

На правах рукописи



Гулякова Ольга Игоревна

Биораспределение и деградация микронных и субмикронных частиц ватерита при интрафолликулярном, интратрахеальном и внутривенном способах введения

1.5.2 – Биофизика

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Саратов – 2024

Работа выполнена на базе лаборатории «Дистанционно управляемые системы для тераностики» федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского».

Научный руководитель:

Горин Дмитрий Александрович, д.х.н., профессор центра фотоники и фотонных материалов автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий».

Официальные оппоненты:

Хомутов Геннадий Борисович, д.ф.-м.н., профессор, профессор кафедры биофизики физического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» (г. Москва).

Букреева Татьяна Владимировна, д.х.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории биоорганических структур Курчатовского комплекса кристаллографии и фотоники Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (г. Москва).

Ведущая организация:

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО» (г. Санкт-Петербург).

Защита диссертации состоится «25» декабря 2024 г. в 14:00 на заседании диссертационного совета 24.2.392.06 на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» по адресу: 410012 г. Саратов, ул. Астраханская, д.83, корпус 11, аудитория 515.

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке имени В.А. Артисевич федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» и на сайте

<https://www.sgu.ru/research/dissertation-council/24-2-392-06/bioraspredelenie-i-degradaciya-mikronnykh-i-submikronnykh>

Автореферат разослан «___» _____ 20___ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.ф.-м.н., доцент



Генина Элина Алексеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Разработка эффективных и безопасных систем доставки лекарственных средств - это одна из наиболее динамично развивающихся в настоящее время областей мультидисциплинарных исследований, целью которых является создания объектов, которые способны адресно доставить терапевтический и/или диагностический агент в интересующую патологическую область организма при минимальном негативном воздействии на другие клетки, ткани и органы [1]. К подобным носителям также могут предъявляться требования обеспечения пролонгации высвобождения иммобилизованных веществ и управления самим процессом высвобождения за счёт изменения параметров химического или физического воздействия: например, таких как pH и ионная сила микроокружения, состав и концентрация ферментов, частота и интенсивность электромагнитного и ультразвукового излучений. Данные воздействия необходимо изучать на трех уровнях: отдельной клетки, ткани, в целом организма. Большую помощь в понимании биофизических аспектов процессов взаимодействия между системами доставки лекарственных средств и целевыми органами, помимо натурального эксперимента, может оказать аппарат математического моделирования. Таким образом, данная тематика соответствует сразу нескольким разделам биофизики: (i) экспериментальное изучение физико-химических механизмов функционирования живых систем в части выявления закономерностей в транспорте вещества, (ii) разработка математических моделей биологических процессов, (iii) исследования в области радиационной биофизики, рассматривающие взаимодействия электромагнитного излучения с биологическими объектами.

Стратегия использования систем доставки лекарственных средств включает в себя, с одной стороны, как можно более длительное избегание адсорбции различных биомолекул, так называемых опсопинов, способствующих захвату инородных объектов мононуклеарной фагоцитарной системой, а с другой – преимущественное накопление в области патологии, проникновение в клетки-мишени и/или интерстициальную жидкость. Основными факторами, контролирующими адресность носителей, являются (i) их физико-химические параметрами (размер, форма, жесткость, поверхностный заряд) [2, 3], (ii) их поверхностная функционализация направляющими векторами для обеспечения специфичной лиганд-рецепторной связи между носителями и клетками пораженных тканей и органов [4, 5], и (iii) патофизиологические особенности пораженной ткани (особенности циркуляции биологических жидкостей в пораженном органе, чрезмерная экспрессия определенных белковых молекул на мембране клеток-мишеней и т.д.) [6, 7]. Принято выделять два типа адресации: пассивную и активную [8]. Пассивная адресация основана на способности вводимого в живой организм объекта накапливаться в той или иной области за счет физиологических процессов. Ярким примером пассивной адресации является накопление наночастиц в опухолевой ткани за счет эффекта повышенной проницаемости сосудов опухоли и удержания ("EPR" эффект), позволяющий объектам преимущественно менее 200 нм проникать через увеличенные просветы между эндотелиальными клетками. Активная же адресация в дополнение к указанному задействует либо специфическое взаимодействие поверхности клетки и носителя, либо навигацию за счет внешних сил, либо комбинацию этих методов.

На настоящий момент разработано большое число различных систем доставки лекарственных средств [9], но все они обладают рядом недостатков. Во-первых, некоторые из них обладают выраженной цитотоксичностью и гемолитическим действием [10], во-вторых, низкая загрузочная емкость (соотношение массы инкапсулированного вещества к массе контейнера выраженное в процентах) в случае твердых неорганических наночастиц и белковых конъюгатов [11]. В-третьих, стабильность во времени и узкий температурный интервал хранения [12]. В-четвертых, высокая стоимость производства, плохо масштабируемый синтез с громоздкими протоколами существующих носителей делает многие системы доставки лишь объектом научных исследований без перспективы быстрого внедрения в практику.

Одним из перспективных примеров неорганических частиц, используемых в исследованиях по доставке различных терапевтических и диагностических агентов к органам с патологией, являются частицы карбоната кальция в полиморфной модификации ватерит благодаря ряду преимуществ: биосовместимость [13], высокая загрузочная емкость и эффективность загрузки (соотношение массы загруженного вещества к загружаемому, выраженное в процентах) за счет пористой структуры [14], возможность растворения в рН слабокислых средах, которые соответствуют содержанию лизосом [15], пролонгированное высвобождение [16]. Многие научные группы показали эффективность использования частиц ватерита, как системы доставки лекарственных средств и различных контрастных агентов для проведения терапии и диагностики при внутрисосудистом, парентеральном, наружном и других способах введения.

Несмотря на наличие большого количества работ, посвященных особенностям и преимуществам использования частиц ватерита в качестве системы доставки лекарств, существуют области, требующие дальнейших исследований. В частности, остаются открытыми важные вопросы биораспределения частиц ватерита в организме при интрафолликулярном, интратрахеальном и внутривенном способах введения под действием биофизических процессов и динамики их деградации, являющиеся ключевыми факторами в разработке стратегий применения и способов введения лекарственных форм, обеспечивающих как эффективную терапию и/или диагностику, так и безопасность применения таких формуляций, поэтому **целью данной диссертационной работы** являлось выяснение биофизических закономерностей распределения и деградации частиц ватерита при пассивной адресации (i) в легкие в результате интратрахеального введения, (ii) в привитую подкожно аденокарциному при внутривенном введении, (iii) в волосяные фолликулы при наружной аппликации.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить **следующие задачи**:

- Получение и определение физических и химических параметров частиц ватерита с различным размером (от 500 нм до 3 мкм). Изучение морфологии и распределения по размерам получаемых частиц, эффективности инкапсуляции как модельных веществ, так и биологически активных / терапевтических веществ, кинетики их высвобождения в различных средах, влияния компонентов микроокружения на кинетику процесса диссоциации и перекристаллизации частиц ватерита.
- Оценка возможности замедления процессов перекристаллизации и высвобождения иммобилизованного вещества при нанесении различного числа полимерных слоев

на поверхность частиц ватерита с целью управления транспортом веществ в органах и тканях организма.

- Изучение эффективности интернализации и цитотоксичности частиц ватерита без и с различными оболочками на культурах эукариотических клеток (клетки человеческой карциномы легких A549, нормальные человеческие дермальные фибробласты NHDF).
- Сравнительное изучение эффективности подавления роста дрожжеподобных грибов рода *Candida* иммобилизованным в частицы ватерита (1.0 ± 0.4 мкм) и свободным препаратом нафтифин.
- Экспериментальное изучение физико-химических механизмов, обуславливающих биораспределение флуоресцентного красителя (Цианин 7), агента фотодинамической терапии (порфиразин) или самих частиц ватерита после интратрахеальной инстилляцией, внутривенной инъекции и интрафолликулярного введения, соответственно. Определение локализации в целевом органе/тканях вводимых ватеритных носителей микроскопическими методами исследования.
- Численное моделирование распространения молекул порфиразина из капилляра в интерстиций опухоли после быстрого высвобождения из частиц ватерита по сравнению с частицами на основе сополимера молочной и гликолиевой кислот.
- Проведение сравнительного исследования эффективности применения облучения светодиодным источником света с длиной волны 640 нм в дозе 150 Дж/см² в рамках фотодинамической терапией (ФДТ) подкожно привитой опухоли после внутривенного введения порфиразина как в свободной форме, так и в составе частиц ватерита.

