

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

Кафедра физики полупроводников

**Субмикронные минеральные носители для модели гемодиализа и
магнитных взаимодействий**

АФТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студента 2 курса 2252 группы
направления 11.04.04 «Электроника и наноэлектроника»
института физики

Анисимова Романа Андреевича

Научный руководитель:

к.ф.-м.н., доцент

должность, уч. степень, уч. звание

подпись, дата

М.В. Ломова

фамилия, инициалы

Консультант:

мл. науч. сотр.

должность, ученая степень, ученое звание

подпись, дата

П.А. Демина

фамилия, инициалы

Зав. кафедрой физики
полупроводников:

д.ф.-м.н., профессор

должность, ученая степень, ученое звание

подпись, дата

А.И. Михайлов

фамилия, инициалы

Саратов 2021

ВВЕДЕНИЕ

Общая характеристика темы.

Актуальность темы.

Одними из важных задач, связанных с развитием биофизики, медицины и фармакологии является разработка новых протоколов лечения и паллиативной медицины, повышение эффективности диагностики и мониторинга различных заболеваний. Создание новых классов материалов для фильтрации биологических жидкостей является перспективной задачей для решения вопросов, связанных с персонализированной медициной и приложениями фармакологии. Необходимость в получении быстро меняющихся платформ для фильтрации, например, крови, является требованием проведения гемодиализа на современном уровне. Патологические процессы организма, требующие очистки крови, не протекают равноценно у различных людей в связи с наличием спектра сочетанных заболеваний и наличием персональных особенностей. Возможность миниатюризации новых фильтрационных систем обращает нас к поиску субмикронных, легко воспроизводимых технологий вплоть до применений в терапии и паллиативной медицине, исключая нахождение в клинике и стационарах.

Целью данной работы является модификация поверхности квазиэллипсоидных пористых субмикронных частиц карбоната кальция с помощью хелатирования ЭДТА ионов кальция и изучение влияния обработки субмикронных частиц CaCO_3 на их сорбционную емкость. Модификация поверхности субмикронных частиц карбоната кальция может служить хорошей платформой для дальнейших применений в гемодиализе. Помимо биосовместимой, биodeградируемости, не иммуногенности пористость минеральных субмикронных частиц позволяет дополнительно функционализировать поверхность пор с целью локального точечного захвата токсичных веществ.

Модификация поверхности субмикронных частиц CaCO₃

Основой эксперимента явилось хелатирование ЭДТА ионов кальция. Источником ионов кальция были частицы карбоната кальция субмикронного размера. Эксперимент представлял собой растворение синтезированных частиц карбоната кальция в кислотной среде ЭДТА.

Для получения субмикронных частиц CaCO₃ к 4 мг глицерина добавлялось 400 мкл раствора 0.5 М CaCl₂ и 400 мкл раствора 0.5 М Na₂CO₃. После чего раствор перемешивали в течение 1 часа на магнитной мешалке (400 об/мин). После центрифугирования полученной суспензии и удаления жидкой фазы получался твёрдый осадок субмикронных частиц CaCO₃.

Для модификации поверхности субмикронных частиц CaCO₃ использовалась кислотная среда ЭДТА. Концентрация кислоты была в диапазоне от 0.02 М до 0.06 М с шагом 0.02, использовалась рН 6.4 и 7. Частицы CaCO₃ заливались раствором ЭДТА и оставлялись при интенсивном перемешивании на 45 минут.

В таблице 1 показаны размеры субмикронных частиц CaCO₃ в зависимости от значений рН и концентрации раствора ЭДТА, а также, рассчитанная площадь микрочастиц.

Таблица 1 – Размеры частиц карбоната кальция, полученных при различных условиях, и площади их поверхности.

