканей; высокий квантовый выход продукции синглетного кислорода (Гельфонд, 2007; Josefsen et al., 2008).

Несмотря на то, что в последние десятилетия были синтезированы десятки веществ, обладающих фотосенсибилизирующими свойствами, многие из них имеют существенные недостатки: сложный неоднородный химический состав; длительное удержание в организме, что является причиной выраженной кожной фототоксичности; относительно невысокая селективность накопления в опухолевой ткани; поглощение в диапазоне длин волн 600–700 нм с низким коэффициентом экстинкции, что позволяет достигнуть при проведении ФДТ биологической эффективности в ткани лишь на небольшой глубине. В связи с этим разработка новых фотосенсибилизаторов по-прежнему остается актуальной задачей.

Как потенциальные фотосенсибилизаторы активно исследуются соединения различных химических классов: порфирины и их аналоги, хлорины, бактериохлорины, тетраазапорфирины и др. (Allison et al., 2004). Особый интерес вызывают порфиразины (тетраазапорфирины) в силу наличия у них макросистемы сопряжения двойных связей, а также способности образовывать прочные комплексы с большинством металлов периодической системы. Известно большое количество порфиразинов с различными боковыми заместителями и атомами металла в макроцикле (Ломова, 2006). Среди металлокомплексов порфиразина наиболее изучены как фотосенсибилизаторы нафталоцианины и фталоцианины цинка, алюминия и кремния.

Флуоресценция фотосенсибилизатора является ключевым свойством для использования его в целях диагностики и контроля распределения в организме, а свободнорадикальные реакции, запускаемые синглетным кислородом, лежат в основе его лечебного действия. Для клинической онкологии актуальным и нерешенным остается также вопрос раннего контроля эффективности фотодинамической терапии. В 2009 году впервые появилось сообщение об использовании мезо-замещенного порфиринового димера в качестве фотосенсибилизатора для ФДТ, позволяющего наблюдать протекание фотодинамического процесса по изменению внутриклеточной вязкости (Kuimova et al., 2009). Такая возможность появилась благодаря уникальному сочетанию для

данного флуорофора свойств фотосенсибилизатора и молекулярного ротора. Отличительной чертой последних является сильная зависимость параметров флуоресценции от вязкости среды, связанная с индуцированными светом внутримолекулярным вращением или скручиванием (Haidekker et al., 2010; Kuimova, 2012). Поскольку вязкостные свойства внутриклеточной среды существенно меняются в процессе фотоиндуцированной смерти клеток (Kuimova et al., 2009), такой подход дает потенциальную возможность осуществлять в живом организме мониторинг фотодинамического процесса в режиме реального времени с применением метода флуоресцентного имиджинга с регистрацией времени жизни возбужденного состояния флуорофора. Ограничениями для внедрения описанного в работе (Kuimova et al., 2009) соединения являются исключительная сложность и дороговизна его получения в промышленных количествах.

В связи с этим, поиск и исследование новых соединений, обеспечивающих флуоресцентную диагностику и фотодинамическую терапию с возможностью раннего контроля её эффективности, может рассматриваться как одна из актуальных задач современной экспериментальной биологии.

Цель и основные задачи исследования

Цель работы состояла в исследовании тетраарилтетрацианопорфиразинов в составе различных полимерных наночастиц в качестве потенциальных фотосенсибилизаторов для фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики новообразований.

В связи с поставленной целью решались следующие задачи:

1. исследование фотофизических свойств тетраарилтетрацианопорфиразинов и допированных ими полимерных наночастиц; оценка принадлежности тетраарилтетрацианопорфиразинов к классу флуоресцентных молекулярных роторов;
2. исследование динамики накопления тетраарилтетрацианопорфиразинов в составе различных полимерных наночастиц опухолевыми клетками и их внутриклеточной локализации;
3. разработка методического подхода и инструментария для контролируемого светового воздействия на опухолевые клетки для последующей оценки фотодинамического эффекта исследуемых фотосенсибилизаторов;
4. анализ фотодинамической активности тетраарилтетрацианопорфиразинов в отношении опухолевых клеток в культуре;
5. исследование фармакокинетики и специфичности накопления в опухоли тетраарилтетрацианопорфиразинов в эксперименте *in vivo* на лабораторных животных.

Научная новизна

Охарактеризованы новые соединения — тетраарилтетрацианопорфиразины, для которых показано сочетание свойств фотосенсибилизатора и флуоресцентного молекулярного ротора.

Показано, что тетраарилтетрацианопорфиразины активно накапливаются в опухолевых клетках в культуре и концентрируются в околоядерной области и

ядерной мембране, что может иметь важное значение для фотодинамической терапии.

Разработана установка для создания равномерного светового потока в 96-луночных планшетах с возможностью независимого светового воздействия на индивидуальные группы лунок при высокой стабильности световой мощности в процессе работы и прецизионном контроле температурного режима во время проведения исследований.

В экспериментах на животных-опухоленосителях показано, что тетраарилтетрацианопорфиразины характеризуются высокой селективностью накопления в опухоли по сравнению с мышцами и кожей.

Научно-практическое значение

Тетраарилтетрацианопорфиразины, сочетающие свойства фотосенсибилизаторов со свойствами флуоресцентных молекулярных роторов, представляют интерес как новый инструмент для получения фундаментальных знаний о механизме внутриклеточных процессов. Возможность наблюдения и контроля в режиме реального времени эффективности фотодинамической терапии позволяет рассматривать их в качестве принципиально новых агентов для последующей разработки препаратов для практической медицины.

Реализованный методический подход по оценке фотодинамического эффекта на клеточных культурах с помощью установки для создания равномерного светового потока в 96-луночных планшетах позволяет осуществлять эффективный и очень быстрый скрининг новых соединений с целью выявления наиболее перспективных для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии.

Основные выводы и результаты будут использованы в учебном процессе, при разработке соответствующих спецкурсов для студентов биологических и медицинских факультетов ВУЗов.

Основные положения, выносимые на защиту:

Тетраарилтетрацианопорфиразины сочетают в себе функции фотосенсибилизатора и флуоресцентного молекулярного ротора.

Тетраарилтетрацианопорфиразины интенсивно накапливаются в опухолевых клетках в культуре и концентрируются в околядерной области и ядерной мембране.

Тетраарилтетрацианопорфиразины в составе наночастиц на основе полимерных щеток способны генерировать синглетный кислород и обладают выраженным фотодинамическим эффектом в отношении опухолевых клеток в культуре.

Тетраарилтетрацианопорфиразины позволяют осуществлять контроль проведения процесса фотодинамической терапии в живых клетках по изменению времени жизни их возбужденного состояния.

Тетраарилтетрацианопорфиразины в составе наночастиц на основе полимерных щеток характеризуется высокой селективностью накопления в опухоли по сравнению с мышцами и кожей.

Личный вклад автора

Автор лично участвовал в проведении всех экспериментальных исследований, обработке полученных и изложенных в диссертации результатов, их анализе и обсуждении, а также совместно с соавторами участвовал в написании научных статей и апробации результатов исследования на семинарах, конференциях и симпозиумах.

Достоверность научных результатов

Достоверность научных результатов подтверждается воспроизводимостью экспериментальных данных и обусловлена широкой апробацией и надежностью использованных экспериментальных методов исследования, а также качественной и количественной согласованностью с результатами независимых исследований других авторов.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на 17 международных и российских мероприятиях, в том числе: Нижегородской сессии молодых ученых (Н. Новгород, 2009); Международной школе-конференции молодых ученых «Биология — наука XXI века» (Пушино, 2009, 2011); Научной сессии молодых ученых и студентов «Современное решение актуальных научных проблем в медицине» (Н. Новгород, 2009, 2011); XI и XII Международных школах для молодых ученых и студентов по оптике, лазерной физике и биофизике «Saratov Fall Meeting — SFM» (Саратов, 2010, 2011); III Всероссийском с международным участием конгрессе студентов и аспирантов биологов «Симбиоз–Россия 2010» (Н. Новгород, 2010); Международном симпозиуме «Topical problems of biophotonics» (С. Петербург — Н. Новгород, 2011; Н. Новгород, 2013); IX конференции «Нанотехнологии в онкологии» (Москва, 2011); VI Съезде Российского фотобиологического общества (Шепси, Россия, 2011); V Троицкой конференции «Медицинская физика и инновации в медицине» (Троицк, 2012); XI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» (Н. Новгород, 2012); IV Съезде биофизиков России, (Н. Новгород, 2012), XIX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2012), 14 конгрессе Европейского общества фотобиологов «The European Society for Photobiology» (Швейцария, 2011).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 26 работ, из них 4 — статьи в рецензируемых изданиях, входящих в список ВАК.

Конкурсная поддержка работы. Проведенные исследования поддержаны Министерством образования и науки (договор №14.Z50.31.0022) и Российским фондом фундаментальных исследований.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 135 страницах, включает 7 таблиц и 45 рисунков. Список литературы содержит 270 источников, из них 216 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объект и методы исследования

В работе исследованы новосинтезированные тетраарилтетрацианопорфиразины (ИМХ РАН, г. Нижний Новгород): Pz(I), с 4-фторфенильными (4FPh), и Pz(II), с фенильными (Ph) группами в периферическом окружении макроцикла, а также их иттербиевые комплексы. Структурные формулы соединений представлены на рис. 1.

