

Министерство образования и науки Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

**ФИЗИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ АДРЕСАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЖИВЫХ СИСТЕМАХ С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОНОСИТЕЛЕЙ**

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД ОБ ОСНОВНЫХ РЕЗУЛЬТАТАХ ПОДГОТОВЛЕННОЙ
НАУЧНО-КВАЛИФИКАЦИОННОЙ РАБОТЫ (ДИССЕРТАЦИИ)

аспиранта 4 года обучения

направление подготовки 06.06.01 – «Биологические науки»

физического факультета

Курочкина Максима Андреевича

Научный руководитель

доцент кафедры оптики и биофотоники

к.ф.-м.н., доцент

_____ Федосов И.В.

Саратов 2018

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Одной из актуальных задач современной медицины XXI века является развитие персонализированных методов профилактики, диагностики и лечения патологических состояний. Задачи персонализированной медицины неразрывно связаны с развитием различных полимерных интеллектуальных систем доставки биологически активных веществ. В настоящее время полимерные носители широко используются в биомедицинских приложениях, таких как адресная доставка лекарственных средств, репродуктивная и регенеративная медицина, антибактериальная и противораковая терапия, тканевая инженерия, а также для задач контроля экспрессии генов клеточных культур. Существует широкий спектр целевых систем доставки биологически активных веществ таких, как визикулы гидрогеля, полимерные или липосомальные микрокапсулы для адресации действующих агентов в проблемные зоны биологических тканей (зоны воспаления, злокачественные новообразования и т.д.), позволяющие не только контролируемо высвободить инкапсулированные агенты посредством лазерного, электрического, магнитного, ультразвукового или биохимического воздействия, но и визуализировать целевые участки биологических тканей.

Однако подобные суспензионные микроносители имеют ряд недостатков, связанных с проблемами контроля распределение микроносителей в биологических тканях. Применение магнитных наночастиц для функционализации микрокапсул позволяет неинвазивно концентрировать магнитные микрокапсулы в целевой области биологической ткани *in vivo*, под действием внешнего градиентного магнитного поля.

Целью данного исследования является разработка и апробация методов неинвазивной адресации, и активации полимерных микроносителей в живых системах.

Основными задачами данной работы являются:

1. Разработка и апробация физических методов визуализации и магнитного захвата, полимерных полислойных флуоресцентных микрокапсул, функционализированных магнитными наночастицами, в разветвлённых сетях кровеносных сосудов брыжейки крысы.
2. Разработка и апробация методов магнитного захвата модельных клеток МА-104, поглотивших магнитные флуоресцентные полислойные микрокапсулы, для формирования жизнеспособной клеточной колонии в стеклянном фантоме кровеносного сосуда.

3. Разработка не инвазивных оптических методов визуализации динамики микропотоков крови разветвлённой сети сосудов методами адаптивного корреляционного PIV анализа (Particle Image Velocimetry) для задач анализа движения полимерных/клеточных носителей.
4. Разработка методов фототермической лазерной активации полимерной трёхмерных микроструктурированных плёнки, с массивом микроконтейнеров на её поверхности, при помощи оптического многомодового волокна в фантоме мягких тканей на основе агарозного геля.
5. In-situ лазерная ИК активация клеточной подложки на основе полимерной трёхмерных микроструктурированной плёнки, с массивом микроконтейнеров на её поверхности, для доксициулин-индуцированной активации ЗФБ (Enhanced Green Fluorescence Protein) экспрессии единичных клеток.

Объектом исследования являются полимерные полислоиные микрокапсулы и полимерные трёхмерные микроструктурированные плёнки.

Предмет исследования:

- Полимерные полислоиные флуоресцентные PSS\PAH микрокапсулы
- Зависимость количества захваченных магнитных микрокапсул в потоке крови от величины магнитной индукции поля.
- Разветвлённая сеть сосудов куриного эмбриона
- Полимерные трёхмерные микроструктурированные плёнки, с массивом полых микроконтейнеров на их поверхности.

