

Министерство образования и науки Российской Федерации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра динамического моделирования и биомедицинской инженерии
наименование кафедры

**Композитные капсулы, чувствительные к ультразвуку,
для in vivo применений**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 461 группы

направления 12.03.04 «Биотехнические системы и технологии»
код и наименование направления

факультета нано- и биомедицинских технологий
наименование факультета

Рудневой Ольги Вячеславовны
фамилия, имя, отчество

Научный руководитель
доцент, к.х.н.
должность, уч. степень, уч. звание


подпись, дата

О. А. Иноземцева
инициалы, фамилия

Зав. кафедрой:
д.ф.-м.н., доцент
должность, уч. степень, уч. звание


дата, подпись

Е.П. Селезнев
инициалы, фамилия

Саратов 2018 г.

Введение. Одной из главных задач современной медицины является разработка новых методов борьбы с раковыми клетками. Создания новых методов терапии, не наносящих вред здоровым клеткам и не приводящих к побочным эффектам, является ключевой проблемой. Одним из перспективных методов является создание систем направленной доставки лекарственных средств. Применение таких систем на практике позволит значительно повысить эффективность лечения за счет их направленного действия, обеспечить пролонгированное поступление веществ в пораженную область, а также снизить общую концентрацию лекарственных препаратов, используемых в ходе терапии, уменьшая, таким образом, токсический эффект на организм в целом.

Использование композитных капсул для направленной доставки лекарственных средств имеет ряд преимуществ. Данные структуры обладают целым рядом универсальных свойств: простота получения, возможность модификации и функционализации их оболочек (например, для дистанционного управления их проницаемостью с помощью ультразвука, лазерного излучения и др.), высокая стабильность в биологических жидкостях, высокая эффективность инкапсуляции биологически активных веществ, биосовместимость и биodeградация. Направленный транспорт таких структур может быть достигнут путем модификации их оболочек молекулами-векторами, например фолатом.

Цель данной работы является формирование композитных микрокапсул для *in vivo* применений, чувствительных к ультразвуковому воздействию.

Основное содержание работы. В настоящее время около 90% смертных случаев происходит в результате метастазирования опухолевых тканей. Под опухолью подразумевают патологический процесс, представленный новообразованной тканью, в которой изменения генетического аппарата клеток приводят к нарушению регуляции

их роста и изменению функций клетки. Опухоли различают доброкачественные и злокачественные.

Доброкачественная опухоль характеризуется медленным ростом, отсутствием склонности к метастазированию. Злокачественная опухоль характеризуется быстрым ростом, также отдельные ее клетки способны к проникновению в соседние ткани с повреждением их структуры, а также распространению в отдаленные органы и ткани по кровеносным и лимфатическим сосудам.

В настоящее время есть множество методов борьбы с опухолью (рисунок 1)



Рисунок 1 - Схема методов лечения рака

Но многие из методов при терапии наносят вред не только раковым, но и здоровым клеткам, и это влечет множественные побочные эффекты. Поэтому одним из перспективных методов является метод направленной доставки лекарств.

Направленный транспорт лекарственных веществ - это транспорт лекарственного вещества в заданную область организма, органа или клетки.

Активная доставка лекарственных препаратов в поврежденные ткани предполагает маркирование поверхности наночастиц антителами или иными распознающими элементами, которые обеспечивают высокоизбирательное связывание наночастиц с антигенами, экспрессирующимися на поверхности поврежденных клеток. Присутствие распознающих молекул на поверхности вектора позволяет ему сконцентрироваться в заданной области (опухоли, очаге воспаления, около зоны ишемии и т. д.) и доставить туда лекарственное вещество. При активной доставке само лекарственное вещество, а чаще средство его доставки (контейнер) модифицируются молекулами, распознающими рецепторы на клетках-мишенях (рисунок 2). Классическим примером являются молекулы фолиевой кислоты, которые активно захватываются клетками опухолей.



