

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

Кафедра общей и неорганической химии  
наименование кафедры

**Продукты фотодегградации фолиевой кислоты: оптические свойства,  
биологическая активность, инкапсуляция в полиэлектролитные капсулы**

**АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТРСКОЙ РАБОТЫ**

Студента (ки) 2 курса 251 группы

направления 04.04.01 «Химия»

код и наименование направления

Института химии

наименование факультета

Цюпка Дарьи Владиславовны

фамилия, имя, отчество

Научный руководитель

проф. кафедры, д.х.н., проф.  
должность, уч. степень, уч. звание

16.06.21 Тер  
дата, подпись

И.Ю. Горячева  
инициалы, фамилия

Зав. кафедрой:

д.х.н., доцент  
должность, уч. степень, уч. звание

16.06.21 Черк  
дата, подпись

Д.Г. Черкасов  
инициалы, фамилия

Саратов 2021 г.

## Введение

**Актуальность работы.** В последнее десятилетие большой научный интерес был сфокусирован на разработке наноматериалов модифицированных фолиевой кислотой (ФК), которая обладает высокой специфичностью к взаимодействию с фолатными рецепторами клеток. Активность фолатных рецепторов на большинстве опухолевых клеток заметно выше соответствующих значений для нормальных клеток, что позволяет использовать данные материалы для нацеливания на раковые клетки. Получение таких конъюгатов является сложным многостадийным процессом, требующим дополнительной очистки.

Известно, что ФК легко разлагается и очень чувствительна к факторам окружающей среды. Из литературных данных известно, что продукты фотодеградации ФК обладают высоким КВ (Фпт 12%, Кпт 27%) То есть, использование УФ-излучения позволяет получить высокофлуоресцентный фотопродукт.

ФК является доступным реагентом с низкой стоимостью в отличии от 6-карбокситерина (Кпт). Поэтому, получение высокофлуоресцентного Кпт из ФК позволило бы применять его в качестве нацеливающего и визуализирующего агента.

Инкапсуляцией различных молекул и соединений в полиэлектролитные микрокапсулы демонстрирует их широких потенциал для различных биомедицинских приложений. Что позволяет их использовать для загрузки фотопродуктов ФК с целью получения материала, который одновременно обладает высоким связыванием с фолатным рецептором и высокой интенсивностью флуоресценции в качестве эффективной альтернативы существующих нацеливающих и визуализирующих агентов.

**Целью данной работы** является изучение влияния компонентов раствора фотопродуктов фолиевой кислоты на оптические свойства 6-карбокситерина, оценка потребления продуктов фотодеградации фолиевой кислоты и их влияние на прирост раковых клеток HeLa. А также получение полиэлектролитных микрокапсул, подбор условий для оптимальной инкапсуляции

высокофлуоресцентного фотопродукта фолиевой кислоты (6-карбокситерина) и оценка возможности интернализации полученных микрокапсул раковыми клетками HeLa.

**Практическая значимость.** Получение материалов, которые имеют высокую интенсивность флуоресценции и специфичность к фолатным рецепторам клеток позволяет применять их в качестве флуоресцентных меток для нацеленной визуализации раковых клеток и тканей, а также для целевой доставки лекарственных средств.

**Научная новизна** данной работы заключается в изучении и подборе оптимальных условий для применения высокофлуоресцентного фотопродукта ФК для получения полиэлектролитных микрокапсул, которые в дальнейшем могут быть использованы для визуализации клеток.

**Структура и объем работы.** Работа включает в себя введение, 3 основные главы (27 разделов), выводы и заключение, технику безопасности и список используемых источников, состоящий из 93 наименований. Работа изложена на 60 листах, включает 22 рисунка.

## Основное содержание работы

**Во введении** обоснована актуальность темы работы, изложена научная новизна и практическая значимость, сформулированы цель и задачи.

**В первой главе** представлен литературный обзор, в котором описаны факторы, влияющие на деградацию ФК, механизм фотодеградации. Рассмотрены особенности строения ФК и ее оптические свойства, а также продуктов деградации ФК, описана возможность ее использование в качестве нацеливающего агента на раковые клетки. Описаны биологические эффекты ФК и ее продуктов деградации и влияния на живые организмы. Литературный обзор также включает данные о полиэлектролитных микрокапсулах, о способности инкапсуляции различных молекул и соединений различными методами, их преимуществе и применении. Рассмотрены различные материалы, модифицированные ФК, и их недостатки.

**Во второй главе** представлено описание используемого оборудования и реагентов, описаны методы исследования. Представлены методики приготовления используемых растворов; воздействия УФ-света на раствор ФК; оценки потребления продуктов фотодеградации ФК раковыми клетками HeLa; оценки жизнеспособности клеток HeLa; анализа прироста клеток HeLa; синтеза сферических ядер карбоната кальция; получения полиэлектролитных микрокапсул и инкапсуляции веществ; анализа интернализации клеток HeLa.

