

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования

«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ  
Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

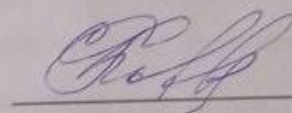
ПОЛУЧЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ С ОБОЛОЧКОЙ ИЗ ДИОКСИДА  
КРЕМНИЯ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНСКИХ ПРИМЕНЕНИЙ

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента 4 курса 421 группы

Направления подготовки  
06.03.01 "Биология" Биологического факультета  
Лобанова Кирилла Валерьевича

Научный руководитель  
проф., д.б.н., проф.



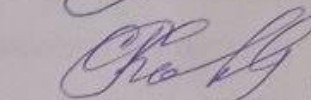
С.А. Коннова

Научный консультант  
ст.науч.сотр., канд. физ.-мат. наук



В.А. Ханадеев

Зав. кафедрой биохимии и биофизики  
проф., д.б.н., проф.



С.А. Коннова

30.08.2024

Саратов 2024

**Введение.** Наноразмерные материалы приобрели к сегодняшнему времени статус большой и интенсивно развивающейся области исследований в биомедицине. Более конкретизированными объектами выступают наночастицы. Их создаются из разных веществ, придают необходимую морфологию и новые химические, физические свойства, что позволяет этим современным материалам подстраиваться под четко определенные задачи.

В случае практического медицинского применения основными направлениями разработки и создания наноматериалов являются: носители для таргетной доставки лекарственного препарата [1,2], фототермическая терапия [3], биовизуализация [4].

При этом наиболее исследуемая область использования – лечение онкологических заболеваний. Все вышеуказанные направления чаще всего применяются именно для решения проблем в онкологии, как альтернативные или дополнительные лечебные методы.

Так в настоящее время один из ключевых принципов терапии рака основан на использовании химических соединений для индуцирования гибели клеток [5]. Однако системное введение цитотоксических препаратов усиливает гибель клеток как в опухоли, так и в здоровых тканях. К сожалению, этот недостаток избирательности обычно провоцирует серьезные побочные эффекты у пациента, которые снижают потенциальную применимость. Чтобы избежать этого ограничения, биомедицинское научное сообщество приложило много усилий для улучшения терапевтического профиля этих цитотоксических препаратов. Один из наиболее многообещающих подходов основан на разработке наноносителей для избирательного достижения областей опухоли и высвобождения цитотоксических целевых веществ на месте, что позволяет уменьшить дозу используемого препарата.

Сам же носитель должен обладать малой или, в идеальном случае, отсутствующей собственной токсичностью. Наименее цитотоксичными

можно назвать наночастицы из диоксида кремния или покрытые оболочкой из него.

Сам по себе диоксид кремния достаточно безопасен, так по данным Управления по контролю за продуктами питания и лекарствами США и Европейского органа по безопасности пищевых продуктов для пероральной доставки его можно потреблять в количествах до 1500 мг в день для человека [6].

Наночастицы из диоксида кремния, используемые для доставки, обычно имеют размер частиц от 50 до 200 нм, размеры пор 2-6 нм, объем пор 0,6–1 см<sup>3</sup>/г и большую площадь поверхности 700-1000 м<sup>2</sup>/г [7].

Кремниевые наночастицы обладают рядом полезных качеств, которые делают их удобной системой доставки. Обладают способностью связываться с различными функциональными группами активных фармацевтических препаратов. В структуру кремниевого каркаса можно встраивать различные функциональные группы, чтобы обеспечить адресную доставку к требуемому месту действия, так, например, можно доставить нейротрофический фактор головного мозга (НФГМ), если модифицировать поверхность нацеливающим лигандом, пептидом, который связывается с компонентами внеклеточного матрикса [8]. Из-за присутствия отрицательно заряженных силанольных групп на поверхности наночастиц возможна модификация поверхности положительно заряженными лигандами, что, например, улучшает локализацию в опухолевой ткани за счет эффекта повышенной проницаемости и удерживания (ЭПУ) [9] или позволяет продлить время нахождения лекарства в кровотоке.