Рисунок 2 – Схема адресной доставки

Фолиевая кислота необходима для создания и поддержания в здоровом состоянии новых клеток, поэтому её наличие особенно важно в периоды быстрого развития организма на стадии раннего внутриутробного развития и в раннем детстве. Также в процессе репликации ДНК требуется участие фолиевой кислоты, и нарушение этого процесса увеличивает опасность развития раковых опухолей.

Фолиевая кислота (FA) представляет собой полностью охарактеризованный лиганд, рецептор которого (FR) экспрессируется в различных опухолевых клетках.

Использование композитных капсул в качестве контейнера для направленной доставки лекарственных средств имеет ряд преимуществ.

Данные структуры обладают целым рядом универсальных свойств: простота получения, возможность модификации и функционализации их оболочек.

Композитные капсулы на основе диоксида кремния являются перспективными в качестве контейнера для доставки лекарств. Так диоксид кремния являются одними из наиболее распространенных и широко используемых синтетических материалов применяемых в катализе, зондировании, визуализации и адресной доставке лекарственных средств [1-2]. Преимущества данного материала:

- биосовместимость и биodeградируемость;
- способность удерживать вещества внутри капсул;
- возможность биофункционализации поверхности.

В зависимости от степени пористости, аморфный диоксид кремния может быть загружен активными молекулами различными методами. Если система адресной доставки основана на мезопористом оксиде кремния, то гидрофильные и гидрофобные препараты могут быть размещены внутри пор.

Одним из хорошо разработанных методов формирования диоксида кремния на темлатах является золь – гель процесс — это технология получения материалов, в том числе, наноматериалов, включающая формирование золя с последующим переходом его в гель, то есть в коллоидную систему, состоящую из жидкой дисперсионной среды, заключенной в пространственную сетку, образованную частицами дисперсной фазы. На рисунке 3 приведена схема, иллюстрирующая происходящие в золь-гель системе процессы.



Рисунок 3 – Схема перехода истинного раствора в золь и далее в гель

В золь-гель технологии прекурсор – это вещество, которое при определенных условиях может образовывать полимолекулы, полисольватированные группы, мицеллы, из которых будут формироваться зародыши наночастиц золя. В качестве прекурсоров могут использоваться практически любые, как правило, гидролизующиеся соединения – в случае кремния – это алкоксиды $\text{Si}(\text{OR})_4$.

Как правило, капсулы на основе диоксида кремния загружаются препаратом путем его диффузии в поры диоксида кремния при выдерживании контейнеров в растворе вещества, которое нужно инкапсулировать. Однако этот способ невозможно применить для инкапсуляции макромолекул, так как они не могут проникнуть в поры из-за своего размера [3].

В качестве темплатов для покрытия диоксидом кремния могут быть использованы пористые частицы карбоната кальция (ватерит), потому что они могут быть загружены различными веществами и легко деградируют в мягких условиях.

Особую актуальность приобретает реализация возможности дистанционного управления проницаемостью оболочек микрокапсул с целью контролируемого высвобождения их содержимого. Управлять проницаемостью капсул можно различными способами, например, воздействием лазерного излучения, переменного магнитного поля, ультразвука и т.д. Для обеспечения чувствительности оболочек микрокапсул к перечисленным воздействиям необходимо ввести в состав их оболочек нанообъекты, чувствительные к тому или иному внешнему воздействию. Например, наличие наночастиц магнетита в структуре оболочки микрокапсул обеспечивает их чувствительность к ультразвуку.

Облучение капсул ультразвуком с целью изменения их проницаемости и высвобождения капсулированного вещества является наиболее перспективным с медицинской точки зрения, так как действие ультразвука на

микрокапсулы является групповым, дистанционным, а ультразвуковая обработка может проводиться локально в определенной области организма.

Результаты экспериментальных исследований. Полученные темплатные частицы характеризовали сканирующей электронной микроскопией (см. рисунок 4). Средний размер темплатных «ядер» составил 4-6 мкм.