**В третьей главе** представлено описание результатов экспериментов, полученных в ходе работы.

Для оценки влияния других компонентов на оптические свойства полученного Кпт необходимо провести сравнение со стандартным раствором Кпт и его смеси с ПАБК и ПАБК-Глу. Для этого были зарегистрированы спектры поглощения и флуоресценции растворов ФК, ФК-УФ и стандартов Кпт, ПАБК, Глу, и их смеси в соотношении 1:1 (ПАБК-Глу, ПАБК-Кпт, ПАБК-Глу-Кпт) (рисунок 1 А). Из полученных данных видно, что положение и форма максимума поглощения при 350 нм, характерный для птерина и его производных, аналогичны для всех растворов, кроме ПАБК и ПАБК-Глу. Положение и форма

коротковолнового максимума поглощения для представленных растворов различны. Это связано с присутствием ПАБК-Глу в молекуле ФК и растворе ее фотопродуктов (ФК-УФ), которая вносит свой вклад в спектр поглощения. При добавлении ПАБК и ПАБК-Глу к Кпт происходит незначительное уширение максимума при 290 нм в коротковолновую область.

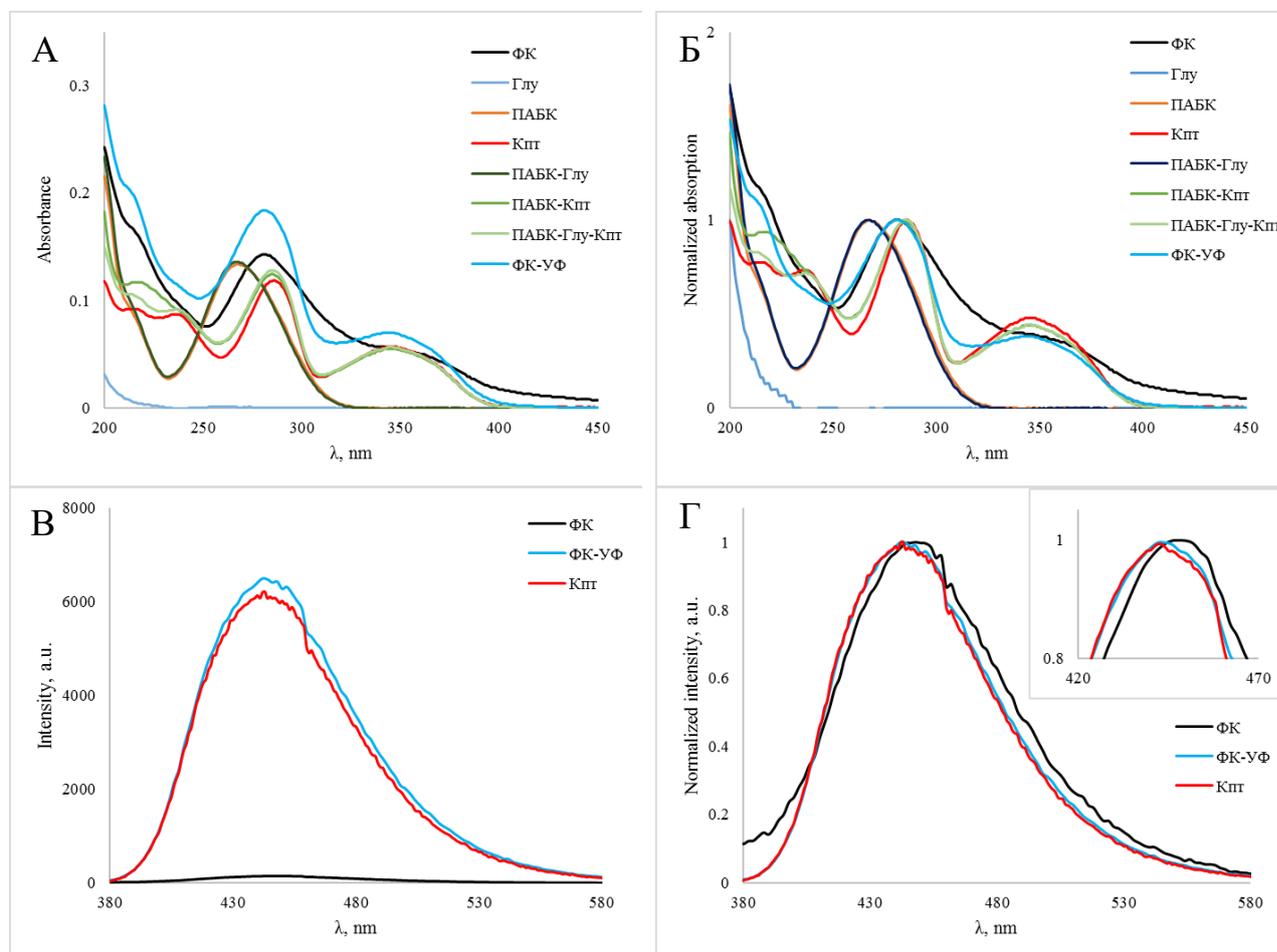


Рисунок 1 – Спектры поглощения (А) и флуоресценции (В) ( $\lambda_{ex}=350\text{nm}$ ) растворов ( $C = 1 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ ). Нормированные спектры поглощения (на максимум при 350 нм) (Б) и флуоресценции (Г) ( $\lambda_{ex}=350\text{nm}$ )

Из полученных спектров флуоресценции видно, что интенсивность флуоресценции растворов Кпт и ФК-УФ отличается не значительно (рисунок 1 В), их КВ составляет  $30 \pm 2 \%$ . Из нормированных спектров флуоресценции (рисунок 10 В) видно, что спектры Кпт и ФК-УФ полностью перекрываются и имеют максимум флуоресценции при 443 нм, что согласуется с литературными данными.