К плюсам можно так же отнести следующее: устойчивость к стрессовым факторам окружающей среды (рН, механическое напряжение, высокая температура), способность легко утилизироваться внутри организма за счёт гидролиза, накопление не приносит организму вреда, простая и недорогая процедура синтеза является важным преимуществом по сравнению с другими новыми системами доставки лекарств, которые в настоящее время

исследуются в фармацевтике. Дополнительным преимуществом является возможность создавать композитные частицы, где диоксид кремния выступает как внешнее покрытие, что позволяет сохранить свойства присущие ему и добавить новые.

**Целью** данной работы было создание наноразмерного носителя с оболочкой из диоксида кремния и ядром из золотых наностержней для доставки лекарственного средства и исследование его биосовместимости для будущего применения.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1) Синтезировать золотые наностержни с плазмонным резонансом, настроенным на ближний инфракрасный диапазон.

2) Подобрать параметры для покрытия полученных золотых наностержней оболочкой из диоксида кремния контролируемой толщины.

4) Провести травление оболочки и выяснить на сколько возможно увеличить объем внутреннего пространства, без разрушения оболочки.

3) Исследовать цитотоксичность синтезированных наночастиц на клеточных линиях *in vitro* с использованием теста на восстановление резазурина.

**Основное содержание работы.** В ходе работы были синтезированы золотые наностержни с малым распределением по размерам. Это можно определить по графику экстинкции, представленному на рисунке 3. Основной пик, в ближней ИК-области спектра, при 900 нм, характерный для наностержней золота по ширине узкий. Для наностержней также характерен небольшой пик плазмонного резонанса при 500-510 нм.

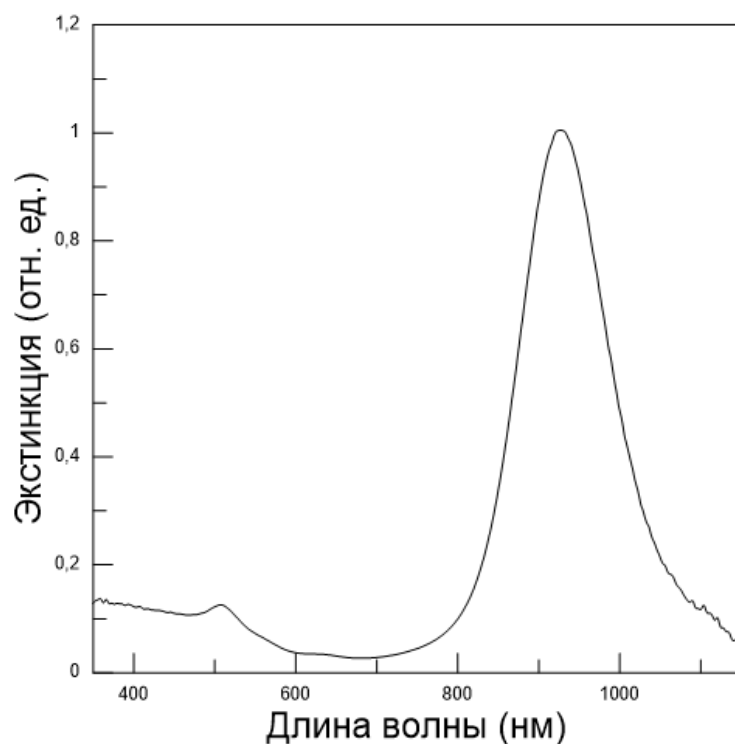


Рисунок 3 – Спектр поглощения золотых наностержней

По ПЭМ изображениям размеры полученных образцов, в среднем, 70 нм в продольном направлении и, в среднем, 20 нм в поперечном.

Полученные наночастицы были покрыты ПЭГ для стабилизации и предотвращения агрегации во время последующих синтезов. Само покрытие осуществлялось с поддержанием концентрации ЦТАБ в растворе наночастиц не ниже 10 мМ. При уменьшении количества ЦТАБ, как случилось при подгоночных покрытиях, частицы агрегировали и не могли быть использованы в дальнейшем. Покрытие ПЭГ так же улучшает биосовместимость ЗНЧ, что необходимо для применения в качестве средства доставки в живом организме.

