

МИНОБРНАУКИ РОССИИ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра материаловедения, технологии
и управления качеством

**МУЛЬТИСЛОЙНЫЕ ЭМУЛЬСИИ ТИПА МАСЛО-В-ВОДЕ ДЛЯ
ИНГИБИРОВАНИЯ РАКОВЫХ КЛЕТОК IN VITRO**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студентки магистратуры 2 курса 2291 группы
направления 22.04.01 «Материаловедение и технологии материалов»,
профиль «Нанотехнологии, диагностика и синтез современных материалов»
института физики

Корабель Марины Викторовны

Научный руководитель,
доцент, к.ф.-м.н.

должность, уч. степень, уч. звание

подпись, дата

М.В. Ломова

инициалы, фамилия

Зав. кафедрой,
д.ф.-м.н., профессор

должность, уч. степень, уч. звание

подпись, дата

С.Б. Вениг

инициалы, фамилия

Саратов 2025

Введение. В настоящее время эффективная доставка новых лекарственных препаратов имеет ряд практических ограничений. Введение и усвоение лекарства может быть осложнено различными факторами: физико-химическими свойствами препарата, а также физиологией пациента.

Биофармацевтическая классификационная система делит лекарства по двум физико-химическим свойствам: растворимость и проницаемость. Около 40% продаваемых лекарств имеют низкую растворимость. До 90% лекарственных препаратов, находящихся в стадии разработки, оказываются неудачными из-за проблем с растворимостью [1].

Актуальность получения новых форм доставки лекарственных средств связана с тем, что на данный момент не существует лекарств без или с минимальными побочными действиями в отношении социально значимых заболеваний.

В данной работе будет рассмотрена эмульсия типа масло-в-воде, как форма доставки лекарственных средств.

Целью выпускной квалификационной работы является разработка стабильной, биосовместимой, многослойной системы для капсулирования жирорастворимых лекарственных средств.

На основе поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- Сравнить биоэффекты фармакологических форм жирорастворимых лекарственных средств.
- Апробировать протоколы приготовления эмульсии типа масло-в-воде с различными типами стабилизаторов и мультислойных структур.
- Исследовать изменение послойно гидродинамического диаметра эмульсий с цитостатиком и без.
- Исследовать изменение гидродинамического диаметра эмульсий на 0 и 21 сутки в зависимости от типа стабилизирующей оболочки.
- Определить количественный состав мультислойных эмульсий с цитостатиком и без.

- Проанализировать цитотоксичность эмульсий, а также их составных частей, в зависимости от их концентрации, наличия цитостатика и времени хранения на примере раковых и здоровых клеточных линий *in vitro*.

- Определить интернализацию эмульсий в клетки *in vitro*.

Выпускная квалификационная работа занимает 59 страниц, имеет 29 рисунков и 5 таблиц.

Обзор составлен по 43 информационным источникам.

Во введение рассматривается актуальность работы, устанавливается цель и выдвигаются задачи для достижения поставленной цели. В разделе 1-3 изучены теоретические основы: фармакологических систем доставки лекарственных средств, таких как липосомы, мицеллы и эмульсии; материаловедение современных эмульсионных систем для получения новых форм лекарственных средств типа ядро-оболочка; методы определения содержания белка в фармакологии. Во разделах 4-10 описывалась экспериментальная часть: протоколы формирования эмульсий типа масло-в-воде с варьированием стабилизаторов в мультислойной оболочке; изучение интернализации эмульсий с белково-таниновой оболочкой, допированной доксорубицином, в раковые клетки; *in vitro* исследование выживаемости клеток здоровых и раковых линий (Alamar Blue); исследование гидродинамического диаметра; определение концентрации белка в растворе с помощью метода Бредфорда; технико-экономическое обоснование; уровень востребованности технической разработки в области применений эмульсий для фармацевтики.

Основное содержание работы.

Доставка лекарственных средств представляет собой нацеленный транспорт лекарственного вещества в заданную область организма, органа или клетки.