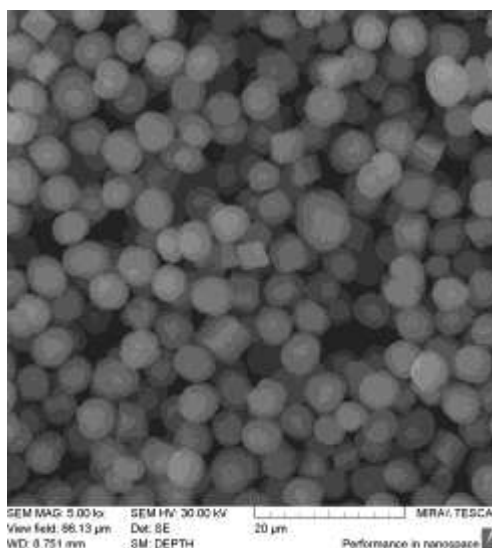


Рисунок 4 - СЭМ изображение микрочастиц карбоната кальция

Далее на поверхность темплатных частиц сорбировали слой поливинилпирролидона (мол. вес. 40 кДа), который служит матрицей для формирования наночастиц диоксида кремния в результате гидролиза силанового прекурсора и их последующего зарастивания в сплошную мезопористую оболочку. После завершения процесса формирования оболочки диоксида кремния темплатные «ядра» растворяли путем комплексообразования ионов кальция с динатриевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) в течение суток.

Затем полученные частицы промывали водой и характеризовали методом сканирующей электронной микроскопии (рисунок 5)

