

СВЕНСКАЯ ЮЛИЯ ИГОРЕВНА

**УПРАВЛЯЕМОЕ ВЫСВОБОЖДЕНИЕ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА
«ФОТОСЕНС», ИММОБИЛИЗОВАННОГО В ЧАСТИЦЫ КАРБОНАТА
КАЛЬЦИЯ, ДЛЯ РАЗРУШЕНИЯ ОПУХОЛЕВОЙ ТКАНИ**

03.01.02 – Биофизика

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени кандидата
физико-математических наук

Саратов
2013

Работа выполнена на кафедре физики полупроводников
факультета нано- и биомедицинских технологий
ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени
Н.Г. Чернышевского»

Научный руководитель:

доктор химических наук, доцент
Горин Дмитрий Александрович

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, ведущий научный
сотрудник лаборатории нанобиотехнологии
ФГБУН ИБФРМ РАН
Богатырев Владимир Александрович

кандидат химических наук, научный сотрудник
лаборатории биоорганических структур
ФГБУН Институт кристаллографии
им. А.В. Шубникова РАН
Бородина Татьяна Николаевна

Ведущая организация:

ФГБОУ ВПО «Оренбургский Государственный
Университет»

Защита диссертации состоится 19 декабря 2013 года в 15 часов 30 мин
на заседании диссертационного совета Д 212.243.05, созданного на базе
ФГБОУ ВПО «Саратовский государственный университет имени
Н.Г. Чернышевского», по адресу: 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке ФГБОУ ВПО
«Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

Автореферат разослан

« » _____ 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
д. ф.-м. н., профессор



Дербов Владимир Леонардович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. В настоящее время в клинической практике широкое распространение получил такой метод лечения онкологических заболеваний, как фотодинамическая терапия (ФДТ). В его основе лежит разрушение опухолевой ткани под действием синглетного кислорода и высокоактивных свободных радикалов, образующихся при поглощении света определенной длины волны молекулами фотосенсибилизатора (ФС), предварительно введенного в организм. Однако для большинства применяемых на данный момент препаратов существует проблема фотосенсибилизации здоровых тканей организма. Кроме того, для достижения необходимых концентраций в опухолевых тканях требуется введение в организм больших доз ФС, являющихся токсичными. В связи с этим, ведется поиск средств инкапсуляции ФС, применяемых в ФДТ, с целью их последующего высвобождения в пораженной области. К настоящему моменту для решения этой задачи были предложены липосомы [1], мицеллы [2], наночастицы диоксида кремния [3] и фосфата кальция [4], а также полимерные [5] и золотые [6] наночастицы.

Большой интерес для иммобилизации биологически активных веществ представляют микрочастицы карбоната кальция (CaCO_3). В природе карбонат кальция может находиться в виде одной из трех полиморфных модификаций: ватерита, арагонита или кальцита. Частицы ватерита могут быть применены в качестве контейнеров для инкапсуляции ФС, поскольку обладают пористой структурой с диаметром пор от 20 до 60 нм и рядом таких достоинств, как биосовместимость, мягкие условия разрушения (растворение при $\text{pH} \leq 5.5$), простота приготовления и низкая себестоимость [7]. Изменение параметров (температуры, скорости перемешивания реакционной смеси, концентрации исходных реагентов и др.) при синтезе таких частиц позволяет варьировать форму и размер получаемых микрообъектов. Путем изменения значения pH среды можно добиться растворения частиц карбоната кальция, что обеспечит высвобождение иммобилизованного в них препарата.

Известны работы, свидетельствующие об усилении цитотоксичности различных противораковых веществ при локальном ультразвуковом воздействии. Данный эффект лег в основу сонодинамической терапии раковых опухолей (СДТ). Особый интерес представляют экспериментальные данные о наличии синергетического эффекта при проведении комбинированной ФДТ и СДТ [8]. Интересным направлением в СДТ раковых опухолей является также применение твердофазных неоднородностей (нано- и микрочастиц), играющих роль концентраторов энергии ультразвука. Терапевтический эффект при действии ультразвука на биосистемы, модифицированные агрегатами наночастиц, достигается за счет дополнительного выделения акустической энергии в областях их

локализации [9]. В связи с этим, актуально исследование воздействия УЗ-излучения на пористые CaCO_3 -контейнеры, содержащие ФС, а также изучение эффекта, возникающего в опухолевой ткани при совместном применении ультразвукового и светового излучения в присутствии таких микроконтейнеров.

Целью диссертационной работы явилась иммобилизация фотосенсибилизатора «Фотосенс» в пористые микроразмерные и субмикронные частицы карбоната кальция, его высвобождение путем понижения значения pH дисперсионной среды и с помощью ультразвукового воздействия, а также изучение разрушающего эффекта при использовании такой системы на опухолевую ткань.

Для достижения данной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

- исследовать влияние физико-химических параметров синтеза, таких, как способ перемешивания системы и состав дисперсионной среды, на размер формируемых частиц карбоната кальция;
- оценить эффективность инкапсуляции фотосенсибилизатора в пористые частицы карбоната кальция двумя способами: адсорбцией на поверхность частиц и совместным осаждением в процессе их формирования;
- исследовать влияние значения pH дисперсионной среды на высвобождение фотосенсибилизатора, иммобилизованного в микроразмерные и субмикронные ватеритные контейнеры;
- изучить влияние интенсивности терапевтического ультразвукового излучения на выход фотосенсибилизатора, иммобилизованного в ватеритные микроконтейнеры;
- оценить эффект комбинированного ультразвукового и светового воздействия на морфологию клеток перевитых опухолей крыс штамма РС-1 в присутствии микроконтейнеров на основе частиц карбоната кальция, содержащих фотосенсибилизатор;
- изучить влияние длительности ультразвуковой обработки на электропроводность суспензии, содержащей частицы карбоната кальция, модифицированные наночастицами серебра.

Научная новизна работы

1. Показана возможность формирования нагруженных фотосенсибилизатором «Фотосенс» частиц карбоната кальция в полиморфной форме ватерита размером 0.9 ± 0.1 мкм при применении ультразвука (1 Вт/см^2 , 20 кГц) для перемешивания реакционной среды.
2. Изучена зависимость массы высвобожденного из микроразмерных и субмикронных CaCO_3 -контейнеров фотосенсибилизатора от значения pH дисперсионной среды, которое варьировалось в диапазоне от 4.5 до 6.5.

3. Продемонстрирован повреждающий эффект комбинированного ультразвукового и светового воздействия *in vivo* на перевитые опухоли печени крыс штамма РС-1 при использовании CaCO_3 -микрочтейнеров, содержащих фотосенсибилизатор «Фотосенс».

Практическая значимость работы

Созданы микроразмерные и субмикронные контейнеры на основе частиц ватерита, содержащие фотосенсибилизатор «Фотосенс», чувствительные к изменению рН дисперсионной среды и ультразвуковому излучению, предлагаемые для применения в противораковой терапии в качестве носителей фотодинамического красителя с возможностью его управляемого высвобождения.

Результаты работы создают основу для разработки методики терапии онкологических заболеваний за счет комбинированного ультразвукового и светового воздействия в присутствии CaCO_3 -контейнеров, нагруженных фотосенсибилизатором «Фотосенс».

Полученные зависимости электропроводности суспензии, содержащей частицы карбоната кальция, в том числе модифицированные наночастицами серебра, от времени ультразвукового воздействия известной мощности могут быть использованы для определения поглощенной дозы ультразвукового излучения в биоткани.

Достоверность полученных результатов подтверждается применением научного оборудования, которое верифицируется в соответствии с международными стандартами обеспечения единства измерений и единообразием средств измерений.

Основные положения и результаты, выносимы на защиту:

1. Высвобождение фотосенсибилизатора «Фотосенс» из контейнеров на основе частиц ватерита обеспечивается в процессе их растворения, в том числе в процессе перехода ватерит-кальцит, при диспергировании их в воде или ацетатных буферах. При этом скорость высвобождения фотосенсибилизатора увеличивается при снижении рН среды и зависит от размера контейнеров.
2. Комбинированное ультразвуковое (выше порога кавитации) и световое (в области эффективного поглощения фотосенсибилизатора) воздействие на перевитые опухоли печени крыс штамма РС-1 при использовании микрочтейнеров на основе частиц карбоната кальция, содержащих фотосенсибилизатор «Фотосенс», приводит к повреждающему эффекту в виде дистрофических изменений опухолевых клеток и обширных очагов некроза.
3. Ультразвуковое облучение водной суспензии, содержащей частицы карбоната кальция, увеличивает значение ее электропроводности, величина изменения определяется модификацией (ватерит, кальцит) и размером частиц, а также наличием включений наночастиц серебра.