Тип образца	\bar{a} , нм	\bar{b} , нм	$S_{\text{поверх}}$, нм ²
рН 6.4 / 0.02 М	453,9 ± 16,6	295,3 ± 16,6	1503,8 ± 52,7
рН 6.4 / 0.04 М	422,45 ± 19,4	262,9 ± 16,6	1235,2 ± 55,1
рН 6.4 / 0.06 М	441,25 ± 13,8	308,4 ± 16,6	1549,8 ± 49,1
рН 7 / 0.02 М	463,7 ± 18,9	287,75 ± 16,6	1483,1 ± 59,1
рН 7 / 0.04 М	445,5 ± 17,2	281,15 ± 16,6	1396,7 ± 52,8
рН 7 / 0.06 М	465,5 ± 18,2	294,75 ± 16,6	1531 ± 58,5
Без обработки	482 ± 18,2	304 ± 16,6	1633,8 ± 60,1

На рисунке 1 показана зависимость площади поверхности субмикронных частиц после обработки раствором ЭДТА при различных значениях концентрации раствора и pH. Как можно заметить, и для pH 6.4, и для pH 7 при концентрации раствора ЭДТА 0.04 М, площадь поверхности субмикронных частиц CaCO₃ уменьшилась больше всего.

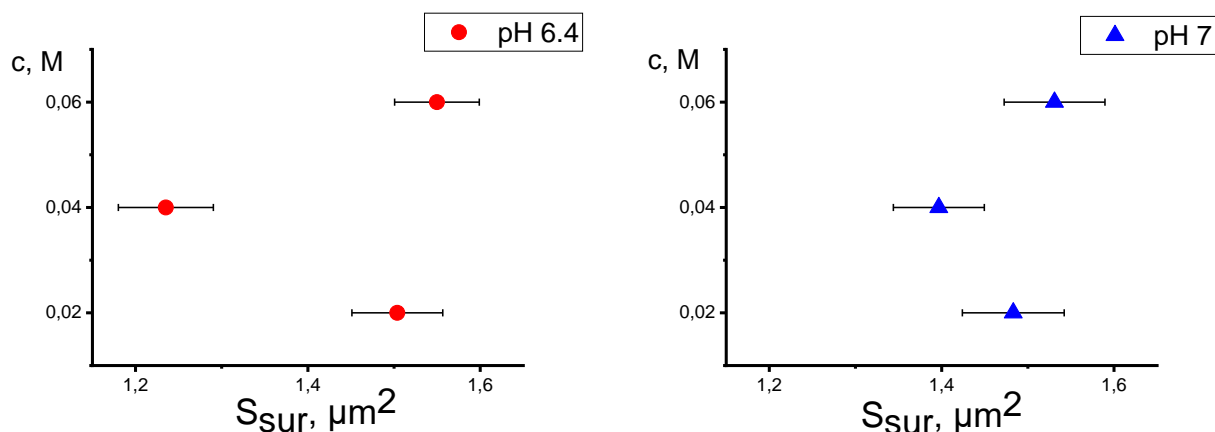


Рисунок 1 – Зависимость площади поверхности субмикронных частиц после обработки раствором ЭДТА при различных значениях концентрации раствора и pH.

Из рисунка 1 видно, что и для pH 6.4, и для pH 7 при концентрации раствора ЭДТА 0.04 М, площадь поверхности частиц CaCO₃ уменьшилась больше всего, для pH 6.4 этот эффект наиболее заметен.

Высвобождение инкапсулированного вещества

Для оценки изменения сорбционной ёмкости частиц CaCO₃ после обработки растворами ЭДТА на частицы адсорбировался флуоресцентно меченный полисахарид FITC-dextran с молекулярной массой 70 кДа и 4 кДа.

За 7 дней происходит полная перекристаллизация частиц ватерита в кальцит, и адсорбированное вещество выходит из частиц. Каждый день собирался супернатант и заново доливалось 500 мкл раствора PBS. На рисунке 2 приведена зависимость массы вышедшего за 7 дней FITC-dextran с молекулярной массой 4 кДа, а на рисунке 3 FITC-dextran с молекулярной массой 70 кДа.