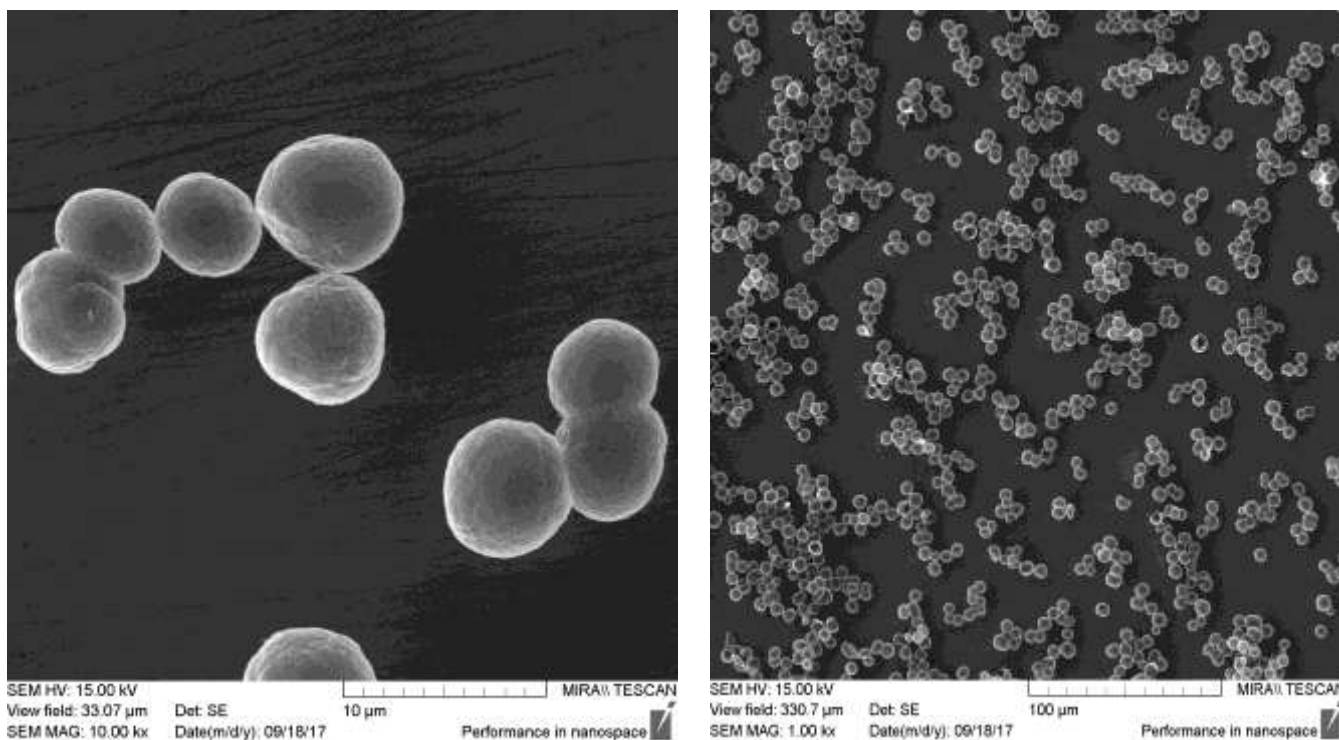


Рисунок 5 – СЭМ изображения микрокапсул

Получение фолат-модифицированных капсул на основе диоксида кремния

Для дальнейшей пришивки фолиевой кислоты необходимо было модифицировать поверхность диоксида кремния амино-группами путем модификации аминоксодержащим кремниевым прекурсором (APTES, аминопропилтриэтоксисиланом). Для контроля пришивки фолата использовали измерения электрокинетического потенциала.

Однако в результате характеристики методом сканирующей электронной микроскопии было замечено, что в образце, полученном в органической среде (через дииклокарбодимид) присутствует кристаллическая примесь, которая не устранилась промывкой (рисунок 6). Проблему удалось решить путем проведения реакции с использованием водорастворимого карбодимида в водной среде.

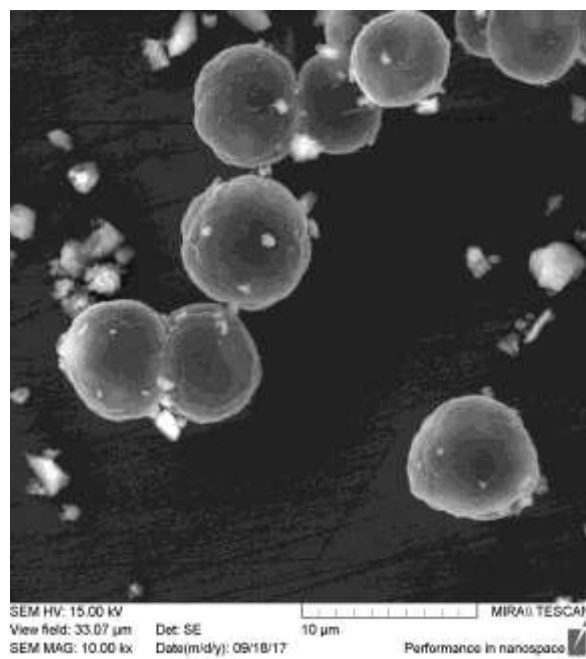
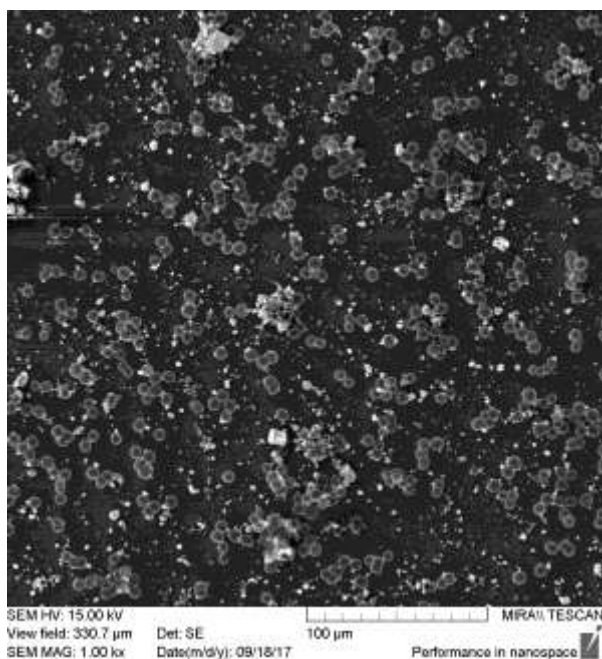


Рисунок 6 - Изображения микрокапсул модифицированных фолатом в органической среде, полученные методом сканирующей электронной микроскопии