Апробация работы

Основные результаты работы были представлены на 3-й Международной школе-семинаре «Nanoparticles, nanostructured coatings and microcontainers: technology, properties, applications» (Турция, устный доклад, май 2011); в ходе работы 1-й Немецко-русской недели молодого ученого «Человек и энергия» (Казань, устный доклад, сентябрь 2011); в работе 15-й Международной школы для студентов и молодых учёных по оптике, лазерной физике и биофотонике «Saratov Fall Meeting 2011» в конкурсе «У.М.Н.И.К.» (Саратов, устный доклад, сентябрь 2011); на конференции «Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине-2011» (Саратов, устный доклад, октябрь 2011); в ходе конкурса «УМНИК-Сколковец», проводимого кластером биомедицинских технологий инновационного центра «Сколково» (Москва, устный доклад, декабрь 2011, по результатам выступления присвоен статус «УМНИК-Сколковец»); в ходе работы 7-го Саратовского салона изобретений, инноваций и инвестиций (Саратов, устный доклад, март 2012); на Русско-германской конференции «Fundamentals and applications of nanoscience» (Германия, устный доклад, май 2012); в работе 16-й Международной школы для студентов и молодых учёных по оптике, лазерной физике и биофотонике «Saratov Fall Meeting 2012» (Саратов, постер, сентябрь 2012); на 2-м Международном семинаре «Smart nanocomposite scaffold for tissue engineering» (Саратов, устный доклад, сентябрь 2012), в ходе симпозиума по оптике и биофотонике в рамках «Saratov Fall Meeting 2013» (Саратов, устный доклад, сентябрь 2013), а также на научных семинарах кафедры физики полупроводников Саратовского государственного университета (СГУ) им. Н.Г. Чернышевского в течение всего периода обучения в аспирантуре.

Гранты

Исследования, представленные в диссертации, выполнены при финансовой поддержке следующих проектов: «Создание структур ядро-оболочка для капсуляции фотодинамических красителей» в рамках программы «У.М.Н.И.К.» (НИОКР № 01201265349, ГК № 9928p/14246) (2012-2013 гг.); стажировка в рамках программы «Erasmus Mundus Action 2 «Multic» европейского фонда Erasmus Mundus в г. Тренто (индивидуальный грант № ЕМА 2 MULTIC 11 – 804) (2012 /2013 гг.); стажировка в Макс Планк Институте коллоидов и границ раздела фаз (Потсдам/Гольм, Германия) в рамках Программы развития Национального исследовательского Саратовского государственного университета (2011); стажировка в Центре биотехнологии Трентского университета (г. Тренто, Италия) в рамках Программы развития Национального исследовательского Саратовского государственного университета (2012); грант РФФИ № 12-03-33088 мол_а_вед.

Личный вклад диссертанта состоит в самостоятельном выполнении представленных в диссертации экспериментальных исследований и расчетов.

Постановка задач исследования и обсуждение результатов проведены под руководством профессора Д.А. Горина. Отработка методики синтеза субмикронных частиц карбоната кальция, а также планирование и анализ результатов эксперимента по изучению влияния рН дисперсионной среды на выход иммобилизованного в ватеритные контейнеры вещества проводились совместно с сотрудниками Центра биотехнологии Трентского Университета (Италия) к.ф.-м.н. Б.В. Парахонским и профессорами Ренцо Антолини и Альбрехтом Хаазе. Изучение комбинированного УЗ и светового воздействия на перевитые опухоли печени крыс в присутствии нагруженных микроконтейнеров осуществлялось совместно с профессором базовой кафедры биофизики факультета нелинейных процессов СГУ, д.б.н. Г.С. Терентюком и сотрудниками Саратовского НИИ фундаментальной и клинической уронефрологии в лице директора института, д.м.н. Г.Н. Масляковой, руководителя НОЦ фундаментальной медицины и нанотехнологий, к.м.н. А.Б. Бучарской и н.с. центра Н.А. Наволокина.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 8 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах перечня, рекомендованного ВАК.

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав, заключения, списка литературы, включающего 257 источников, и двух приложений. Общий объем диссертации составляет 113 страниц, включая 48 рисунков и 6 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы исследования, освещена научная новизна работы и ее практическая значимость, сформулированы цель и задачи исследования.

В первой главе представлен аналитический обзор литературы по теме диссертации. В нем описываются физико-химические механизмы и принцип фотодинамической терапии, приводится классификация и основные особенности различных фотосенсибилизаторов. Рассматриваются различные способы инкапсуляции и осуществления адресной доставки биологически активных веществ, в частности фотосенсибилизаторов. Описываются методы синтеза и физико-химические свойства частиц карбоната кальция, анализируется их применимость в качестве контейнеров, локализирующих фотосенсибилизатор; рассматривается взаимосвязь высвобождения биологически активных веществ из частиц ватерита с процессами их растворения и перекристаллизации. Обсуждается принцип сонодинамической терапии онкологических заболеваний, а также рассматриваются особенности применения ультразвука в онкологии.

Во второй главе описываются использованные материалы, методы исследования, характеристики оборудования и методики подготовки образцов, приводятся математические методы обработки данных и статистической оценки.

Формирование CaCO_3 -микрочастиц осуществлялось по стандартной методике [10] (методика *МС1*), где для перемешивания реакционной смеси используется ротор магнитной мешалки, а также по модифицированной методике, отличающейся тем, что перемешивание производится с помощью ультразвука с частотой 20 кГц при интенсивности 1 Вт/см^2 (методика *МС2*).

Формирование субмикронных частиц CaCO_3 проводилось по методике *МС1* с добавлением этиленгликоля в реакционную среду (методика *МС3*).

Для нагрузки частиц использовался фотосенсибилизатор (ФС) «Фотосенс» (ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», Россия) в виде водного раствора, предоставленный заведующим лабораторией ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», д.х.н., профессором Е.А. Лукьянцом. Препарат представляет собой смесь натриевых солей ди-, три- и тетрасульфофталоцианина гидроксиалюминия со средней степенью сульфирования ~ 3 . ФС имеет максимум поглощения на длине волны 675 нм и активируется, как правило, источником лазерного излучения с плотностью энергии $50\text{--}300 \text{ Дж/см}^2$ при плотности мощности $100\text{--}300 \text{ мВт/см}^2$. Структурная формула и спектр поглощения ФС «Фотосенс» приведены на рисунке 1. Препарат является эффективным как для диагностики, так и для терапии опухолей губы, глотки, гортани, языка, легких, пищевода и желудка.

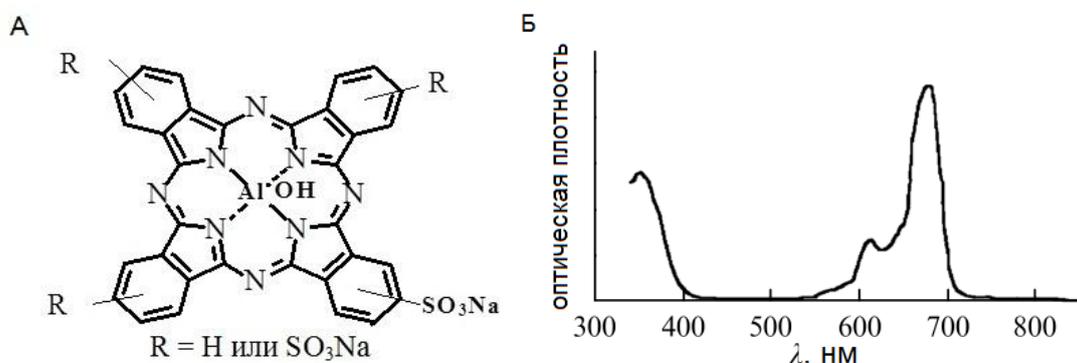


Рисунок 1. Структурная формула (А) и спектр поглощения (Б) «Фотосенса»

Иммобилизация ФС в CaCO_3 -контейнеры осуществлялась путем его адсорбции (*МИ1*) на поверхность частиц, а также путем совместного осаждения CaCO_3 -частицами в процессе их синтеза (*МИ2*). Адсорбция производилась из раствора «Фотосенса» с концентрацией 0.5 мг/мл. Формирование микроконтейнеров путем соосаждения осуществлялось по методике *МС2*, с тем отличием, что синтез проводился в среде раствора «Фотосенса» с концентрацией 2 мг/мл.

