

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

Кафедра материаловедения, технологии  
и управления качеством

**БИМОДАЛЬНО ОКРАШЕННЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ  
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

**АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ**

студентки 4 курса 4091 группы  
направления 22.03.01 «Материаловедения и технологии материалов»,  
профиль «Нанотехнологии, диагностика и синтез современных материалов»  
института физики

Кузнецовой Людмилы Ивановны

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 2024

**Введение.** Современные методы лечения заболеваний предполагают применение широкого арсенала традиционных лекарственных средств [1] в разных формах: в виде капсул, таблеток, пластырей, инъекций и т.д.

Макро-, микро- и наноразмерные системы на основе биосовместимых материалов, соединённые с лекарственной формой, применяются для лечения тяжёлых заболеваний, включая сахарный диабет, туберкулёз, опухоли различного происхождения. Целью разработки систем доставки лекарств является улучшение фармакокинетики и фармакодинамики лекарств, предотвращения токсичности, иммуногенности органов-мишеней, чего не удается достичь традиционными методами. Разработка систем доставки препаратов обусловлена необходимостью эффективного нацеливания препарата на очаг заболевания, повышения переносимости его пациентами и снижения стоимости медицинской помощи.

Исследования показали, что большинство твердых опухолей имеют кровеносные сосуды с повышенной проницаемостью сосудов, которые обеспечивают ткани опухоли достаточным количеством питательных веществ и кислорода для быстрого роста. На основе этого эффекта можно воспользоваться данной уникальной природой кровеносных сосудов опухоли для транспорта макромолекул в опухолевые ткани [2]. Этот феномен может служить основным способом адресной доставки антираковых лекарств, т.е. адресной химиотерапии рака.

Карбонат кальция ( $\text{CaCO}_3$ ) занимает важное место среди используемых в медицине биосовместимых неорганических соединений. Для применения разрабатываемых систем доставки на основе  $\text{CaCO}_3$  в живом организме необходимо использовать поликристаллы определенного размера, при этом особенно востребованы субмикронные частицы. Поликристаллические частицы обычно получают в ходе массовой кристаллизации из раствора.

Биологическая визуализация может относиться к любому методу визуализации, используемому в биологии. Типичным примером является

биолюминесцентная визуализация, метод изучения лабораторных животных с использованием люминесцентного белка [3].

Целью выпускной квалификационной работы является: получение структурных составляющих систем адресной доставки лекарств с варьируемыми параметрами: форма и размер частиц карбоната кальция и люминесцентные свойства конъюгированного с красителем белком.

На основе поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

- Определить влияние концентраций реагирующих солей на форму и размер частиц карбоната кальция;
- Определить соотношение комплексов цианиновых красителей, используемых в качестве зондов для мечения клеток.

Выпускная квалификационная работа занимает 70 страниц, имеет 54 рисунка и 3 таблицы.

Обзор составлен по 52 информационным источникам.

Первый раздел представляет собой литературный обзор по проводим ранее исследования в области адресной доставки лекарств, а также характеристики средств доставки, и, обзор флуоресцирующих красителей, которые используются в качестве зондов для мечения наночастиц и клеток.

Во втором разделе работы представлена экспериментальная часть, согласно цели и поставленным задачам выпускной квалификационной работы, в результате которой сделан вывод о применимости ряда исследований, представленным в первом разделе.

### **Основное содержание работы**

Альтернативным методом доставки биологически активных веществ (БАВ) ко внутренним структурам служит капсулирование в нано- и микрообъекты, способные обеспечить пролонгированное высвобождение и адресную доставку лекарства [4]. Кристаллы ватеритной модификации  $\text{CaCO}_3$  активно используются в качестве матриц (включая полиэлектролитные частицы) при капсулировании БАВ. Легко синтезируемые в мягких условиях, высокопористые и биосовместимые частицы ватерита необходимого размера

являются привлекательными в качестве контейнеров для загрузки и контролируемого высвобождения белков [5].

Люминесцентная биовизуализация – это уникальный инструмент для визуализации морфологии живых тканей с высоким разрешением, использование которого становится все более популярным при исследовании микромира благодаря его селективности, чувствительности, возможности получения необходимой информации в режиме реального времени без разрушения исследуемого образца и относительно невысокая стоимость. Другие современные методы визуализации, такие как магнитно-резонансная и позитронно-эмиссионная томографии, требуют дорогостоящего оборудования и длительного времени экспозиции. Поэтому с каждым годом стремительно растет актуальность люминесцентной биовизуализации для медицинских применений, таких как анализ клеточных и тканевых функций, адресная доставка лекарств, определение механизмов их действия и другие.