В фармацевтике используется понятие «лекарственная форма», описывающее способ введения лекарства в организм, например, в виде таблеток, раствора для внутривенных инъекций, глазных капель, мазей и др.

Современные достижения в области биомедицины и биотехнологий способствовали появлению новых средств упаковки и доставки лекарственных веществ, например, липосом, мицелл, эмульсий [2].

В роли формы доставки лекарственных средств предлагается использовать эмульсию типа масло-в-воде.

В качестве активных компонентов современных эмульсионных систем нами были выбраны следующие материалы: льняное масло, бычий сывороточный альбумин, таниновая кислота, лецитин яичный, доксорубицин, исходя из их свойств и уровней практического и исследовательского применений.

В работе проведены три эксперимента для анализа стабильности эмульсии. В первом эксперименте использовались оболочки из бычьего сывороточного альбумина (БСА) и таниновой кислоты (ТА). Во втором эксперименте оболочки были из бычьего сывороточного альбумина (БСА), таниновой кислоты (ТА) и доксорубина (DOX). В третьем эксперименте использовались оболочки из таниновой кислоты (ТА) и яичного лецитина (lipoid E 80).

Разрабатываемые эмульсии обладают следующими преимуществами:

- В состав оболочки входит хелатирующий агент – таниновая кислота, которая ингибирует окисление полиненасыщенных жирных кислот (источником которых является льняное масло в ядре эмульсии).
- В состав оболочки входит цитостатик (доксорубицин), который является противораковым средством.
- Получаемые нами эмульсии являются полидисперсными – широкое распределение частиц по размерам позволяет увеличивать количество доставляемого вещества за счет вариативности интернализации частиц в различные по размеру клетки.
- Наличие жирового ядра позволяет капсулировать высокоэффективно жирорастворимые лекарственные средства в мультислойные эмульсии типа масло-в-воде с дополнительной возможностью функционализации стабилизирующих оболочек.

Были разработаны протоколы получения эмульсий, содержащей в оболочке БСА и ТА, БСА, ТА и DOX, ТА и lipoid E 80.

Для приготовления эмульсии необходимо подготовить компоненты в нужной пропорции: БСА 4 мг/мл, ТА 3 мг/мл, DOX 1 мг/мл и lipoid E 80 4 мг/мл. Для смешивания полученные растворы помещаем в ультразвуковую ванну на 10 мин. После приступаем к приготовлению эмульсии.

Этап 1. Для получения первичной эмульсии, содержащей в оболочке ТА/БСА и БСА/ТА/DOX в пробирку добавляем льняное масло и БСА, согласно формуле 1.

$$0,5 \text{ ml l.oil} + 4,5 \text{ ml БСА } 4 \text{ mg/ml} \quad (1)$$

Для приготовления первичной эмульсии, содержащей в оболочке ТА/lipoid E 80 в пробирку вводим льняное масло и lipoid E 80 в соответствии с формулой (2).

$$0,5 \text{ ml l.oil} + 4,5 \text{ ml lipoid E } 80 \text{ } 4 \text{ mg/ml} \quad (2)$$

Полученные растворы по формуле (1) и (2) с помощью ультразвука взбиваем на мощности 50 Вт в течение 30 с.

Этап 2. Один миллилитр полученной первичной эмульсии постепенно добавили к 20 мл компонента оболочки, находящейся в пробирке с магнитом на магнитной мешалке, перемешивали в течении 20 минут. Далее полученную смесь перенесли в фильтрационную ячейку объемом 50 мл с магнитом находящуюся на магнитной мешалке и выдерживали под давлением 0,69 бар при энергичном перемешивании в течение 15 мин. Получилось 5 мл эмульсии.

Далее этап 2 повторяется в зависимости от количества оболочек, содержащихся в эмульсии. В итоге будет получена готовая эмульсия. Структуры эмульсии с разными оболочками представлены на рисунке 1.