Научная новизна

1. Показана возможность доставки и распределения частиц ватерита субмикронного размера (0.65 ± 0.17 мкм) в альвеолярной части легких мыши при интратрахеальном введении в следствии преимущественного влияния процесса диффузии на движение частиц малого размера в потоке и малых чисел Стокса.
2. Показана успешная доставка фермента барназа в составе формуляции на основе частиц ватерита (300 – 500 нм) с оболочкой функционализированной аптамером к ЕрСАМ в альвеолярную часть легких после интратрахеальной инстилляцией и удержание в целевом органе за счет лиганд-рецепторного взаимодействия.
3. Показано замедление процесса диссоциации и перекристаллизации частиц ватерита (0.65 ± 0.17 мкм) при взаимодействии с компонентами бронхоальвеолярного лаважа мыши *in vitro* в следствии связывания с поверхностью частиц и препятствования покиданию ионов Ca²⁺.
4. Изучены и объяснены биофизические закономерности адгезии частиц ватерита с агентом фотодинамической терапии (порфиразином) к эндотелию капилляров опухоли в следствии аномалий сосудистой сети, характеризующихся медленной скоростью кровотока и извилистой архитектурой, с последующим высвобождением лекарственного средства, которое частично распространяется из капилляра в интерстиций опухоли.
5. Построена математическая модель и проведено численное моделирование зависимости создаваемой концентрации порфиразина в интерстиции опухоли на

фиксированном расстоянии от капилляра ($r = 50$ мкм) от времени. Проведено сравнение с ранее представленной моделью медленно высвобождающих частиц на основе сополимера молочной и гликолиевой кислот.

6. Подтверждена большая эффективность ингибирования роста дрожжеподобных грибов рода *Candida* в случае использования частиц ватерита с иммобилизованным нафтифином по сравнению со свободной формой данного антимикотика за счет эффекта длительного высвобождения.
7. Изучены биофизические закономерности проникновения и постепенной деградация частиц ватерита, содержащих противогрибковый препарат, по всей длине волосяного фолликула мыши после нанесения суспензии частиц на кожу и внедрения опосредованного применением терапевтического ультразвука (с частотой 1 МГц, мощностью 0.5 Вт/см², длительностью воздействия 3 минуты).

Научная и практическая значимость

В настоящей работе приведены результаты изучения биораспределения частиц ватерита при различных способах введения (интратрахеальном, внутривенном и трансфолликулярном), обосновано их преимущество с позиции биофизических процессов, протекающих в здоровых и патологических тканях и органах, определены методики обеспечивающие эффективную локализацию в целевых органах. В частности, был определен оптимальный средний диаметр частиц ватерита (0.65 ± 0.17 мкм) для эффективной аккумуляции флуоресцентного сигнала в легких в течение нескольких дней (не менее 72 часов) после интратрахеальной инстилляцией за счет способности частиц проникать и распределяться в альвеолярной области. Предварительные оценки также показали превосходство частиц ватерита субмикронного размера в связи с преимущественным влиянием процессов диффузии при прохождении частицами воздухоносных путей и размещении в дистальных областях легких.

Была успешно продемонстрирована альтернативная стратегия доставки лекарств в паренхиму опухоли при внутрисосудистом введении, не основанная на эффекте повышенной проницаемости и удержания (EPR). Частицы ватерита с лекарством (порфиразин) пассивно накапливались в аномальной сосудистой сети опухоли, характеризующейся медленной скоростью кровотока, после внутривенной инъекции. Указанные частицы прикреплялись к эндотелию капилляров и высвобождали лекарственное средство, которое распространялось из капилляра в интерстиций опухоли. Быстрое высвобождение лекарства из частиц ватерита в данной ситуации представляло собой ключевое преимущество в рамках представленной концепции.

Также данное исследование показало ряд преимуществ использования частиц ватерита в качестве носителей противогрибкового препарата нафтифина для адресации в глубокие слои кожи через волосяные фолликулы. С помощью сканирующей электронной микроскопии было наглядно продемонстрировано проникновение частиц ватерита на всю глубину волосяного фолликула и их медленная деградация, что рассматривается как способность обеспечить доставку лекарственного препарата в глубокие слои дермы.

Одним из наиболее значимых практических результатов настоящей работы является подтверждение того факта, что, субмикронные пористые частицы ватерита способны обеспечить значимые преимущества при выборе тактик лечения различных заболеваний.

Так, например, в разработке стратегии терапии различных заболеваний легких можно опираться на иммобилизацию лекарственного вещества в частицы ватерита, как матрицу-носитель, и высвобождение лекарства только после достижения дыхательной части. Ряд заболеваний легких, включая хроническую обструктивную болезнь легких и острое поражение легких, имеют значительную долю воспаления в этих областях как компонент их патофизиологии. Кроме того, взаимодействие с компонентами легочного сурфактанта будет вызывать медленное высвобождение лекарства, что может быть полезно при лечении хронических заболеваний легких, таких как эмфизема. Формуляция с направляющим вектором, включающая в себя частицы ватерита, в качестве ядра, и фермент барназа, в качестве компонента оболочки, могут быть эффективны при лечении раковых заболеваний и вирусных инфекций, включая коронавирусные заболевания человека. Результаты, полученные при исследовании накопления частиц ватерита в опухоли после внутривенного введения с последующим быстрым высвобождением лекарственного средства (порфиразином), могут быть использованы в усовершенствовании тактик проведения терапии онкологических заболеваний препаратами, характеризующимися высокой токсичностью, так как подобные формуляции способны обеспечить локально в опухоли высокую концентрацию иммобилизованного лекарственного средства.

Достоверность подтверждается хорошей воспроизводимостью полученных результатов, их соответствием данным, полученным другими авторами и опубликованным в современной литературе, а также фактом прохождения их критического рассмотрения рецензентами перед публикацией. Достоверность экспериментальных результатов была обеспечена применением современной измерительной аппаратуры, сертифицированной в соответствии с международными стандартами качества, и использованием стандартизированных методик проведения измерений. Все выявленные и сформулированные в работе закономерности основаны на строгом анализе полученных результатов с помощью принятых статистических методов обработки данных.

Основные положения и результаты, выносимые на защиту

1. Частицы ватерита диаметром 0.65 ± 0.17 мкм, содержащие комплекс бычьего сывороточного альбумина и флуоресцентного красителя (Цианин 7), обеспечивают флуоресцентный сигнал в легких с интенсивностью $51.3 \pm 1.4\%$ от общей интенсивности флуоресценции по органам (легкие, печень, почки, желудок и кишечник), благодаря способности достигать альвеолярного пространства в следствии преимущественного влияния процесса диффузии на движение частиц малого размера в потоке, по сравнению с частицами ватерита диаметром 1.35 ± 0.16 мкм и 3.15 ± 0.60 мкм, движение которых управляется суперпозицией сил гравитации и инерции прямо пропорциональными квадрату аэродинамического диаметра частиц, обеспечивающими $30.2 \pm 1.4\%$ и $29.1 \pm 1.1\%$ интенсивностей флуоресцентных сигналов, соответственно, через 72 часа после интратрахеальной инстилляции.
2. Интратрахеальная инстилляционная суспензия носителей (30×10^6) на основе ватеритных частиц диаметром 0.55 ± 0.12 мкм, содержащих на поверхности олигонуклеотид специфичный к ЕpСAM, обеспечивает распределение и удержание в течение одного часа в альвеолярном пространстве в 1.8 раз больше носителей (поверхностная концентрация частиц 2.3×10^3 мм⁻²) по сравнению с введением носителей, не обладающих векторными молекулами на поверхности (поверхностная концентрация

частиц 1.3×10^3 мм²) в следствие улучшения адгезии за счет образования лиганд-рецепторной связи между вводимыми частицами и клетками эндотелия легких.