Основными методами исследования являлись сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), спектрофотометрия, спектрофлуориметрия, рентгеновская

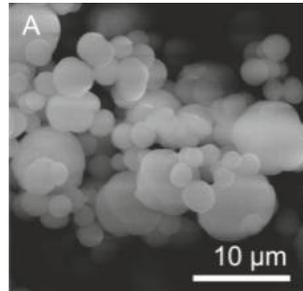
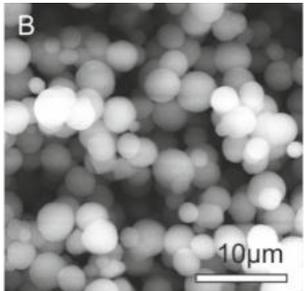
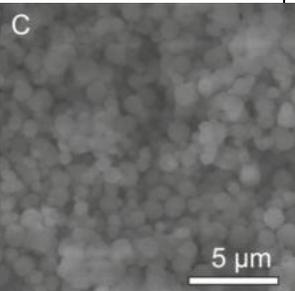
дифрактометрия, флуоресцентная двухфотонная сканирующая микроскопия, кондуктометрия и гистологический анализ.

Третья глава содержит результаты экспериментов по формированию CaCO_3 -контейнеров на основе частиц ватерита, содержащих фотосенсибилизатор «Фотосенс». Описан процесс оптимизации методик синтеза микроразмерных и субмикронных частиц ватерита и иммобилизации в них фотосенсибилизатора. Основными задачами оптимизации являлись уменьшение размера формирующихся контейнеров и увеличение эффективности их загрузки.

Синтез микроразмерных частиц карбоната кальция

На первом этапе было исследовано влияние способа перемешивания реакционной смеси на размер формируемых частиц карбоната кальция. Синтез осуществлялся тремя способами: 1) без перемешивания реагентов; 2) при механическом перемешивании с помощью магнитной мешалки (методика *MC1*); 3) при перемешивании с помощью ультразвука (методика *MC2*). Результаты эксперимента представлены в *таблице 1*.

Таблица 1. Размер и СЭМ-изображения микрочастиц карбоната кальция в зависимости от способа перемешивания

Вид перемешивания	--	с помощью магн.мешалки (<i>MC1</i>)	с помощью ультразвука (<i>MC2</i>)
Размер частиц, мкм	4 ± 2	3 ± 1	0.9 ± 0.1
СЭМ-изображения частиц			

Отсутствие перемешивания реакционной смеси приводит к формированию полидисперсных микрочастиц карбоната кальция диаметром 4 ± 2 мкм. Такой разброс размера объясняется неравномерностью протекания процессов зародышеобразования и роста частиц в объеме смеси. Кроме того, при отсутствии перемешивания процесс поликристаллического роста преобладает над процессом зародышеобразования, что приводит к формированию крупных микрочастиц CaCO_3 . Перемешивание с помощью магнитной мешалки гомогенизирует реакционную смесь и распределяет центры нуклеации более однородно, «выравнивая» процесс роста частиц. В результате формируются частицы диаметром 3 ± 1 мкм. Полидисперсность такой системы все же является выраженной. Чем быстрее оба

раствора будут гомогенно распределены в рабочем объеме, тем большее число центров нуклеации будет сформировано, и, следовательно, тем большим будет количество растущих микрочастиц CaCO_3 и меньшим их средний размер. Гомогенизация реакционной смеси ультразвуком позволила существенно уменьшить размер формирующихся частиц и уменьшить его разброс (0.9 ± 0.1 мкм). УЗ активно перемешивает среду и обеспечивает преобладание процесса зародышеобразования над процессом роста частиц.

Таким образом, УЗ-воздействие на реакционную смесь в процессе синтеза частиц карбоната кальция (методика МС2) позволяет уменьшить размер формируемых частиц и степень полидисперсности.

Полученные таким методом микрочастицы CaCO_3 были исследованы с помощью рентгеновской дифрактометрии. Анализ пиков на дифрактограмме с помощью программы «Crystal Impact Match» показал, что полученные сферолиты представляют собой микрочастицы ватерита.

Синтез субмикронных частиц карбоната кальция

Синтез субмикронных частиц карбоната кальция осуществлялся по методике МС3. Исследовалось влияние концентрации этиленгликоля (ЭГ) в дисперсионной среде при синтезе на размер формирующихся частиц. Концентрация ЭГ варьировалась от 0 до 83% от общего реакционного объема: выбирались соотношения объема каждой из солей (хлорида кальция и карбоната натрия, в мл) к объему ЭГ (в мл) ряда 12:0, 10:2, 8:4, 6:6, 4:8 и 2:10. Образцы исследовались методом СЭМ, результаты отражены на графике (рисунок 2).

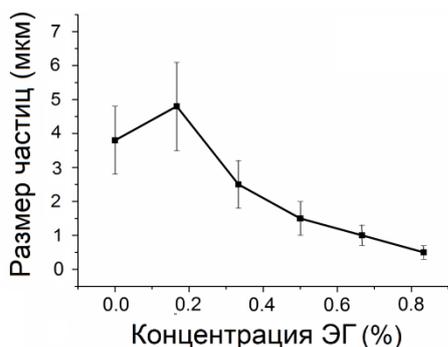


Рисунок 2. Зависимость размера субмикронных частиц от концентрации этиленгликоля

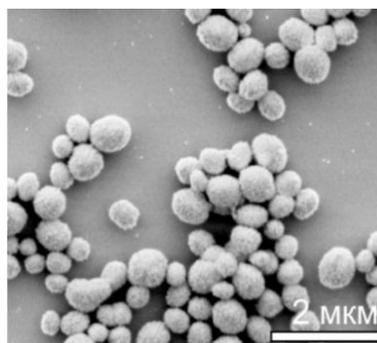


Рисунок 3. СЭМ-изображение субмикронных частиц CaCO_3

Установлено, что увеличение концентрации ЭГ в дисперсионной среде приводит к уменьшению диаметра формируемых частиц. Это связано с тем, что ЭГ увеличивает вязкость среды и, следовательно, замедляет диффузию ионов в растворе. Наименьшим размером обладают частицы, формируемые в среде с 83% этиленгликоля (0.6 ± 0.1 мкм). СЭМ-изображение таких частиц приведено на

рисунке 3. Анализ методом рентгеновской дифрактометрии показал, что полученные сферолиты представляют собой частицы ватерита.

Иммобилизация фотосенсибилизатора «Фотосенс» в микро-размерные и субмикронные CaCO_3 -контейнеры

Инкапсуляция ФС «Фотосенс» в CaCO_3 -контейнеры осуществлялась путем его адсорбции (методика *МИ1*) и соосаждения (методика *МИ2*).

Адсорбция ФС на поверхность пористых микро-размерных (4 ± 1 мкм) и субмикронных (0.6 ± 0.1 мкм) частиц карбоната кальция осуществлялась в течение 1 часа по методике *МИ1* (синтез микро-частиц производился по методике *МС1*,

синтез субмикронных частиц – по методике *МС3*).

СЭМ-изображения и изображения, полученные с помощью флуоресцентной двухфотонной микроскопии приведены на рисунке 4.

Микрофотографии 4А и 4Б доказывают, что после адсорбции ФС частицы сохраняют сферическую форму. Флуоресцентный сигнал на рисунках 4В и 4Г показывает, что контейнеры обоих типов были успешно загружены «Фотосенсом» с сохранением его флуоресцентных свойств.

Был проведен статистический расчет массы «Фотосенса» в микро-размерных и субмикронных контейнерах. Концентрация ФС определялась спектрофлуориметрическим методом. В результате было установлено, что

эффективность загрузки по массе субмикронных частиц карбоната кальция (отношение массы инкапсулированного красителя к массе ненагруженных контейнеров) составила $1.4\pm 0.4\%$, а для микро-размерных частиц – $0.9\pm 0.2\%$.

Путем **совместного осаждения** «Фотосенса» с частицами CaCO_3 осуществлялась его инкапсуляция в микро-частицы карбоната кальция, формируемые по технологии УЗ-перемешивания (методика *МИ2*). Размер полученных контейнеров составил 0.9 ± 0.1 мкм, их СЭМ-изображение приведено на рисунке 5.