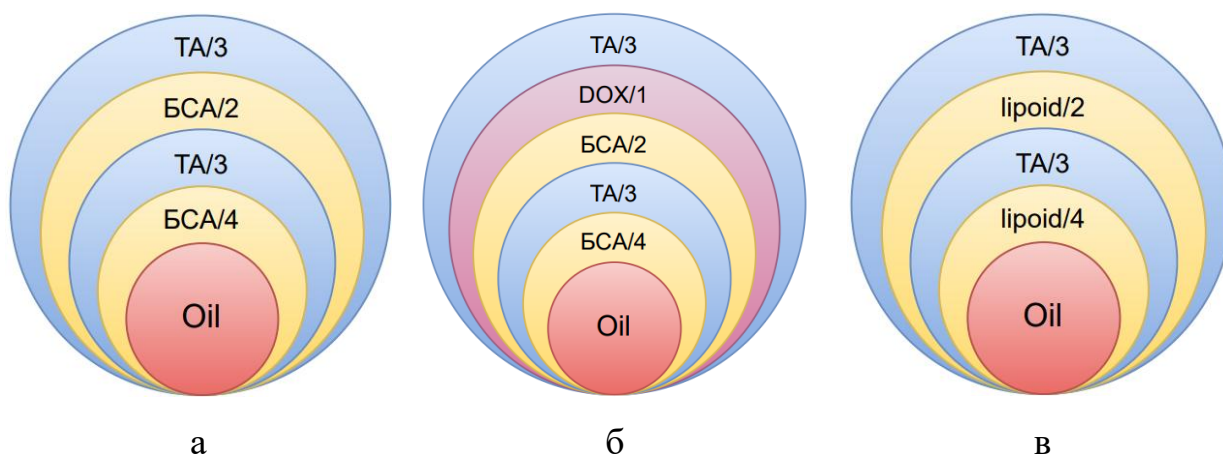


Рисунок 1 – Структуры эмульсии, содержащей в оболочке ТА и БСА (а), БСА, ТА и DOX (б), ТА и lipid E 80 (в)

Изучение интернализации эмульсий с белково-таниновой оболочкой, допированной доксорубицином, в раковые клетки.

Для изучения интернализации эмульсий, содержащих доксорубицин, использовали клеточную линию 4T1 (рака молочной железы мыши). На рисунке 2 показаны результаты измерения флуоресценции клеток проточного цитометра с визуализацией (диапазон 640-745 нм).