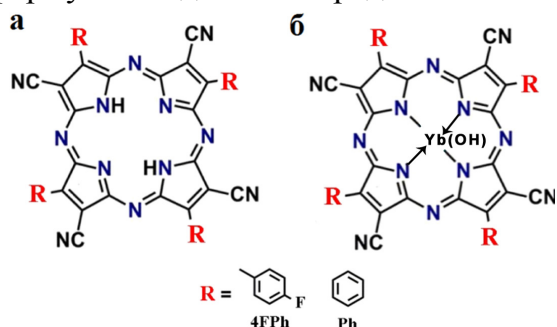


Рис.1. Структурные формулы тетраарилтетрацианопорфиразинов Pz(R)₄(CN)₄ (а) и их иттербиевых комплексов Yb [Pz(R)₄(CN)₄] (б), R – радикалы (4-FPh – 4-фторфенильный (I), Ph – фенильный (II))

Для перевода исследуемых соединений в гидрофильную форму они были включены в состав наночастиц на основе полиэтиленгликоля (ПЭГ), альгината натрия (AlgNa), метилцеллюлозы (МЦ) и полиимидграфт-поли-*t*-бутилметакрилата, или полимерных щеток (ПЩ).

Оценка гидрофобности тетраарилтетрацианопорфиразинов проводилась на основании расчета коэффициента распределения в двухфазной системе *n*-октанол-вода *IgP* с использованием ресурса Virtual Computational Chemistry Laboratory (<http://www.vcclab.org>).

Анализ спектров поглощения и флуоресценции тетраарилтетрацианопорфиразинов осуществлялся с помощью спектрофлуориметра RF-5301PC (Shimadzu, Япония), спектрофотометра СФ-2000 (ОАО ЛОМО, Россия) и планшетного спектрофотометра-спектрофлуориметра Synergy Mx (BioTek, США).

Относительный квантовый выход флуоресценции тетраарилтетрацианопорфиразинов рассчитывался относительно родамина В в воде (0,31). Оценка времени жизни возбужденного состояния тетраарилтетрацианопорфиразинов осуществлялась методом время-разрешенной лазерной спектроскопии с использованием модуля для времякоррелированного счета одиночных фотонов SPC-150 (Becker & Hickl, Германия).

Квантовый выход синглетного кислорода рассчитывался по методике, описанной в работе (Kuimova et. al., 2009.).

Исследование динамики накопления и внутриклеточной локализации тетраарилтетрацианопорфиразинов проводилось на культурах опухолевых клеток человека: эпидермоидной карциномы А-431 (ATCC[®] CRL-1555[™]); карциномы шейки матки HeLa (ATCC[®] CCL-2[™]); карциномы мочевого пузыря Т24 (ATCC[®] HTB-4[™]) и аденокарциномы молочной железы MCF7 (HTB-22[™]).

Оценка дозовой и временной зависимости накопления тетраарилтетрацианопорфиразинов в клетках проводилась по изменению интенсивности флуоресценции клеточного монослоя с помощью планшетного спектрофотометра-спектрофлуориметра Synergy Mx (BioTek, США). Исследование внутриклеточной локализации тетраарилтетрацианопорфиразинов в клетках проводилось с использованием системы лазерной сканирующей микроскопии

Axiovert 200M LSM-510 META NLO (Carl Zeiss, Германия). Для определения внутриклеточной локализации тетраарилтетрацианопорфиразинов использовались трансфицированные клеточные линии T24, экспрессирующие белок TagGFP2 в цитоплазме, митохондриях или ядрах. Для ингибирования клатрин-зависимого пути эндоцитоза использовался хлорпромазин (5 мкг/мл).

Время-разрешенный имиджинг проводился на системе лазерной сканирующей микроскопии Axio Observer Z1 LSM-710 DUO NLO с функцией FLIM (Carl Zeiss, Германия). Исследование времени жизни возбужденного состояния красителя в клетках в культуре проводили при двухфотонном возбуждении (800 нм). Фотодинамическое воздействие осуществляли путем сканирования участка образца гелий-неоновым лазером 594 нм, доза облучения составляла 50 Дж/см². Полученные данные аппроксимировались биэкспоненциальной зависимостью, анализировалось среднее время жизни возбужденного состояния τ_{av} .

Исследование световой активности тетраарилтетрацианопорфиразинов в отношении опухолевых клеток проводилось с использованием специально разработанного светодиодного излучателя для получения равномерного светового потока в стандартных 96-луночных планшетах. Доза облучения составляла 10 Дж/см² при плотности мощности 20 мВт/см². Жизнеспособность клеточной культуры оценивали через 24 часа после облучения с помощью микротитрационного теста для анализа метаболической активности (МТТ-тест) (Фрешни, 2010). Фотодинамический эффект исследуемых соединений был сопоставлен с эффектом препаратов, применяющихся в настоящее время в клинической практике: Фотосенс[®] (ФГУП ГНЦ «НИОПИК») и Фотодитазин[®] (ООО «Вета-Гранд»).

Для оценки способности тетраарилтетрацианопорфиразинов селективно накапливаться в опухолевой ткани при системном введении были проведены эксперименты на мышах линии Balb/c с подкожно привитой колоректальной аденокарциномой Colo-26. Исследование проводилось по достижении опухолями размера ~0,5 см³ (около 9 дней после перевивки).

Мониторинг распределения исследуемого соединения в опухоли и нормальных тканях проводился методом поверхностного флуоресцентного имиджинга с помощью установки IVIS-Spectrum[®] (Caliper Life Sciences, США). Исследуемые соединения вводились животным через хвостовую вену в концентрации 15 мг/кг. Изображения животных регистрировались до введения препаратов (контроль), через полчаса после введения, затем каждый час в течение 7 ч и через 24 ч, а затем каждые сутки в течение недели. Для определения параметров фармакокинетики по полученным изображениям анализировалась интенсивность флуоресценции, усредненная по площади опухоли, и отношение интенсивности сигнала флуоресценции в опухоли к сигналу в нормальных тканях (правое бедро).

Микроскопическое исследование накопления красителей в тканях животных *ex vivo* осуществлялось с помощью конфокального микроскопа Axiovert 200M LSM 510 META (Carl Zeiss, Германия).

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием пакетов Microsoft Excel 2007 и GraphPad Prizm 6 с применением методов параметрической статистики.

Результаты и их обсуждение

Фотофизические свойства тетраарилтетрацианопорфиразинов

Тетраарилтетрацианопорфиразины имеют несколько полос поглощения, локализованных в коротковолновой и длинноволновой областях спектра (таблица 1). Для красителей в виде свободных оснований характерно смещение максимума поглощения в длинноволновую область. Флуоресценция тетраарилтетрацианопорфиразинов регистрируется в области 630–675 нм. Наличие иттербия в макроцикле приводит к смещению пика флуоресценции в более коротковолновую область спектра (таблица 1).

Таблица 1.

Положение пиков поглощения и флуоресценции для тетраарилтетрацианопорфиразинов и их иттербиевых комплексов

	Максимум поглощения, нм		Максимум флуоресценции, нм
	Коротковолновая область спектра	Красная область спектра	
Pz(I)	275; 340; 406	612	660
Pz(II)	277; 334; 405	618	675
YbPz(I)	270; 364	610	625
YbPz(II)	263; 338; 402	610	630

Расчет коэффициента распределения в двухфазной системе *n*-октанол-вода lgP тетраарилтетрацианопорфиразинов показал низкую гидрофильность исследуемых соединений. Это обусловило необходимость получения тетраарилтетрацианопорфиразинов в водорастворимой биосовместимой форме, что было достигнуто включением исследуемых флуорофоров в состав полимерных мицеллоподобных частиц на основе ПЭГ, AlgNa, МЦ и ПЩ.

Водные мицеллярные растворы тетраарилтетрацианопорфиразинов характеризуются высокими коэффициентами молярной экстинкции в максимуме пика в длинноволновой области спектра ($\epsilon \sim 10^5$ л·моль⁻¹·см⁻¹), что типично для большинства фотосенсибилизаторов фталоцианиновой природы, которые также относятся к группе порфиразинов (Макаров, 2009). Положение максимума поглощения не зависит от природы используемого полимера, при этом высота пика поглощения изменяется несущественно.

В отличие от поглощения, интенсивность красной флуоресценции мицеллярных растворов исследуемых тетраарилтетрацианопорфиразинов существенным образом зависит от природы используемого полимера (рис. 2).

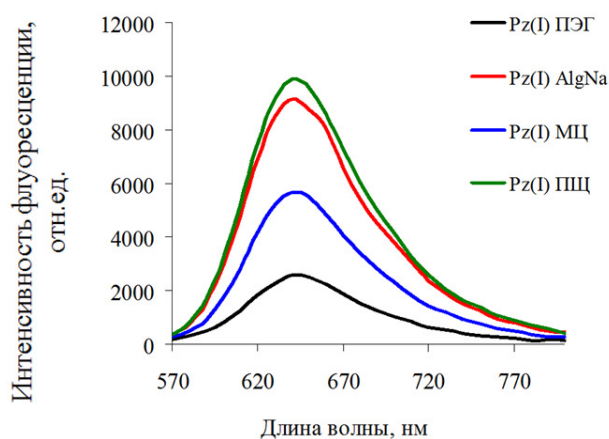


Рис. 2. Спектры флуоресценции Pz(I) в составе различных полимерных наночастиц в воде. λ_{ex} 560 нм, концентрация Pz(I) 5мкМ

задачей являлось определение тетраарилтетрацианопорфиразинов в сыворотке крови. Нами были определены величины квантовых выходов флуоресценции для тетраарилтетрацианопорфиразинов в составе различных полимеров в дистиллированной воде, сыворотке крови и 10% растворе альбумина (рис. 3).