Методология и методы исследования.

Метод полиионной сборки альтернативно заряженных полиэлектролитных слоёв широко применяется для синтеза полимерных функциональных самоорганизующихся систем таких, как полислоиные плёнки и полислоиные микрокапсулы. Метод полиионной сборки позволяет варьировать в широком диапазоне толщину (жесткость и проницаемость) и состав, стенки полимерных носителей, а также функционализировать полислоиные системы магнитными частицами, флуоресцентными красителями, флуоресцентными частицами (квантовые и карбоновые точки) и металлическими наночастицами (золото, серебро). В результате, достигается возможность управлять физико-химическими свойствами полимерных полислоиных систем посредством внешних электромагнитных полей.

Метод PIV заключается в визуализации распределения мгновенной скорости потока жидкости путем анализа двух и более последовательно зарегистрированных изображений перемещающихся в частиц-трассеров. Трассеры, как правило, не различимы между собой, поэтому для оценки локальной скорости потока используется среднее смещение группы трассеров в пределах некоторой области конечного размера, именуемая «расчетная область» (РО). Наиболее распространенным способом при этом является оценка взаимной корреляционной функции изображений одной и той же расчетной области, зарегистрированных в два последовательных момента времени. Смещение максимума корреляционной функции соответствует среднему по расчетной области перемещению частиц в плоскости изображения, и, следовательно, средней скорости потока.

Достоверность полученных результатов обеспечивается применением современных методов исследования таких, как оптическая флуоресцентная микроскопия, оптическая конфокальная флуоресцентная микроскопия, сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ). Основные результаты диссертационной работы были опубликованы в высокорейтинговых научных журналах, пройдя независимую экспертную оценку (ACS applied materials & interfaces – IF – 7.504; Journal of Controlled Release IF – 7.786). Представленные результаты находятся в соответствии с результатами, полученными другими авторами, работающими в области нано- и биомедицинских технологий.

Научная новизна работы:

1. В данном исследовании впервые была реализована методика адресации флуоресцентных полислойных микрокапсул в потоке крови *in-vivo* при помощи электромагнитного пинцета в пределах выбранного сосудистого сегмента васкулатурной сети.
2. Реализована методика магнитного захвата модельных клеток МА-104, поглотивших магнитные флуоресцентные полислойные микрокапсулы, в стеклянном фантоме кровеносного сосуда. В результате была сформирована жизнеспособная клеточная колония в месте неразрушающего магнитного воздействия.
3. Разработана безмаркерная методика визуализации сосудистых сетей на основе кросс-корреляционных алгоритмов для построения карт скоростей крови в сосудистых сетях. Разработаны оригинальные алгоритмы стабилизации

- изображений сосудистых сетей. Разработана методика маскирования границ сосудов на основе методов локальной бинаризации яркостных картин сосудов.
4. Разработана методика фототермической активации полимерной трёхмерных микроструктурированной плёнки, с массивом микроконтейнеров на её поверхности, при помощи ИК лазерного воздействия через многомодовое оптическое волокно внутри фантома мягких тканей.
 5. Впервые была продемонстрирована система лазерного ИК фототермической активации единичных микроконтейнеров трёхмерных микроструктурированной плёнки, с последующим релизом инкапсулированного доксицилина. Разработана методика доксицилин-индуцированной активации ЗФБ экспрессии единичных клеток, на клеточной подложки, на основе полимерной трёхмерных микроструктурированной плёнки, с массивом микроконтейнеров на её поверхности.

Теоретическая и практическая значимость исследования:

Диссертационная работа выполнена при поддержке следующих научных фондов:

1. Грант Правительства Российской Федерации №14.Z50.31.0004 для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, научных учреждениях государственных академий наук и государственных научных центрах Российской Федерации (исполнитель).
2. Грант РНФ № 16-15-10252 «Разработка технологии мониторинга проницаемости васкулярных барьеров на основе мульти-масштабного анализа переходных процессов по данным оптических методов визуализации» (2016-2018, исполнитель).
3. Проектная часть госзадания в сфере научной деятельности № 3.1586.2017/ПЧ при поддержке Минобрнауки РФ «Квантификация физических закономерностей регуляции кровотока в микроциркуляторной сети методами оптического мониторинга и численного моделирования» (2017-2019, исполнитель).