Эффективность загрузки микроконтейнеров ФС,

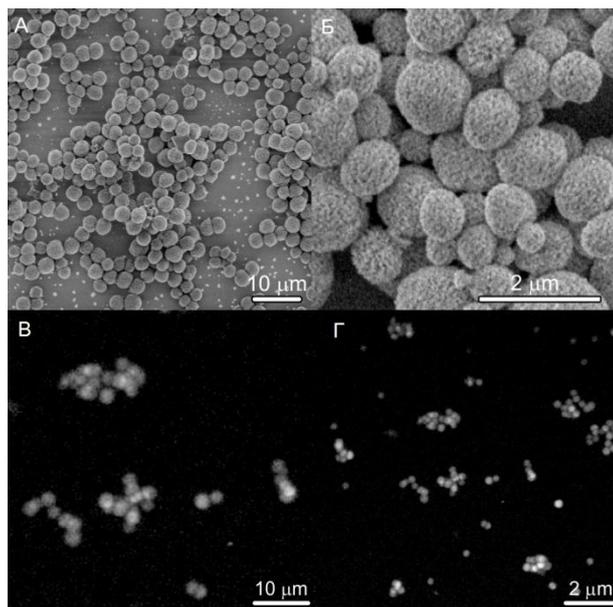


Рисунок 4. СЭМ-изображения (А, Б) и флуоресцентные микрофотографии, полученные методом двухфотонной микроскопии (В, Г), CaCO_3 -контейнеров микро-размерного (А, В) и субмикронного (Б, Г) размера

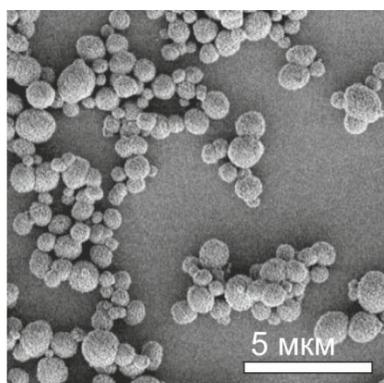


Рисунок 5. СЭМ-изображение микро-контейнеров, полученных методом *МИ2*

оцениваемая спектрофотометрическим методом, в данном случае составила $2.0 \pm 0.2\%$ по массе.

Таким образом, установлено, что путем соосаждения можно инкапсулировать большее количество ФС, чем путем его адсорбции. Однако формирование таких контейнеров осуществляется в присутствии водного раствора «Фотосенса» в реакционной среде. Синтез субмикронных контейнеров таким методом затруднен, поскольку требует проведения в вязкой среде. В связи с этим, выбор методики формирования контейнеров определяется тем, что приоритетнее в рамках определенной задачи: размер контейнеров (методика *МС3* в сочетании с *МИ1*) или концентрация иммобилизованного в них фотосенсибилизатора (методика *МИ2*).

В четвертой главе приводятся результаты исследования процесса высвобождения фотосенсибилизатора из микроразмерных и субмикронных контейнеров при таких внешних воздействиях, как изменение величины рН дисперсионной среды (от 4.5 до 6.5) и обработка низкоинтенсивным терапевтическим ультразвуком ($0.05-1 \text{ Вт/см}^2$, 0.88 МГц); а также исследуется повреждающий эффект комбинированного ультразвукового и светового воздействия на перевитые опухоли печени крыс при использовании нагруженных фотосенсибилизатором «Фотосенс» CaCO_3 -микроразмерных контейнеров.

Исследование влияния величины рН дисперсионной среды на выход фотосенсибилизатора, иммобилизованного в микроразмерные и субмикронные CaCO_3 -контейнеры

Был исследован выход ФС из нагруженных методом адсорбции (*МИ1*) микроразмерных и субмикронных контейнеров, синтезированных методами *МС1* и *МС3*, в ацетатных буферах со значениями рН от 4.5 до 6.5 (с шагом 0.5) и в водном растворе, время экспозиции образцов в жидкости варьировалось от 5 минут до 6 дней. Надосадочная жидкость отбиралась для спектрофлуориметрической оценки концентрации вышедшего ФС, а осадок исследовался методом СЭМ.

Высвобождение заключенного внутри пористых частиц вещества обеспечивается его десорбцией и разрушением/растворением носителя. При инкубации ватеритных контейнеров в водном растворе начинается процесс их растворения: гидратированные ионы Ca^{2+} и CO_3^{2-} покидают поверхность частиц и диффундируют в объем суспензии. Далее они способны снова осаждаться на крупных частицах CaCO_3 , формируя термодинамически стабильные кристаллы кальцита. Процесс перехода ватерита в кальцит сопровождается высвобождением заключенного внутри контейнеров вещества.

В ходе наблюдения были выделены различные состояния карбоната кальция: в виде сферических поликристаллов ватерита (*рисунок 7А*), кубических монокристаллов кальцита (*рисунок 7Б*), а также для ряда образцов наблюдалось растворение частиц ватерита (*рисунок 7В*).

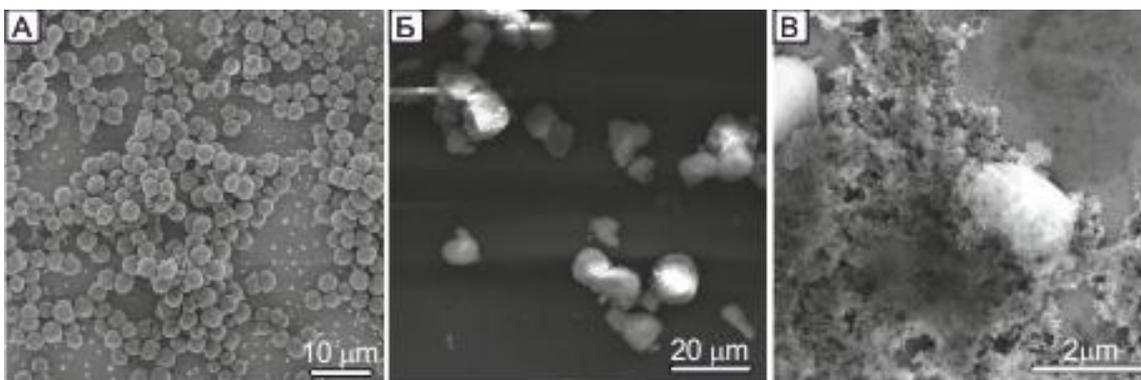


Рисунок 7. СЭМ-изображения микрочастиц карбоната кальция в различных состояниях, полученных в ходе эксперимента: ватерит (А), кальцит (Б) и карбонат кальция в процессе растворения (В)

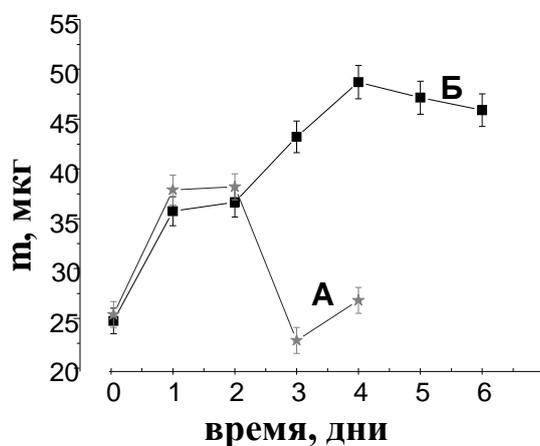


Рисунок 8. Зависимость массы фотосенсибилизатора, вышедшего из микроразмерных (А) и субмикронных (Б) контейнеров, от времени (водный р-р)

Зависимости массы высвобожденного фотосенсибилизатора из микроразмерных (рисунки 8А) и субмикронных (рисунки 8Б) контейнеров от времени инкубации в водном растворе, описывается следующим образом: в начальный момент времени наблюдается увеличение массы вышедшего ФС из контейнеров обоих типов, обусловленное десорбцией молекул красителя с поверхности частиц; далее высвобождение ФС из субмикронных контейнеров (кривая Б) продолжается и его максимальное содержание в растворе отмечается на 4й день инкубации; для микроразмерных контейнеров (кривая А) максимальное высвобождение ФС происходит в течение 2 дней, на 3й день отмечается уменьшение массы вышедшего «Фотосенса». Уменьшение концентрации фотосенсибилизатора в растворе объясняется его адсорбцией на поверхность формируемых в результате ватерит-кальцитного перехода частиц, что подтверждается данными о морфологическом состоянии частиц в характерных точках. Так, для обоих типов загруженных частиц через 24 часа инкубации в водном растворе начинается переход ватеритной фазы в кальцит, полная перекристаллизация для микрочастиц происходит в течение 3 дней, а для субмикронных - в течение 6.