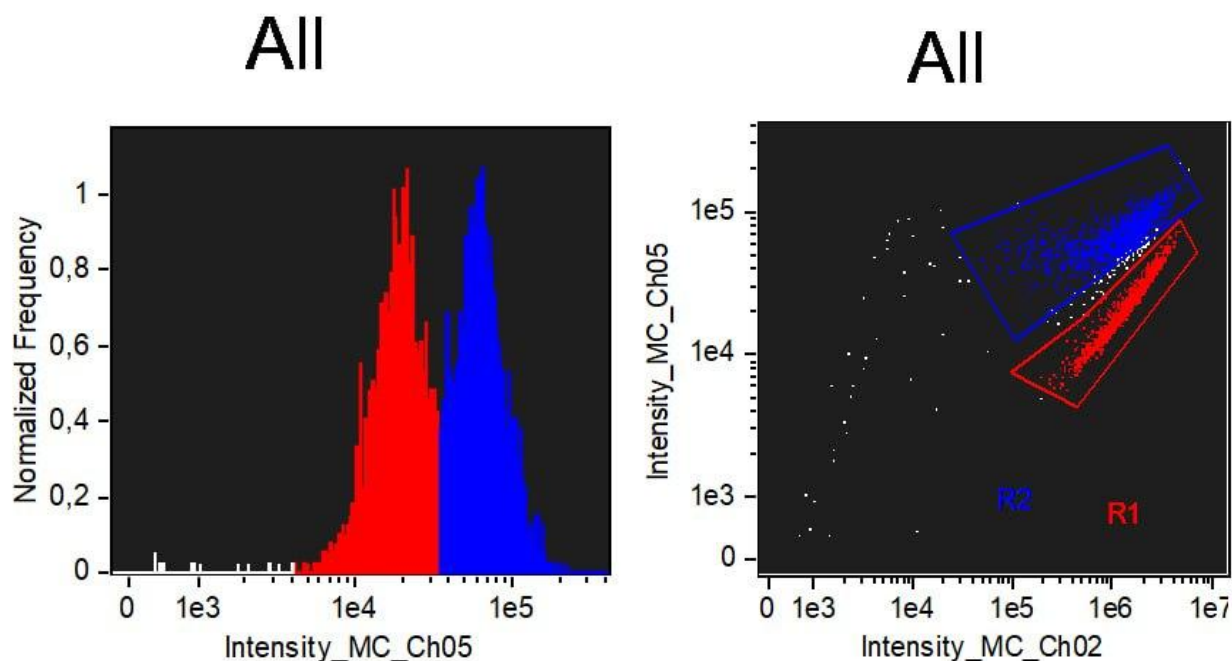


Рисунок 2 – Результаты измерения флуоресценции клеток

На 1 графике видны два четких пика флуоресценции: первый пик соответствует сигналу от кальцеина, которым были окрашены клетки, второй

пик отражает флуоресценцию доксорубина, содержащегося в эмульсиях. Наличие данных сигналов доказывает, что клетки успешно поглощали эмульсии.

На втором графике представлены те же данные в альтернативном формате. Визуализируются две различные популяции клеток, которые соответствуют разнице в интенсивности флуоресценции.

Оба графика демонстрируют успешное поглощение эмульсии клетками.

In vitro исследование выживаемости клеток здоровых и раковых линий (Alamar Blue) под действием эмульсий с белково-таниновой оболочкой в процессе старения эмульсии.

Было проведено первичное in vitro исследование выживаемости клеток здоровых и раковых линий. Видно, что для свежего раствора через две недели есть разница в выживаемости, здоровые клетки показывают более низкую выживаемость, чем раковые клетки. Из рисунка 3 можно сделать выводы:

1 Клетки имеют разную морфологию, поэтому эмульсии по-разному интернализируются, поэтому разная выживаемость.

2 Раковые клетки более устойчивы к любому виду воздействия, в том числе к воздействию с помощью эмульсии.

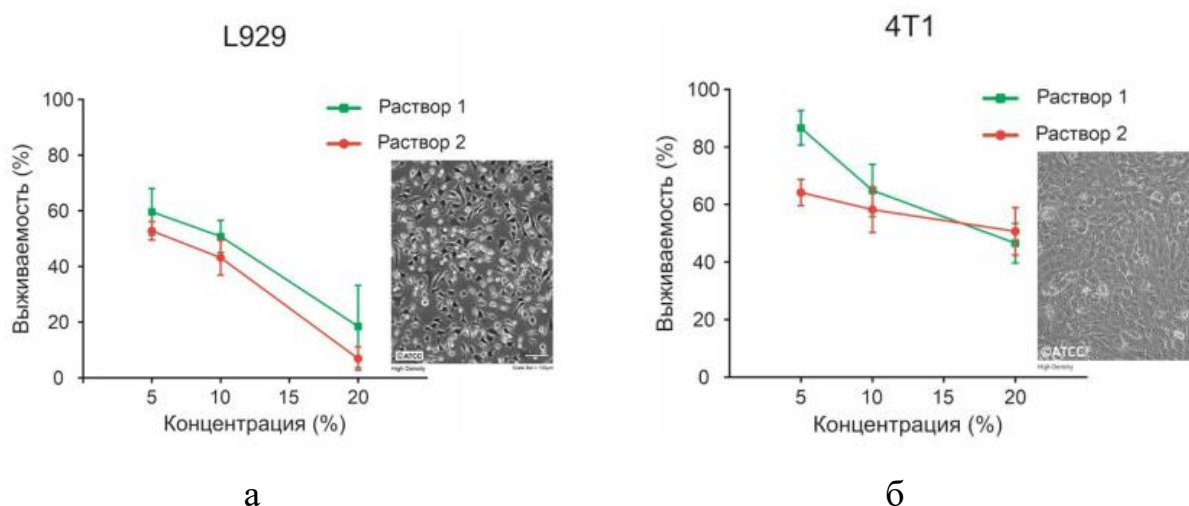


Рисунок 3 – Выживаемость клеток: а – L929 – линия клеток фибробластов мыши: раствор 1 – эмульсии 0 день, раствор 2 – эмульсии 14 день; б – 4T1 – линия клеток рака молочной железы мыши: раствор 1 – эмульсии 0 день, раствор 2 – эмульсии 14 день