Квантовый выход флуоресценции тетраарилтетрацианопорфиразинов в составе различных полимерных наночастиц, растворенных в воде, составил 10^{-3} – 10^{-4} . Существенное возрастание этой величины было зарегистрировано в присутствии белков сыворотки крови. Наибольшее значение величины квантового выхода флуоресценции для всех исследуемых флуорофоров зарегистрировано в 10% растворе альбумина, для Pz(I) это значение приближается к 0,85. При этом можно говорить об усилении флуоресценции до 400 раз по отношению к водному раствору тех же соединений.

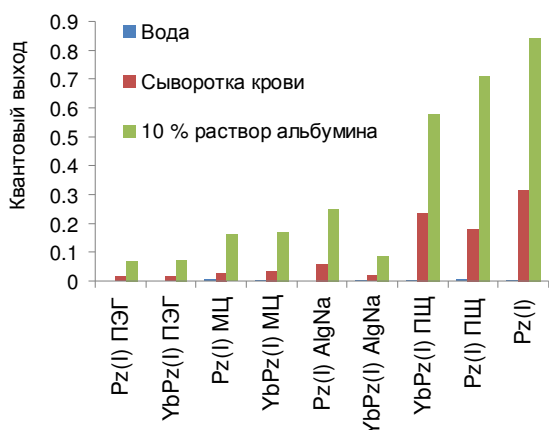


Рис. 3. Квантовый выход флуоресценции для Pz(I) и YbPz(I) в составе различных полимерных наночастиц в воде и в присутствии белков сыворотки крови

для внутримолекулярного переноса заряда от донора к акцептору при поглощении молекулой кванта света. Это сопровождается внутримолекулярным движением отдельных фрагментов молекулы (вращением или скручиванием), что и послужило

Из рисунка 2 видно, что из всех исследованных полимерных наночастиц наибольшей интенсивностью флуоресценции характеризуется суспензия, содержащая Pz(I), инкорпорированный в наночастицы на основе ПЩ.

Предполагается, что разрабатываемый фотосенсибилизатор будет доставляться к целевым тканям посредством введения препарата в кровеносное русло. В связи с этим важной

спектральных свойств

На основании полученных данных о сильной зависимости квантового выхода флуоресценции исследуемых соединений от параметров среды нами было сделано предположение о возможной принадлежности тетраарилтетрацианопорфиразинов к классу флуоресцентных молекулярных роторов. Такие соединения показывают сильную зависимость фотофизических свойств от вязкости среды. Особенностью структуры молекулярных роторов является наличие в молекуле флуорофора донорной и акцепторной групп, включенных в общую систему π -сопряжения, что создает предпосылки

основанием для введения термина «молекулярные роторы» (Haidekker et al., 2010). Индуцированное светом внутримолекулярное движение оказывает сильное влияние на вероятность безызлучательной и излучательной релаксации возбужденного состояния молекулы. Возможность безызлучательного расхода энергии возбужденного состояния посредством внутримолекулярного движения облегчается в средах с низкой вязкостью. И, напротив, в вязком окружении внутримолекулярное движение затруднено, что приводит к резкому возрастанию флуоресценции и к изменению таких ее параметров, как квантовый выход и время жизни возбужденного состояния. Изменение флуоресцентных параметров молекулярного ротора с вязкостью μ описывается уравнениями Фёрстера-Хоффмана (Förster et al., 1971). Для квантового выхода φ это выражение имеет вид

$$\lg(\varphi) = z + \alpha \lg(\mu), \quad (1)$$

где z и α — константы. Аналогичным образом представляется зависимость между вязкостью и временем жизни возбужденного состояния τ :

$$\lg(\tau) = \lg(z / k_r) + \alpha \lg(\mu), \quad (2)$$

где k_r — константа скорости излучательного перехода, z — константа. Известно, что для молекулярных роторов α определяется, по разным источникам, в диапазоне 0,5–0,75 (Haidekker et al., 2005; Jin et al., 2010) или 0,33–0,67 (Yoon et al., 2011; Kuimova, 2012).

Нам было показано существенное возрастание интенсивности флуоресценции тетраарилтетрацианопорфиразинов с увеличением вязкости на примере этанол-глицериновых смесей (рис. 4а). Рассчитанные в соответствии с уравнением Фёрстера-Хоффмана значения тангенса угла наклона α прямых, характеризующих степень «вязкостной чувствительности» квантового выхода флуоресценции, составили 0,5 и 0,37 для Pz(I) и Pz(II) соответственно (рис. 4б), что может указывать на принадлежность тетраарилтетрацианопорфиразинов к классу молекулярных роторов.

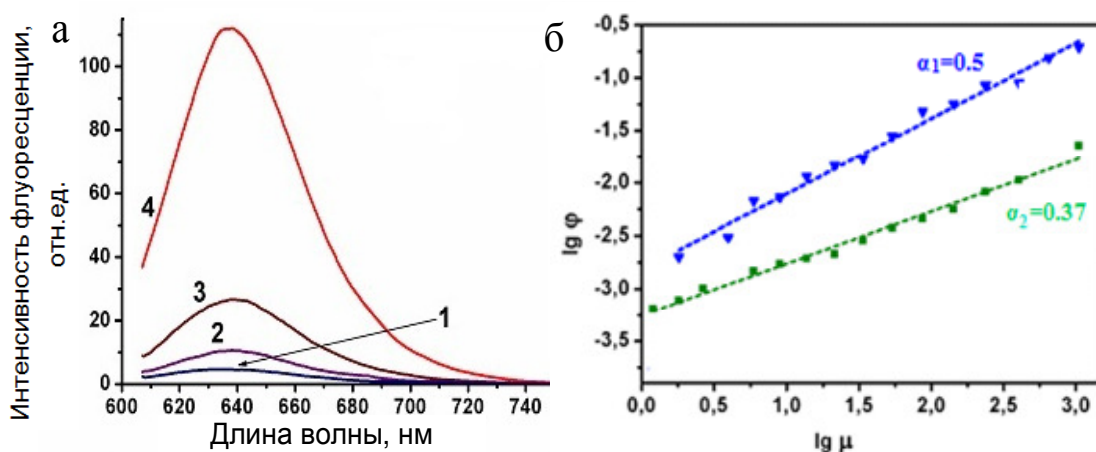


Рис. 4. Зависимость квантового выхода флуоресценции Pz(I) и Pz(II) от вязкости среды. а – спектры флуоресценции Pz(I) в этанол-глицериновых смесях (1) — 0%, (2) — 30%, (3) — 70%, (4) — 97 % глицерина;

б – зависимость квантового выхода флуоресценции для Pz(I) и Pz(II) от вязкости растворителя, α_1 — Pz(I); α_2 — Pz(II)

Кроме этого, нами были получены зависимости времени жизни возбужденного состояния флуоресценции от вязкости среды (рис. 5). Величина тангенса угла наклона прямой α для Pz(I) составила 0,49 (рис. 5б).

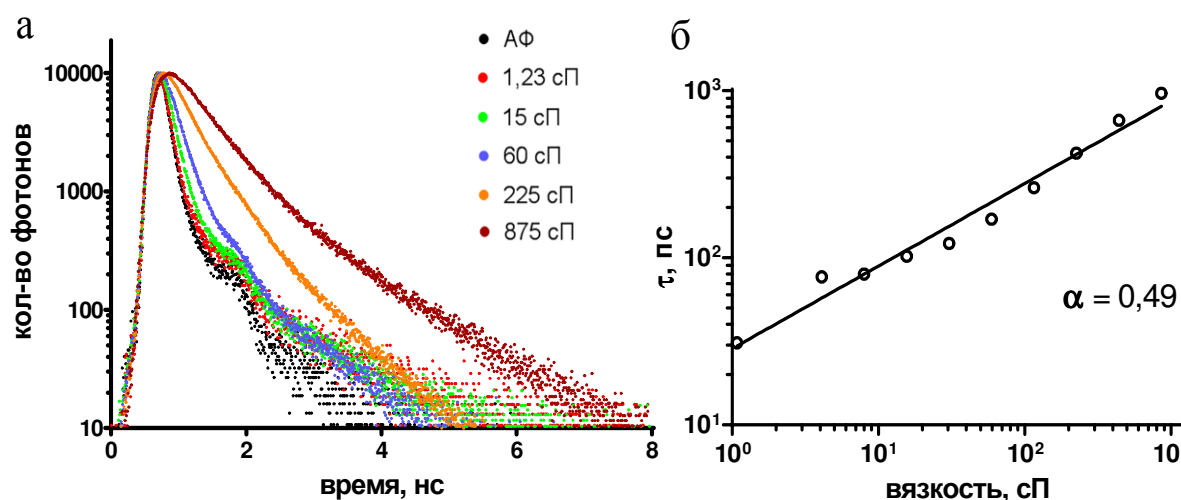


Рис. 5. Зависимость времени жизни возбужденного состояния Pz(I) от вязкости раствора. а — кривые затухания флуоресценции Pz(I) в этанол-глицериновых смесях с известной вязкостью; АФ — аппаратная функция; б — зависимость времени жизни возбужденного состояния Pz(I) от вязкости раствора

Таким образом, полученные данные подтверждают принадлежность исследуемых тетраарилтетрацианопорфиразинов к классу флуоресцентных молекулярных роторов. Предполагаемый нами механизм фотоиндуцированного внутримолекулярного движения Pz(I) может быть связан с поворотом ароматической или CN- группы относительно плоскости макроцикла.