Таким образом, побочные продукты фотодеградации (ПАБК-Глу) ФК не приводят к значительным изменениям флуоресцентных свойств целевого высокофлуоресцентного фотопродукта (Кпт).

Для оценки влияния всех компонентов смеси ФК-УФ на жизнеспособность раковых клеток HeLa был проведен тест с Alamar Blue при времени инкубации 4 и 24 часа.

Из полученных данных (рисунок 2) видно, что после инкубации в течении 4 часов, добавление 5 и 10 об. % ФК-УФ к клеткам не влияет на их жизнеспособность и аналогична результатам контрольного образца (клетки HeLa в RPMI). Различия в результатах анализа после 4 и 24 часов не значительны (в пределах погрешности).

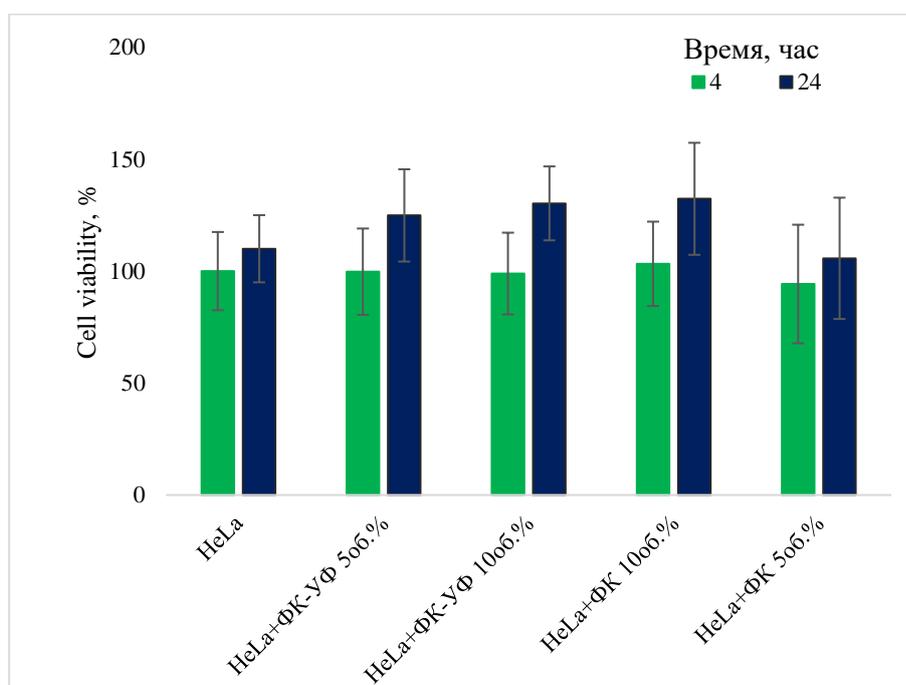


Рисунок 2 – Интенсивность флуоресценции в максимуме ( $\lambda_{em} = 586 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{ex} = 540 \text{ nm}$ ) Alamar Blue для клеток HeLa с образцами ФК с временем инкубации 4 (А) и 24 (Б) часа

Таким образом, продукты фотодеградации ФК не оказывают негативного влияния на жизнеспособность клеток и полученные значения сопоставимы с результатами контрольных образцов (клетки HeLa в RPMI и с ФК). Важно, что смесь фотопродуктов ФК не проявляет токсичных свойств на живые клетки, как и индивидуальные компоненты.

Чтобы исследовать различия между ФК и ФК-УФ в поглощении фолата раковыми клетками HeLa, которое влияет на пролиферацию клеток, оценивали

скорость роста клеток. Для этого изучали рост клеток HeLa в среде RPMI без ФК и с добавлением 5 об. % ФК и ФК-УФ. Из полученных изображений (рисунок 3) видно, что через 24 часа инкубации клеток HeLa их количество увеличилось во всех чашках Петри, но отличается не значительно. Через 48 часов инкубации наблюдается сильный прирост клеток в присутствии ФК и ФК –УФ.

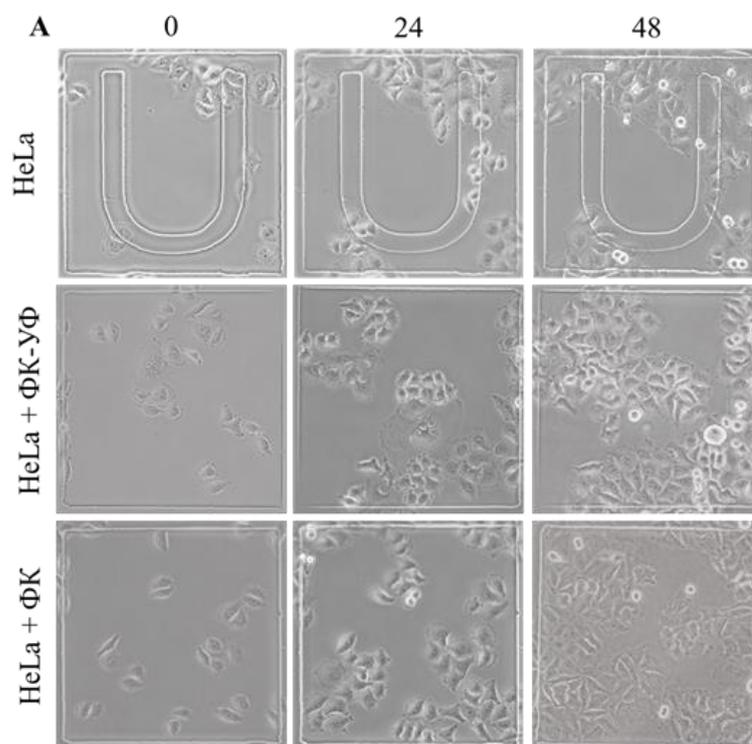


Рисунок 3 - Изображения в светлом поле клеток HeLa после добавления образцов и через 24 и 48 часов инкубации