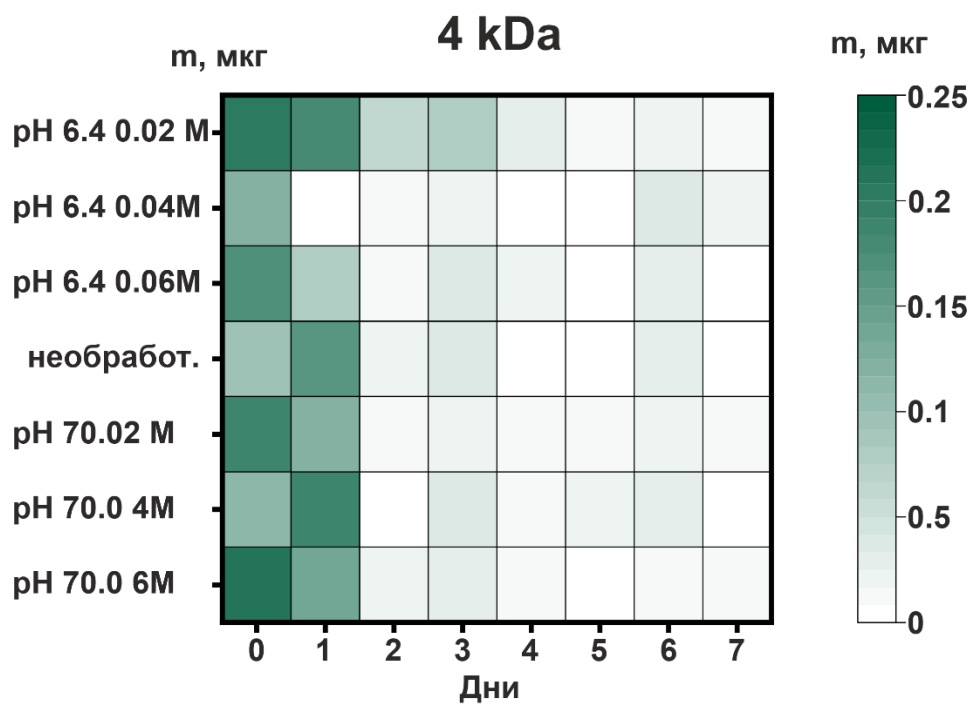


Рисунок 2 – Зависимость массы вышедшего за 7 дней FITC-dextran с молекулярной массой 4 кДа в течении каждого дня.

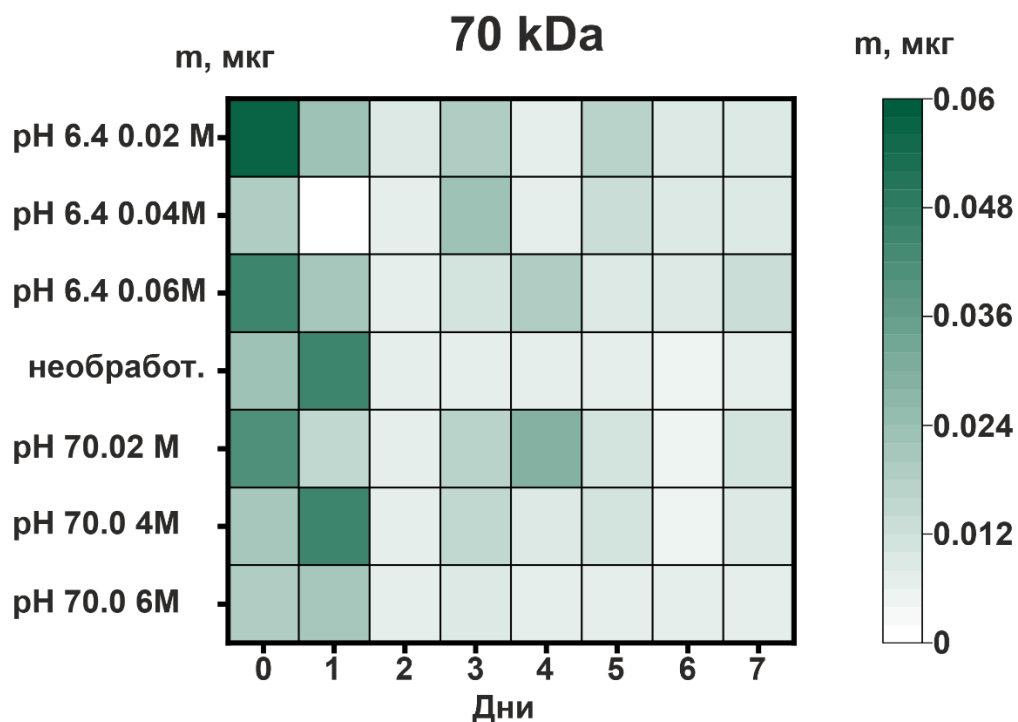


Рисунок 3 – Зависимость массы вышедшего за 7 дней FITC-dextran с молекулярной массой 70 кДа в течении каждого дня.