In vitro исследование выживаемости клеток здоровых и раковых линий (Alamar Blue) под действием эмульсий с белково-таниновой оболочкой допированной доксорубицином, в различных концентрациях.

Исследование цитотоксичности проводилось на клеточных линиях: 4T1 – рака молочной железы мыши и L929 – фибробластов мыши. С целью определения воспроизводимости экспериментов было проведено 2 эксперимента в разные дни. Из рисунка 4 видно, что эксперименты воспроизводимы, так как основные тенденции в выживаемости раковых и здоровых клеток при действии эмульсии с доксорубицином и без него сохраняются. Эмульсия в концентрации 1% не токсична для раковых и здоровых клеток. Для некоторых объектов эмульсия с доксорубицином также не проявляет токсичность, что свидетельствует о том, что содержание цитостатика в таких концентрациях на поверхность эмульсии мало. Концентрация 5% говорит о том, что эмульсия более токсична. Для некоторых случаев клетки находятся в стадии некроза, в других остаются в стадии апоптоза. Эмульсия в концентрации 10% токсична для всех экспериментов.

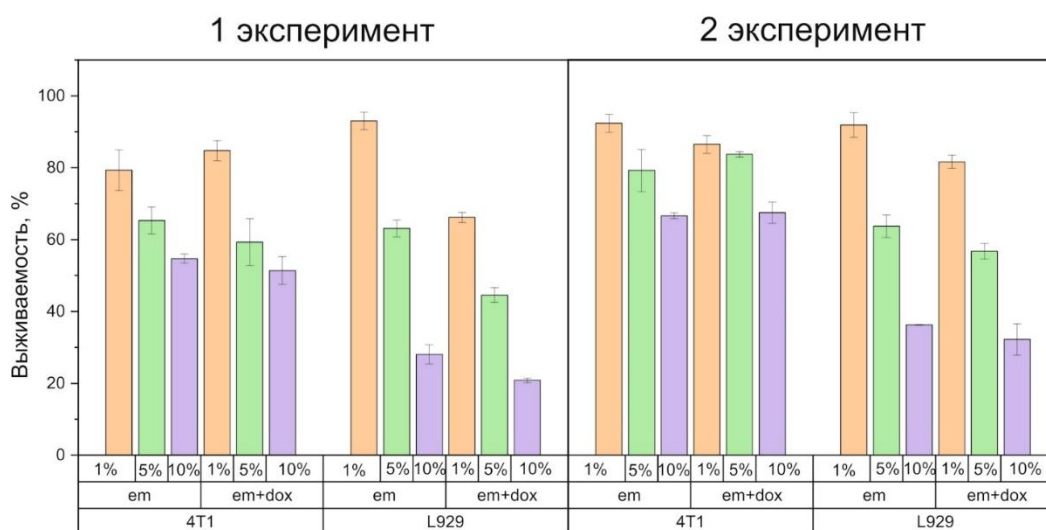


Рисунок 4 – Выживаемость клеток в зависимости от типа клеток и концентрации эмульсий

Определение гидродинамического диаметра эмульсии в процессе ее формирования послойно.