Проведя статистическую обработку полученных данных о количестве клеток можно сделать вывод, что для клеток, культивируемых в среде без ФК, прирост через 48 часов составляет  $309 \pm 66\%$ . Для клеток, культивируемых в присутствии растворов ФК и ФК-УФ значения прироста сопоставимы и через 48 часов составляют  $589 \pm 141\%$  и  $538 \pm 155\%$  соответственно (рисунок 4).

Таким образом, присутствие ФК и ФК-УФ существенно влияет на процесс деления клеток HeLa, значительно увеличивая их прирост. Следовательно, продукты фотодеградации ФК сохраняют биологические функции ФК и способствует усиленному делению раковых клеток.

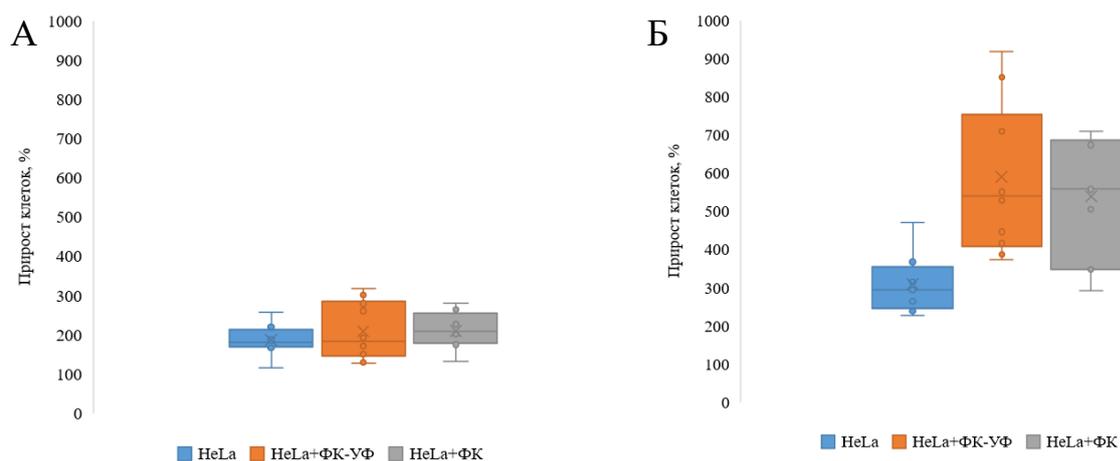


Рисунок 4 - Данные о приросте клеток HeLa после 24 (А) и 48 (Б) часов инкубации, нормализованные к базальному числу

Для изготовления микрокапсул были использованы ядра  $\text{CaCO}_3$  (4-6 мкм) в качестве шаблона для послойной сборки из двух противоположно заряженных полиэлектролитов – PAAH и PSS. Растворение ядра карбоната кальция привело к образованию полиэлектролитных микрокапсул размером 7-10 мкм с внутренней матрицей, состоящей из полиэлектролитного комплекса.

При инкубации микрокапсул в течении трех часов при  $80^\circ\text{C}$  уменьшается проницаемость для различных молекул. Это связано с утолщением стенок и уплотнением оболочек, которое приводит к уменьшению размера микрокапсул до 4-6 мкм. Морфологические изменения при нагревании могут быть использованы для инкапсуляции молекул с различным размером и зарядом, которые могут быть включены в полость капсулы, захватив их из окружающей среды.

Для исследования возможности инкапсуляции ФК и ее продуктов фотодеградации использовали полые микрокапсулы с различным нанесением полимеров на ядра карбоната кальция. Первый слой положительный для получения микрокапсул  $(\text{PAAH/PSS})_4$  или отрицательный для  $(\text{PSS/PAAH})_4$ .

Различий между инкапсулированными и пустыми микрокапсулами во всех флуоресцентных каналах не наблюдается, т.к. ФК имеет низкий КВ флуоресценции (рисунок 5).

После термической инкубации большая часть микрокапсул  $(\text{PSS/PAAH})_4$  осталась не сформированной и деформированной. При инкубации  $(\text{PSS/PAAH})_4$  с

ФК все микрокапсулы сформированы, возможно это связано с тем, что происходит стабилизация поверхностных слоев микрокапсул ФК.