В таблице 2 показаны значения вышедшего за 7 дней FITC-dextran на 1 мкм² площади частиц.

Таблица 2 – Количество вышедшего за 7 дней FITC-dextran на мкм² площади частиц карбоната кальция, полученных при различных условиях.

	Масса на 1 мкм ² площади, мкг/мкм ²
pH=6.4 / 0.04M	37,8
pH=7 / 0.04M	51,5
pH=7 / 0.02M	42,4
pH=6.4 / 0.02M	49,4
pH=7 / 0.06M	47,4
pH=6.4 / 0.06M	55,4
Без обработки	53,6

Как можно заметить, при обработке субмикронных частиц CaCO₃ раствором ЭДТА с pH 6.4 и концентрацией 0.04 М, они показывают наилучшую сорбционную ёмкость и наилучшим образом удерживают инкапсулированное вещество.

Субмикронные носители для модели гемодиализа

Для модели гемодиализа были использованы субмикронные частицы CaCO₃ обработанные и необработанные в кислотной среде ЭДТА с pH 6.4 и концентрацией 0.04 М. На субмикронные частицы адсорбировался холестерин и общий белок. Для определения содержания холестерина и общего белка использовались наборы биохимических реагентов ДиаВетТест.

Было получено три типа исследуемых образцов: необработанная плазма крови; плазма крови, обработанная субмикронными частицами CaCO₃ после хелатирования ЭДТА концентрацией 0.04 М и pH 6.4; плазма крови, обработанная субмикронными частицами CaCO₃. Кровь была получена у 4 мышей.

На рисунке 4 показано относительное изменение содержания холестерина в крови, содержащей необработанные частицы CaCO₃, и крови, содержащей частицы CaCO₃ обработанные ЭДТА с концентрацией 0.04 М и pH 6.4, по сравнению с необработанной кровью.

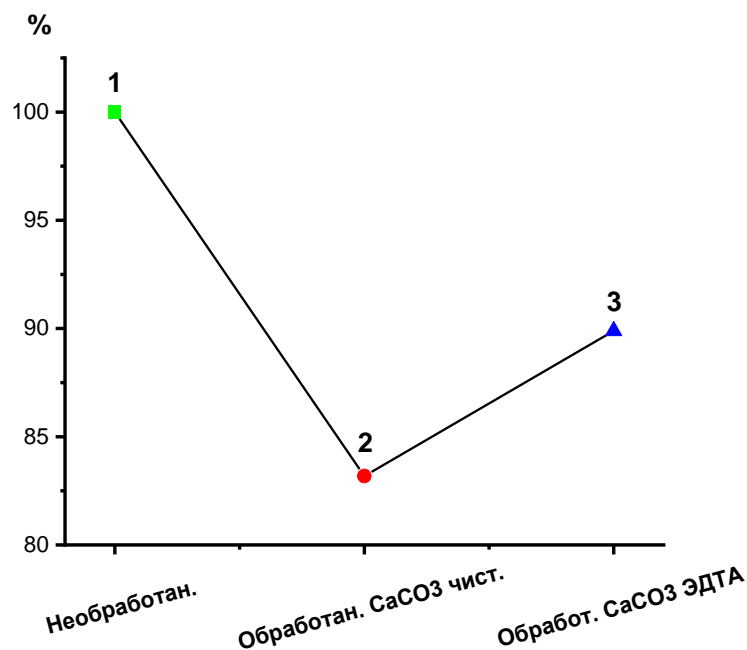


Рисунок 4 – Относительное изменение содержания холестерина в крови, содержащей необработанные частицы CaCO₃ (2), и крови, содержащей частицы CaCO₃ обработанные ЭДТА с концентрацией 0.04 М и рН 6.4 (3), по сравнению с необработанной кровью (1).

После обработки частицами CaCO₃, количество холестерина, содержащееся в крови, уменьшилось. Причём, для частиц, необработанных, этот эффект наиболее выражен, по сравнению с частицами, обработанными ЭДТА с концентрацией 0.04 М и рН 6.4.

На рисунке 6 показано относительное изменение содержания общего белка для крови, содержащей необработанные частицы CaCO₃, и крови, содержащей частицы CaCO₃ обработанные ЭДТА с концентрацией 0.04 М и рН 6.4, по сравнению с необработанной кровью.