Исследование динамики накопления и внутриклеточной локализации тетраарилтетрацианопорфиразинов

Нами была определена зависимость накопления тетраарилтетрацианопорфиразинов в опухолевых клетках в культуре от времени инкубации и концентрации красителя в среде (рис. 6 а, б). Исходя из зависимости, представленной на рисунке 6а, для дальнейших исследований был выбран диапазон концентраций 5–15 мкМ. Было показано, что тетраарилтетрацианопорфиразины интенсивно накапливаются опухолевыми клетками уже в течение первых 30 минут после добавления их в среду инкубации (рис. 6б).

Анализ накопления тетраарилтетрацианопорфиразинов, заключенных в различные полимерные наночастицы, показал, что тип полимера существенно влияет на величину сигнала флуоресценции, и при одной и той же концентрации красителя для исследуемых полимеров интенсивность сигнала флуоресценции Pz(I) в клетке увеличивается в ряду ПЭГ<МЦ≅AlgNa<ПЩ (рис. 7). В случае отсутствия солюбилизатора сигнал был сравним с таковым при использовании полимерных щеток. Эти результаты хорошо согласуются с данными, представленными на рисунке 2. При исследовании внутриклеточной локализации и цитотоксичности Pz(I) вносился в среду в составе наночастиц на основе ПЩ.

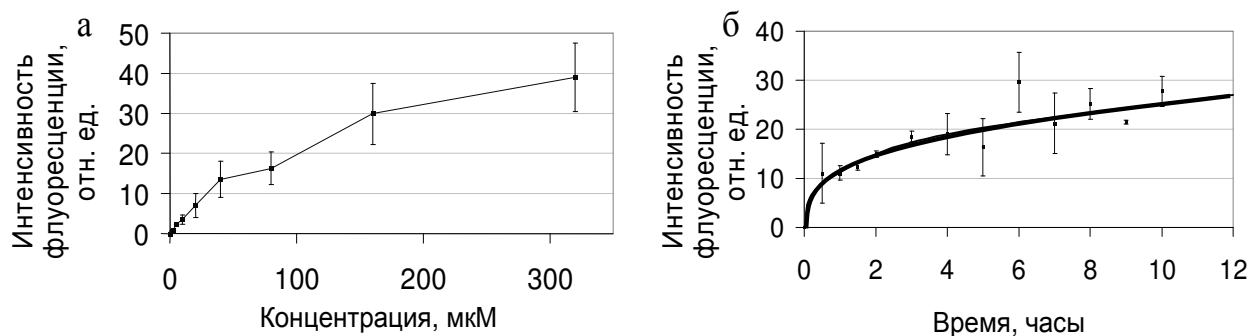


Рис. 6. Накопление опухолевыми клетками YbPz(II): (а) — в зависимости от концентрации (инкубация 30 минут); (б) — в зависимости от времени инкубации (концентрация 10 мкМ)

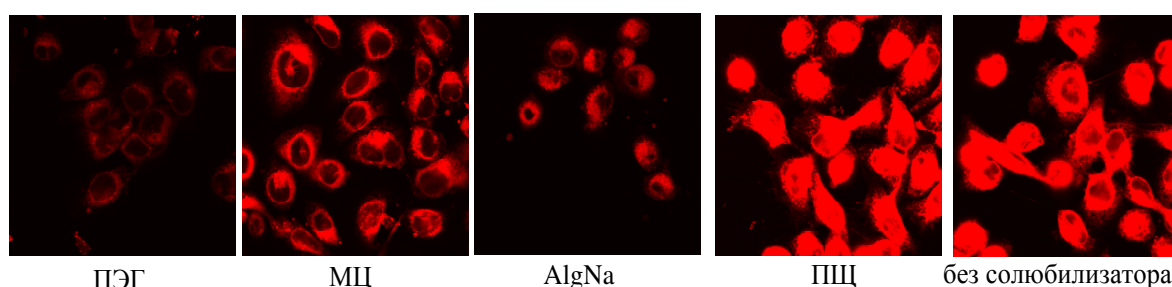


Рис.7. Накопление опухолевыми клетками Pz(I) в составе различных полимерных наночастиц. Инкубация 30 минут, концентрация 5 мкМ, размер изображения 143x143 мкм, λ_{ex} 633 нм, λ_{em} 650–710 нм

Было показано, что присутствие в среде инкубации белков сыворотки крови снижало скорость поступления Pz(I) в клетку как в составе наночастиц ПЩ, так и в отсутствие солибилизатора. При этом ингибирование клатринового пути эндоцитоза не приводило к значимому изменению поступления или внутриклеточного распределения красителя. Основными местами внутриклеточной локализации Pz(I) являются околядерная область клетки, эндосомы и мембранные структуры, предположительно ЭПР (рис. 8). Использование клеток, трансфицированных белком слияния TagGFP2 (флуоресцентный белок) и ламина, позволило подтвердить значительное окрашивание порфиразином ядерной мембраны или плотно прилегающих к ней структур. Зарегистрированное накопление Pz(I) в околядерной области и, в особенности, в ядерной мембране может иметь важное значение для фотодинамической терапии, так как последняя наиболее чувствительна к фотоповреждению (Rosenkranz et al., 2002).

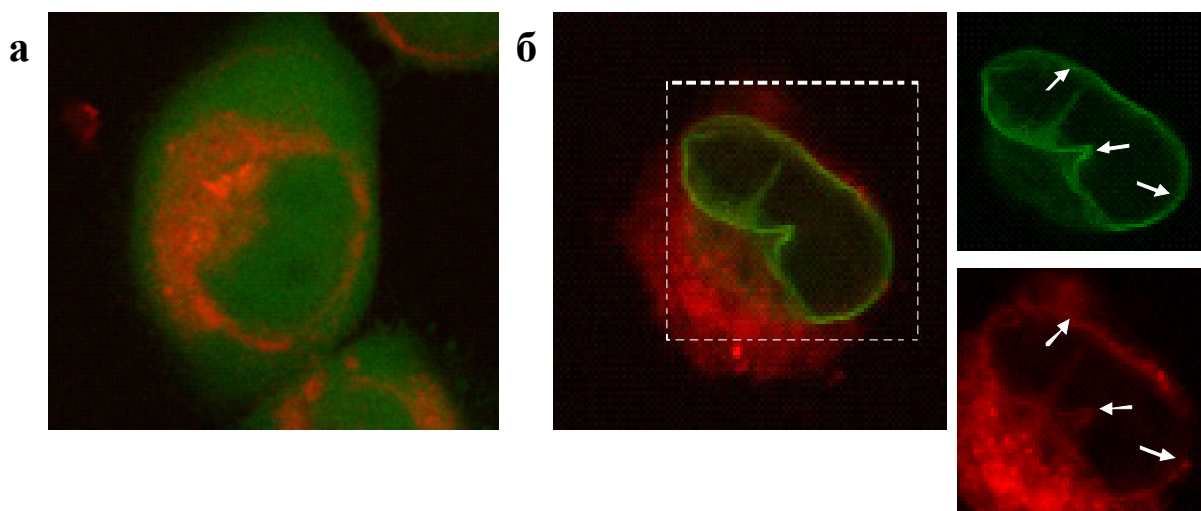


Рис. 8. Внутриклеточная локализация Pz(I) ПЩ (красный канал). Клетки T-24, экспрессирующие белок TagGFP2 (зеленый канал) в цитоплазме (а) и ядрах (б). Время инкубации 20 минут, концентрация 5 мкМ. λ_{ex} (GFP2) 488 нм, λ_{em} 500–550 нм. λ_{ex} (Pz(I)) 594 нм, λ_{em} 600–700 нм. Размеры изображений (а) 40x40 мкм, (б) 25x25 мкм

Анализ фотодинамической активности тетраарилтетрациано-порфиразинов в отношении опухолевых клеток в культуре

Нами была показана способность Pz(I) ПЩ вызывать фотоиндуцированную гибель клеток (рис. 9). При освещении галогеновой лампой клеток, предынкубированных с красителем, через 10–20 минут наблюдали «пузырение» мембран клеток и их гибель, в то время как при инкубации в темноте или освещении клеток без красителя они сохраняли свою жизнеспособность. Химическая структура исследуемых соединений позволила сделать предположение об их способности генерировать синглетный кислород при освещении. Квантовый выход синглетного кислорода для Pz(I) ПЩ при измерении в дейтериевой воде составил 0,29, однако необходимо отметить, что в связи с особенностями фотофизических свойств флуоресцентных молекулярных роторов эта величина будет в значительной степени зависеть от параметров среды.

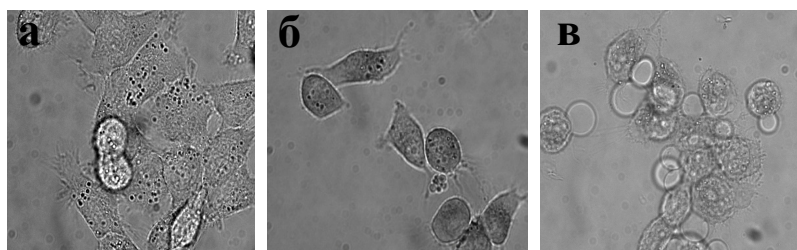


Рис. 9. Клетки линии A431.
 а — облученные клетки без фотосенсибилизатора;
 б — клетки, предынкубированные с Pz(I) ПЩ с последующей инкубацией в темноте;
 в — клетки, предынкубированные с Pz(I) ПЩ с последующим облучением.
 Концентрация Pz(I) 5 мкМ, время инкубации 30 минут, освещение галогеновой лампой (20 минут)

Для количественной оценки фотодинамического эффекта нами был разработан светодиодный излучатель для получения равномерного светового потока в 96-луночных планшетах с возможностью независимого светового воздействия на индивидуальные группы лунок при высокой стабильности световой мощности в процессе

работы и прецизионном контроле температурного режима во время проведения исследований.