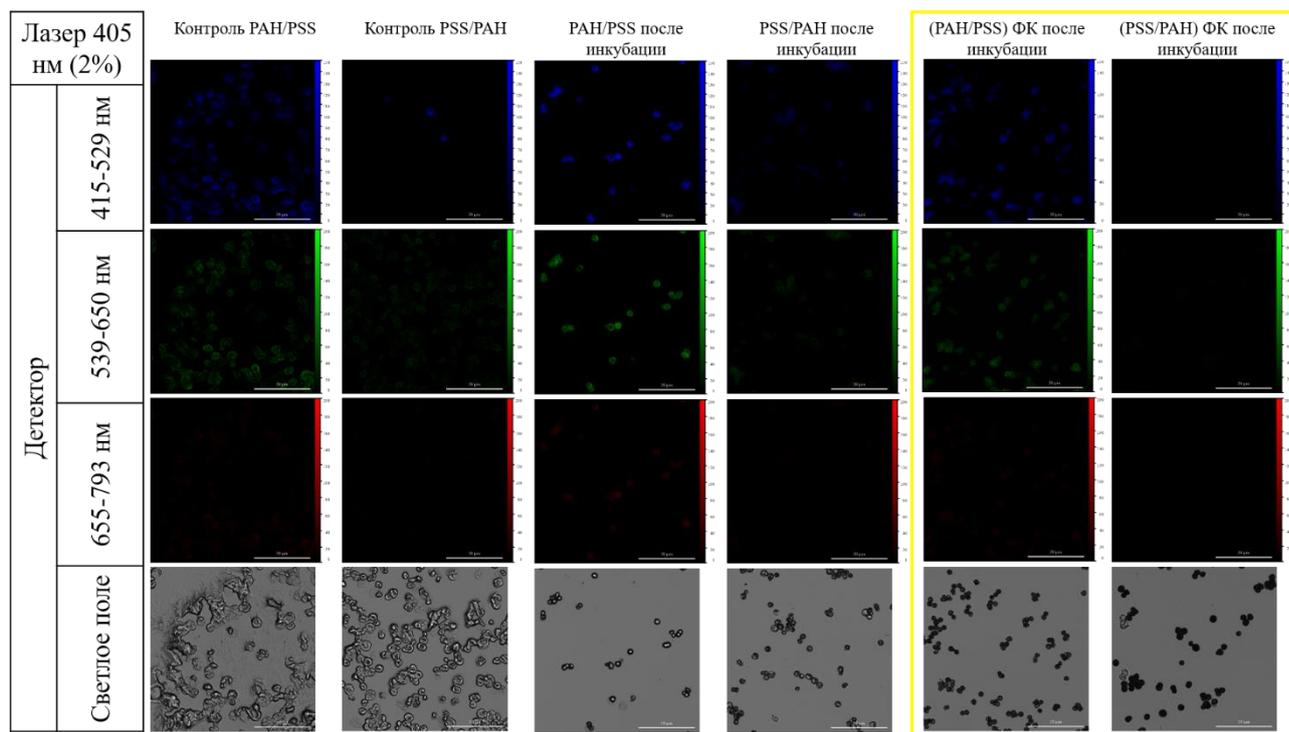


Рисунок 5 – Конфокальные изображения микрокапсул (PAH/PSS)<sub>4</sub> и (PSS/PAH)<sub>4</sub> без термообработки и после инкубации при 80 °С в течении 3 часов без загрузки и с ФК в светлом поле, синем, зеленом и красном канале

На изображениях в светлом поле видно, что в микрокапсулы (PAH/PSS)<sub>4</sub> и (PSS/PAH)<sub>4</sub> произошла инкапсуляция ФК, т.к. не наблюдается внутренняя полость микрокапсул, как у пустых микрокапсул. Значительных различий между микрокапсулами с различным нанесением слоев не обнаружено.

Таким образом, невозможно сделать однозначный вывод о предпочтительном выборе слоев (PAH/PSS)<sub>4</sub> или (PSS/PAH)<sub>4</sub> для инкапсуляции ФК. Необходимы более детальные исследования другими методами для оценки загрузки ФК в микрокапсулы.

При использовании (PSS/PAH)<sub>4</sub> для инкапсуляции ФК-УФ наблюдается флуоресценция от фотопродукта ФК (синий канал), но на изображениях (рисунок 6) в светлом поле заметна внутренняя полость микрокапсул. Это свидетельствует о том, что произошла адсорбция молекул ФК-УФ только на поверхности и/или в верхние слои микрокапсулы.