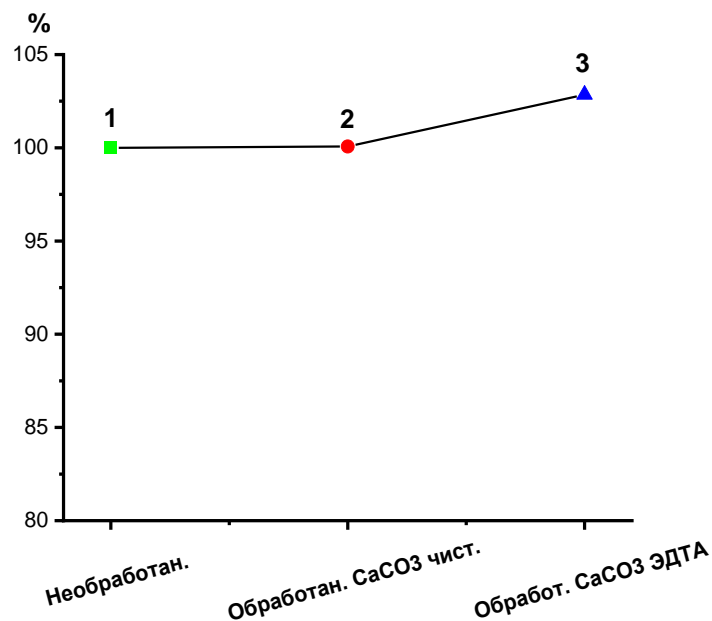


Рисунок 6 – относительное изменение содержания общего белка в крови, содержащей необработанные частицы CaCO₃ (2), и крови, содержащей частицы CaCO₃ обработанные ЭДТА с концентрацией 0.04 М и рН 6.4 (3), по сравнению с необработанной кровью (1).

Содержание общего белка изменяется не сильно. Это может объясняться тем, что типов белков в организме большое количество, и их состав может варьироваться от 466 аминокислот и массы 50 кДа, до 38000 аминокислот и массы 3000–3700 кДа. Поэтому они могут не адсорбироваться на субмикронные частицы CaCO₃, с размером пор от 30 до 50 нм.

Изучение введения в организм мыши субмикронных частицы CaCO₃ с наночастицами магнетита

В бедренную артерию мыши устанавливался катетер. Через него первой контрольной группе мышей вводилось 100 мкл суспензии физиологического раствора и 1.1 мкг частиц CaCO₃, второй группе вводилось 100 мкл физиологического раствора, 1.1 мкг частиц CaCO₃ и 0.7 мкг магнетита. Затем магнитное поле в течении 15 минут фокусировалось на четвёртой молочной железе мыши. После чего магнитное поле выключалось и катетер извлекался, сосуд перетягивался лигатурами выше и ниже области введения, область

операции промакивалась антибиотиком для препятствия возникновения воспалительных процессов.

При помощи автоматического гемоанализатора URIT-3020 были получены анализы венозной крови мыши, до, через 15 минут (сразу после отключения магнитного поля), через 24 часа, через 3 дня, через 5 дней и через 7 дней после введения субмикронных частиц CaCO_3 , и частиц CaCO_3 , содержащих наночастицы магнетита.

На рисунке 7 показаны изменения количества форменных элементов крови (лейкоцитов, эритроцитов, и тромбоцитов) и показатель гемоглобина во времени:

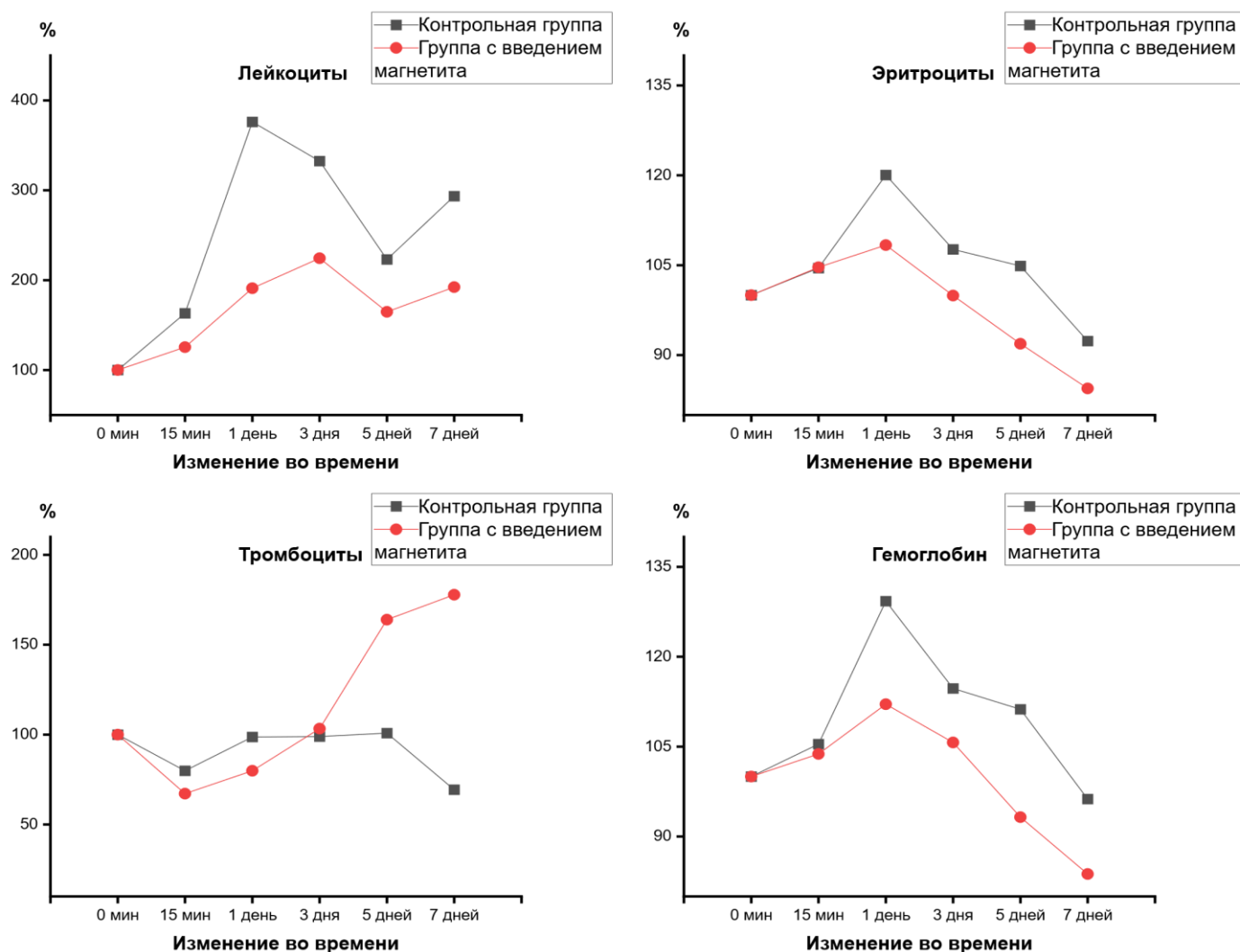


Рисунок 7 - Изменения количества форменных элементов крови (лейкоцитов, эритроцитов, и тромбоцитов) и показатель гемоглобина во времени.

Видно, что на следующий день после операции резко возрастают показатели лейкоцитов и эритроцитов, а также увеличивается содержание гемоглобина, напрямую зависящего от концентрации эритроцитов. Такой эффект в полнее объясним реакцией организма на операционное вмешательство. Содержание лейкоцитов находится в пределах нормы. Повышение уровня лейкоцитов во время всего эксперимента не является экстремальным, значений не превышают отметки в 100 раз и более, этот факт может свидетельствовать об отсутствии токсического воздействия на организм.

На следующий день после операции наблюдается резкий выброс эритроцитов и повышение уровня гемоглобина. Во избежание гипоксии включаются компенсаторные механизмы организма и обуславливается этот эффект рядом причин первого дня эксперимента: психологическим стрессом, введением максимально допустимого объёма жидкости в организм, обезвоживанием, связанного с тем, что в крови присутствуют твёрдые носители, так же максимально допустимым объёмом сбора крови для анализа или возможной потерей крови при проведении операции. На 3 день значения приближаются к норме. Дальнейшее снижение показателей эритроцитов может быть связано с тем, что потеря крови, то есть сбор крови для анализа, происходит через день, соответственно, организм может не успевать вырабатывать новые клетки.