3. Частицы ватерита (0.47 ± 0.14 мкм) с иммобилизованным агентом фотодинамической терапии (порфиразином) при внутривенном введении способны накапливаться в сосудах опухоли, индуцированной подкожной инъекцией клеток колоректальной карциномы (СТ26.WT) в области бедра мыши, и обеспечивать доставку $23.1 \pm 2.4\%$ от введенной дозы порфиразина на массу животного за счет изменения биофизических параметров кровотока в опухолевой кровеносной сети, а именно снижения скорости кровотока и аномального извилистого строения сосудистой сети.
4. Частицы ватерита (1.0 ± 0.4 мкм) с иммобилизованным противогрибковым препаратом нафтифина гидрохлоридом, суспензированные в 70% водном растворе этилового спирта и наносимые *in vivo* на поверхность кожи мышей в области спины с использованием нефокусированного терапевтического ультразвука (с частотой 1 МГц, мощностью 0.5 Вт/см², длительностью воздействия 3 минуты), во-первых, проникают и распределяются по всей глубине волосяного фолликула, во-вторых, подвергаются биодеградации в течении, как минимум, четырех дней.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на российских и международных конференциях:

1. 7-я Международная конференция «Nanoparticles, Nanostructured Coatings and Microcontainers: Technology, Properties, Applications» (12-15 мая 2016 г., Томск, Россия);
2. 21-й Международный симпозиум «Surfactants in Solution» (5-11 июня, 2016 г., Джинан, КНР);
3. Объединенная конференция Американского сообщества клеточной биологии и Европейской организации молекулярной биологии 2017 (ASCB-EMBO/ 2017 Meeting) (2-6 декабря 2017 г., Филадельфия, США);
4. Юбилейная конференция по медицинской микологии и микробиологии (11-12 апрель, 2018 г., Москва, Россия);
5. 6-й Международный симпозиум «Оптика и биофотоника», Saratov Fall Meeting 2018 (24-28 сентября 2018 г., Саратов, Россия);
6. 7-й Международный симпозиум «Оптика и биофотоника», Saratov Fall Meeting 2019 (23-27 сентября 2019 г., Саратов, Россия);
7. Британско-российская школа-семинар «Patient-tailored biomaterials for tissue regeneration, combating microbial contamination and drug delivery» (2–4 октября 2019 г., Ланкастер, Великобритания).

Исследования, представленные в диссертации, выполнены при финансовой поддержке следующих проектов: «Дистанционно управляемые наноструктурированные системы для адресной доставки и диагностики» в рамках гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих учёных в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования (договор №14.Z50.31.0004 от 4 марта 2014); «Субмикронные мезопористые частицы ватерита для трансдермальной доставки биологически активных веществ» в рамках гранта РФФИ №17-73-20172; «Фотоакустические

технологии для ранней тераностики метастатических опухолей» в рамках гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих учёных в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования (договор №14.Z50.31.044 от 5 февраля 2018); стажировка в Ратгерс (университет штата Нью-Джерси) в рамках победы на Всероссийском открытом конкурсе для назначения стипендии Президента РФ для обучающихся за рубежом в 2019/2020 учебном году; стипендия Президента Российской Федерации для молодых ученых и аспирантов, осуществляющих перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики.

Личный вклад

Личный вклад автора состоит в самостоятельном выполнении представленных в диссертации экспериментальных исследований и расчетов, а именно синтез, визуализация и характеристика исследуемых носителей, определение эффективности загрузки и высвобождения из ватеритных контейнеров модельных и терапевтических веществ, визуализации как отдельных биологических тканей методами лазерной сканирующей конфокальной и сканирующей электронной микроскопии, так и всего организма в целом методами флуоресцентной томографии. Постановка исследовательских задач и обсуждение результатов проведены под руководством профессора Д.А. Горина (Сколковский институт науки и технологий, г. Москва). Экспериментальные исследования проводились совместно с сотрудниками и на оборудовании лаборатории «Дистанционно управляемые системы для тераностики» (Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»). Исследования, направленные на определение оптимальных параметров частиц ватерита для обеспечения доставки лекарственных средств в нижние отделы легких, были проведены совместно с профессором Ратгерс (Университет штата Нью-Джерси) Эндрю Гоу и научным сотрудником отделения медицины университета Пенсильвании Е.Н. Аточиной-Вассерман. Сравнительное исследование эффективности локализации и удержания носителей на основе ватеритных частиц в отсутствие и присутствии векторных молекул на поверхности после интратрахеальной инстилляции было выполнено совместно с профессором Сколковского института науки и технологий А.М. Яценком. Изучение изменения характера биораспределения препарата для ФДТ при его иммобилизации в субмикронные частицы ватерита и внутривенном введении было выполнено совместно с сотрудниками лаборатории оптической тераностики Нижегородского государственного университета имени Н.И. Лобачевского при научной консультации профессора А.В. Звягина и научного сотрудника Б.В. Парахонского. Применение ватеритных контейнеров для доставки противогрибкового препарата в волосяные фолликулы было выполнено совместно со старшим научным сотрудником лаборатории «Дистанционно управляемые системы для тераностики» СГУ Ю.И. Свенской.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 5 статей в журналах перечня, рекомендованного ВАК, включая 4 работы, относящиеся к Q1 (WoS), 7 тезисов докладов на научных российских и международных конференциях.

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав, заключения, списка литературы, включающего 264 источника. Общий объем диссертации составляет 196 страниц, включая 63 рисунка и 4 таблицы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении приведено обоснование актуальности исследований, проведенных в рамках данной диссертационной работы, раскрыта их новизна и практическая значимость, обозначены цель и задачи.

В первой главе представлен обзор научной литературы о методиках получения частиц ватерита и модификации их поверхности для расширения функциональности получаемых носителей на их основе. Приведены примеры использования частиц ватерита для терапевтических и диагностических целей. Рассмотрены различные способы введения: пероральное, внутривенное, трансдермальное, внутрилегочное, внутрибрюшинное, интраназальное, внутриопухолевое введение, а также имплантация в составе тканеинженерных конструкций.

Использование карбоната кальция с функциональной полимерной, белковой оболочкой является наиболее перспективным подходом к созданию адресной доставки большинства видов препаратов от противоопухолевых до противогрибковых. Носители на основе карбоната кальция могут использоваться как для обеспечения высокого терапевтического эффекта, так и для повышения контрастности в диагностике. Многие научные группы доказали эффективность и безопасность использования таких носителей при различных способах введения. Важно отметить, что частицы карбоната кальция, которые могут служить минеральным «ядром» для структур «ядро»-полимерная оболочка или полимерных капсул, сами по себе заслуживают внимания как носители лекарственных средств благодаря своей безопасности, биосовместимости, биоразлагаемости, простоте приготовления и пористой структуре. Благодаря специфической морфологии частицы ватерита могут эффективно инкапсулировать как высокомолекулярные, так и низкомолекулярные вещества, реализуя пролонгированное высвобождение и биосенсорство. Следует подчеркнуть, что многие исследования продемонстрировали безопасность систем доставки, основанных на частицах карбоната кальция. Это доказано наблюдением за весом животных, гистологическим анализом, биохимическим анализом крови. Конечно, для широкого использования минеральных частиц карбоната кальция с полимерной оболочкой необходимы дополнительные исследования, но имеющиеся данные показывают перспективность используемого материала.

Во второй главе приведено описание методик проведения всех экспериментов и выполненных расчетов при пост-обработке данных. Описано получение частиц ватерита разного размера, иммобилизация модельных высокомолекулярных веществ, терапевтических агентов (барназа, порфиразин, нафтифин), расчет эффективности и емкости загрузки, определение цитотоксического эффекта и эффективности интернализации исследуемых носителей на эукариотических клетках, наблюдение противогрибкового действия частиц ватерита, содержащих нафтифин, на дрожжеподобных грибах *C. albicans*. Представлены методики проведения экспериментов с животными *in vivo* с помощью флуоресцентной томографии и наблюдения эффективности ФДТ. Изложена пробоподготовка тканей органов экспериментальных животных для анализа методами микроскопии *ex vivo*.

В третьей главе проведено сравнение эффективности использования частиц ватерита разного размера для доставки флуоресцентного агента в дыхательный отдел легких. Описаны способы получения микроразмерных частиц ватерита и иммобилизация флуоресцентного агента, представляющего собой конъюгат бычьего сывороточного альбумина и цианина 7, проведены исследования полученных образцов методами сканирующей электронной микроскопии для определения распределения по размерам частиц (*рисунок 1А-В*), и лазерной сканирующей конфокальной микроскопии для подтверждения адсорбции флуоресцентного агента.