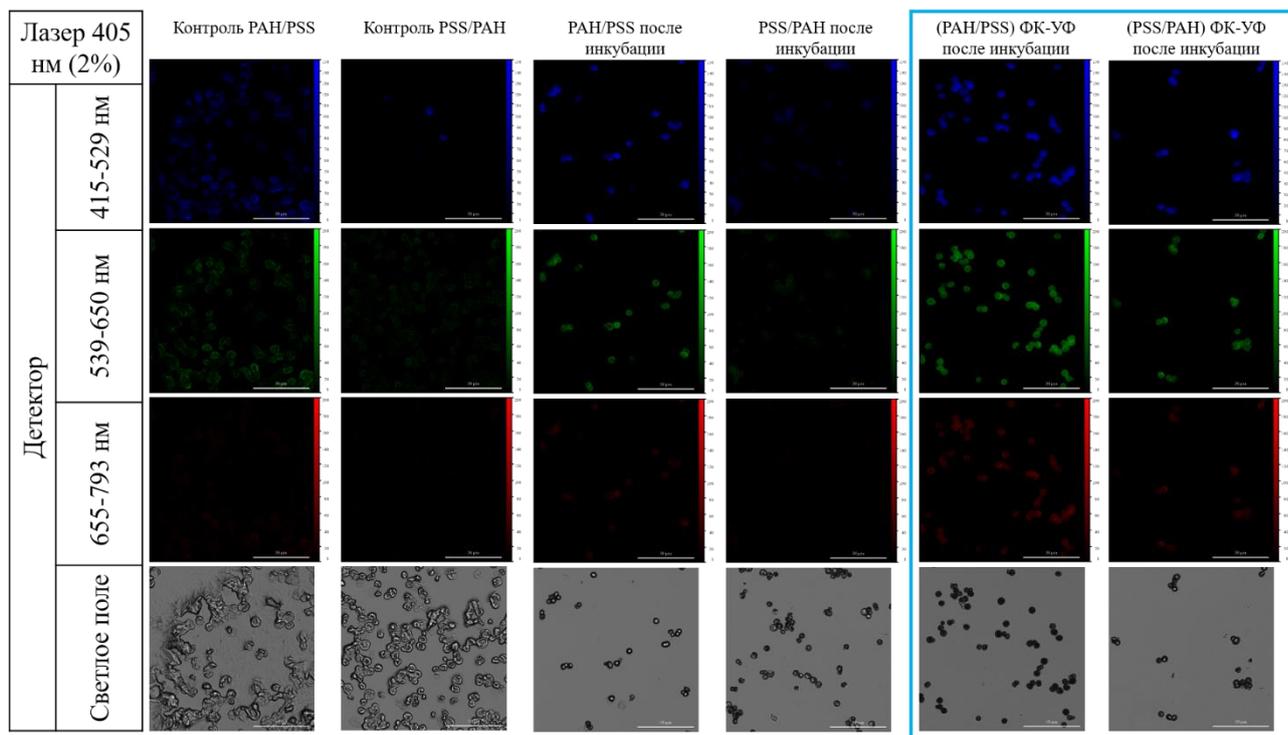


Рисунок 6 - Конфокальные изображения микрокапсул (PAH/PSS)<sub>4</sub> и (PSS/PAH)<sub>4</sub> без термообработки и после инкубации при 80 °С в течении 3 часов без загрузки и с ФК-УФ в светлом поле, синем, зеленом и красном канале

При этом для микрокапсул (PAH/PSS)<sub>4</sub> инкапсулированных ФК-УФ наблюдается более высокая интенсивность флуоресценции по сравнению с (PSS/PAH)<sub>4</sub> загруженными ФК-УФ и пустыми (PAH/PSS)<sub>4</sub>, а также на изображения в светлом поле не наблюдается внутренняя полость микрокапсул. Предположительно это связано с тем, что адсорбцией молекул происходит не только в слое микрокапсулы, но и во внутреннюю полость. Т.е. количество молекул ФК-УФ в (PAH/PSS)<sub>4</sub> значительно больше, чем в (PSS/PAH)<sub>4</sub>.

Таким образом, инкапсуляция высокофлуоресцентного продукта фотодеградации ФК из смеси ФК-УФ преимущественно проходит в микрокапсулы (PAH/PSS)<sub>4</sub>, поэтому в дальнейшем использовались микрокапсулы с нанесением слоев (PAH/PSS)<sub>4</sub>.

Для оценки влияния других компонентов на инкапсуляцию полученного Кпт из ФК-УФ в микрокапсулы (PAH/PSS)<sub>4</sub> необходимо провести сравнение инкапсуляции Кпт из стандартного раствора в аналогичных условиях. Из полученных изображений (рисунок 7) в светлом поле видно, что микрокапсулы

с Кпт аналогичны микрокапсулам с ФК-УФ, т.е. загрузка Кпт происходит в слои и внутреннюю полость микрокапсул (РАН/РSS)<sub>4</sub>.

На конфокальных изображениях в синем и зеленом каналах различия в интенсивности флуоресценции между микрокапсулами с Кпт и ФК-УФ не значительны.

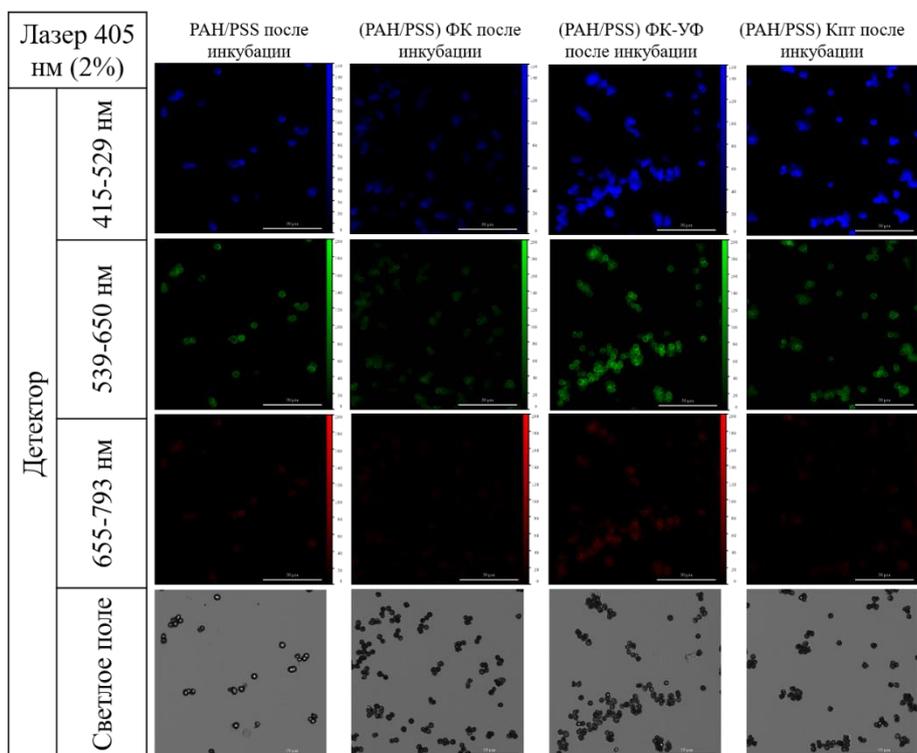


Рисунок 7 - Конфокальные изображения полых микрокапсул (РАН/РSS)<sub>4</sub> после инкубации при 80 °С в течении 3 часов с загрузкой ФК, ФК-УФ и Кпт в светлом поле, синем, зеленом и красном канале