Показатели тромбоцитов сперва, снизились, что объясняется результатом хирургического вмешательства и необходимостью выполнения прямых функций клеток, затем после 3 дней увеличились почти в 2 раза, по сравнению с первым забором крови. Стоит отметить, что не происходит критического роста тромбоцитов, что говорит о том, что введение магнитных носителей не приводит к тромбозу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполнения данной работы все поставленные задачи были решены полностью. Получены следующие основные результаты:

1. Были измерены размеры необработанных частиц и обработанных ЭДТА с различными значениями рН и концентраций. для рН 6.4, и для рН 7 при концентрации раствора ЭДТА 0.04 М, площадь поверхности субмикронных частиц CaCO_3 уменьшилась больше всего.

2. Была измерена сорбционная ёмкость субмикронных частиц CaCO_3 до и после ЭДТА. Для этого, флуоресцентно меченный полисахарид FITC-dextran с молекулярной массой 70 кДа адсорбировался на частицах. При обработке субмикронных частиц CaCO_3 раствором ЭДТА с рН 6.4 и концентрацией 0.04 М, они показывают наилучшую сорбционную ёмкость и наилучшим образом удерживают инкапсулированное вещество.

3. Была изучена возможность использования частиц CaCO_3 для гемодиализа. После обработки частицами CaCO_3 , количество холестерина, содержащееся в крови, уменьшилось. Причём, для частиц, необработанных, этот эффект наиболее выражен, по сравнению с частицами, обработанными ЭДТА с концентрацией 0.04 М и рН 6.4. Однако, частицы обработанные ЭДТА с концентрацией 0.04 М и рН 6.4 показывают наибольшее изменение содержания холестерина в пересчёте на единицу площади.

Содержание общего белка изменяется не сильно. Это может объясняться тем, что типов белков в организме большое количество, и их состав может варьироваться от 466 аминокислот и массы 50 кДа, до 38000 аминокислот и массы 3000–3700 кДа. Поэтому они могут не адсорбироваться на субмикронные частицы CaCO_3 , с размером пор от 30 до 50 нм.

4. Было изучено возможное токсичное воздействие на организм частиц CaCO_3 , содержащих наночастицы магнетита при помощи гематологического анализа крови.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Highly-magnetic mineral protein–tannin vehicles with anti-breast cancer activity / Дёмина П.А. [и др.] *Materials Chemistry Frontiers*. 2021. №5. С. 2007–2018.
2. Endovascular addressing improves the effectiveness of magnetic targeting of drug carrier. Comparison with the conventional administration method / Майорова О.А. [и др.] *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2020. Vol. 28.
3. Structural effects on the magnetic hyperthermia properties of iron oxide nanoparticles / Eric C. Abenojar [и др.] *Progress in Natural Science: Materials International*. 2016. Vol. 26. pp. 440–448.
4. B.V. Parakhonskiy, Albrecht Haase, Renzo Antolini. Sub-Micrometer Vaterite Containers: Synthesis, Substance Loading, and Release / B.V. Parakhonskiy [и др.] // *Angewandte Chemie*. – 2012. – Volume 51, Issue 5. – С. 1195–1197.
5. Шамсутдинова Е.С., Ломова М.В., Р. Анисимов Р.А. Управление адсорбцией на поверхности ватеритных частиц путем хелатирования / Е.С. Шамсутдинова // «Наноэлектроника, нанофотоника и нелинейная физика»: тез. докл. XV Всерос. конф. молодых ученых. – Саратов: Изд-во “Техно-Декор”, 2020. – С. 305–306.
6. P.A. Demina, A.A. Abalymov, D.V. Voronin, A.V. Sadovnikov, M.V. Lomova. Highly-magnetic mineral protein–tannin vehicles with anti-breast cancer activity / Demina P.A. [и др.] // *Materials Chemistry Frontiers*. 2021. №5. – С. 2007–2018.
7. O.A. Mayorova, O.A. Sindeeva, M.V. Lomova, Olga I. Gusliakova, Y.V. Tarakanchikova, E. V. Tyutyayev, S.I. Pinyaev, O.A. Kulikov, S.V. German, N.A. Pyataev, D.A. Gorin, G.B. Sukhorukov. Endovascular addressing improves the effectiveness of magnetic targeting of drug carrier. Comparison with the conventional administration method / Mayorova O.A. [и др.] // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*. 2020. Vol. 28.