Научно-квалификационная работа состоит из 6 глав.

Во **Введении** обоснована актуальность темы диссертации, сформулирована её цель и основные задачи, описаны научная новизна и практическая значимость работы, приведены основные положения и результаты, выносимые на защиту, описано краткое содержание, структура и объем диссертации, апробация работы и личный вклад автора.

В **Главе 1** рассмотрены полимерные полислоистые микроносители для задач адресной доставки биологически активных веществ к целевым участкам живых систем.

В **Главе 2** впервые продемонстрирован подход магнитного захвата полислоистых микрокапсул в биологических тканях. Был разработан магнитный пинцет для концентрации микрокапсул в целевых сосудистых сегментах сети сосудов брюжейки крысы.

В **Главе 3** продемонстрирована методика формирования жизнеспособной клеточной колонии в стеклянном канале, посредством магнитной локализации клеток, поглотивших магнитные микрокапсулы, при помощи магнитного пинцета.

В **Главе 4** продемонстрированы оригинальные алгоритмы морфологического анализа кровеносных сетей, а также методы расчета полей скоростей по полученным маскам сети сосудов, методами корреляционного PIV анализа.

В **Главе 5** проведено исследование процессов фототермического лазерного ИК воздействия, на полимерные трёхмерные микроструктурированные плёнки, с массивом полых микроконтейнеров на их поверхности, через многомодовое оптическое волокно, в фантоме мягких тканей.

В **Главе 6** продемонстрирован метод адресации биологически активных веществ к единичным клеткам, при помощи фототермической ИК активации микроструктурированных биополимерных плёнок.

Апробация работы.

Основные результаты работы были представлены на научных семинарах, научных школах, всероссийских и международных конференциях, в том числе: 1. Kurochkin M.A., Timoshina P.A., Fedosov I.V., Tuchin V.V., "STUDY OF THERMAL SOURCE LIGHT SPATIAL COHERENCE" SFM 2011, Saratov State University, Saratov, Russia. 2. Kurochkin M.A., Timoshina P.A., Fedosov I.V., Tuchin V.V., "PARTICLE IMAGE VELOCIMETRY FOR BLOOD MICRO CIRCULATE STUDIES" SFM 2012, Saratov State University, Saratov, Russia. 3. Kurochkin M.A., "СИСТЕМА ДЛЯ ПРИЖИЗНЕННОЙ ЦИФРОВОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ И МИКРОАНЕМОМЕТРИИ КАПИЛЛЯРНОГО КРОВОТОКА" УМНИК, Устный доклад, SSU, Russia, 2013 4. Kurochkin M.A., Fedosov I.V.,

Tuchin V.V.,” REAL TIME PARTICLE IMAGE VELOCIMETRY FOR BLOOD MICROCIRCULATION STUDIES” SFM 2013, Saratov State University, Saratov, Russia. 5.

Kurochkin M.A., Fedosov I.V., Tuchin V.V.,” ADVANCED DIGITAL IMAGE PROCESSING FOR IN VIVO CAPILLARIES NETWORK FLUX ANALYSIS” SFM 2014, Saratov State University, Saratov, Russia. 6. Kurochkin M.A., Timoshina P.A., Fedosov I.V.,

Tuchin V.V.,” Advanced digital image processing for in vivo analysis of blood flow in capillary network,” Asia Communications and Photonics Conference (ACP), China, Shanghai, 2014.

7. Курочкин М.А., Тимошина П.А., Федосов И.В., Тучин В.В.,” Прижизненная цифровая микроскопия для анализа динамики кровотока в сети капилляров,” VII Съезд Российского фотобиологического общества, Россия, пос. Шепси, 2014. 8. Е.С. Стюхина, М.А.