Из полученных данных можно сделать вывод о том, что микрокапсулы (РАН/РSS)<sub>4</sub> с Кпт и ФК-УФ не имеют значительных различий по интенсивности флуоресценции. В связи с этим использование ФК-УФ является наиболее перспективным для инкапсуляции в микрокапсулы (РАН/РSS)<sub>4</sub> благодаря низкой стоимости и доступности ФК.

Таким образом, полученные микрокапсулы (РАН/РSS)<sub>4</sub> с ФК-УФ имеют высокую интенсивность флуоресценции за счет Кпт, на которую не оказывают негативного влияния побочные продукты.

Для изучения захвата полученных микрокапсул клетками HeLa инкубировали клеточную культуру с микрокапсулами в течении 12-ти часов с расчетом 1 микрокапсула на 1 клетку.

Из полученных изображений (рисунок 8) видно, что интернализация микрокапсул (РАН/PSS)<sub>4</sub> с ФК и ФК-УФ происходит аналогично. Для обоих типов микрокапсул наблюдается различная интернализация клетками – без захваченных микрокапсул и до трех штук на клетку. При этом все клетки остаются жизнеспособными, т.к. наблюдается флуоресценция в зеленом канале от красителя, флуоресценция которого появляется только в живых клетках.

При данных параметрах съемки автофлуоресценция клеток не наблюдается (синий канал), при этом микрокапсулы (РАН/PSS)<sub>4</sub> с ФК-УФ имеют высокую интенсивность флуоресценции в синем канале. Что позволяет с легкостью визуализировать клетки с загрузкой.

Таким образом, получение микрокапсул (РАН/PSS)<sub>4</sub> с ФК-УФ является простым и эффективным методом, которые в дальнейшем могут применяться для визуализации живых клеток, не приводя к их гибели. Благодаря высокой интенсивности флуоресценции и не токсичности Кпт его можно эффективно инкапсулировать в микрокапсулы, что позволит использовать их для мониторинга адресной доставки лекарств, также загруженных в микрокапсулы.

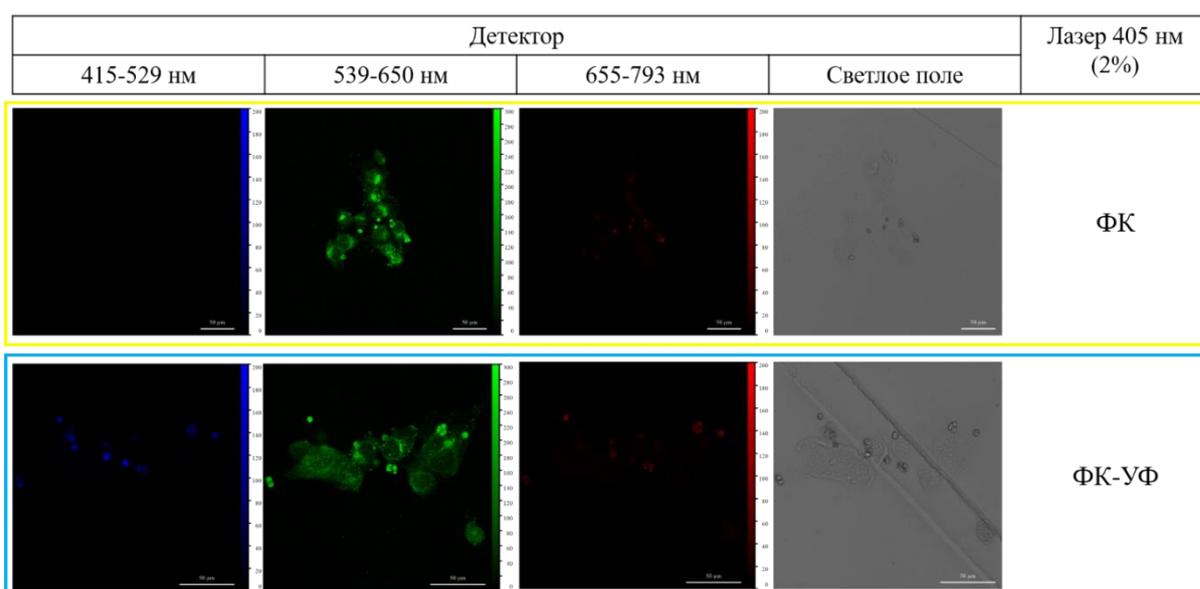


Рисунок 8 - Конфокальные изображения клеток HeLa интернализированных микрокапсулами (РАН/PSS)<sub>4</sub> с загрузкой ФК и ФК-УФ

## Выводы

На основании полученных данных можно сделать выводы:

1. Наличие ПАБК-Глу в растворе ФК-УФ приводит к изменениям в коротковолновом максимуме поглощения и не влияет на интенсивность и форму спектра флуоресценции, тем самым наличие других продуктов фотодегградации ФК не оказывает негативного влияния на дальнейшие исследования.