Были проведены тестовые синтезы с разными условиями для установления оптимального размера оболочки из диоксида кремния (Таблица 1).

Таблица 1 – Условия синтеза подгоночных образцов

Название образца	V TEOS (100 мМ)	V NH <sub>3</sub> (3%)	Перемешивание
GMS_1	1,8 мл	120 мкл	магнитное
GMS_2	1,8 мл	100 мкл	магнитное
GMS_3	4 мл	100 мкл	магнитное
GMS_4	1,8 мл	120 мкл	шейкер

Контроль покрытия на этих образцах наностержней оценивали по графику экстинкции. Зная форму изначального графика, оценивали изменения в области от 350 до 600 нм, где наблюдалось увеличение экстинкции (Рисунок 5).

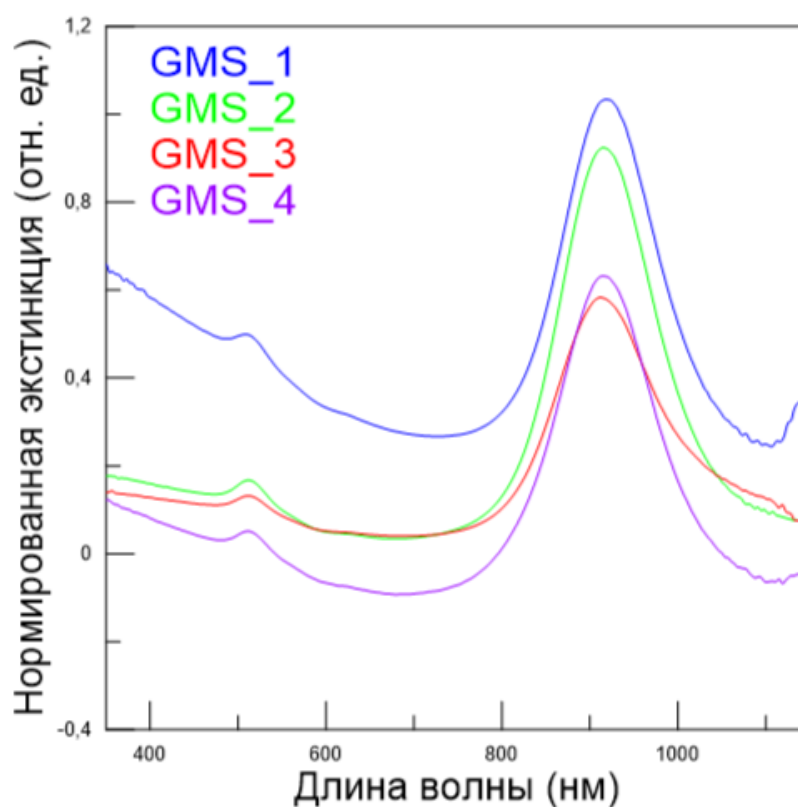


Рисунок 5 – Нормированные спектры экстинкции полученных образцов

Наибольшей оболочкой обладал образец GMS\_4, так же его оболочка была более плотной и ровной, в отличие от других образцов, где заметны

неровности в толщинах покрытия в разных местах на золотом наностержне. Помимо оценки получаемой оболочки смотрели также на количество побочных силикатных сфер; так, в образце GMS\_4 их было наименьшее количество, а размер был достаточно крупным, что позволяет удобнее сепарировать их от полученных стержней.

По аналогичному для образца GMS\_4 протоколу был получен большой объем покрытых диоксидом кремния наностержней. Травление оболочки проводили добавлением 3% раствора гидроксида аммония. Процесс травления происходил при температуре 45°C в термостате.

Наличие травления устанавливали отбором небольших количеств образца на ПЭМ анализ (рисунок 8).