В основе люминесцентной биовизуализации лежит маркировка предмета исследования (например, молекулы лекарства или органеллы клетки) люминесцентной меткой, сигнал которой может быть задетектирован при подаче энергии возбуждения [6].

Проточная цитометрия рассматривается как современная технология быстрого измерения клеточных показателей, характеристики, их органеллы и процессы, происходящие в них. Считается эффективным решением во многих важных областях клеточной биологии, иммунологии и клеточной инженерии [7].

Карбонат кальция ( $\text{CaCO}_3$ ) имеет широкое биомедицинское применение благодаря своей доступности, низкой стоимости, безопасности, биосовместимости, чувствительности к pH и медленной биоразлагаемости. В последнее время возрос интерес к их применению в качестве систем доставки различных групп лекарств [8]. Функционализированные наночастицы  $\text{CaCO}_3$  могут привести [9] к улучшенным характеристикам, таким как повышенная

термодинамическая стабильность, улучшенная способность загрузки лекарств и эффективность нацеливания на опухоль.

Были получены образцы частиц карбоната кальция после одного и трех циклов замораживания и размораживания наночастиц магнетита, которые подвергали воздействию клеточной среды при температуре  $+37^{\circ}\text{C}$  при постоянном перемешивании с отбором проб каждые 24 часа в течение 3 дней для анализа методами СЭМ и рентгенографии. Схематично этапы экспериментальной работы показаны на рисунке 1.

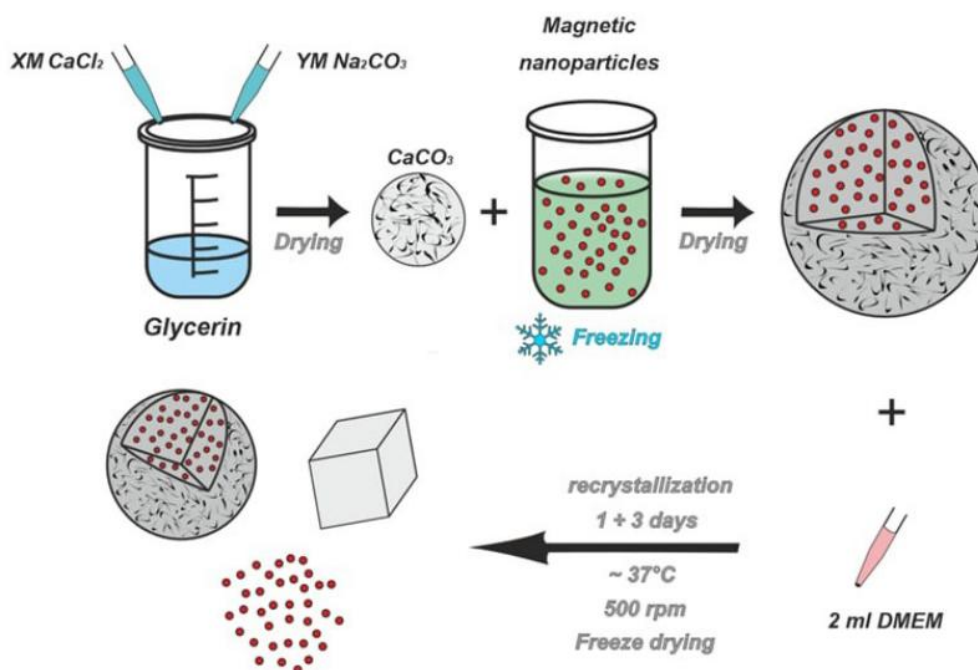


Рисунок 1 – Схема получения магнитных частиц ватерита карбоната кальция с последующей их перекристаллизацией с выделением фаз кальцита и магнетита

Анализ рентгеновских спектров показывает, что перекристаллизации ватерита при раздельном выпадении кальцитовой и магнетитовой фаз не происходит. Невозможно визуализировать изменение диаметра частиц при 3 циклах замораживания с течением времени в процессе перекристаллизации из-за того, что образуются кластеры частиц, из которых трудно выделить отдельные частицы для дальнейшего анализа, в отличие от частиц при 1 цикле введения магнитных наночастиц.