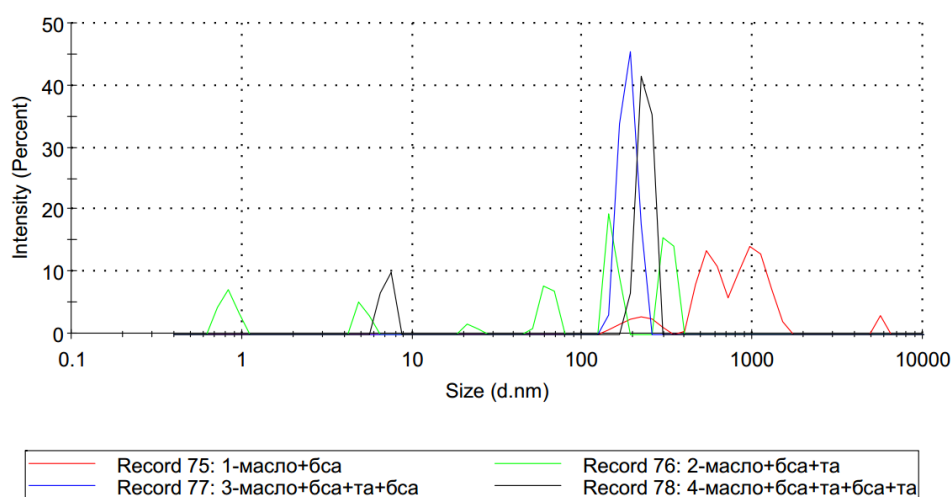


Рисунок 5 – График зависимости интенсивности от размера слоев эмульсии

Из рисунка 5, можно сделать вывод о том, что со стабилизацией каждого последующего слоя происходит изменение размера частиц. Это свидетельствует о процессе стабилизации. Переход от нестабильных крупных капель к стабильным частицам, при этом в системе преобладают частицы диаметром 220 нм.

Определение гидродинамического диаметра эмульсии с доксорубицином в процессе ее формирования послойно.

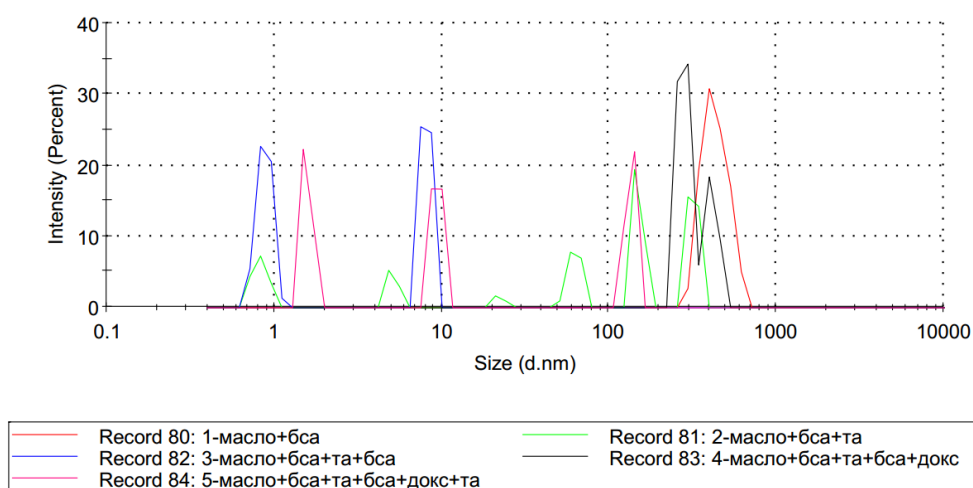


Рисунок 6 – График зависимости интенсивности от размера слоев эмульсии с доксорубицином

Рисунок 6 показывает, что эмульсия с доксорубицином является стабильной, с каждым последующим слоем происходит перераспределение частиц, в системе преобладают частицы диаметром 220 нм.

«Старение» эмульсий: Гидродинамический диаметр в 0 и 21 день эмульсии и эмульсии с доксорубицином.

На рисунке 7 представлена зависимость интенсивности от размера частиц эмульсии и эмульсии с доксорубицином в 0 и 21 день. При сравнении эмульсии и эмульсии с доксорубицином, можно сделать заключение, что доксорубицин увеличивает размер частиц и обе системы демонстрируют стабильность в течении 21 дня. Система не разрушается, изменяется только размер частиц.