При инкубации микроразмерных контейнеров в буферных растворах со значениями рН=6.5 и 6 выход красителя осуществляется в течение 1 дня. При значении рН=5.5 фотосенсибилизатор выходит в течение 1 часа, так как за это время происходит растворение частиц ватерита. При рН 4.5 и 5 контейнеры растворяются в течение 5 минут.

Для субмикронных контейнеров, диспергированных в ацетатных буферах с рН 4.5-5.5, исчезновение осадка частиц наблюдается в первые 5 минут инкубации. Для значений рН 6 и 6.5 растворение контейнеров происходит в течение 1 часа.

Исследование влияния ультразвукового излучения на выход фотосенсибилизатора, иммобилизованного в CaCO₃-микрочтейнеры

УЗ-воздействию подвергались микрочтейнеры, нагруженные «Фотосенсом» по методике МИ2. Исследовалась возможность разрушения таких микрочтейнеров с целью высвобождения иммобилизованного в них фотосенсибилизатора с помощью аппарата ультразвуковой терапии УЗТ 1.01 Ф. Воздействие осуществлялось в течение 5 минут в непрерывном режиме с частотой 0.880 ± 0.009 МГц при различных интенсивностях излучения (0.05, 0.2, 0.4, 0.7 и 1 Вт/см²).

Целью данного *in-vitro* эксперимента являлся подбор параметров для последующего исследования такой системы *in-vivo*. В связи с этим, в качестве дисперсионных сред для приготовления суспензий микрочтейнеров использовались физиологический раствор и ацетатный буфер со значением рН=5, моделирующий среду в пораженной области, поскольку имеются данные, что рядом с очагами патологических процессов, в частности во внутреннем пространстве солидных опухолей, наблюдается снижение рН до величин 6.5-7.2 [11], при эндоцитозе частиц в клетку и транспортировке в эндосомальный компартмент значение рН снижается до 5.0-6.5, а в лизосомах оно достигает 4.5-5.

При отсутствии воздействия навеска микрочтейнеров с «Фотосенсом» в среде физраствора сохраняла целостность в течение часа наблюдения. УЗ-воздействие с плотностью мощности 0.4 Вт/см² диспергировало микрочтейнеры в среде физраствора, однако часть осадка сохранялась. При такой интенсивности воздействия визуально отмечалось усиление интенсивности окраски раствора. Исчезновение осадка при диспергировании частиц наблюдалось при интенсивности ≥ 0.7 Вт/см².

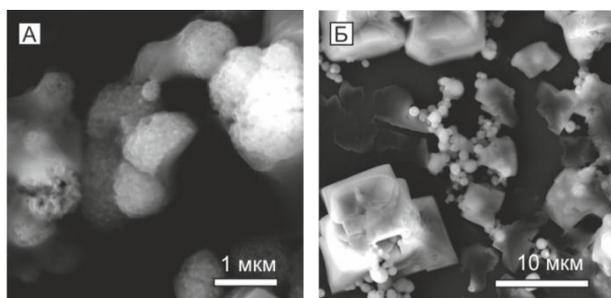


Рисунок 9. СЭМ-изображения микрочтейнеров после 5 мин воздействия с помощью УЗ при интенсивности 1 Вт/см²: фрагменты частиц ватерита (А) и частицы кальцита (Б)

Установлено, что УЗ-воздействие с интенсивностью 1 Вт/см² приводит к разрушению (рисунок 9А) CaCO₃-контейнеров, диспергированных в физрастворе, а также ускоряет процесс ватерит-кальцитного перехода (рисунок 9Б). Оба процесса приводят к высвобождению инкапсулированного ФС.

В буферном растворе при отсутствии УЗ-воздействия происходило растворение микрочтейнеров с выходом

иммобилизованного в них фотосенсибилизатора в течение 5 минут, что согласуется с данными предыдущего раздела. УЗ-воздействие с интенсивностью более 0.2 Вт/см² ускоряло процесс растворения.

О выходе ФС под действием ультразвука во всей серии экспериментов свидетельствовало окрашивание дисперсионной среды, что было подтверждено изменением спектра оптической плотности физраствора и ацетатного буфера, а именно - появлением характерных для «Фотосенса» пиков (608±2 нм и 676±2 нм) у исследованных образцов.

Таким образом, была продемонстрирована возможность разрушения СаСО₃-микроконтейнеров, диспергированных в физрастворе, и высвобождения иммобилизованного в них фотосенсибилизатора при 5-минутном воздействии с помощью терапевтического УЗ с интенсивностью 1 Вт/см² (0.9 МГц), а также было показано, что в подкисленной среде (рН=5) УЗ-воздействие приводит к мгновенному растворению частиц карбоната кальция.

Изучение комбинированного ультразвукового и светового воздействия на перевитые опухоли печени крыс при использовании нагруженных «Фотосенсом» СаСО₃-микроконтейнеров

В эксперименте использовалось 40 самцов белых лабораторных крыс массой 160±20 г, которым имплантировалось подкожно в область лопатки по 0.5 мл 25% опухолевой взвеси клеток альвеолярного рака печени – РС-1, полученного из банка опухолевых штаммов ФГБУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. При достижении опухоли диаметра 1.0±0.3 см животные с перевитыми опухолями методом случайной выборки делились на четыре группы по 10 крыс в каждой (таблица 2).

Таблица 2. Описание опытных групп

№ группы	Описание
1 (контрольная)	без воздействия на опухоль
2	ультразвуковое воздействие на опухоль
3	интратуморальное введение суспензии ненагруженных микроконтейнеров, полученных по методике МС2, ультразвуковое воздействие
4	интратуморальное введение нагруженных ФС микроконтейнеров, полученных по методике МИ2, комбинированное ультразвуковое и световое воздействие

Введение суспензий микроконтейнеров в физрастворе проводилось интратуморально в количестве 30% от объема опухоли. Суспензия вводилась струйно с 2 противоположных точек по направлению к центру опухоли со скоростью 0.1 мл в минуту. Через 15 минут после введения осуществлялось

УЗ-воздействие на опухоль с помощью прибора УЗТ 1.01 Ф в непрерывном режиме в течение 10 минут с интенсивностью 1 Вт/см² (такие параметры воздействия, как было продемонстрировано в ходе *in vitro* эксперимента, обеспечивают разрушение микроконтейнеров, сопровождаемое выходом ФС). Затем через 15 минут после снятия воздействия область облучалась с помощью фототерапевтического излучателя АФС («Полироник») на длине волны 660 нм при плотности мощности излучения 10 мВт/см² в течение 10 минут.

Для оценки патоморфоза опухоли через сутки после воздействия все животные выводились из эксперимента и ткань опухоли забиралась на гистологическое исследование с использованием стандартной окраски гематоксилином и эозином. Производился разрез через середину опухоли перпендикулярно к ее поверхности и иссекался образец ткани толщиной 0.3-0.5 см с площадкой 0.5 см x 0.5 см, из которого после завершения подготовительных процедур (фиксации фрагмента с помощью формалина, проводки и заливки парафином) при помощи микротомы были получены срезы толщиной 5 мкм. Морфометрическое исследование гистологических препаратов проводилось с помощью системы анализа цифровых изображений микровизора медицинского «μVizo-103».