Согласно рентгеновским данным, количество осадков встречается фаза кальцита и магнетита, что также указывает на то, что процесс

перекристаллизации протекает в условиях, близких к условиям культивирования клеток *in vitro*.

Диаметр частиц при 1 цикле замораживания магнитных наночастиц при инкубации в питательной среде в течение 3 дней появляется крупная фракция частиц, в то время как количество эллиптических частиц уменьшается. Среднее значение большой оси  $b$  и малой оси  $a$  эллиптических частиц увеличивается к 3-му дню, но отношение ( $b/a$ ) среднего значения большой оси эллиптических частиц к малой оси уменьшается, таблица 1. Эллиптические частицы магнитными наночастицами приобретают округлую форму при длительной инкубации в питательных средах [10]. В таблице 1  $a$ ,  $b$  – средние арифметические значения длин больших и малых осей эллиптических частиц,  $x$ ,  $y$  – арифметические ошибки значений длин больших и малых осей эллиптических частиц.

Таблица 1 – Процентное соотношение сферических и эллиптических частиц по отношению к общему количеству частиц в группе, диаметру частиц в продольной и поперечной частях частиц и расчет их соотношения для определения приближения формы частиц к различным группам

Параметр	Контроль	1 день	2 день	3 день
Количество круглых частиц, %	9,72	2,05	3,36	4,00
Количество эллиптических частиц, %	90,28	97,95	96,64	96,00
$b \pm x$ , nm	682 $\div$ 121	683 $\div$ 153	678 $\div$ 144	769 $\div$ 183
$a \pm y$ , nm	502 $\div$ 77	534 $\div$ 111	524 $\div$ 107	606 $\div$ 142
$b/a$	1,36	1,28	1,29	1,27

На рисунке 2 представлены СЭМ-изображения (a-h), рентгеновские спектры (a-h), распределение частиц по размерам (a-d) с теоретическими кривыми нормального распределения (красные линии на графике распределения частиц по размерам, a-d), построенные на основе экспериментальных данных с использованием моделирования частиц, частицы карбоната кальция, полученные при соотношении концентраций солей  $\text{CaCl}_2$  и

$\text{Na}_2\text{CO}_3$  1,00:1,00 с 1 (a-d) и 3 (e-h) цикла замораживания/оттаивания в растворах наночастиц магнетита с наблюдением за перекристаллизацией частиц в клеточных средах при температуре  $+37^\circ\text{C}$  в течение 3 дней. Масштаб на изображениях СЭМ – 1 мкм.