Курочкин, И.В. Федосов, В.В. Тучин, Д.Э. Постнов, «Оценка динамических характеристик капиллярного кровотока методами окклюзионной фотоплетизмографии и капилляроскопии», материалы VII съезда Российского фотобиологического общества, Пущино, 92 (2014). 9. Kurochkin M.A., Fedosov I.V., Tuchin V.V., “Computational side

of micro-circulation assessment by PIV,” Saratov Fall Meeting – SFM’14 Microscopic and Low-Coherence Methods in Biomedical and Non-Biomedical Applications VII, Russia, Saratov, 2015.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные выводы по данной работе заключаются в следующем:

1. Разработана и апробирована методика адресации флуоресцентных полислойных микрокапсул в потоке крови in-vivo при помощи электромагнитного пинцета в пределах выбранного сосудистого сегмента васкулатурной сети. Также было показано, что полислойные микрокапсулы захватывались магнитным пинцетом в сосудистых сетях брыжейки крысы, в зонах с наличием изгибов и ветвлений сосудистых сегментов. Было показано, что в зоне воздействия магнитного поля, после введения в кровотоки, остановки кровотока не произошло.
2. Реализована методика магнитного захвата модельных клеток МА-104, поглотивших магнитные флуоресцентные полислойные микрокапсулы, в стеклянном фантоме кровеносного сосуда. В результате была сформирована жизнеспособная клеточная колония в стеклянном канале, в месте неразрушающего магнитного воздействия.
3. Разработана безмаркерная методика визуализации сосудистых сетей на основе кросс-корреляционных алгоритмов для построения карт скоростей крови в сосудистых сетях. Разработаны оригинальные алгоритмы стабилизации

изображений сосудистых сетей. Разработана методика маскирования границ сосудов на основе методов локальной бинаризации яркостных картин сосудов.

4. Разработана методика фототермической активации полимерной трёхмерной микроструктурированной плёнки, с массивом микроконтейнеров на её поверхности, при помощи ИК лазерного воздействия через многомодовое оптическое волокно внутри фантома мягких тканей.

Публикации автора по теме диссертации в журналах, включенных в перечень ВАК:

Список основных публикации:

1. Voronin, D. V., Sindeeva, O. A., Kurochkin, M. A., Mayorova, O., Fedosov, I. V., Semyachkina-Glushkovskaya, O., ... & Sukhorukov, G. B., In vitro and in vivo visualization and trapping of fluorescent magnetic microcapsules in a bloodstream //ACS applied materials & interfaces. – 2017. – Т. 9. – №. 8. – С. 6885-6893.

2. Gai, M., Kurochkin, M. A., Li, D., Khlebtsov, B. N., Dong, L., Tarakina, N., ... & Sukhorukov, G. B., In-situ NIR-laser mediated bioactive substance delivery to single cell for EGFP expression based on biocompatible microchamber-arrays //Journal of Controlled Release. – 2018. – Т. 276. – С. 84-92.

3. Е. С. Стюхина, М. А. Курочкин, И. В. Федосов, Д. Э. Постнов, Лазер-индуцированные сосудодвигательные реакции на хориоаллантаимной мембране // Изв. Саратов. ун-та. Нов. сер. Сер. Химия. Биология. Экология. 2018. Т. 18, вып. 1. С. 71–77. DOI: 10.18500/1816-9775-2018-18-1-4-8.

4. Kurochkin, M. A., Stiukhina, E. S., Fedosov, I. V., & Tuchin, V. V., Blood flow velocity measurements in chicken embryo vascular network via PIV approach //Saratov Fall Meeting 2017: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XIX. – International Society for Optics and Photonics, 2018. – Т. 10716. – С. 107160H.