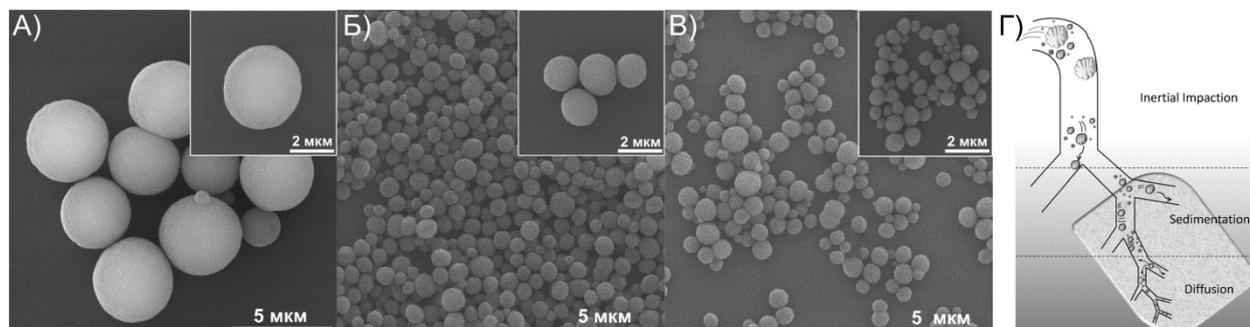


Рисунок 1. Изображения сканирующей электронной микроскопии частиц ватерита получаемых (А) при смешении эквимольных растворов солей (средний диаметр 3.15 ± 0.60 мкм), (Б) при смешении с помощью ультразвука эквимольных растворов солей в присутствии этиленгликоля (средний диаметр 1.35 ± 0.16 мкм), (В) при смешении эквимольных растворов солей в присутствии этиленгликоля (средний диаметр 0.65 ± 0.17 мкм). (Г) [17] Схематическая диаграмма, показывающая распределение частиц в легких в соответствии с различными механизмами, связанными с их размером: инерционное столкновение, седиментация и диффузия. [18].

Существует пять различных механизмов, влияющих на распределение частиц в легких: инерционное столкновение (уравнение (1)), седиментация (уравнение (2)), диффузия (уравнение (3)), перехват и электростатическое осаждение. Два последних механизма связаны с формой частиц и электростатическим зарядом, и не были рассмотрены в настоящей работе. Механизмы осаждения, прямо (или обратно) связанные с размером частиц, представлены на *рисунке 1Г* и описываются формулами (1) – (4).

$$Stk = \frac{\rho_p \times d_{ae}^2 \times V}{18 \times \eta \times R}, \quad (1);$$

$$V_{ts} = \frac{(\rho_p - \rho_a) \times d_{ae}^2 \times g}{18 \times \eta}, \quad (2);$$

$$Dif = \frac{k \times T}{3\pi \times \eta \times d_{ae}}, \quad (3);$$

$$d_{ae} = d \times \sqrt{\frac{\rho_p}{\rho_0}}, \quad (4);$$

где Stk – число Стокса; ρ_p – плотность частиц; d_{ae} – аэродинамический диаметр частицы; V – скорость воздуха; η – вязкость воздуха; R – радиус дыхательных путей; V_{ts} – конечная скорость осаждения; ρ_a – плотность воздуха; g – гравитационное ускорение; Dif – коэффициент диффузии; k – постоянная Больцмана; T – температура; d – это геометрический диаметр частиц; ρ_0 – единичная плотность. В уравнение (4) значениями плотности воздуха пренебрегли [18]. Под аэродинамическим диаметром понимается диаметр сферической частицы плотностью 1000 кг/м^3 , имеющей скорость осаждения такую же, как и рассматриваемая частица [19].

Из анализа литературы следует, что частицы с геометрическим диаметром 0.65 мкм (аэродинамическим диаметром 1.1 мкм) будут распространяться в легких за счет броуновского движения. Осаждение оказывает значительное влияние на частицы размером 1.35 мкм (2.2 мкм). На расположение крупных частиц с диаметром 3.15 мкм (5.13 мкм) больше всего должна повлиять сила инерции [20]. Увеличение аэродинамического

диаметра в 2 и 4.7 раза ведет к увеличению чисел Стокса в 4 и 22 раза соответственно, тем самым подтверждая, что большие частицы распределяются в верхних воздухоносных путях под действием инерционных сил.

Полученные частицы трех размеров (3.15, 1.35 и 0.65 мкм) с иммобилизованным конъюгатом альбумина и Цианина 7 были введены в легкие мышей через трахеостому (искусственно созданное отверстие в трахее) в виде суспензии. В качестве жидкой дисперсионной среды был выбран физиологический раствор. В качестве контроля использовали свободный конъюгат альбумина и Цианина 7. Доза флуоресцентного красителя Цианина 7 составляла 300 нг для каждого введения. Все мыши (n = 3-4 в каждой группе) были визуализированы перед и через 5, 20 минут и 24, 48 и 72 часа после введения с использованием флуоресцентной томографии *in vivo* (IVIS, PerkinElmer).

Результаты визуализации показали, что все три размера частиц способны распределяться в легких, обеспечив большую интенсивность флуоресценции, чем свободный раствор конъюгата альбумина и Цианина 7. Другими словами, все частицы обладают способностью доставлять меченые биомолекулы в легкие. Однако способность эффективно аккумулировать в легких иммобилизованные в частицах вещества, по-видимому, зависит от размера, поскольку частицы размером 0.65 ± 0.17 мкм демонстрируют наибольший флуоресцентный сигнал как сразу после введения, так и на протяжении 72 часов (рисунок 2).

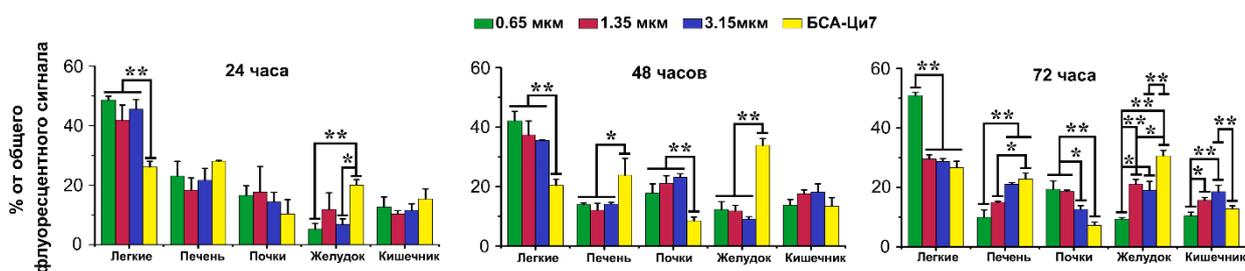


Рисунок 2. Биораспределение в органах частиц размером 0.65 мкм, 1.35 мкм и 3.15 мкм, содержащих конъюгат альбумина и Цианина 7 или свободного данного конъюгата, через (А) 24 ,(Б) 48 и (В) 72 часа после интратрахеального введения. Данные выражены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение, n = 3 мыши на группу [17].

Чтобы определить, достигли ли частицы размером 0.65 ± 0.17 мкм респираторной части легкого, были исследованы криосрезы данной ткани на наличие флуоресцентного сигнала от Цианина 7 с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии. Легкие были извлечены из тел животных через 20 мин после интратрахеальной инстилляцией частиц ватерита 0.65 ± 0.17 мкм с иммобилизованным конъюгатом альбумина и Цианина 7. Трёхмерная реконструкция конфокальных изображений в части легкого подтвердила расположение частиц ватерита в альвеолярной области (рисунок 3).

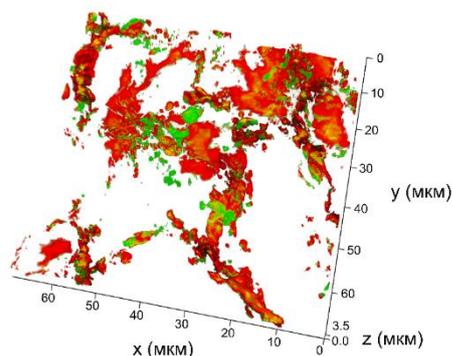


Рисунок 3. Трёхмерная реконструкция флуоресцентного изображения криосреза легких, отделенных от умерщвленного животного, через 20 минут после интратрахеальной инстилляцией частицы размером 0.65 мкм, содержащих конъюгат альбумина и Цианина 7. Толщина 3D реконструкция - 3.5 мкм. Шаг сканирования - 0.2 мкм [17].