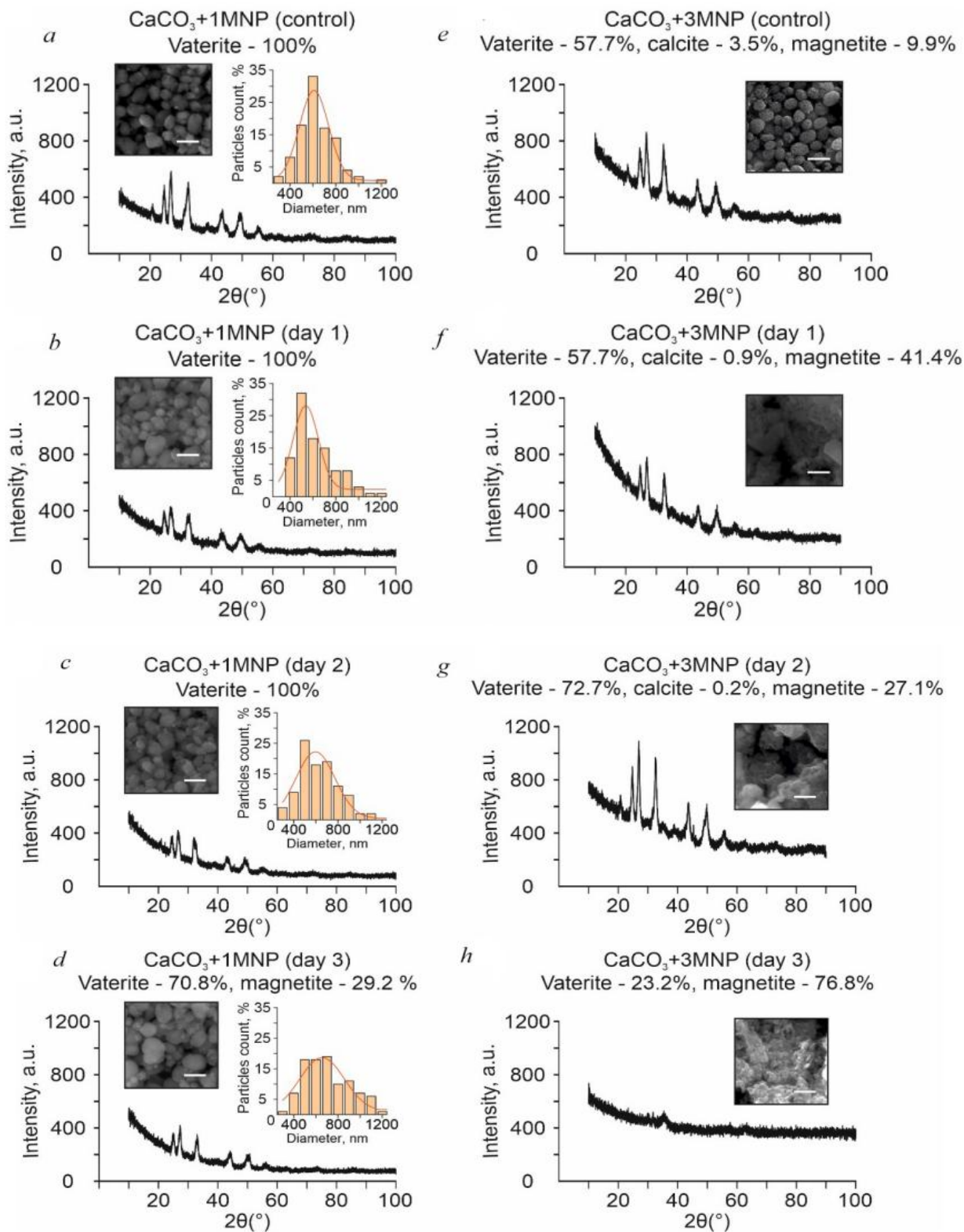


Рисунок 2 – Форма и размер частиц

Активированные эфиры, такие как NHS- (N-гидроксисукцинимидные), а также другие (sulfo-NHS, STP-), являются реакционноспособными производными, способными модифицировать аминокруппы биомолекул. Наиболее часто используются NHS-эфиры.

С помощью активированных эфиров часто вводят репортерные группы, такие как флуоресцентные красители. Алкины и азидогруппы могут быть также введены в состав биомолекул с помощью соответствующих активированных эфиров для того, чтобы подготовить биомолекулы к модификации через клик-реакции.

Поскольку почти все белки и пептиды содержат аминокруппы, их модификация особенно часто проводится посредством активированных эфиров. Другими примерами являются модификации аминоклинонуклеотидов, аминоклинофицированная ДНК и аминоклиносодержащие сахара.

Для эксперимента использовались красители Cyanine 7 NHS-эфир, Cyanine 7,5 NHS-эфир и Cyanine 5,5 NHS-эфир от фирмы «Lumiprobe».

Все красители и их комплексы растворялись в 0,5 мл этанола. В таблице 2 представлены объемные соотношения красителей в каждом полученном комплексе.

Таблица 2 – Объемное соотношение красителей в каждом комплексе

Наименование красителя	Номер комплекса и объемное соотношение красителя в комплексе, мл					
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5	№ 6
Cy 5,5	1	0,5	1	0,5	-	-
Cy 7,5	-	-	0,5	1	1	0,5
Cy 7	0,5	1	-	-	0,5	1
Этиловый спирт, мл	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

Установлено, что белки способны к образованию молекулярных комплексов с флуорофорами. Механизмы комплексообразования различны и зависят от природы заместителей в молекуле флуорофора.

Полученные результаты представлены в виде графиков на рисунках 3-8. На графиках представлены зависимости флуоресценций чистых комплексов



красителей, комплексов красителей пришитых к белку и отдельные красители, входящие в состав из каждой смеси.