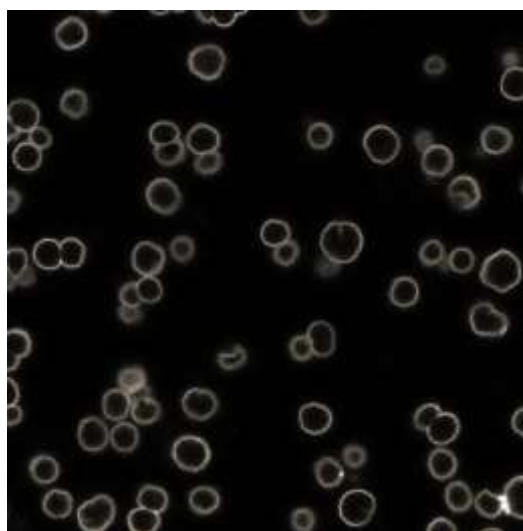


Рисунок 7 - CLSM изображение полученных капсул, модифицированных фолатом

С помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии было продемонстрировано, что полученные капсулы флуоресцируют при возбуждении 405 нм лазером, что объясняется наличием молекул фолата на поверхности частиц (рисунок 7).

Инкапсуляция фотодинамического лекарственного препарата

В ходе выполнения дипломной работы были получены образцы композитных микрокапсулы на основе диоксида кремния, содержащие фотодинамический препарат Холосенс, поверхность которых функционализирована фолиевой кислотой (рисунок 8).

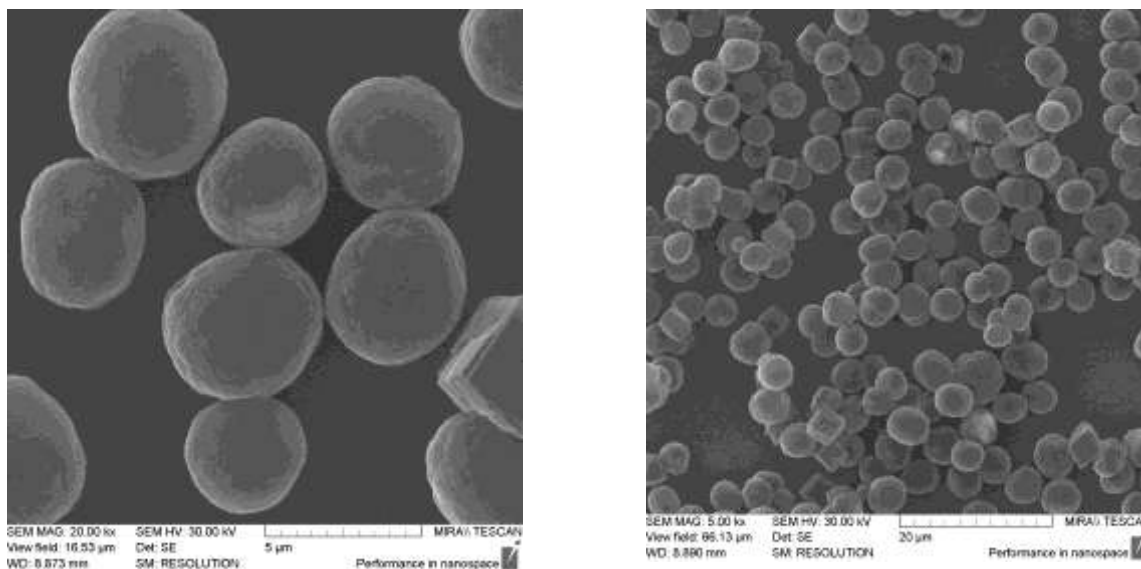


Рисунок 8- Изображения микрокапсул, полученные методом сканирующей электронной микроскопии

Фотодинамический препарат удерживался внутри полученных капсул. Поверхность диоксида кремния модифицировали фолиевой кислотой и окрашивали флуоресцентным красителем TRITC (см. рисунок 9).