Было показано что фототоксичность Pz(I) ПЩ существенно превышает темновую токсичность (рис. 10а). Ингибирующая концентрация ИК₅₀ для данного соединения составила 20 мкМ при облучении в дозе 10 Дж/см².

В отличие от безметалльного порфиразина, токсичность YbPz(I) в темноте и при освещении существенно не различалась (рис. 10б). Предположительно, снижение фотодинамического эффекта в присутствии атома иттербия в молекуле хромофора связано с появлением дополнительного пути релаксации триплетного возбужденного состояния (150 кДж/моль), а именно переходом энергии на атом иттербия (123 кДж/моль).

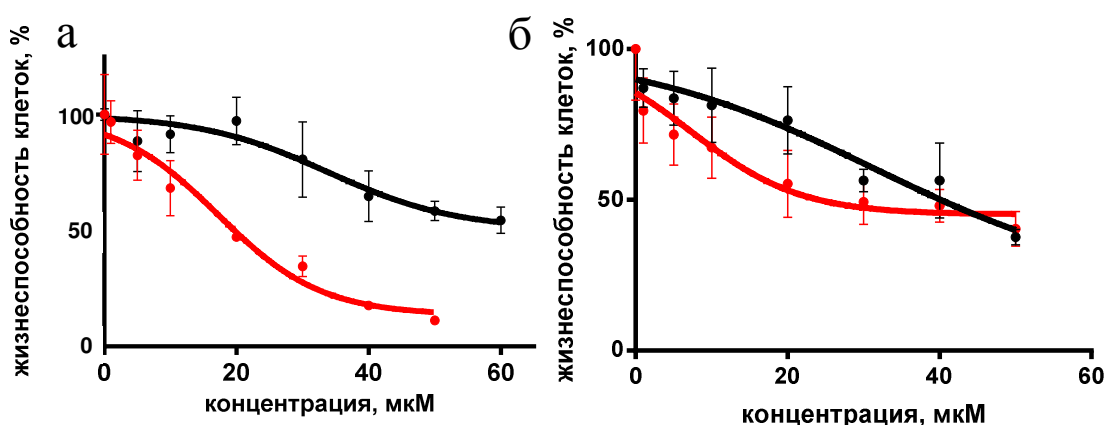


Рис. 10. Зависимость жизнеспособности клеток A431 от концентрации фотосенсибилизатора в темноте и при облучении светом 615–635 нм (20 мВт/см², 10 Дж/см²). Красная линия — при облучении, черная — в отсутствии облучения.
а — Pz(I) ПЩ; б — YbPz(I) ПЩ

Исследование фотодинамической активности Pz(I) ПЩ и препаратов, одобренных к клиническому применению, Фотосенс[®] и Фотодитазин[®] показало сравнимую световую токсичность в отношении опухолевых клеток (рис. 11).

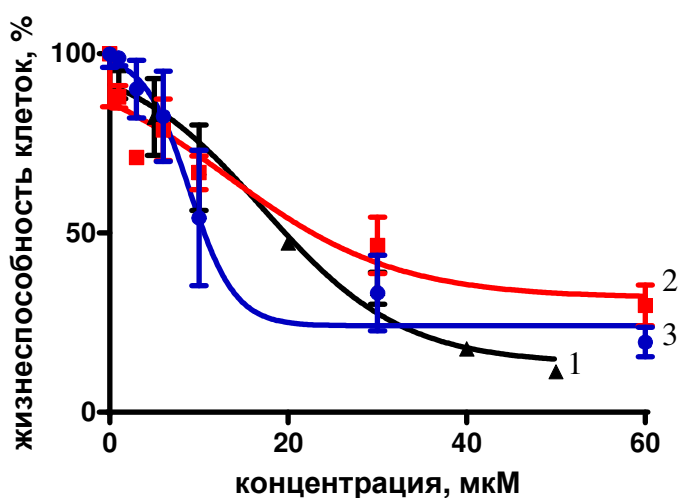


Рис. 11. Зависимость жизнеспособности клеток A431 от концентрации в среде фотосенсибилизатора: 1 — Pz(I) ПЩ; 2 — Фотодитазин[®]; 3 — Фотосенс[®].
 λ_{ex} 615–635 нм (20 мВт/см², 10 Дж/см²)

Нами была показана принципиальная возможность наблюдения изменения функционального состояния клетки в процессе облучения по оценке времени жизни возбужденного состояния тетраарилтетрацианопорфиринов. На рисунке 12 приводятся изображения клеток в среде с Pz(I) ПЩ, полученные с помощью время-разрешенной флуоресцентной микроскопии (FLIM). Для визуализации среднего времени жизни возбужденного состояния в каждой точке изображения

использована псевдоцветовая палитра.

Из рисунка 12 хорошо видно, что через 70 минут после фотодинамического воздействия в облучаемой зоне регистрируется увеличение времени жизни возбужденного состояния фотосенсибилизатора в клетке, которое может свидетельствовать об увеличении вязкости микроокружения, а также конформационных изменениях макромолекул, с которыми потенциально может связываться Pz(I). Кроме этого, наблюдается существенное увеличение интенсивности сигнала. Последнее может быть обусловлено, во-первых, увеличением квантового выхода флуоресценции, а во-вторых, нарушением целостности плазматической и других мембран клетки и поступлением в цитоплазму значительных количеств флуорофора из окружающей среды.

Таким образом, роторные свойства Pz(I) открывают новые перспективы в области исследования механизмов ответа клетки на фотодинамическое воздействие, позволяя с помощью измерения времени жизни возбужденного состояния фотосенсибилизатора определять изменение вязкости внутриклеточной среды, которая, в свою очередь, коррелирует с функциональным состоянием клетки (Kuimova et al., 2009).

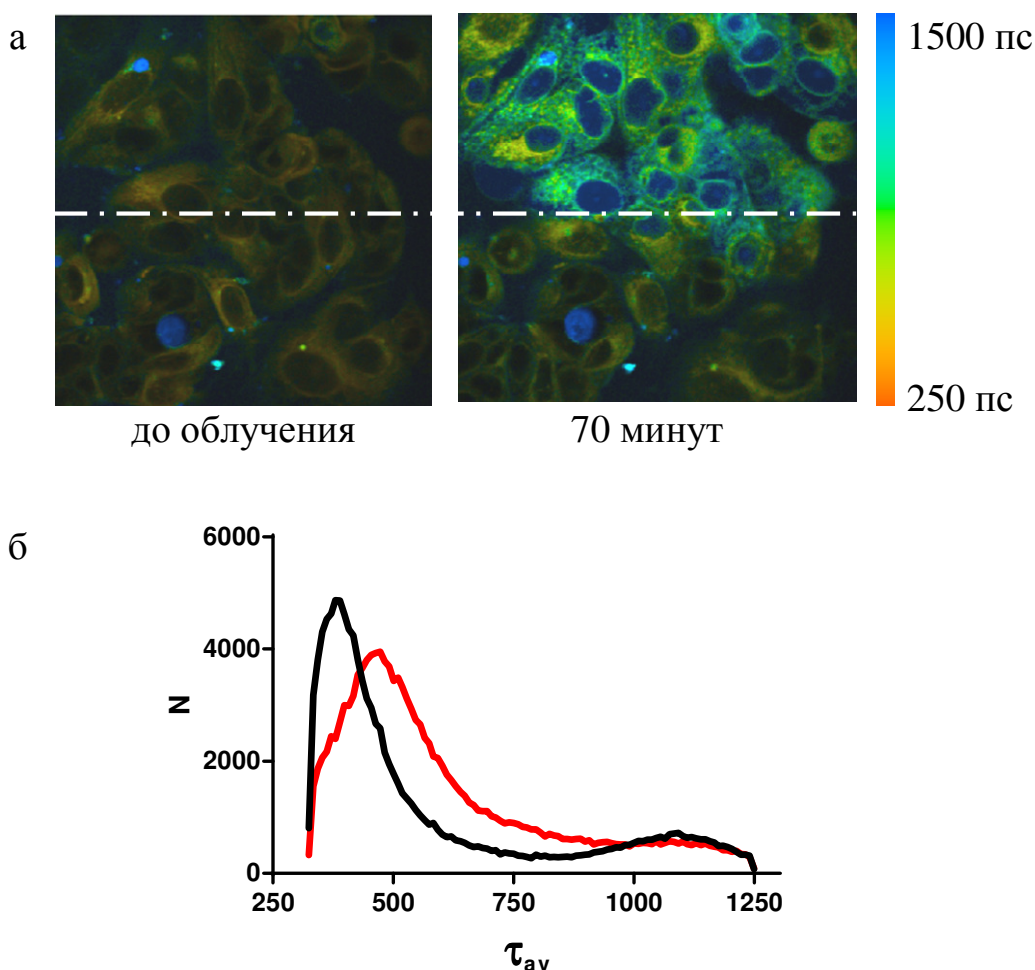


Рис.12. Клетки MCF7 до и через 70 минут после фотодинамического воздействия, сенсibilизированного 5 мкМ Pz(I). Метод FLIM. λ_{ex} 800 нм, λ_{em} 600–750 нм. Воздействие λ_{ex} 594 нм, мощность на объективе 160 мкВт, доза облучения 50 Дж/см². а — изображения клеток в псевдоцветовой палитре, кодирующей τ_{av} . Размер изображения 143x143 мкм. Облученный и необлученные участки разделены пунктиром б — гистограмма распределения τ_{av} для облученного (красная линия) и необлученного (черная линия) участков через 70 минут после воздействия.