Морфологическое исследование микропрепаратов опухоли показало, что у

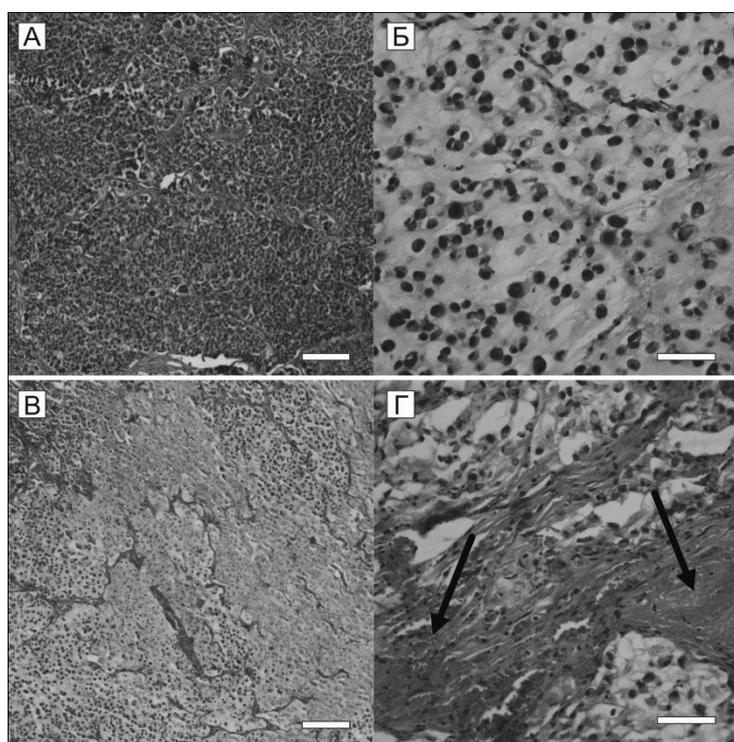


Рисунок 10. Микрофотографии опухолевой ткани крыс 1-й (контрольной) группы (А, Б) и 2-й группы (В, Г) при увеличении x 64 (А, В) и x 246 (Б, Г). Размер шкалы 200 мкм (А, В) и 20 мкм (Б, Г)

крыс в 1-й (контрольной) группе (рисунок 10 А, Б) опухоль имела дольчатое строение, дольки разделялись тонкими прослойками соединительной ткани. Опухолевые клетки имели овально-округлую форму с эксцентрично расположенными ядрами. Значительная часть цитоплазмы была занята крупными вакуолями, содержащими слизь. Были выявлены единичные митозы. Отмечались небольшие очаги некроза (менее 5% общей площади срезов), где наряду с фрагментами разрушенных клеток обнаруживались скопления слизистых масс. Слизистые массы присутствовали также в межклеточных пространствах.

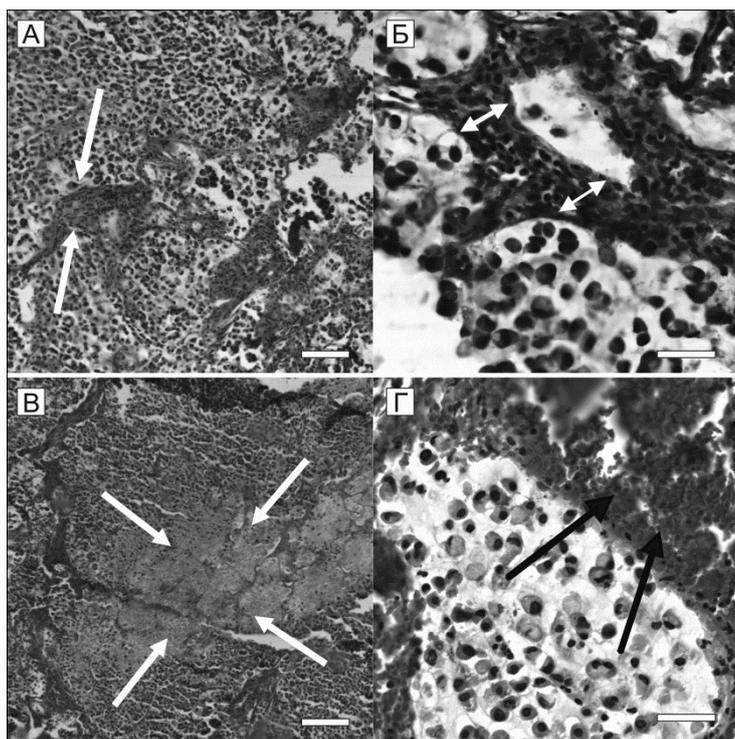


Рисунок 11. Микрофотографии опухолевой ткани крыс 3-й (А, Б) и 4-й группы (В, Г) при увеличении $\times 64$ (А, В) и $\times 246$ (Б, Г). Размер шкалы 200 мкм (А, В) и 20 мкм (Б, Г)

При исследовании гистологических срезов крыс 2-й группы (только УЗ-воздействие) (рисунок 10 В, Г) было установлено, что опухоль сохраняла дольчатое строение. Отмечались небольшие очаги некрозов (5-10% от общей площади срезов), встречались опухолевые клетки с некротическими изменениями. Были выявлены единичные митозы. Сосуды были полнокровными, наблюдалось утолщение соединительнотканых перегородок и инфильтрация их лейкоцитами, присутствовали небольшие очаги кровоизлияний (стрелки на рисунке 10Г).

По данным морфологического исследования, в 3-й группе (УЗ-воздействие с предварительным введением ненагруженных микроконтейнеров) (рисунок 11 А, Б) дольчатость строения опухоли нарушалась, в опухолевой ткани увеличивалась площадь некрозов (10-20% от общей площади срезов), соединительнотканые перегородки местами были утолщены, инфильтрированы лейкоцитами (стрелки на рисунках 11 А, Б).

В 4-й группе (введение нагруженных микроконтейнеров в сочетании с комбинированным УЗ и световым воздействием) дольчатость строения опухоли нарушалась (рисунок 11 В, Г), площадь областей некрозов (стрелки на рисунке 11В) составляла от 40 до 60% площадей срезов, в опухолевых клетках отмечались дистрофические изменения, выявлялись пикнотичные ядра, соединительнотканые перегородки были инфильтрированы лейкоцитами, присутствовали обширные очаги кровоизлияний (стрелки на рисунке 11Г).

Таким образом, патоморфоз рака печени при комбинированном ультразвуковом и световом воздействии при предварительном введении CaCO_3 -микроконтейнеров, содержащих фотосенсибилизатор «Фотосенс», проявлялся в виде дистрофических изменений опухолевых клеток и обширных очагов некроза, свидетельствующих о наличии выраженного повреждающего эффекта.

Глава 5 посвящена изучению влияния ультразвуковой обработки на электропроводность суспензии, содержащей частицы кальцита или ватерита различного размера, в том числе модифицированные наночастицами серебра. Такие

зависимости электропроводности от времени УЗ-воздействия известной интенсивности могут быть использованы для определения поглощенной дозы УЗ-излучения при применении *in-vitro* и *in-vivo*, когда необходимо знать мощность УЗ-воздействия в определенной точке среды. Такая информация может быть полезна при проведении предложенной нами комбинированной ультразвуковой и световой терапии раковых опухолей.

Исследованию подвергались суспензии частиц ватерита микро- и субмикронного размера, синтезированные по методикам *MC1* и *MC3*, а также частицы кальцита, произведенные фирмой «Sigma-Aldrich» (Германия). Размер частиц ватерита составлял 3 ± 1 мкм и 0.6 ± 0.1 мкм (микроразмерный и субмикронный соответственно), частиц кальцита – 12 ± 1 мкм. Площадь поверхности частиц ватерита была оценена с помощью анализатора TriStar (Micrometrics) методом БЭТ (Брунауэра-Эммета-Тейлора) по сорбции азота и составила 22 м²/г для субмикронных частиц и 15.5 м²/г для микроразмерных. Площадь поверхности частиц кальцита была рассчитана, по данным, полученным при анализе СЭМ-изображений, и составила 0.32 м²/г. Изучались зависимости электропроводности суспензий частиц карбоната кальция, в том числе модифицированных наночастицами серебра, от времени при отсутствии воздействия, а также под действием УЗ-излучения. Модификация частиц CaCO₃ наночастицами серебра производилась при помощи реакции «серебряного зеркала». УЗ-воздействие

осуществлялось в течение 1 часа с помощью прибора Vibra-Cell VC-250 (Sonics sonics&materials inc, USA) с частотой 20 кГц и интенсивностью излучения 3.5 Вт/см². Значение электропроводности (σ) измерялось через каждые 10 мин облучения с помощью кондуктометра Cond Level2 (Inolab).

СЭМ-изображения **микрочастиц ватерита**, в том числе после модификации их наночастицами серебра, до и после УЗ-воздействия приведены на *рисунке 12 А-Г*. Зависимости электропроводности суспензии, содержащей такие частицы, от времени при УЗ-обработке и при ее отсутствии изображены на *рисунке 13* (экспериментальные данные получены путем усреднения значений, полученных в результате трех независимых экспериментов).