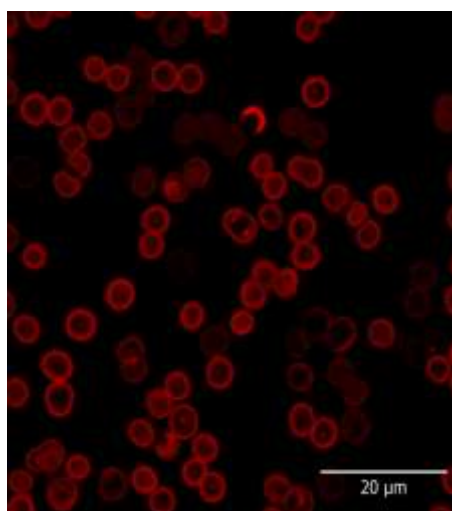


Рисунок 9 – Изображения микрокапсул, полученные методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии

На рисунке 10 представлены интегральные спектры интенсивности флуоресценции микрокапсул, записанные при возбуждении образца лазером 408 нм. Видно, что контрольные капсулы, содержащие TRITC и холосенс, имеют два пика флуоресценции на соответствующих длинах волн 560 нм и 680 нм. В случае капсул, модифицированных фолиевой кислотой, в спектрах добавляется еще один пик флуоресценции в ультрафиолетовой области, соответствующий фолату. Таким образом, мы доказываем, что в наших капсулах присутствуют все использованные в синтезе компоненты – флуоресцентный маркер (TRITC), вектор для доставки (фолат) и лекарство (фотодинамический препарат холосенс).

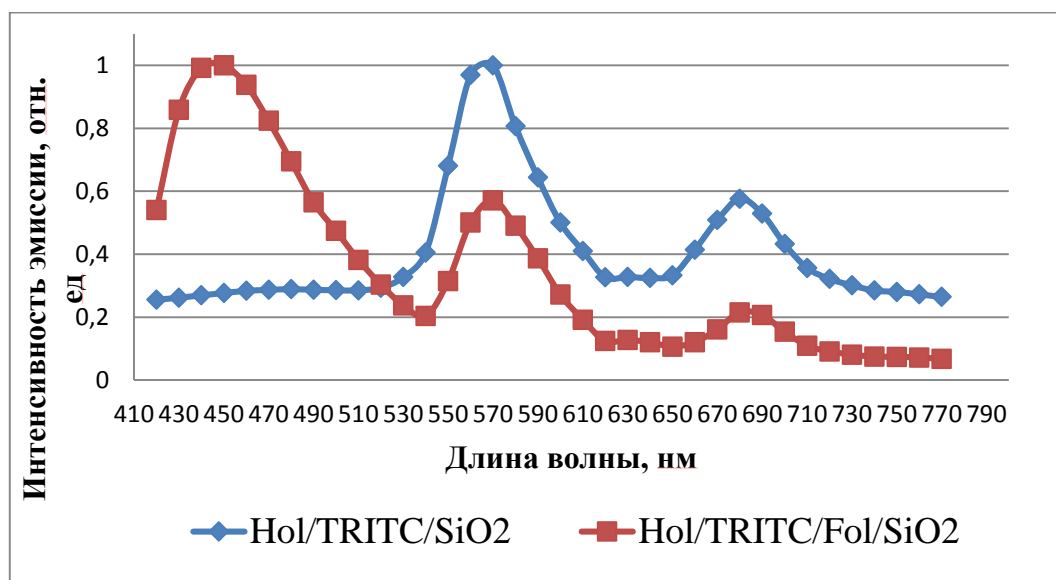


Рисунок 10 - Спектры интенсивности флуоресценции микрокапсул, синим - композитные капсулы на основе диоксида кремния, содержащие холосенс в "ядре" и флуоресцентный краситель (TRITC) в оболочке, красным - композитные капсулы на основе диоксида кремния, содержащие холосенс в "ядре" и флуоресцентный краситель (TRITC) в оболочке, модифицированные фолиевой кислотой

Воздействие на капсулы ультразвуком

Образцы флуоресцентных микрокапсул на основе диоксида кремния были обработаны ультразвуком с целью исследования их чувствительности. Воздействие на капсулы ультразвуком производилось в течение 10 минут.