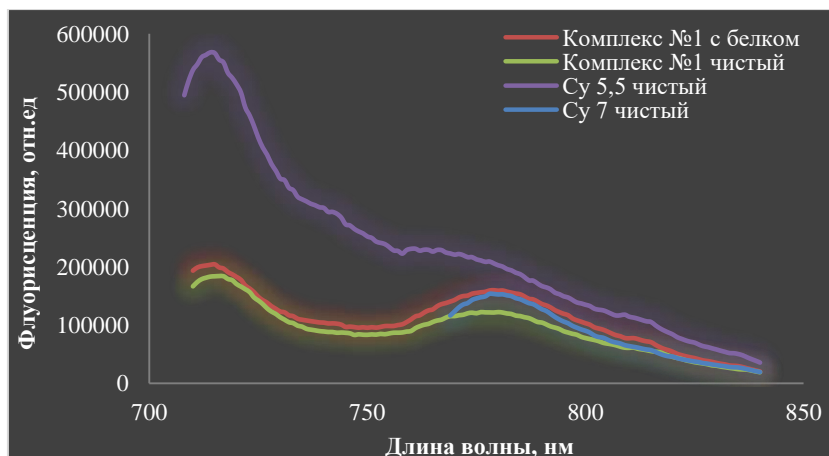


Рисунок 3 – Спектры флуорисценции комплекса красителей № 1 конъюгированные с BSA в сравнении с комплексом красителей № 1 растворенных в буфере и отдельно взятые компоненты для каждой смеси

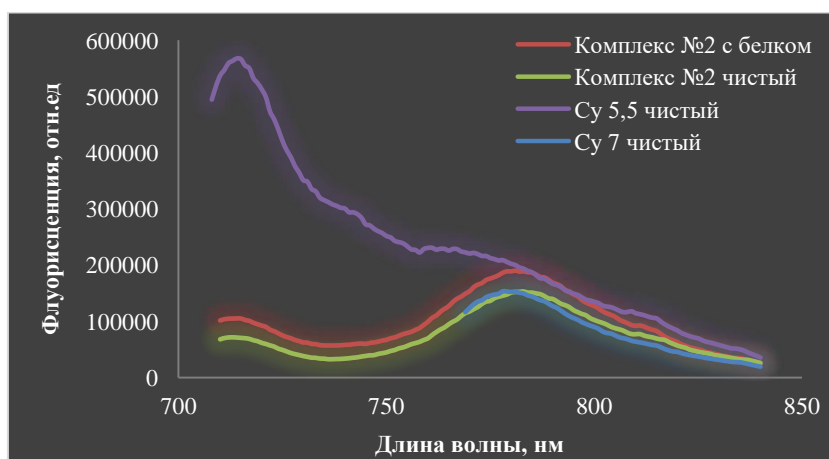


Рисунок 4 – Спектры флуорисценции комплекса красителей № 2 конъюгированные с BSA в сравнении с комплексом красителей № 2 растворенных в буфере и отдельно взятые компоненты для каждой смеси

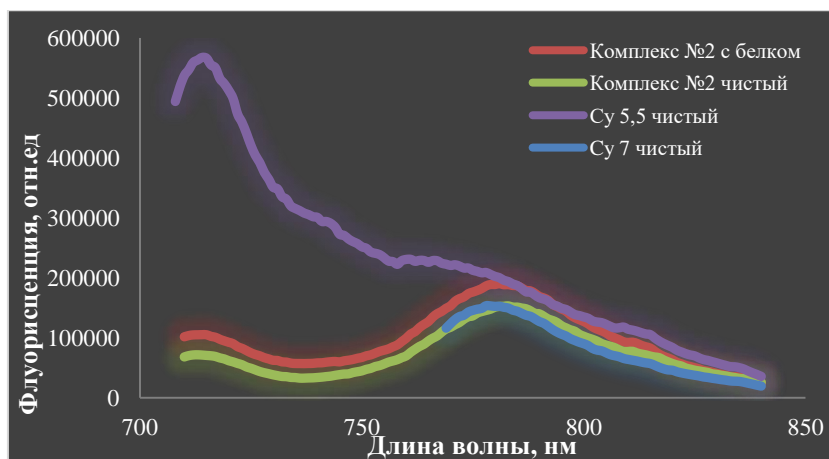


Рисунок 5 – Спектры флуорисценции комплекса красителей № 3 конъюгированные с BSA в сравнении с комплексом красителей № 3 растворенных в буфере и отдельно взятые компоненты для каждой смеси