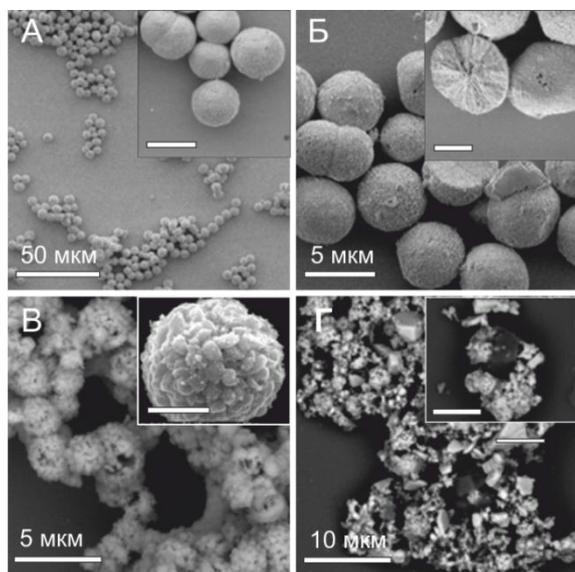


Рисунок 12. СЭМ-изображения микрочастиц ватерита до (А) и после (Б) УЗ-воздействия, а также микрочастиц ватерита, модифицированных наночастицами серебра, до (В) и после (Г) УЗ-воздействия. Масштабный отрезок на вставках составляет 1 мкм

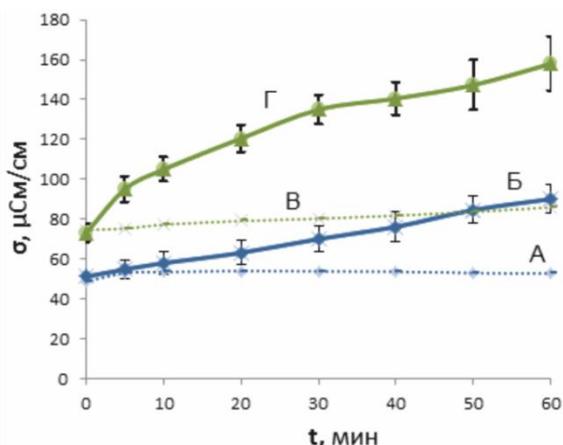


Рисунок 13. Изменение электропроводности суспензии, содержащей микрочастицы ватерита (А, Б), в том числе модифицированные наночастицами серебра (В, Г), без (А, В) и в присутствии УЗ-воздействия (Б, Г)

суспензии, их содержащей, в 1.6 раз (рисунки 13).

При покрытии микроразмерного ватерита наночастицами серебра электропроводность суспензии через 1 час наблюдения увеличивается в 1.7 раз (рисунки 12В и 13В), что обусловлено появлением ионов серебра в растворе. УЗ-воздействие на суспензию таких частиц позволяет увеличить электропроводность системы в 3 раза по сравнению с ее первоначальным состоянием (рисунки 13Г).

Изменение значений электропроводности суспензии частиц в результате покрытия наночастицами серебра и УЗ-воздействия приведены в таблице 3.

Таблица 3. Изменение электропроводности частиц карбоната кальция при УЗ-воздействии и модификации их наночастицами серебра

	σ_0 , мкСм/ см	$\Delta\sigma_1$ (без воздействия через 1 час)	$\Delta\sigma_2$ (влияние УЗ)	$\Delta\sigma_3$ (влияние наночастиц Ag)	$\Delta\sigma_4$ (влияние наночастиц Ag и УЗ)	σ_k , мкСм/ см
микроразмерный ватерит	49±1	1	1.6	1.8	3	150±10
субмикронный ватерит	57±1	1	1.5	1.7	2.7	155±7
кальцит	15±1	1.6	3	3.7	9.3	148±8

СЭМ-изображения субмикронных частиц ватерита, в том числе модифицированных наночастицами серебра, до и после УЗ-воздействия приведены

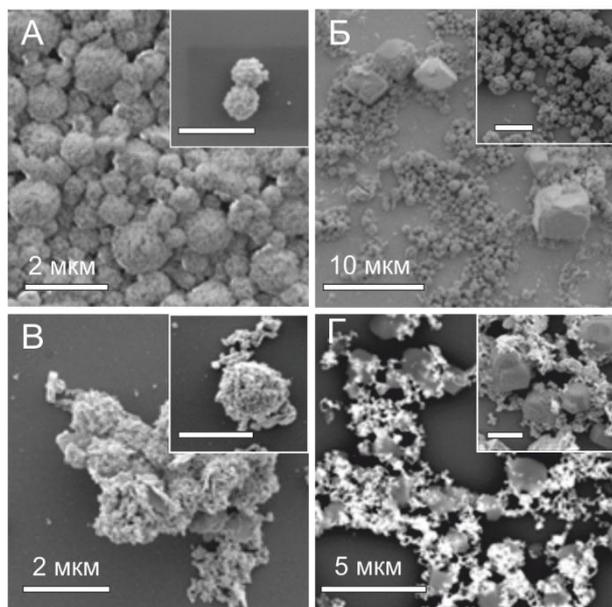


Рисунок 14. СЭМ-изображения субмикронных частиц ватерита до (А) и после (Б) УЗ-воздействия, в том числе модифицированных наночастицами серебра, до (В) и после (Г) УЗ-воздействия. Длина масштабного отрезка на вставках составляет 1 мкм

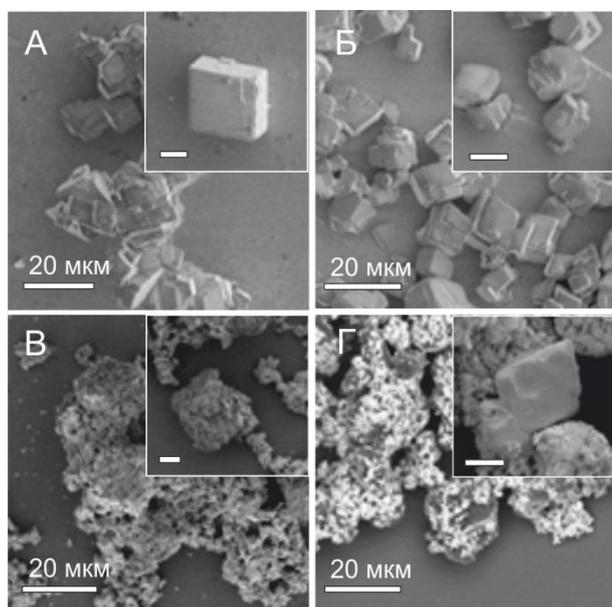


Рисунок 15. СЭМ-изображения частиц кальцита до (А) и после (Б) УЗ-воздействия, а также микрочастиц кальцита, модифицированных наночастицами серебра, до (В) и после (Г) УЗ-воздействия.

Длина масштабного отрезка на вставках составляет 5 мкм

на *рисунке 14 А-Г*. Характер изменения значения электропроводности суспензий, содержащих микроразмерный ватерит и субмикронный ватерит, идентичен (*таблица 3*), поскольку процессы, протекающие в таких системах, одинаковы. УЗ-воздействие ускоряет процесс растворения и связанный с ним процесс перекристаллизации субмикронного ватерита в кальцит (*рисунок 14Б*), что также приводит к увеличению электропроводности суспензии частиц (*таблица 3*). При покрытии субмикронных частиц ватерита наночастицами серебра (*рисунок 14В*) электропроводность суспензии увеличивается в 1.7 раз (*таблица 3*).

Воздействие ультразвука в 2.7 раз увеличивает электропроводность суспензии, содержащей субмикронные частицы ватерита, модифицированные серебром (*таблица 3*).

Частицы кальцита обладают практически на порядок меньшей площадью поверхности по сравнению с частицами ватерита ($0.32 \text{ м}^2/\text{г}$ по сравнению с $15.5 \text{ м}^2/\text{г}$), в связи с этим ионное равновесие в системе достигается после 40 минут инкубации частиц в воде, что приводит к увеличению электропроводности в 1.6 раз (*таблица 3*). Ультразвуковое воздействие разбивает частицы кальцита (*рисунок 15 Б*), увеличивая площадь поверхности твердой фазы, что приводит к росту электропроводности суспензии, содержащей их, в 3 раза (*таблица 3*).

Модификация частиц кальцита наночастицами серебра (*рисунок 16В*) увеличивает электропроводность суспензии, содержащей их, в 3.7 раз (*таблица 3*). Воздействие ультразвука в 9 раз увеличивает электропроводность такой суспензии (*таблица 3*).