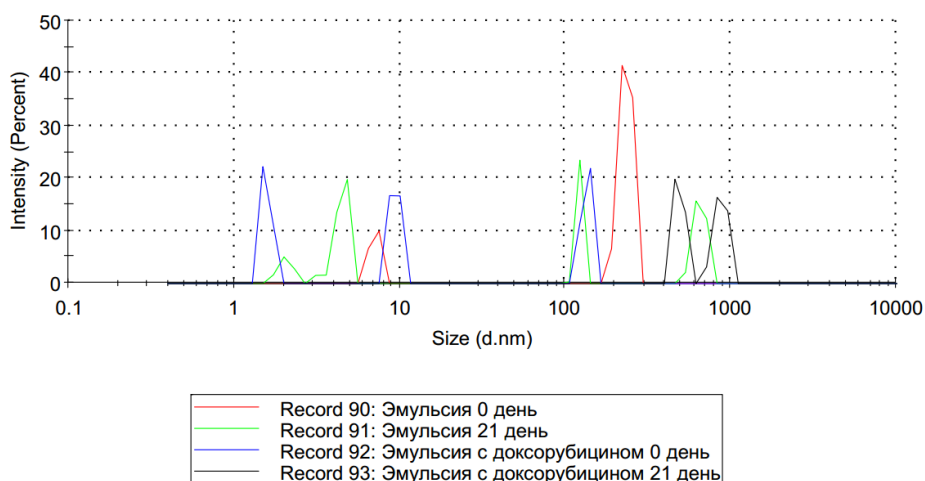


Рисунок 7 – График зависимости интенсивности от размера частиц эмульсии и эмульсии с доксорубицином в 0 и 21 день

Определение концентрации белка в растворе с помощью метода Бредфорда.

Концентрация белка в супернатантах собранных в процессе проведения экспериментов была определена с помощью метода Бредфорда.

Первоначально при адсорбции БСА в качестве первого стабилизирующего слоя промывки эмульсии не происходит, из-за низкой стабильности системы. После добавления таниновой кислоты происходит уплотнение слоев эмульсии, ее стабильность повышается. Поэтому для первых слоев рассчитывается содержание белка после адсорбции двух слоев – БСА и ТА, которое составляет $8,21 \pm 1,40$ мг на 10 мл 10% эмульсии. После адсорбции следующего слоя – БСА – количество белка БСА, адсорбировавшегося в оболочку, на 10 мл 10% эмульсии составляет $25,52 \pm 4,63$ мг. Увеличение адсорбированного количества белка произошло из-за избытка реагента. При формировании первого слоя

количество белка БСА составляло 18 мг на 10 мл 10% эмульсии, при формировании второго слоя белка БСА – 40 мг на 10 мл 10% эмульсии.

Последующее увеличение слоев происходило за счет адсорбции таниновой кислоты и доксорубина, чтобы повысить стабильность и функциональность эмульсий. Было важно произвести оценку белка БСА, который мог потенциально оторваться от поверхности эмульсий ввиду изменений заряда при добавлении реагентов, механически, а также из-за изменения кислотности среды (раствор таниновой кислоты имеет pH 3,0). При адсорбции таниновой кислоты было высвобождено $1,20 \pm 0,06$ мг белка БСА, что составляет 1,78% от массы белка, которое было адсорбировано всего на предыдущих слоях в пересчете на 10 мл 5% эмульсии. При адсорбции доксорубина было высвобождено $0,25 \pm 0,01$ мг белка БСА, что составляет 0,37% от массы белка, которое было адсорбировано всего на предыдущих слоях в пересчете на 10 мл 5% эмульсии.

Расчет массы адсорбированного и высвободившегося белка БСА позволяет нам сказать, что количество высвобождаемого белка при адсорбции таниновой кислоты и доксорубина не является значительным, находится в пределах погрешности измерений, а, следовательно, формируемые нами белково-хелатные оболочки эмульсий с противораковым веществом являются стабильными.

Технико-экономическое обоснование.

Технико-экономическое обоснование технологии было проведено с помощью финансовых показателей CAPEX и OPEX.