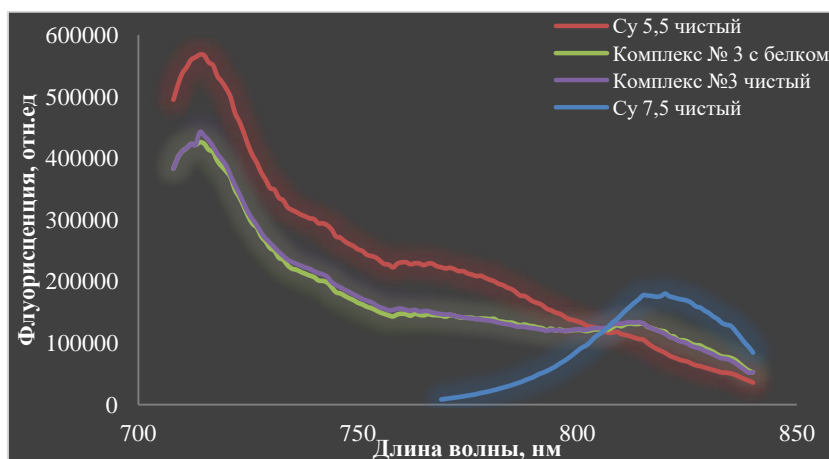


Рисунок 6 – Спектры флуорисценции комплекса красителей № 4 конъюгированные с BSA в сравнении с комплексом красителей № 4 растворенных в буфере и отдельно взятые компоненты для каждой смеси

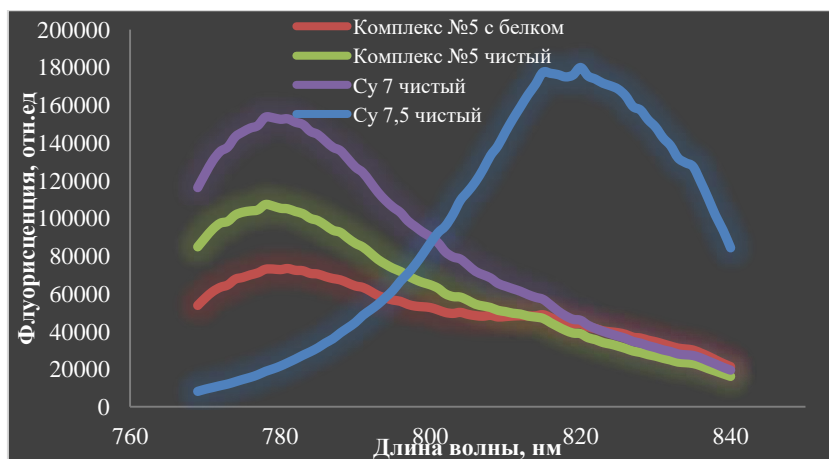


Рисунок 7 – Спектры флуорисценции комплекса красителей № 5 конъюгированные с BSA в сравнении комплексом красителей № 5 растворенных в буфере и отдельно взятые компоненты для каждой смеси

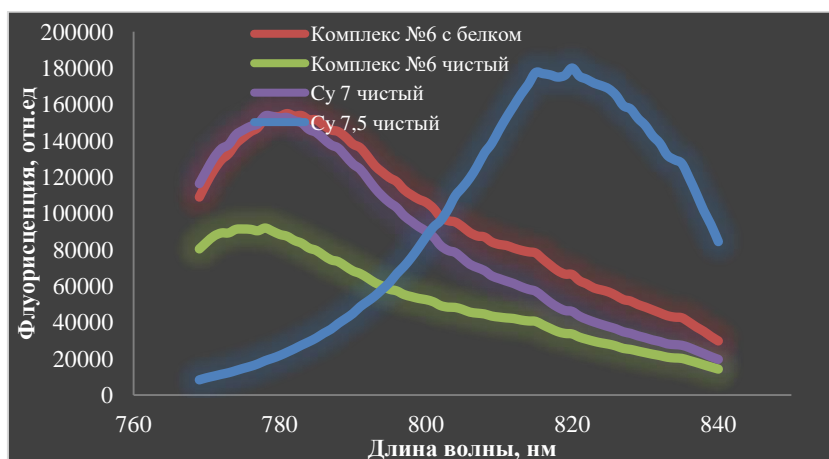


Рисунок 8 – Спектры флуорисценции комплекса красителей № 6 конъюгированные с BSA в сравнении комплексом красителей № 6 растворенных в буфере и отдельно взятые компоненты для каждой смеси

В качестве контроля охарактеризовали смесь красителей, которая не подвергалась конъюгированию. Красители Су 5.5 и 7 показывают лучшую сходимость результатов при пропорциональном увеличении или уменьшении их объемных фаз. Остальные пары красителей 7 и 7.5, 5.5 и 7.5 не показывают наличия двух пиков при их смешивании в одной молекуле-носителе.