Частицы ватерита, как и другие экзогенные частицы, способны взаимодействовать с биологическими молекулами, прежде всего белками, которые адсорбируются на поверхности частиц и образуют покрытие, называемое «корона» [21], которая способна замедлять процессы растворения или кристаллизации неорганических частиц. Понимание как компоненты выстилающего легкого флюида влияют на скорость перекристаллизации частиц является важным в части возможности обеспечения пролонгации высвобождения биологически активных веществ. В связи с этим было изучено как инкубирование с компонентами легочного сурфактанта, первого вещества, с которым вступает в контакт любая формуляция при легочной доставке, меняет морфологию частиц ватерита.

Для сравнительного изучения кинетики процесса перекристаллизации в зависимости от иммерсионной среды было проведено с помощью программного обеспечения Fiji по измерению геометрических размеров образующихся со временем кристаллов кальцита (рисунок 4). В первый час инкубации в деионизированной воде и физиологическом растворе присутствуют отдельные кристаллы кальцита размером 3 мкм, а через 24 часа размер их агрегатов превышает 20 мкм. В то время как для инкубации во фракциях легочного сурфактанта рост размеров как отдельных частиц кальцита, так и их агрегатов происходит очень медленно, от 1.5 мкм через 5 часов до 2.7 мкм через 144 часа при взаимодействии частиц с гидрофильной фракцией сурфактанта. В случае инкубации ватерита в гидрофобной фракции сурфактанта размер кальцита изменяется от 2 до 4.1 мкм за тот же период времени. Из графика на рисунке 4 видно, что размер кристаллов кальцита в случае инкубации частиц ватерита в гидрофобной фракции в два раза больше, чем при инкубации в гидрофильной фракции легочного сурфактанта. Это указывает на то, что гидрофильная фракция покрывает частицы более эффективно и, таким образом, в большей степени замедляет рекристаллизацию. Эти исследования ясно демонстрируют, что частицы ватерита будут иметь пониженную скорость рекристаллизации при доставке в легкие из-за их взаимодействия с жидкостью, выстилающей альвеолярные мешочки.

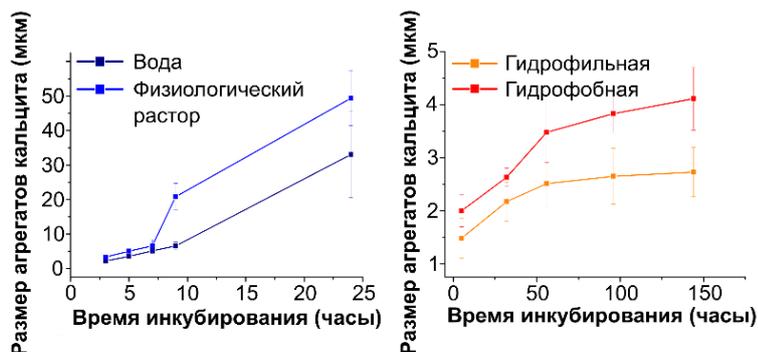


Рисунок 4. Изменение размера агрегатов кальцита во времени при инкубации частиц ватерита 0.65 мкм с различными биологическими жидкостями. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение [17].

В рамках исследования фармакокинетики модельных веществ, доставляемых в легкие с помощью субмикронных частиц ватерита, были получены данные о концентрации Ци7 в крови. Данный краситель вводили в легкие мышей через трахеостому либо в свободном виде, либо в составе частиц ватерита размером 0.65 мкм. В каждом случае концентрация Ци7 в крови достигала максимума в определенный период времени. Как для Ци7, адсорбированного на частицах, так и для свободного Ци7 максимальная концентрация наблюдается через 1.5–3 часа после введения. Наибольшая концентрация Ци7 в крови после интратрахеального введения частиц ватерита, содержащих конъюгат альбумина и Цианина 7 (как модель высокомолекулярного вещества) была детектирована через 6–9 часов. Однако общее количество Ци7, попадающего в кровоток в течение 48 часов после введения красителя в составе частиц ватерита, значительно ниже по сравнению с введением свободного Ци7, что свидетельствует об удержании модельного вещества в целевом органе.

Полученные данные демонстрируют, что частицы ватерита способны обеспечивать медленное высвобождение как высокомолекулярных, так и низкомолекулярных веществ в легких с последующим их проникновением в системный кровоток.

В описанных исследованиях акцент был сделан именно на изучении свойств ватерита как системы доставки в нижние отделы легких. Данные о преимуществах ватерита субмикронного размера позволяют перейти к рассмотрению формуляции уже не с модельным веществом, а с конкретным биологически активным веществом, например, вызывающим апоптотическую гибель клетки. В рамках представленной работы была реализована стратегия, подразумевающая иммобилизацию бактериальной рибонуклеазы барназы в ватеритную матрицу (частицы размером 0.55 ± 0.12 мкм) с последующей функционализацией поверхности носителей с помощью аптамера, специфичного к молекуле клеточной адгезии эпителия (ErSAM). Для включения в состав носителей флуоресцентного маркера, частицы ватерита инкубировали в водном растворе бычьего сывороточного альбумина, меченного Цианином 5 или Цианином 7, до нанесения слоев из сульфата декстрана и барназы. Контроль эффективности формирования слоев был произведен с помощью измерения дзета-потенциала. Была оценена эффективность (LE) и емкость (CE) загрузки при нанесении одного или двух слоев барназы:

$$LE = ((M_u - M_c)/M_u) \times 100\% \quad (5),$$

$$LC = ((M_u - M_c)/M_u) \times 100\% \quad (6),$$

где M_c соответствует количеству фермента оставшееся в супернатанте (не адсорбированное на частицы ватерита), M_u - исходное количество фермента, а M_c - масса частиц (в мг).

Увеличение числа слоев приводило к увеличению как LE (с $23.1 \pm 0.8\%$ до $31.3 \pm 15.3\%$), так и CE (с $2.5 \pm 0.3\%$ до $3.1 \pm 0.9\%$). Сохранение активности фермента барназа было подтверждено для каждого вида формуляции.

Дополнительная модификация поверхности носителей аптамером, специфичным к ErSAM, была проведена после формирования всех слоев. Чтобы проверить успешность использования разработанных структур «ядро-оболочка» с иммобилизованным ферментом барназа, а также учесть вклад векторного олигонуклеотида к ErSAM в обеспечение цитостатического эффекта был проведен MTS тест на клеточной линии легочной карциномы человека (A549). Наибольший цитостатический эффект был продемонстрирован частицами с двойной загрузкой барназой и при наличии векторного олигонуклеотида к ErSAM.

Легочное аэрозольное введение, в частности интратрахеальная инстилляционная как модель ингаляции, является одной из наиболее эффективных стратегий локализации систем доставки лекарств в легкие [22], хотя могут возникать некоторые воспалительные изменения. Прежде всего, были проверены безопасность и эффективность разработанных носителей в трех дозах: 6×10^6 , 18×10^6 , 30×10^6 частиц. Был проведен гистологический анализ легочной ткани через 24 часа после однократной интратрахеальной инстилляционной 6×10^6 и 30×10^6 частиц на мышшь. Патологических изменений в альвеолярной структуре не было выявлено (окраска гематоксилином и эозином). Кроме того, более высокая доза была связана с лучшим сигналом флуоресценции и использовалась в следующих экспериментах.

Основным преимуществом местного введения является достижение желаемого эффекта при низких дозах введения. В данном случае это увеличение интенсивности флуоресцентного сигнала в легких, что напрямую связано с накоплением вводимых частиц «ядро-оболочка». Было проанализировано биораспределение 30×10^6 частиц с одним слоем

барназы с вектором к ЕрСАМ и без него через 1 ч и 24 ч после их интратрахеальной инстилляцией. Флуоресцентная визуализация органов *ex vivo* и анализ сигналов флуоресценции представлены на *Рисунке 4*. Более высокая флуоресценция в легких через 1 ч была обнаружена для частиц ватерита, модифицированных олигонуклеотидом к ЕрСАМ, по сравнению с частицами без него и контрольным образцом (введение фосфатно-солевого буфера).