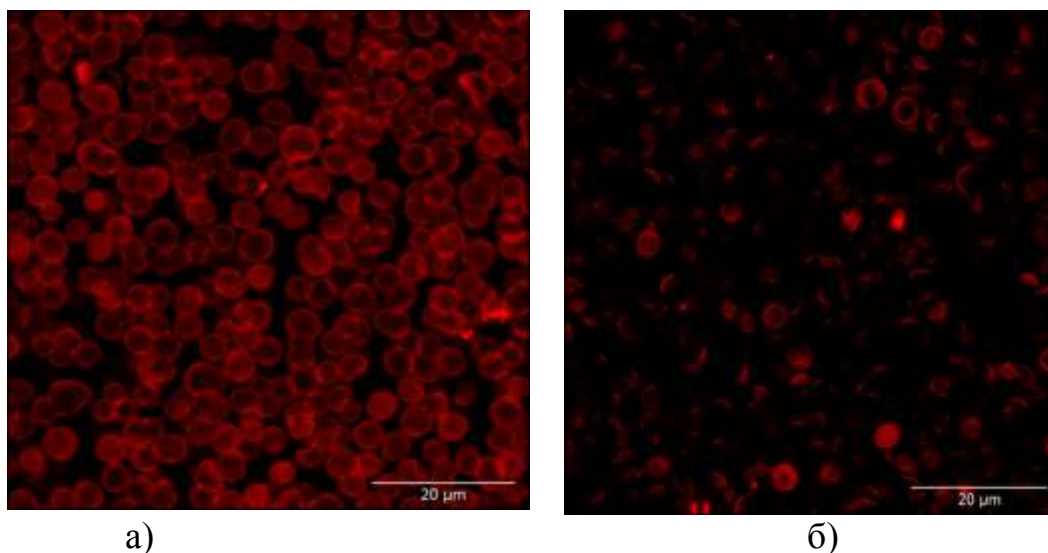


Рисунок 11 - Изображения микрокапсул полученные методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии а) до ультразвукового воздействия, б) после ультразвукового воздействия

Было продемонстрировано, что капсулы на основе диоксида кремния чувствительны к ультразвуку и разрушаются после 10 минут воздействия (рисунок 11).

Заключение. В ходе выполнения работы были получены композитные микрокапсулы, чувствительных к ультразвуковому воздействию для последующих *in vivo* применений.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

- Были получены композитные капсулы на основе диоксида кремния
- Разработана и оптимизирована методика модификации микрокапсул фолиевой кислотой в качестве вектора доставки
- Проведена инкапсуляция лекарственного фотодинамического препарата Холосенс в полученные микрокапсулы на основе диоксида кремния.
- Полученные капсулы были охарактеризованы методами сканирующей электронной микроскопии (SEM) и конфокальной лазерной сканирующей микроскопии.
- Было произведено воздействие ультразвукового излучения на полученные капсулы и продемонстрировано разрушение оболочек микрокапсул.

Литература

1. Sanles-Sobrido, M. Design of SERS-encoded, submicron, hollow particles through confined growth of encapsulated metal nanoparticles / M. Sanles-Sobrido, W. Exner, L. Rodriguez-Lorenzo, B. Rodriguez-Gonzalez, M. A. Correa-Duarte, R. A. Alvarez-Puebla, L. M. Liz-Marzan // J. Am. Chem. Soc. 2009. V. 131. P. 2699.
2. Hwang, D. W. Development of quadruple imaging modality using nanoparticle / D. W. Hwang, H. Y. Ko, S. K. Kim, D. Kim, D. S. Lee, S. Kim // Chem. Eur. J. 2009. V. 15. P. 9387.
3. Ott, A. Light-Addressable and Degradable Silica Capsules for Delivery of Molecular Cargo to the Cytosol of Cells / A. Ott, X. Yu, R. Hartmann, J. Rejman, A. Schütz, M. Ochs, W. J. Parak, S. Carregal-Romero // Chemistry of materials. 2015. V. 27. P. 1929–1942.