В этой связи наибольший интерес представляет системы комплексов № 1 и № 2, обладающие достаточной селективностью к действию белков, а также при молекулярном комплексообразовании повышающее свои флюоресцентные свойства. При рассмотрении заметно, что при конъюгации смеси красителей с

белком наблюдается наибольшая интенсивность флуорисценции. Это может быть связано, с энергетическим переходом электронов с одного уровня на другой, который усиливается за счёт конъюгации с белком. Очевидное наличие двух пиков свидетельствует о том, что комплекс, можно возбуждать двумя длинами волн, что в последствие может быть применимо для мечения наночастиц и обнаружении их в экспериментах как *in vivo*, так и *in vitro*.

Для оценки интернализации субмикронных частиц ватерита, нагруженных красителями Cy 5.5 и Cy 7, были использованы клеточные линии рака молочной железы мыши. В качестве модельной клеточной линии использовалась культура клеток 4T1.

Было продемонстрировано, что интернализация наночастиц в клетки может значительно варьироваться (рисунок 9). Было обнаружено, что некоторые клетки показывают высокую степень интернализации, что может указывать на эффективное проникновение частиц в клетку. В то же время, другие клетки демонстрируют низкую степень интернализации, что может быть связано с неспособностью частиц преодолевать клеточные мембраны или с активными механизмами клеточной защиты. Кроме того, были идентифицированы клетки, в которых не обнаруживалась интернализация частиц вообще, что предполагает наличие специфических барьеров или механизмов отторжения на уровне клеточной мембраны.

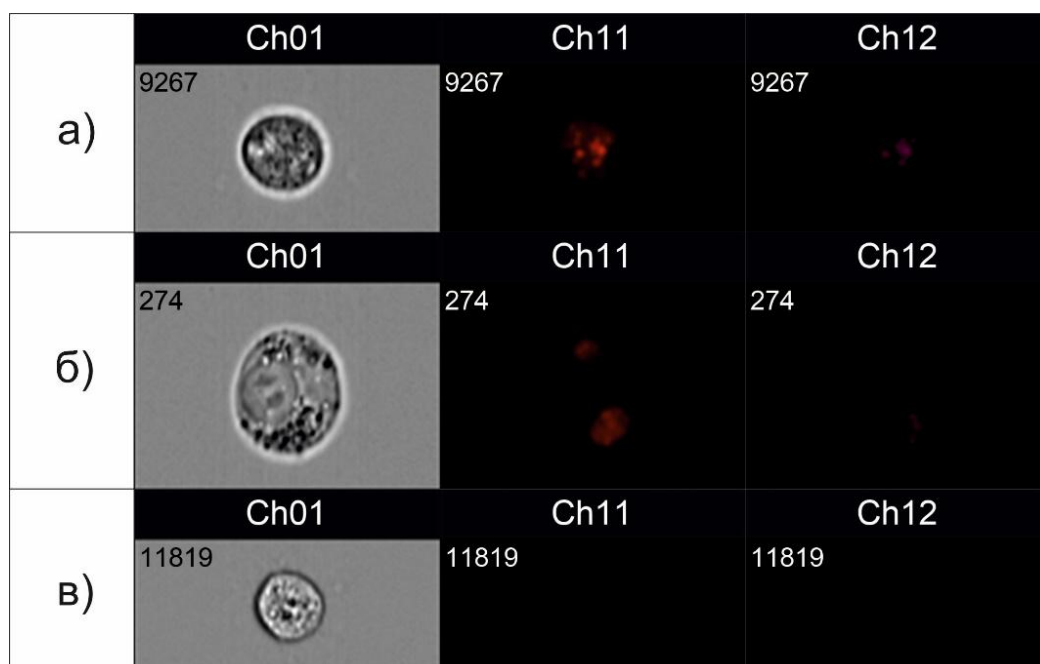


Рисунок 9 – Изображения одиночных клеток 4T1, полученных при помощи цитометра ImageStream X MkII: а – изображение клеток с высокой интернализацией, б – изображение клеток с низкой интернализацией, в – изображение клеток без частиц  $\text{CaCO}_3$