5. Kurochkin M. A., Stiukhina, E. S., Fedosov, I. V., & Tuchin, V. V., Micro-PIV quantification of capillary blood flow redistribution caused by laser-assisted vascular occlusion //Saratov Fall Meeting 2015: Third International Symposium on Optics and Biophotonics and Seventh Finnish-Russian Photonics and Laser Symposium (PALS). – International Society for Optics and Photonics, 2016. – Т. 9917. – С. 99171T.

6. Kurochkin M. A., Stiukhina, E. S., Fedosov, I. V., & Tuchin, V. V., Advanced digital methods for blood flow flux analysis using μ PIV approach //Saratov Fall Meeting 2014: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XVI; Laser Physics and Photonics

XVI; and Computational Biophysics. – International Society for Optics and Photonics, 2015. – Т. 9448. – С. 94481A.

7. Kurochkin M. A., Fedosov I. V., Tuchin V. V. In-vivo study of blood flow in capillaries using μ PIV method //Saratov Fall Meeting 2013: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XV; and Laser Physics and Photonics XV. – International Society for Optics and Photonics, 2014. – Т. 9031. – С. 903107.

8. Stiukhina, E. S., Kurochkin, M. A., Klochkov, V. A., Fedosov, I. V., & Postnov, D. E. Tissue perfusability assessment from capillary velocimetry data via the multicompartiment Windkessel model //Saratov Fall Meeting 2014: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XVI; Laser Physics and Photonics XVI; and Computational Biophysics. – International Society for Optics and Photonics, 2015. – Т. 9448. – С. 94481K.

9. Kurochkin, M. A., Stiukhina, E. S., Fedosov, I. V., & Tuchin, V. V. Adaptive μ PIV for visualization of capillary network microcirculation using Niblack local binarization //Saratov Fall Meeting 2016: Optical Technologies in Biophysics and Medicine XVIII. – International Society for Optics and Photonics, 2017. – Т. 10336. – С. 103360W.

10. Postnikov, E. B., Tsoy, M. O., Kurochkin, M. A., & Postnov, D. E. A fast method for the detection of vascular structure in images, based on the continuous wavelet transform with the Morlet wavelet having a low central frequency //Saratov Fall Meeting 2016: Laser Physics and Photonics XVII; and Computational Biophysics and Analysis of Biomedical Data III. – International Society for Optics and Photonics, 2017. – Т. 10337. – С. 103370X.

11. Stiukhina, E. S., Kurochkin, M. A., Fedosov, I. V., & Postnov, D. E. Highly localized laser-induced vascular responses //Saratov Fall Meeting 2017: Laser Physics and Photonics XVIII; and Computational Biophysics and Analysis of Biomedical Data IV. – International Society for Optics and Photonics, 2018. – Т. 10717. – С. 107171Z.

Патенты, авторские свидетельства:

Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ №2015615618 «Цифровой анализ динамики кровотока в нативных капиллярных сетях». Авторы: Курочкин Максим Андреевич (аспирант), Федосов Иван Владленович, Тучин Валерий Викторович. Заявка №2015612476, дата поступления 31 марта 2015г., дата регистрации 21 мая 2015г.

Программа ЭВМ «аСА2040» авторов Курочкина М.А. (аспирант), Федосова И.В., Тучина В.В., в созданной в рамках выполнения гос. контракта № 3.1340.2014/К от 01.07.2014 г., гос. заказчик Минобрнауки РФ, НИР «Эндотелий», заявитель ФГБОУ ВПО СГУ им. Н.Г. Чернышевского. Исх. № 94 от «28» сентября 2015г.

Программа ЭВМ «Velocity measurement» авторов Курочкина М.А. (аспирант), Федосова И.В., Тучина В.В., в созданной в рамках выполнения гос. контракта № 3.1340.2014/К от 01.07.2014 г., гос. заказчик Минобрнауки РФ, НИР «Эндотелий», заявитель ФГБОУ ВПО СГУ им. Н.Г. Чернышевского. Исх. № 91 от «28» сентября 2015г.