2. Оценка потребления ФК-УФ раковыми клетками HeLa по разнице в интенсивности флуоресценции до и после инкубации клеток с образцом невозможна, что может быть связано с высокими концентрациями ФК-УФ в питательной среде, поскольку необходимое количество ФК для жизнедеятельности клеток ниже, чем возможно отследить по флуоресценции. Так же интенсивность флуоресценции уменьшается с увеличением времени инкубации для всех образцов, включая контрольные.

3. В результате оценки жизнеспособности раковых клеток HeLa с помощью анализа клеточного окислительно-восстановительного статуса можно сделать вывод, что смесь продуктов фотодегградации ФК не оказывает негативного влияния на жизнеспособность клеток HeLa после 24 часов инкубации.

4. При инкубации клеток HeLa в присутствии ФК и ФК-УФ наблюдается прирост количества клеток, который через 48 часов составляет  $589 \pm 141\%$  и  $538 \pm 155\%$  соответственно. Тогда как в отсутствии ФК и ФК-УФ значение прироста составляет  $309 \pm 66\%$ . Следовательно, присутствие ФК и ФК-УФ существенно влияет на процесс деления клеток HeLa.

5. Инкапсуляция высокофлуоресцентного продукта фотодегградации (Кпт) из смеси ФК-УФ преимущественно проходит в микрокапсулы (РАН/PSS)<sub>4</sub>. Данные микрокапсулы не имеют значительных различий по интенсивности флуоресценции по сравнению с микрокапсулами (РАН/PSS)<sub>4</sub>, инкапсулированными Кпт. Микрокапсулы (РАН/PSS)<sub>4</sub> с ФК-УФ обладают высокой интенсивностью флуоресценции за счет Кпт, на которую не оказывают

негативного влияния побочные продукты ФК-УФ, что Высокая интенсивность позволяет применять их для визуализации живых клеток.

Таким образом, нами был получен высокофлуоресцентный продукт фотодеградации ФК – Кпт, изучено влияние других продуктов в смеси ФК-УФ и питательной среды на оптические свойства Кпт. Полученный раствор ФК-УФ не оказывает негативного влияния на жизнеспособность раковых клеток HeLa. Продукты фотодеградации ФК сохраняют биологические функции ФК и способствуют усиленному делению раковых клеток. Что позволяет инкапсулировать ФК-УФ в полиэлектролитные микрокапсулы (PAA/PSS)<sub>4</sub> и в дальнейшем применять их для визуализации живых клеток и адресной доставки лекарств.

Полученные микрокапсулы (PAA/PSS)<sub>4</sub> с ФК-УФ обладают многими необходимыми требованиями чтобы использовать их для визуализации живых клеток.

### Список используемых источников

- 1 Dántola, M. L. Effect of pterin impurities on the fluorescence and photochemistry of commercial folic acid / M. L. Dántola, M. N. Urrutia, A. H. Thomas // J. Photochem. Photobiol. – 2018. – Vol. 181. – P. 157–163.
- 2 Lucock, M., A critical role for B-vitamin nutrition in human developmental and evolutionary biology / M. Lucock, Z. Yates, T. Glanville, R. Leeming // Nutrition Research. – 2003. – Vol. 23. – P. 1463–1475.
- 3 Bermingham, A. The folic acid biosynthesis pathway in bacteria: evaluation of potential for antibacterial drug discovery / A. Bermingham, J. P. Derrick // BioEssays. – 2002. – Vol. 24. – P. 637–648.
- 4 Heelis, P. F. New Trends in Photobiology: The photo repair of pyrimidine dimers by DNA photolyase model systems / P. F. Heelis, S.-T. Kim, T. Okamura, A. Sancarb // J. Photochem. Photobiol. – 1993. – Vol. 17. – P. 219–228.
- 5 Akhtar, M.J. Identification of photoproducts of folic acid and its degradation pathways in aqueous solution / M.J. Akhtar, M.A. Khan, I. Ahmad // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2003. – Vol. 31. – P. 579–588.
- 6 Heuberger R., Biofunctional polyelectrolyte multilayers and microcapsules: Control of non-specific and bio-specific protein adsorption / Heuberger R., Sukhorukov G., Vörös J., Textor M., Möhwald H. //Advanced Functional Materials. – 2005. – Vol. 15 (3). – P. 357-366.
- 7 Ke C. Y., The folate receptor as a molecular target for tumor-selective radionuclide delivery / Ke C. Y., Mathias C. J., Green M. A. //Nuclear medicine and biology. – 2003. – Vol. 30 (8). – P. 811-817.
- 8 Antipov A. A., Sustained release properties of polyelectrolyte multilayer capsules / Antipov A. A., Sukhorukov G. B., Donath E., Möhwald H. //The Journal of Physical Chemistry B. – 2001. – Vol. 105 (12). – P. 2281-2284.
- 9 Gao H., In situ synthesis of fluorescent carbon dots/polyelectrolyte nanocomposite microcapsules with reduced permeability and ultrasound sensitivity / Gao H., Sapelkin A. V., Titirici M. M., Sukhorukov G. B. //ACS nano. – 2016. – Vol. 10 (10). – P. 9608-9615.