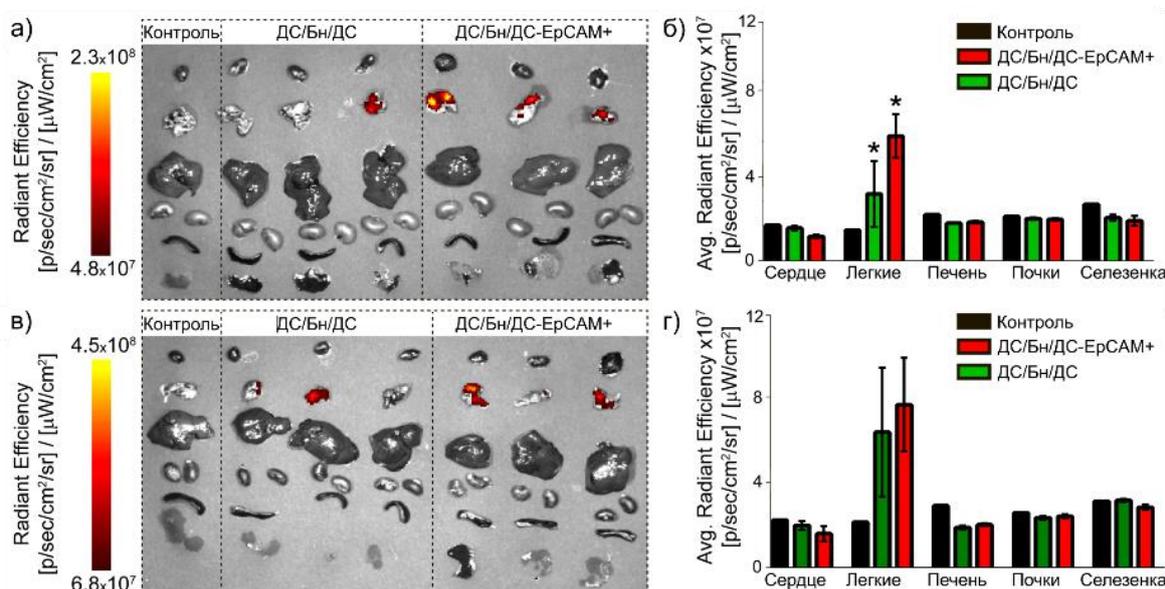


Рисунок 4. а) - г) Анализ биораспределения меченных Цианином 7 частиц ватерита без и с дополнительной модификацией аптамером к ЕрСАМ (ДС/Бн/ДС и ДС/Бн/ДС-ЕрСАМ+), после интратрахеальной инстилляцией через 1 ч (а, б) и 24 ч (в, г). В качестве контроля было осуществлено введение физиологического раствора (контроль). Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение (* - р-уровень значимости <0.05). Органы (сверху вниз): сердце, легкие, печень, почки, селезенка. Флуоресцентную визуализацию выполняли на системе визуализации IVIS SpectrumCT In Vivo в режиме эпи-освещения (возбуждение/испускание при 710/780 нм). ДС – декстран сульфат, Бн – барназа. [23].

Криосрезы легких, сделанные через 1 ч после интратрахеального введения частиц с аптамером, специфичным к ЕрСАМ, и без него, также продемонстрировали большее количество частиц с модифицированной поверхностью в легочной ткани (*Рисунок 5б-в*). На микроскопических изображениях криосрезов легких представлено именно альвеолярное пространство, которое являлось целью для распределения вводимых частиц. В случае с контрольным образцом сигнал от флуоресцентного красителя Цианина 5 (Ци5) не был обнаружен, только автофлуоресценция биологической ткани (*Рисунок 5а*). На остальных изображениях (*Рисунок 5б-в*) видны яркие пятна с типичной эмиссией Ци5, которые связаны с частицами «ядро-оболочка», вводимыми посредством интратрахеальной инстилляцией. Таким образом, внутрилегочное введение разработанных носителей, независимо от функционализации вектором к ЕрСАМ, приводит к их распространению в альвеолах. Частицы размером 0.5-1 мкм распределяются и глубоко проникают в легкие за счет броуновского движения. Таким образом, модификация олигонуклеотидом, специфичным к ЕрСАМ, не оказала значимого влияния на место депонирования, однако наличие векторных молекул на поверхности введенных частиц повлияло на количество частиц, оставшихся в легких (*Рисунок 5г*). Рассчитанная средняя поверхностная концентрация частиц после введения показывает, что наличие на поверхности векторных молекул позволяет сохранить в целевом органе больше носителей ($2.3 \times 10^3 \text{ мм}^{-2}$) по сравнению с немодифицированными носителями ($1.3 \times 10^3 \text{ мм}^{-2}$).

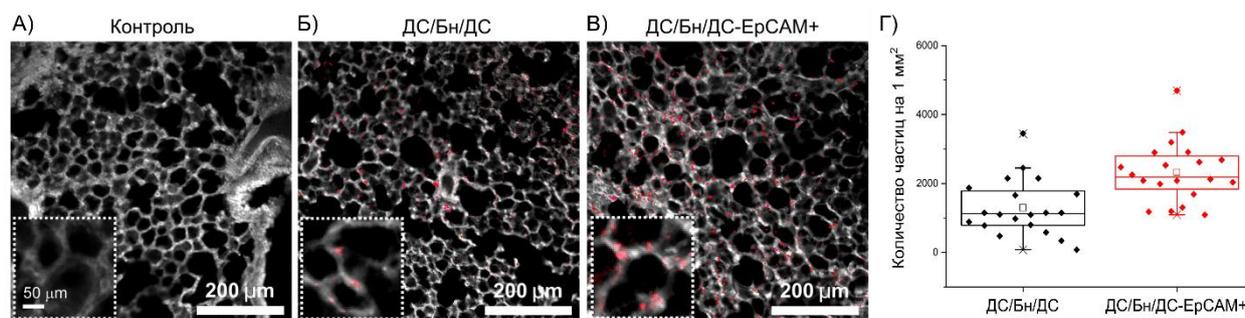


Рисунок 5. Наложение автофлуоресценции и канала Цианина 5 (маркер частиц) криосрезов легких через 1 ч после интратрахеального введения (а) фосфатно-солевого буфера, (б) частиц в отсутствии и (в) при наличии лиганда, специфичного к ЕрСАМ. На вставке показано увеличенное изображение структуры легкого [23]. (г) Плотность распределения частиц без и с модификацией поверхности векторным олигонуклеотидом специфичным к ЕрСАМ через 1 ч после интратрахеальной инстилляции (р-критерий составляет 0.0456).

Данный этап исследований продемонстрировал возможность новой системы доставки на основе частиц ватерита обеспечить эффективное накопление рибонуклеазы барназа в тканях легких. Таким образом, частицы ватерита с двумя бислоями, содержащими барназу, могут быть перспективным средством для эффективной доставки рибонуклеазы и других белков для лечения заболеваний легких, включая рак и вирусные заболевания.

В четвертой главе представлено исследование накопления субмикронных частиц ватерита (0.47 ± 0.14 мкм), несущих в себе агент фотодинамической терапии (порфиразин), в солидной опухоли мыши с последующей терапией. Эффективность загрузки составила 2.3×10^{-2} моль порфиразина на 1 мг ватеритных частиц (или около 10% масс./масс.), что сопоставимо с указанными в литературе данными для ватерита и малых молекул (<1 кДа). Были проведены эксперименты, направленные на оценку морфологических, фазовых изменений и кинетики высвобождения. Был проведен фазовый анализ частиц карбоната кальция с иммобилизованным порфиразином после инкубации в воде со значениями pH 7.4 и 6.8 методом рентгеновской дифракции. Замечено, что иммобилизация порфиразина сместила путь деградации ватерита в сторону растворения, а не перекристаллизации, которая оставалась доминирующей в случае исходных частиц. Ватеритные частицы в жидкостях подвергаются растворению/перекристаллизации со скоростью, зависящей от значения pH. Например, при pH 6.8 частицы ватерита высвобождали около 50% иммобилизованного вещества в течение 3 часов.