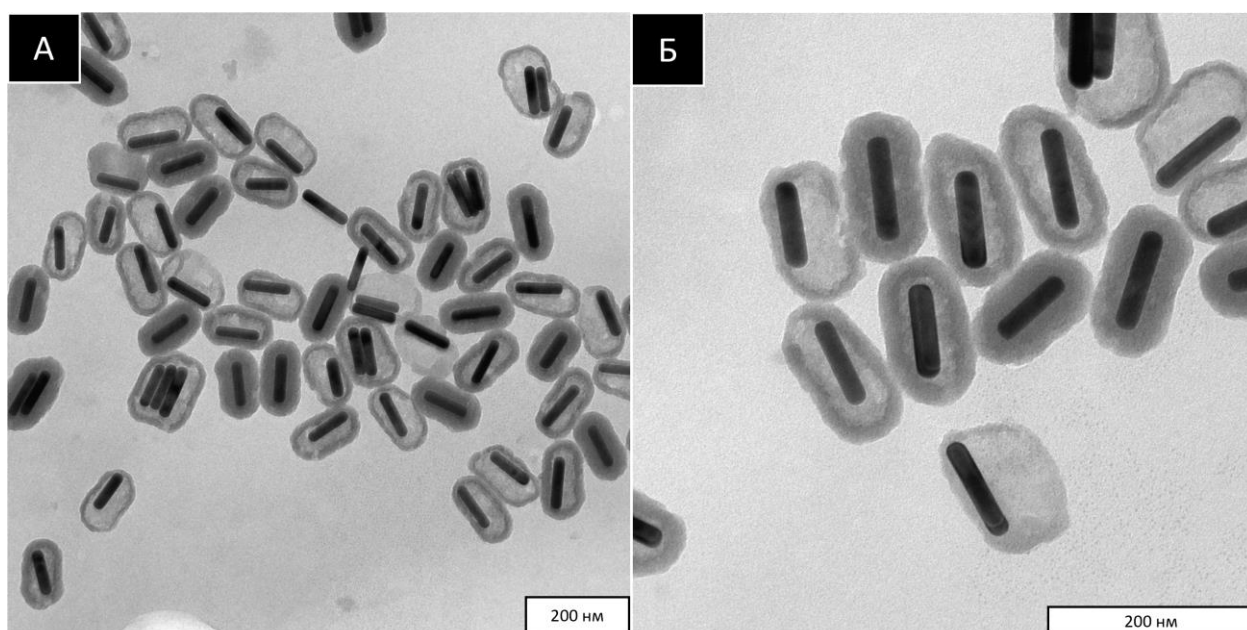


Рисунок 8 – ПЭМ изображение образца с протравленной оболочкой

Так как предполагается использовать полученные наночастицы для доставки лекарства и ФТТ в живом организме, то необходимо выяснить, какое действие наночастицы будут оказывать на жизнеспособность живой ткани. Для такой проверки была использована клеточная линия здоровой ткани – яичника китайского хомячка СНО II. В работе был применен прижизненный анализ на восстановление резазурина. На рисунке 12 представлены результаты

количественной оценки метаболической активности клеточных линий в зависимости от концентрации золотых наностержней, покрытых оболочкой из диоксида кремния.