Исследование фармакокинетики и специфичности накопления в опухоли тетраарилтетрацианопорфиразинов в экспериментах in vivo

Помимо возможности вызывать фотоиндуцированную гибель клеток, потенциальные фотосенсибилизаторы должны обладать способностью селективно накапливаться в опухолевой ткани. Поскольку эта способность не может быть исследована на культурах клеток, нами были проведены эксперименты на животных-опухоленосителях. Было показано, что внутривенное введение Pz(I) ПЩ приводит к появлению интенсивного сигнала флуоресценции в области опухоли, значительно превосходящего сигнал от нормальных тканей, уже через 20–30 минут после его введения (рис. 13а).

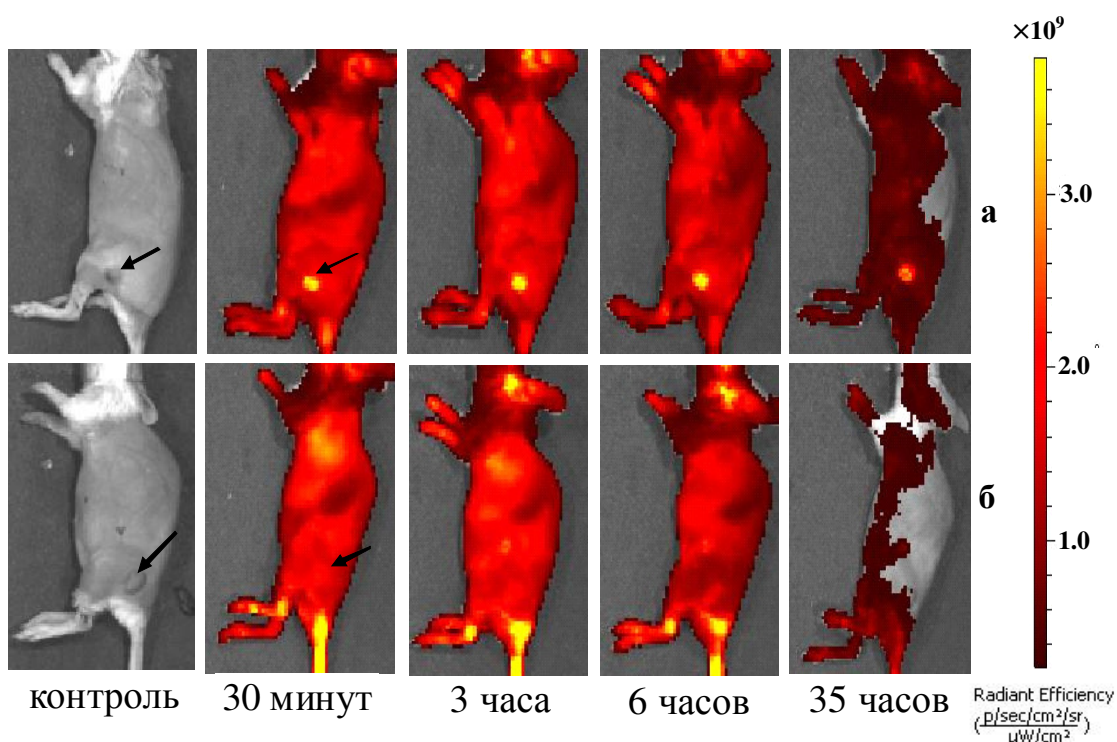


Рис. 13. Динамика накопления и выведения фотосенсибилизатора (15 мг/кг) в тканях животного-опухоленосителя. λ_{ex} 605 нм, λ_{em} 670–690 нм.

Опухолевый узел указан стрелкой.

а — Pz(I) ПЩ; б — Pz(I)

После введения Pz(I) без солубилизатора видимой разницы между участком опухоли и здоровыми тканями зарегистрировано не было (рис. 14 б).

Количественная оценка сигнала показала, что максимум накопления Pz(I) ПЩ достигался через 3–6 часов после инъекции, при этом наблюдалось длительное удержание красителя в опухолевой ткани (время полувыведения около 48 часов), в то время как в нормальных тканях уже через сутки значения составляли менее половины от максимального уровня сигнала (рис. 14а). Время полного выведения из нормальных и опухолевых тканей составило около 2 и более 6 суток соответственно. Значения контраста опухоль/нормальная ткань, по изображениям, полученным *in vivo*, составили ~2 в максимуме накопления и ~4 через 24 часа после инъекции.

В отличие от Pz(I) ПЩ, при введении Pz(I) без солюбилизатора отсутствовали какие-либо различия в распределении красителя в опухоли и нормальных тканях животного (бедро). После увеличения сигнала флуоресценции наблюдали быстрое выведение красителя с периодом полувыведения не более 5–7 часов. Через сутки после инъекции в тканях животного оставалось лишь незначительное количество красителя, а контраст в накоплении в течение всего времени наблюдения не наблюдался (рис. 14б).

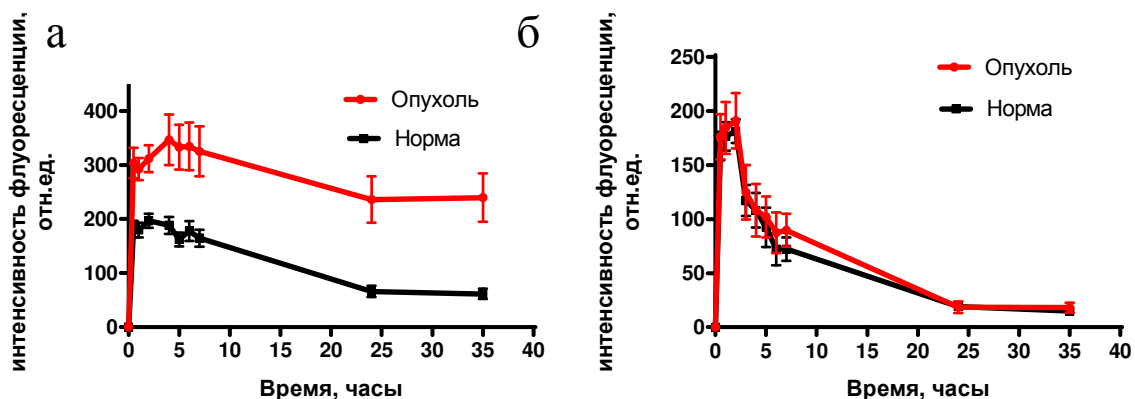


Рис. 14. Изменение интенсивности сигнала флуоресценции в нормальных тканях (бедро) и опухолевых участках после введения фотосенсибилизатора. а — Pz(I) ПЩ, б — Pz(I)

Таким образом, полученные результаты позволяют говорить о том, что наночастицы на основе ПЩ обеспечивают селективность накопления Pz(I) в опухоли. Данный эффект может объясняться так называемым EPR-эффектом (от англ. «enhanced permeability and retention») (Maeda, 2012), обусловленным повышенной проницаемостью несовершенного сосудистого русла опухоли для объектов нанометрового размера, а также их удержанием в опухоли за счет неразвитого лимфатического оттока.

При проведении экспериментов *in vivo* методом поверхностного флуоресцентного имиджинга значительное влияние на результат оказывает экранировка кожей сигнала от более глуболежащих органов и тканей. В связи с этим для верификации результатов, полученных *in vivo*, нами была проведена

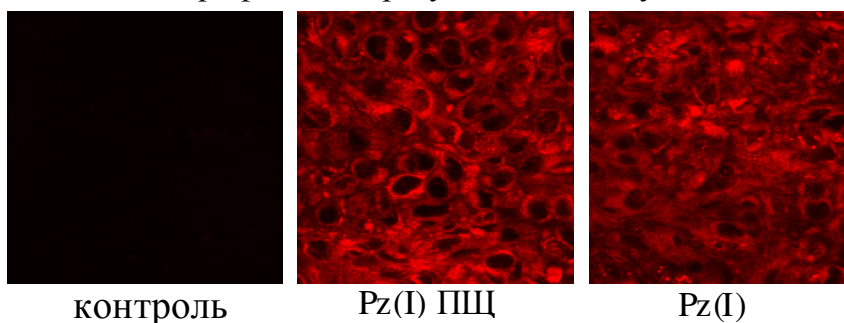


Рис. 15. Конфокальная флуоресцентная микроскопия образцов опухолевой ткани через 3 часа после введения фотосенсибилизатора (15 мг/кг, в/в). λ_{ex} 633 нм, λ_{em} 650–710 нм. Размер изображений 75x75 мкм

оценки накопления Pz(I) в органах и тканях животных-опухоленосителей методами микроскопии *ex vivo*. По данным конфокальной микроскопии, Pz(I) проникал в глубину опухолевого узла и накапливался в цитоплазме клеток (рис. 15). Независимо от варианта введения, максимальный уровень сигнала наблюдался в образцах печени и легких животных, в меньшей степени — в почках и селезенке (рис. 16).

Количественная оценка уровня флуоресцентного сигнала подтвердила селективное накопление Pz(I) в опухоли по сравнению с мышцами и кожей. Отношение сигналов опухоль/мышцы через 3 часа после введения для Pz(I) ПЩ и Pz(I) составило 4 и 3 раза соответственно (рис. 16).