Для исследования распределения $\tau_{1/2}$ была проведена микроскопия времени жизни флуоресценции порфиразин-ватерита и свободного порфиразина, инкубированных в культуральной среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС). Среднее значение времени жизни флуоресценции порфиразин-ватерита составило 1.7 ± 0.1 нс, что было почти в 4 раза больше, чем у порфиразина, связанного с ФБС (0.4 ± 0.1 нс) [24].

Чтобы продемонстрировать концепцию доставки лекарств к опухолям *in vivo*, была использована модель животных с привитыми подкожно опухолями (карцинома толстой кишки, СТ26.WT). Композиции порфиразин-ватерит или свободного порфиразина (доза по порфиразину составляла 15 мг/кг, объем инъекции 150 мкл) вводили внутривенно (в/в) в хвостовую вену мыши. Были получены прижизненные флуоресцентные изображения животных с опухолью до и после инъекции (через 5, 30 минут, 1, 3, 6 и 24 часа). На Рисунке б а,б показаны зависимости интенсивности флуоресценции областей на двух лапах мышей (с опухолью $I_{Фл}^{Опухоль}$ и без $I_{Фл}^{Здоров}$) от времени при в/в введении порфиразин-ватерита и свободного порфиразина, соответственно. Флуоресцентный контраст опухоли был

определен как соотношение интенсивностей флуоресценции областей с опухолью и без. Контраст, оцененный в момент времени после инъекции $t = 3$ ч, показан в виде гистограммы на *Рисунке 6 в*.

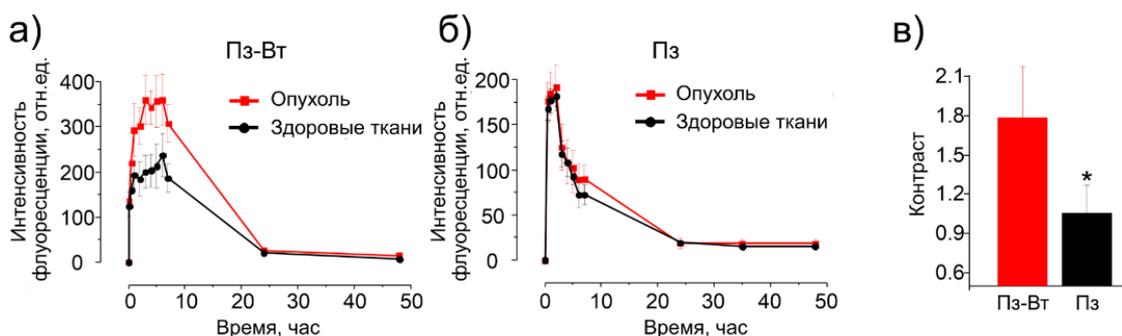


Рисунок 6. а-б) Графики интенсивностей сигналов флуоресценции, усредненных по площади, в области опухоли на левой задней конечности («опухоль», красные квадраты) и такой же области на противоположной конечности («здоровые ткани», черные кружки), полученные после внутривенной инъекции в случае введения порфиразин-ватерита (а) и свободного порфиразина (б). в) Гистограмма соотношения интенсивностей флуоресценции опухоль/здоровые ткани через 3 часа после внутривенной инъекции порфиразин-ватерита (красный столбец) и свободного порфиразина (черный столбец). Данные представлены как среднее арифметическое \pm стандартное отклонение. * Обозначает статистически значимую разницу, оцененную как $p < 0.05$. Пз – порфиразин, Вт – ватерит [25].

Начало накопления порфиразина в опухоли было обнаружено на временной точке в 30 мин, и в течение последующих 3 ч постепенно увеличивалось вместе с общим уровнем $I_{Фл}$ (интенсивность флуоресценции). Максимум был достигнут в 3 часа (соотношение между $I_{Фл}^{Опухоль}$ и $I_{Фл}^{Здоров}$ составляло 1.8 ± 0.3 (*Рисунок 6 в*), после чего интенсивность флуоресценции начала спадать сигнализируя о выведении порфиразина. Учитывая, что в случае свободного порфиразина специфического накопления в опухоли не обнаружено (*Рисунок 6 б*), была выдвинута гипотеза о способствовании частиц ватерита увеличению аккумуляции порфиразина в опухоли.

Биораспределение порфиразин-ватерита и свободного порфиразина дополнительно исследовали с помощью микроскопии *ex vivo* собранных органов и тканей мышей с опухолями. Для оценки поглощения порфиразина органами и тканями использовали усредненное по рассматриваемой области значение $I_{Фл}$. В обоих случаях введения порфиразина-ватерита и свободного порфиразина наиболее выраженным было накопление порфиразина в опухоли, печени и легких. Важно отметить, что режим лечения порфиразин-ватеритом приводил к накоплению в опухоли $23.1 \pm 2.4\%$ введенной дозы на грамм животного (ВД/г), что почти в 2 раза больше, чем при использовании свободного порфиразина. Тогда как в печени накапливалось примерно равное количество порфиразина в обоих случаях введения. Подтверждение локализации частиц ватерита в опухоли было получено с помощью сканирующей электронной микроскопии, совмещенной с энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии, и микроскопии времени жизни флуоресценции. Было обнаружено, что в просветах сосудов скапливались агрегаты частиц ватерита с размерами в несколько микрометров. В некоторых случаях в богатых кальцием агрегатах присутствовала как ватеритная, так и аморфная кристаллическая фаза, косвенно указывая на растворение. В остальных случаях было очевидно образование кристаллитов кальцита, что свидетельствовало о процессе перекристаллизации. Такая трансформация косвенно указывает на высвобождение инкапсулированного вещества, в данном случае порфиразина, как сообщается в литературе.

Скорость кровотока, по-видимому, играет решающую роль в накоплении и биодegradации порфиразин-ватерита опухолевой тканью. Сообщалось, что в ядре опухоли скорость кровотока на порядок ниже, чем в нормальных микрокапиллярах и на периферии. Это объясняет полное растворение/перекристаллизацию порфиразин-ватерита и последующее проникновение порфиразина в паренхиму ядра опухоли. Также было проведено численное моделирование процессов высвобождения из частиц ватерита низкомолекулярных лекарственных средств и последующее проникновение в интерстиций опухоли. Модель Вейбулла [26], которая учитывает первичное резкое высвобождение, лучше всего соответствует экспериментальным данным, полученным при оценке высвобождения в слабокислом pH 6.8, и описывается формулой:

$$\Phi_{ВТ_К}(t) = a_{ВТ_К} + b_{ВТ_К}(1 - \exp(-\kappa_{ВТ_К}t)) \quad (7),$$

где $a_{ВТ_К}$, $b_{ВТ_К}$, $\kappa_{ВТ_К}$ соответствуют 20, 57, 24.5 (рисунки 7а – красная сплошная линия). Совокупное высвобождение при pH 7.4 было аппроксимировано моделью Корсмейера-Пеппаса ($R^2 = 0.9652$), используя $\Phi_{ВТ_Н}(t) = 18t^{0.07}$ (рисунки 7б).

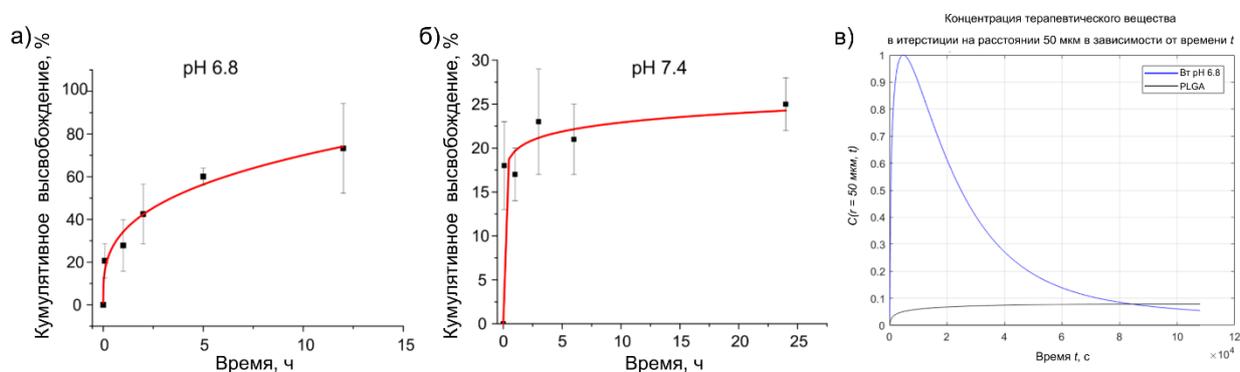


Рисунок 7 – Профиль высвобождения препаратов из частиц ватерита (а) Фотосенса в фосфатно-солевом буфере при pH 6.8 (б) Порфиразина в воде при pH 7.4. Черными квадратами представлены экспериментальные данные (среднее \pm стандартное отклонение), красной сплошной линией – аппроксимация с использованием модели Вейбулла (а) и Корсмейера-Пеппаса (б). (в) Нормализованный график зависимости концентрации порфиразина в интерстиции от времени на радиальном расстоянии $r = 50$ мкм от капилляра в случае средств доставки в составе частиц ватерита (синяя линия) и PLGA (черная линия) [25].