Таким образом, УЗ-воздействие увеличивает электропроводность суспензий, содержащих частицы карбоната кальция, а

покрытие их наночастицами серебра позволяет добиться усиления этого эффекта. **В заключении** сформулированы основные результаты и выводы, полученные в ходе диссертационного исследования.

Основные результаты и выводы

1. Применение ультразвука (20 кГц и 1 Вт/см^2) для перемешивания реакционной смеси в процессе синтеза частиц карбоната кальция позволяет уменьшить их размер (до $1.0 \pm 0.1 \text{ мкм}$) по сравнению с механическим перемешиванием ($3 \pm 1 \text{ мкм}$). Анализ данных рентгеновской дифрактометрии показывает, что формируемые частицы соответствуют полиморфной модификации ватерита.
2. Добавление этиленгликоля в реакционную смесь при синтезе частиц карбоната кальция обеспечивает уменьшение размера формируемых частиц, причем с увеличением его концентрации в среде размер частиц уменьшается. Проведение синтеза в среде с 83% этиленгликоля позволяет получать ватеритные контейнеры размером $0.6 \pm 0.1 \text{ мкм}$.
3. Метод адсорбции фотосенсибилизатора из раствора на готовые частицы карбоната кальция позволяет формировать микроразмерные и субмикронные CaCO_3 -контейнеры, содержащие фотосенсибилизатор «Фотосенс» с эффективностью загрузки $0.9 \pm 0.2\%$ и $1.4 \pm 0.4\%$ по массе соответственно. Методом совместного осаждения фотосенсибилизатора формируются микроконтейнеры, содержащие фотосенсибилизатор «Фотосенс», с эффективностью загрузки $2.0 \pm 0.2 \%$ по массе.
4. Исследована зависимость выхода фотосенсибилизатора из CaCO_3 -контейнеров от их размера и величины pH. Показано, что для микроразмерных частиц высвобождение красителя в водном растворе происходит в течение 3 дней, а для субмикронных – в течение 6 дней. В буферных растворах высвобождение фотосенсибилизатора ускоряется при снижении pH и уменьшении размера контейнеров.
5. Ультразвуковое излучение низкой интенсивности (1 Вт/см^2 , 0.9 МГц) частично разрушает CaCO_3 -микроконтейнеры размером $0.9 \pm 0.1 \text{ мкм}$, а также ускоряет процесс ватерит-кальцитного перехода, обеспечивая выход инкапсулированного фотосенсибилизатора.
6. Комбинированное ультразвуковое (1 Вт/см^2 , 0.9 МГц) и световое (660 нм , 10 мВт/см^2) воздействие на перевитые опухоли печени крыс штамма РС-1 при введении CaCO_3 -микроконтейнеров, содержащих фотосенсибилизатор, приводит к дистрофическим изменениям и появлению обширных очагов некроза, площадь которых в 2-3 раза превышает площадь некрозов, возникающих в результате ультразвукового воздействия в присутствии ненагруженных CaCO_3 -контейнеров.
7. Ультразвуковое излучение (3.5 Вт/см^2 , 20 кГц) разрушает микроразмерные ($2.0 \pm 0.5 \text{ мкм}$) и субмикронные ($0.6 \pm 0.1 \text{ мкм}$) частицы ватерита и увеличивает электропроводность суспензии, их содержащей, в 1.5 раза. Модификация частиц ватерита наночастицами серебра позволяет добиться усиления этого эффекта.

Список использованных источников:

1. Derycke A.S.L., De Witte P.A.M. *Adv Drug Del Rev.* 2004. Vol. 56 (1). P. 17–30.
2. Van Nostrum C.F. *Adv Drug Del Rev.* 2004. Vol. 56 (1). P. 9–16.
3. Ohulchansky T.Y. et al. *Nano Lett.* 2007. Vol. 7 (9). P. 2835–2842.
4. Schwiertz J. et al. *Biomaterials.* 2009. Vol. 30 (19). P. 3324–3331.
5. Ricci-Júnior E., Marchetti J.M. *Int J Pharm.* 2006. Vol. 310 (1-2). P. 187–195.
6. Eshghi H. et al. *Photodiag Photodyn Therapy.* 2013. Vol. 10 (3). P. 304–312.
7. Volodkin D. V., von Klitzing R., Möhwald H. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2010. Vol. 49 (48). P. 9258–9261
8. Jin Z. et al. *J Dermatol.* 2000. Vol. 27 (5). P. 294–306.
9. Николаев А.Л. и др. *Акуст. Жур.* 2009. Т. 55 (4-5). С. 565–574.
10. Volodkin D. V. et al. *Langmuir.* 2004. Vol. 20 (8). P. 3398–3406.
11. Ojugo A.S.E. et al. *NMR in Biomedicine.* 1999. Vol. 12 (8). P. 495–504.

Основные научные публикации

Статьи в журналах из перечня, рекомендованного ВАК для публикации результатов диссертаций:

1. **Svenskaya Yu.**, Parakhonskiy B., Haase A., Atkin V., Lukyanets E., Gorin D., Antolini R. Anticancer drug delivery system based on calcium carbonate particles loaded with a photosensitizers // *Biophysical Chemistry.* - 2013. - V. 182. - P. 11-15 (doi: 10.1016/j.bpc.2013.07.006).
2. Yanina I., Kochubey V., Tuchin V., Portnov S., **Svenskaya Yu.**, Gorin D., Ponomareva E., Nikitina V. Effect of bacterial lectin on acceleration of fat cell lipolysis at in vitro diode laser treatment using encapsulated ICG // *Proc. SPIE 8337, Saratov Fall Meeting 2011: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XIII, 83370F* (March 1, 2012) (doi: 10.1117/12.923778).
3. Садовой А.В., Браташов Д.Н., Ященко А.М., **Свенская Ю.И.**, Сухоруков Г.Б., Горин Д.А. Стабилизация эмульсии жидкий кристалл/вода методом последовательной адсорбции полиэлектролитов // *Письма в ЖТФ.* – 2010. Т. 36. - №1. - с. 84-94 (doi: 10.1134/S106378501001027X).

Тезисы конференций:

4. Svenskaya Yu.I., Lomova M.V., Lukyanets E.A., A.Bartkowiak, Markvicheva E.A., Gorin D.A. Encapsulation of photodynamic dyes using polyelectrolyte core-shell structures // *Nanoparticles, nanostructured coatings and microcontainers: technology, properties, applications. Proceedings of the III International workshop at Antalya, Turkey, 2011 / Saratov.* – 2011.
5. Svenskaya Yu.I., Lukyanets E.A., Markvicheva E.A., Gorin D.A. Preparation of core-shell structures loaded with photodynamic dyes by Layer by Layer assembly method // *Materials of the German-Russian Conference on Fundamentals and Applications of Nanoscience at Berlin, Germany / Berlin.* – 2012. – В4-4.
6. Козина А.М., Янина И.Ю., Свенская Ю.И., Генина Э.А., Портнов С.А., Башкатов А.Н., Горин Д.А., Тучин В.В. Фотодинамический липолиз с использованием индоцианина зеленого // *Проблемы оптической физики и биофотоники: Материалы 14й Международной молодежной научной школы по оптике, лазерной физике и биофотонике.* – Саратов. – 2010. – с. 113.

7. Свенская Ю.И., Лукьянец Е.А., Марквичева Е.А., Горин Д.А. Создание структур ядро-оболочка для капсуляции фотодинамических красителей // Материалы научной школы-семинара Методы компьютерной диагностики в биологии и медицине 2011 / Саратов. – 2011. – с. 99.
8. А.И Михайлов, А.Л. Карагайчев, Ю.И. Свенская, Д.Е. Суетенков, Д.А. Горин. Формирование нанокompозитных покрытий с наночастицами серебра и их исследование методом пьезокварцевого микровзвешивания// Физика и техника волновых процессов: Материалы VIII Международной конференции: приложение «Физика волновых процессов и радиотехнические системы». – С.П.-б. – 2009.- с. 386.

Подписано к печати 14.11.2013 года. Формат 60x48 1/16.
Бумага офсетная. Гарнитура Таймс. Печать цифровая.
Усл. печ. л. 1,5
Тираж 100 экз. Заказ № 260-Т

Отпечатано в типографии СГУ
Саратов, Большая Казачья 112-а
Тел. (8452) 27-33-85