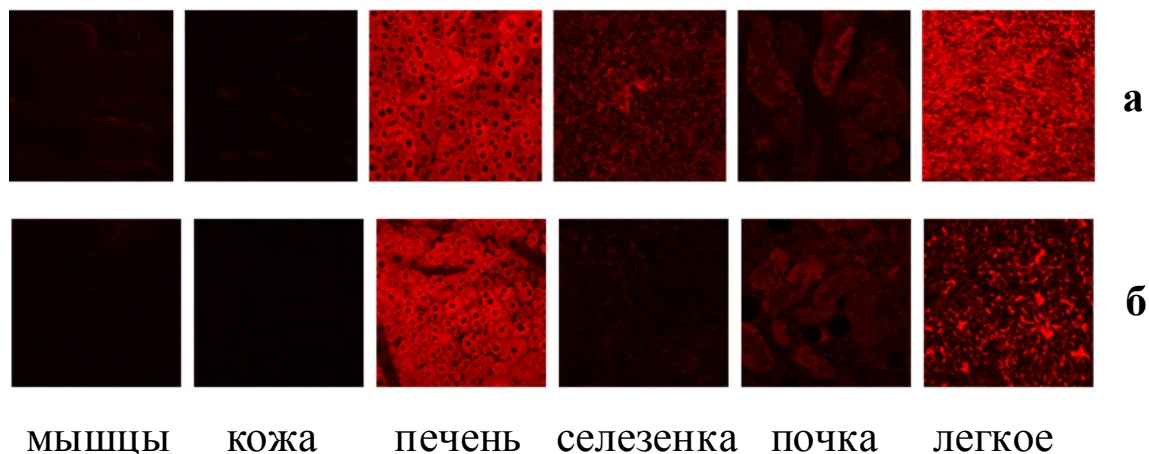


Рис. 16. Конфокальная флуоресцентная микроскопия образцов органов и тканей через 3 часа после введения фотосенсибилизатора (15 мг/кг, в/в). λ_{ex} 633 нм, λ_{em} 650–710 нм. Размер изображений 225x225 мкм. а — Pz(I) ПЩ; б — Pz(I)

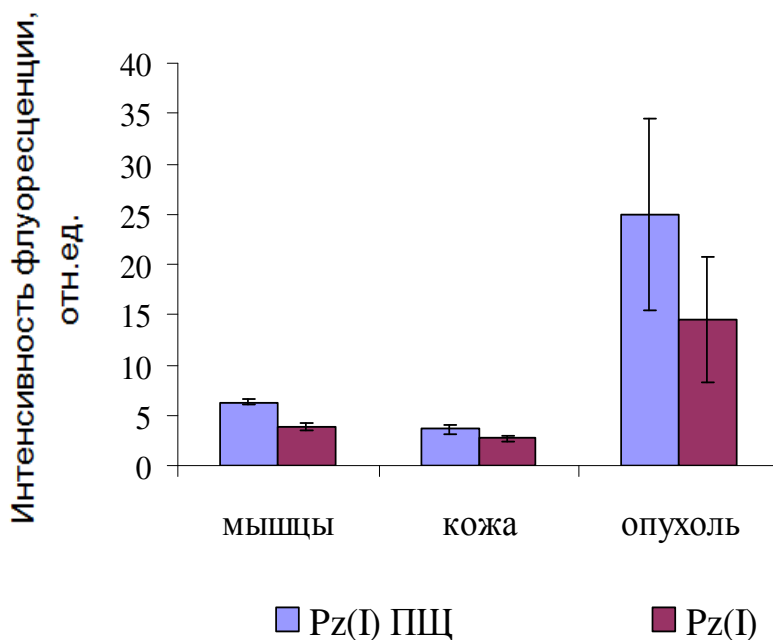


Рис.17. Уровень флуоресцентного сигнала в здоровых и опухолевых участках по данным конфокальной микроскопии

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованные в работе тетраарилтетрацианопорфиразины представляются перспективными для практического внедрения благодаря уникальному сочетанию свойств фотосенсибилизаторов и флуоресцентных молекулярных роторов. Данные соединения соответствуют требованиям к препаратам для фотодинамической терапии: интенсивное поглощение и флуоресценция в красной области спектра; отсутствие выраженной темновой токсичности; способность к генерации синглетного кислорода и высокая фотодинамическая активность; селективное накопление в опухоли при системном введении, показанное на животных-опухоленосителях. Необходимо отметить, что фотодинамическая активность данных соединений в отношении опухолевых клеток в культуре сравнима с активностью применяемых в клинике соединений хлоринового и фталоцианинового ряда. При этом введение атома иттербия в макроцикл позволяет существенно снизить фотосенсибилизирующий эффект, что может быть важным для задач диагностики.

Уникальной особенностью исследованных тетраарилтетрацианопорфиразинов является их принадлежность к классу молекулярных роторов. Сильная зависимость фотофизических свойств, таких как квантовый выход и время жизни возбужденного состояния, от потенциального свободного объема делает возможным их использование в качестве сенсоров для определения параметров микроокружения при протекании внутриклеточных процессов. В настоящее время известны флуоресцентные молекулярные роторы нескольких химических классов, однако лишь для единственного соединения было показано сочетание свойств молекулярного ротора и фотосенсибилизатора (Kuimova et al., 2009).

Важнейшим преимуществом тетраарилтетрацианопорфиразинов является простота и мягкость условий синтеза, а также значительно более высокий выход целевых продуктов (Klapshina et al., 2010) по сравнению с описанными в работе (Kuimova et al., 2009) порфириновыми димерами.

Мы предполагаем, что сочетание свойств фотосенсибилизатора и флуоресцентного молекулярного ротора может стать основой для принципиально нового подхода при проведении ФД и ФДТ, при котором функциональное состояние малигнизированных клеток в ходе диагностического исследования, а также при проведении лечения контролируется по изменению времени жизни возбужденного состояния флуорофора.

ВЫВОДЫ:

1. Фотофизические свойства (квантовый выход флуоресценции и время жизни возбужденного состояния) тетраарилтетрацианопорфиразинов существенно зависят от вязкости среды, что может быть объяснено принадлежностью соединений к классу флуоресцентных молекулярных роторов.
2. Тетраарилтетрацианопорфиразины накапливаются в опухолевых клетках и концентрируются в околядерной области и ядерной мембране, что может иметь важное значение для фотодинамической терапии.

3. Разработан светодиодный излучатель для исследования световой активности фотосенсибилизаторов на культуре клеток. Излучатель обеспечивает равномерный световой поток в 96-луночных планшетах с возможностью независимого светового воздействия на индивидуальные группы лунок и прецизионном контроле температурного режима.
4. Показано, что тетра-4-фтор-фенилтетрацианопорфиразин, солюбилизированный в полимерных щетках, способен генерировать синглетный кислород и обладает выраженным фотодинамическим эффектом в отношении опухолевых клеток в культуре, сравнимым с фотодинамическим эффектом клинически одобренных препаратов.
5. Сочетание свойств фотосенсибилизаторов и флуоресцентных молекулярных роторов позволяет осуществлять контроль проведения процесса фотодинамической терапии в живых клетках по изменению времени жизни возбужденного состояния тетраарилтетрацианопорфиразинов.
6. Показано, что тетра-4-фтор-фенилтетрацианопорфиразин, солюбилизированный в полимерных щетках, характеризуется высокой селективностью накопления в опухоли, отношение флуоресцентного сигнала опухоль/мышца и опухоль/кожа через 3 часа после введения достигало 4 и 3 соответственно.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК:

1. Shirmanova M.V., Zagaynova E.V., Sirotkina M.A., Snopova L.B., Balalaeva I.V., Krutova I.V., **Lekanova N.Y.**, Turchin I.V., Orlova A.G., Kleshnin M.S. In vivo study of photosensitizer pharmacokinetics by fluorescence transillumination imaging // Journal of Biomedical Optics. 2010. V. 15, № 4. P. 048004–8.
2. Shirmanova M.V., Balalaeva I.V., Sirotkina M.A., **Lekanova N.Y.**, Turchin I.V., Zagaynova E.V. Study of photosensitizers pharmacokinetics in mouse tumor model by transillumination fluorescence imaging *in vivo* // SPIE Proc. 2011. V. 7886. P. 78860U–8.
3. Ширманова М.В., Балалаева И.В., **Леканова Н.Ю.**, Мысягин С.А., Брилкина А.А., Клапшина Л.Г., Загайнова Е.В. Разработка нового фотосенсибилизатора на основе порфиразинового комплекса иттербия // Биофизика 2011. Т. 56, № 6. С. 1117–1124.
4. **Шилягина Н.Ю.**, Плеханов В.И., Шкунов И.В., Шилягин П.А., Дубасова Л.В., Брилкина А.А., Соколова Е.А., Турчин И.В., Балалаева И.В. Светодиодный излучатель для исследования *in vitro* световой активности препаратов для фотодинамической терапии // Современные технологии в медицине. 2014. Т. 6, № 2. С. 15–24.

Тезисы:

5. Ширманова М.В., **Леканова Н.Ю.**, Сироткина М.А., Клешнин М.С., Крутова И.В. Флуоресцентная визуализация экспериментальных опухолей *in vivo* с использованием фотосенсибилизаторов и полупроводниковых нанокристаллов // Материалы 13-й Нижегородской сессии молодых ученых. 2008. С. 34–35.