**Заключение.** В процессе выполнения выпускной квалификационной работы были получены следующие основные результаты и сделаны выводы:

- 1) Анализ рентгеновских спектров показал, что перекристаллизации ватерита при раздельном выпадении кальцитовой и магнетитовой фаз не происходит;
- 2) В большом количестве осадков, встречается фаза кальцита и магнетита, что также указывает на то, что процесс перекристаллизации протекает в условиях, близких к условиям культивирования клеток *in vitro*;
- 3) Красители Су 5.5 и 7 показывают лучшую сходимость результатов при пропорциональном увеличении или уменьшении их объемных фаз;
- 4) Остальные пары красителей 7 и 7.5, 5.5 и 7.5 не показывают наличия двух пиков при их смешивании в одной молекуле-носителе;
- 5) Некоторые клетки показывают высокую степень интернализации, что может указывать на эффективное проникновение частиц в клетку, когда в то же время, другие клетки демонстрируют низкую степень интернализации,

что может быть связано с неспособностью частиц преодолевать клеточные мембраны или с активными механизмами клеточной защиты;

б) Частицы, меченные красителем Cy 5,5, продемонстрировали яркую флуоресценцию, что свидетельствует об их высокой фотостабильности и эффективности в качестве флуоресцентных маркеров.

#### **Список использованных источников**

1 Галиуллина, Л. Ф. Принципы и системы адресной доставки лекарственных средств : учебное пособие / Л. Ф. Галиуллина. – Казань : Издательство Казанского университета, 2021. – 172 с.

2 Matsumura, Y. A new concept for macromolecular therapies in cancer chemotherapy: mechanisms of tumor tropic accumulation of proteins and the antitumor agents smancs / Y. Matsumura // *Cancer Res.* – 1986. – V. 6. – P. 6397-6392.

3 Hutchens, M. Application of bioluminescence imaging to the study of infectious diseases / M. Hutchens, G. Luker // *Cellular Microbiology.* – 2007. – V. 9, № 10. – P. 2315-2322.

4 Schmidt, S. Microparticulate biomolecules by mild  $\text{CaCO}_3$  templating / S. Schmidt, D. Volodkin // *J. Mater Chem. B.* – 2013. – V. 1. – P. 1210-1218.

5 Yashchenok, A. Polyelectrolyte multilayer microcapsules templated on spherical, elliptical and square calcium carbonate particles / A. Yashchenok [et al.] // *Journal of Materials Chemistry B.* – 2013. – V. 1, № 9. – P. 1223-1228.

6 Флуоресценция в биологических исследованиях [Электронный ресурс] : свободная энциклопедия / текст доступен по лицензии Creative Commons Attribution-ShareAlike ; Wikimedia Foundation, Inc, некоммерческой организации. – Электрон. дан. (1721205 статей, 6563612 страниц, 230928 загруженных файлов). – Wikipedia®, 2001-2024. – URL: <https://ru.wikipedia.org/wiki/> (дата обращения: 26.04.2023). – Загл. с экрана. – Последнее изменение страницы: 6:31, 26 ноября 2022 – Яз. рус.

7 Хайдуков, С. В. Проточная цитометрия как современный метод анализа в биологии и медицине / С. В. Хайдуков, А. В. Зурочка // Медицинская иммунология. – 2007. – Т. 9, № 4-5. – С. 373-378.

8 Croy, S. R. Kwon G. S. Polymeric micelles for drug delivery / S. R. Croy, G. S. Kwon // Current pharmaceutical design. – 2006. – V. 12, № 36. – P. 4669-4684.

9 MalekiDizaj, S. Calcium carbonate nanoparticles as cancer drug delivery system / S. MalekiDizaj, [et al.] // Expert opinion on drug delivery. – 2015. – V. 12, № 10. – P. 1649-1660.

10 Kalinova, A. E. Recrystallization of  $\text{CaCO}_3$  submicron magnetic particles in biological media / A. E. Kalinova // Izvestiya of Saratov University. Physics. – 2023. – V. 23, I. 4. – С. 371-377.