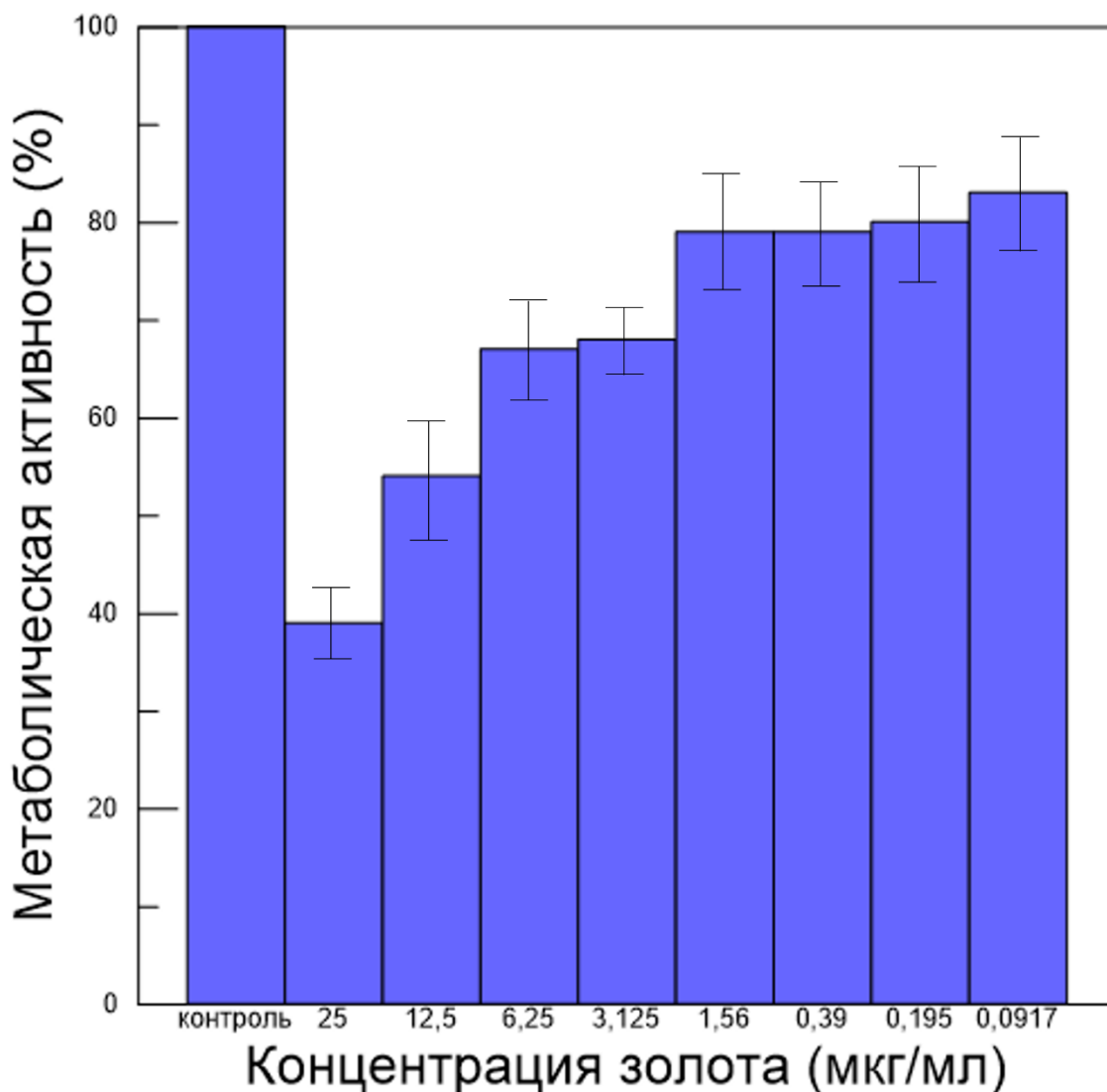


Рисунок 12 – Флуориметрическая количественная оценка метаболической активности клеточной линии СНО II (клетки яичника китайского хомячка)

Для оценки цитотоксичности полученных наночастиц использовался тест с резазурином на клеточной линии СНОII. Препарат показывает цитотоксическое действие на здоровые клетки линии СНОII в концентрациях до 1,56 мкг/мл значительно ингибируют активность клеточных дегидрогеназ, что свидетельствует о гибели клеток.



**Заключение.** Были синтезированы золотые наностержни с плазмонным резонансом, настроенным на «окно прозрачности» биологических тканей, с использованием бромида цетилтриметиламмония и олеата натрия со средней длиной  $65,2 \pm 4,2$  нм и с шириной  $18,9 \pm 1,3$  нм. Полученные наночастицы покрыты оболочкой из неорганического диоксида кремния. Они сохранили свои оптические свойства и приобрели физико-химические свойства, обусловленные присутствием диоксида кремния, а именно улучшенную стабильность в растворе и уменьшение цитотоксичности. Проведено травление оболочки с разным процентом вытравливания оболочки и выяснен наиболее подходящий под задачи переноса лекарственных средств объем внутреннего пространства. Полученные наночастицы проверены на цитотоксическое действие на здоровых клетках яичника китайского хомячка. Полученные результаты показали, что наночастицы токсичны в больших концентрациях от 25 до 3 мкг/мл, тогда как концентрации от 1,56 мкг/мл не проявляют пороговой токсичности.