CAPEX (Capital Expenditures) – капитальные затраты (инвестиции) на приобретение или модернизацию долгосрочных активов (оборудование, недвижимость и тд.).

OPEX (Operational Expenditures) – операционные расходы на поддержание текущей деятельности (аренда, зарплаты, реагенты).

С учетом цен на май 2025 года капитальные затраты составили 2 475 000 рублей, операционные затраты – 782 500 рублей.

Проект имеет коммерческий потенциал, но требует финансовой доработки. На данном этапе проекта рассчитать срок окупаемости и рентабельность невозможно, так как нет массового выпуска продукции.

Уровень востребованности технической разработки в области применений эмульсий для фармацевтики.

Был проведен анализ патентной информации по следующим темам: адресная доставка лекарств и эмульсии типа масло-в-воде.

Для анализа использовались патентные базы: ФИПС, PATENTSCOPE, Яндекс.патенты, Google.Patents, Роспатент платформа, Орбит (Questel).

Анализ патентной информации показал, что, несмотря на снижение числа патентов, технологии адресной доставки лекарств и эмульсии типа масло-в-воде остаются значимыми для фармацевтики, и их развитие продолжается.

Заключение.

В результате выполнения выпускной квалификационной работы были проведены эксперименты по разработке стабильной, биосовместимой, многослойной системы для капсулирования жирорастворимых лекарственных средств – эмульсия типа масло-в-воде с различными типами стабилизаторов и мультислойных структур.

При анализе измерения флуоресценции клеток в канале цитометра (диапазон 640-745 нм) оба графика продемонстрировали успешное поглощение эмульсии клетками.

После первичного *in vitro* исследования выживаемости клеток можно сказать, что клетки имеют разную морфологию и раковые клетки более устойчивы к воздействию эмульсии, чем здоровые.

Повторные эксперименты выживаемости клеток в зависимости от типа клеток и концентрации эмульсий подтвердили воспроизводимость результатов: 1% эмульсия нетоксична для всех клеток, 5% концентрация вызывает апоптоз или некроз в зависимости от типа клеток, а 10% эмульсия демонстрирует токсичность.

Были проанализированы послойный гидродинамический диаметр эмульсии и эмульсии с доксорубицином. Со стабилизацией каждого последующего слоя происходит изменение размера частиц. Это свидетельствует о процессе стабилизации. В каждой системе на заключительном слое преобладают частицы диаметром 220 нм.

Гидродинамический диаметр эмульсии и эмульсии с доксорубицином в 0 и 21 день показали, что доксорубицин увеличивает размер частиц, а также обе системы демонстрируют стабильность в течении 21 дня (система не разрушается, изменяется только размер частиц).

С помощью метода Бредфорда была определена концентрация белка в супернатантах. Результаты анализа показали, что формирование наиболее стабильной оболочки эмульсии происходит на третьем слое, за счет избытка реагента БСА. Увеличение слоев за счет адсорбирования таниновой кислоты и доксорубицина позволило повысить стабильность эмульсии, так как добавление этих реагентов в оболочку приводит к минимальному высвобождению белка.

Технико-экономическое обоснование было проведено с помощью финансовых показателей CAPEX и OPEX. Проект имеет коммерческий потенциал, но требует доработки.

После анализа патентной информации можно сделать вывод, что несмотря на уменьшение общего количества патентов, технологии адресной доставки лекарств и эмульсий типа масло-в-воде по-прежнему имеют важное значение для фармацевтической отрасли, и их развитие продолжается.

Список использованных источников

1 Babu, N. J. Solubility Advantage of Amorphous Drugs and Pharmaceutical Cocrystals / N. J. Babu, A. Nangia // Crystal Growth & Design. – 2011. – № 11(7). – P. 2662-2679.

2 Леонова, М. В. Новые лекарственные формы и системы доставки лекарственных средств: особенности пероральных лекарственных форм. Часть 1 / М. В. Леонова // Лечебное дело. – 2009. – № 2. – С. 21-31.