6. Ширманова М.В., Сироткина М.А., Балалаева И.В., **Леканова Н.Ю.**, Крутова И.В., Орлова А.Г., Клешнин М.С., Загайнова Е.В. Исследование динамики накопления и выведения фотодитазина на опухолевых моделях методом диффузионной флуоресцентной томографии // Материалы VIII научной сессии «Современное решение актуальных научных проблем в медицине». 2009. С. 106–107.
7. **Леканова Н.Ю.**, Крутова И.В., Ширманова М.В. Возможности метода диффузионной флуоресцентной томографии для прижизненного исследования динамики накопления и выведения фотосенсибилизаторов в экспериментальных опухолях // Материалы 14 международной школы-конференции молодых учёных «Биология — наука XXI века», Пущино. 2010. С. 151–152.
8. **Леканова Н.Ю.**, Лермонтова С.А., Крутова И.В., Ширманова М.В. Металлопорфиразиновые комплексы иттербия как потенциальные фотосенсибилизаторы // Сборник тезисов III Всероссийского с международным участием конгресса студентов и аспирантов биологов «Симбиоз-Россия 2010», Нижний Новгород. 2010. С. 176.
9. **Lekanova N.Y.**, Shirmanova M.V., Klapshina L.G., Zagaynova E.V., Balalaeva I.V. Ytterbium porphyrasine as a potential photosensitizer // Materials of International school for junior scientists and students «Saratov Fall Meeting». 2010. <http://optics.sgu.ru/SFM/2010/report/1168> (дата обращения 13.03.2014).
10. **Lekanova N.Y.**, Shirmanova M.V., Balalaeva I.V., Klapshina L.G., Zagaynova E.V. Biocompatible polymeric nanoparticles doped with ytterbium porphyrasine as potential photosensitizer // Proceedings of International symposium «Topical Problems of Biophotonics – 2011», St. Peterburg – Nizhny Novgorod. 2011. P. 300–301.
11. Klapshina L.G., Douglas W.E., Grigoryev I.S., Ladilina E.Y., Lermontova S.A., Shirmanova M.V., Mysyagin S.A., Balalaeva I.V., **Lekanova N.Y.**, Zagaynova E.V. Novel PEG-organized biocompatible fluorescent nanoparticles doped with an ytterbium cyanoporphyrasine complex for biophotonic application // Proceedings of International symposium «Topical Problems of Biophotonics — 2011», St. Peterburg — Nizhny Novgorod. 2011. P. 294–295.
12. Balalaeva I.V., Malekhanova E.A., **Lekanova N.Y.**, Krutova I.V., Brilkina A.A., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. Fluorescence imaging studies of anti-HER2/neu immunotoxin antineoplastic activity // Book of abstracts of the 14-th Congress of the European Society for Photobiology, Geneva, Switzerland. 2011. P. 50.
13. Shirmanova M.V., Balalaeva I.V., **Lekanova N.Y.**, Klapshina L.G., Brilkina A.A., Zagaynova E.V. Study of ytterbium cyanoporphyrasine complex as a potential photosensitizer for fluorescence diagnostics and photodynamic therapy of cancer // Book of abstracts of the 14-th Congress of the European Society for Photobiology, Geneva, Switzerland. 2011. P. 123–124.
14. **Леканова Н.Ю.**, Балалаева И.В., Клапшина Л.Г., Лермонтова С.А., Ширманова М.В., Загайнова Е.В. Оценка фармакокинетических параметров фотосенсибилизаторов методом просветного флуоресцентного имиджинга на примере порфиразинового комплекса иттербия // Материалы 15 международной школы-конференции «Биология — наука XXI века», Пущино. 2011. С. 172.
15. Малеханова Е.А., **Леканова Н.Ю.**, Балалаева И.В., Крутова И.В., Деев С.М. Оценка эффективности противоопухолевых препаратов на модели флуоресцирующей опухоли // Материалы 15 международной школы-конференции молодых учёных «Биология — наука XXI века», Пущино. 2011. С. 193.

16. Клапшина Л.Г., Григорьев И.С., Ладилина Е.Ю., Ширманова М.В., **Леканова Н.Ю.**, Лермонтова С.А., Балалаева И.В., Мысягин С.А., Загайнова Е.В. Получение биосовместимых светоизлучающих наночастиц, допированных новым люминесцентным порфиразиновым металлокомплексом, для использования в биомедицине // Материалы VI Съезда Российского фотобиологического общества, Шепси, Россия. 2011. С. 165.
17. Ширманова М.В., Балалаева И.В., **Леканова Н.Ю.**, Лермонтова С.А., Клапшина Л.Г., Загайнова Е.В. Биосовместимые полимерные наночастицы, допированные порфиразином иттербия, как потенциальные фотосенсибилизаторы // Материалы конференции «Современное решение актуальных научных проблем в медицине». Медицинский альманах. 2011, спецвыпуск. С. 216–217.
18. Malekhanova E.A., **Lekanova N.Y.**, Krutova I.V., Balalaeva I.V., Deyev S.M. Experimental model for fluorescent imaging of tumor growth and regression under therapeutic treatment // Materials of International school for junior scientists and students «Saratov Fall Meeting». 2011. <http://sfm.eventry.org/report/116> (дата обращения 13.03.2014).
19. **Леканова Н.Ю.**, Балалаева И.В., Клапшина Л.Г., Лермонтова С.А., Мысягин С.А., Ширманова М.В. Исследование фотобиологических свойств потенциальных фотосенсибилизаторов на основе порфиразиновых комплексов // Материалы IV Съезда биофизиков России, Симпозиум III «Физика — медицине и экологии», Нижний Новгород. 2012. С. 140.
20. Балалаева И.В., **Леканова Н.Ю.**, Малеханова Е.А., Ширманова М.В., Здобнова Т.А., Брилкина А.А., Клапшина Л.Г., Клешнин М.С., Фикс И.И., Загайнова Е.В., Турчин И.В., Деев С.М. Методы флуоресцентного имиджинга на уровне целого организма для решения задач экспериментальной онкологии // Материалы IV Съезда биофизиков России, Симпозиум III «Физика — медицине и экологии», Нижний Новгород. 2012. С. 21.
21. **Леканова Н.Ю.**, Балалаева И.В., Малеханова Е.А., Ширманова М.В., Клапшина Л.Г. Оценка фармакокинетики фотосенсибилизаторов методом просветного флуоресцентного имиджинга *in vivo* // Тезисы докладов XIX Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов», Москва. 2012. С. 304.
22. **Леканова Н.Ю.**, Балалаева И.В., Клапшина Л.Г., Лермонтова С.А., Ширманова М.В., Мысягин С.А. Оценка флуоресцентных и функциональных свойств потенциальных фотосенсибилизаторов на основе полимерных наночастиц, допированных порфиразином иттербия // Материалы V Троицкой конференции «Медицинская физика и инновации в медицине». 2012. Т. 2. С. 22–24.
23. **Леканова Н.Ю.**, Балалаева И.В., Клапшина Л.Г., Лермонтова С.А., Ширманова М.В. Разработка нового препарата для фотодинамической терапии и флуоресцентной диагностики на основе биосовместимых полимерных наночастиц, допированных порфиразином иттербия // Материалы конференции «Современное решение актуальных научных проблем в медицине». Российский биотерапевтический журнал. 2012. Т. 11, № 2. С. 33.
24. **Леканова Н.Ю.**, Балалаева И.В., Клапшина Л.Г., Лермонтова С.А., Сайфуллаева М.А., Ширманова М.В. Разработка нового фотосенсибилизатора на основе биосовместимых полимерных наночастиц, допированных порфиразином иттербия // Материалы конференции «Отечественные противоопухолевые препараты». Онкохирургия. 2012. Т 4, № 1. С. 88.

25. Klapshina L.G., Kuimova M.K., Balalaeva I.V., Yakimansky A.V., Izquierdo M.A., Lermontova S.A., **Lekanova N.Y.**, Grigoryev I.S., Meleshko T.K., Shirmanova M.V., Zagaynova E.V. Novel fluorescent porphyrazine macrocycles as functional viscosity probes in live cells // Proceedings of International Symposium «Topical Problems of Biophotonics — 2013». P. 160–161.
26. **Lekanova N.Y.**, Sayfullaeva M.A., Balalaeva I.V., Shirmanova M.V., Zagaynova E.V., Klapshina L.G., Lermontova S.A., Yakimansky A.V. Study of novel photosensitizers based on the cyanoporphyrazine chromophors incorporated into biocompatible polymeric brush nanoparticles // Proceedings of International Symposium «Topical Problems of Biophotonics — 2013». P. 194–195.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

МЦ — метилцеллюлоза

ПЩ — полиимид-графт-поли-*t*-бутилметакрилат, или полимерные щетки

ПЭГ — полиэтиленгликоль

ФД — флуоресцентная диагностика

ФДТ — фотодинамическая терапия

AlgNa — альгинат натрия

FLIM — fluorescence-lifetime imaging microscopy, время-разрешенная флуоресцентная микроскопия

GFP — green fluorescent protein, зеленый флуоресцентный белок

Pz(I) — тетра-4-фтор-фенилтетрацианопорфиразин

Pz(II) — тетрафенилтетрацианопорфиразин

TagGFP2 — мономерная мутантная форма зеленого флуоресцентного белка

YbPz(I) — тетра-4-фтор-фенилтетрацианопорфиразиновый комплекс иттербия

YbPz(II) — тетрафенилтетрацианопорфиразиновый комплекс иттербия

λ_{ex} — длина волны возбуждения

λ_{em} — диапазон регистрации флуоресценции