Сравнивая численное моделирование кинетики высвобождения (рисунки 7в) из частиц ватерита и наночастиц кремния покрытых сополимером молочной и гликолиевой кислот (PLGA) можно сделать вывод о способности частиц ватерита обеспечить локально высокую концентрацию терапевтического вещества благодаря быстрой динамике растворения / рекристаллизации под действием слабокислого pH, в отличие от носителей, демонстрирующих медленное высвобождение иммобилизованного вещества.

Чтобы установить, что доставка порфиразина с помощью частиц ватерита в опухоль сохраняет фотосенсибилизирующие свойства свободного порфиразина, была проведена ФДТ на лабораторных животных с привитыми подкожными опухолями. Опухолевые участки облучали светодиодным источником света с длиной волны 640 нм в дозе 150 Дж/см², а результат лечения был оценен по коэффициенту ингибирования роста опухоли (КИРО). На Рисунке 8 представлены результаты анализа динамики роста объема опухоли после проведения ФДТ во всех группах. ФДТ в опытных группах привела к достоверному снижению скорости роста опухоли по сравнению с контрольными группами, включающими только лечение воздействием светом и только внутривенные инъекции порфиразина и порфиразина-ватерита. На вставке показано, что биологически значимый КИРО, оцененный как КИРО > 50%, был обнаружен только у подопытных, которым

вводили раствор порфиразин-ватерит и свободный порфиразин в сочетании со световой обработкой.

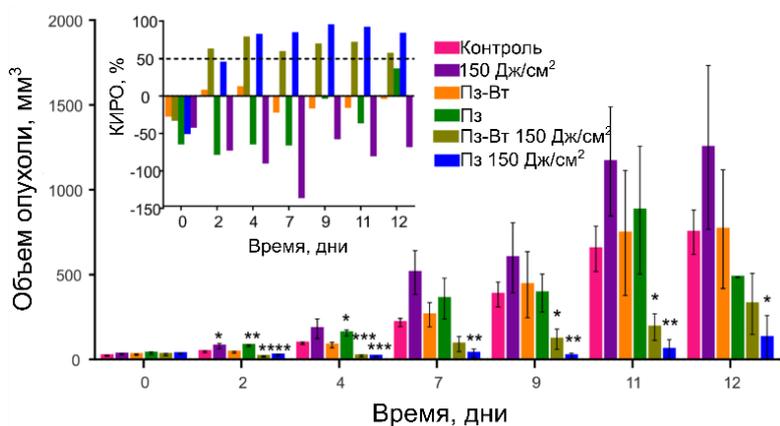


Рисунок 8. Динамика роста объема опухоли *in vivo* у мышей Balb/c после проведения ФДТ. Столбики ошибок означают стандартную ошибку; (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ и (***) $p < 0.001$ (критерий Даннета, $n = 5-7$). Вставка: динамика КИРО во всех группах кроме контрольной (без инъекции и освещения). Пунктирная линия показывает биологически значимое подавление роста опухоли ($>50\%$) [25]

Была успешно продемонстрирована альтернативная стратегия доставки лекарств в паренхиму опухоли, не основанная на эффекте повышенной проницаемости и удержания (EPR). Прямому прохождению нанолекарств из системного кровообращения в интерстиций опухоли препятствует медленная диффузия наночастиц. Чтобы преодолеть этот барьер, был рассмотрен трехэтапный подход к доставке лекарственного средства: (1) контейнеры с лекарственным средством, вводимые системно, прикреплялись к эндотелию опухоли, затем (2) высвобождали лекарственное средство во внутрикапиллярное пространство и (3) лекарственное средство проникало через стенки эндотелия в интерстиций опухоли за счет градиента концентраций. Быстрое высвобождение лекарства из контейнера приводит к созданию высокой локальной концентрации лекарства в сосуде.

В пятой главе субмикронные частицы ватерита рассматриваются как контейнеры для доставки противогрибкового препарата нафтифин (Нф) в волосяные фолликулы мыши. Частицы ватерита, полученные методом осаждения в отсутствие и присутствии антимиотика, были визуализированы с помощью сканирующего электронного микроскопа (MIRA II LMU, Tescan) для определения морфологии поверхности частиц и распределения по размерам. В *таблице 1* приведены значения рассчитанных геометрических параметров. Полученные результаты свидетельствуют об увеличении размера частиц с 0.87 ± 0.32 мкм до 1.04 ± 0.42 мкм и их возрастающей полидисперсности при загрузке антимиотиком (с 0.117 до 0.169).

Количественная оценка эффективности загрузки частиц ватерита препаратом «нафтифин» была проведена по спектрам флуоресценции супернатантов. Под эффективностью загрузки понимается отношение массы иммобилизованного препарата к массе частиц ватерита, выраженное в процентах. Среднее значение эффективности загрузки составило $4.9 \pm 1.2\%$, что показывает высокую эффективность включения антимиотика в предлагаемый носитель по сравнению с разрешенными к применению средствами, такими как 1% раствор (Экзодерил®), 1% крем (Naftifine hydrochloride 1% cream, Renaissance Pharma, Inc.) и 1% гель (Naftifin, Merz Pharmaceuticals).

Для подтверждения факта включения нафтифина в состав частиц ватерита, были исследованы спектры комбинационного рассеяния (КР) полученных образцов. Спектр КР частиц ватерита с иммобилизованным препаратом нафтифином гидрохлоридом, помимо ярко выраженного пика, присущего ватериту (1090 см^{-1}), содержит набор компонент (алкены – 1302 см^{-1} ; амин гидрохлорид – 1439 см^{-1} ; алкены конъюгированные с арильными

группами – 1653 см^{-1}), позволяющих точно утверждать, что молекулы нафтифина гидрохлорида присутствуют в ватеритной матрице.

В зависимости от иммерсионной среды, ватерит либо полностью растворяется, либо трансформируется в кальцит [27]. Высвобождение иммобилизованного вещества из ватеритной матрицы-носителя сопровождается процессом перекристаллизации. На скорость трансформации ватерита влияет не только среда, в которой располагаются частицы, но и наличие стабилизирующих веществ, как например полимеры, белки и т.д., формирующие оболочку, препятствующую покиданию ионов с поверхности частиц. Контролируя фазу частиц, можно судить о скорости высвобождения иммобилизованного вещества. В связи с этим, было проведено исследование кинетики перекристаллизации частиц ватерита, содержащих антимикотик и дополнительные оболочки полимеров, при инкубации в различных средах (деионизованная вода, физиологический раствор). Были созданы образцы без полимерных слоев (Вт+Нф), с одним слоем гепарина ((Вт+Нф)/Геп), с одним бислоем полиаргинина и декстран сульфата ((Вт+Нф)/(ПА/ДС)), с двумя бислоями полиаргинина и декстран сульфата ((Вт+Нф)/(ПА/ДС)₂) и с двумя бислоями полиагренина и декстран сульфата, дополненные одним слоем гепарина ((Вт+Нф)/(ПА/ДС)₂+Геп)).

Результаты исследования кинетики трансформации частиц ватерита с иммобилизованным нафтифином гидрохлоридом в отсутствие и при наличии полимерных оболочек представлены на графиках (Рисунок 9 А-Б), где показано увеличение площади частиц в модификации кальцита по отношению к площади занимаемой всеми частицами карбоната кальция.

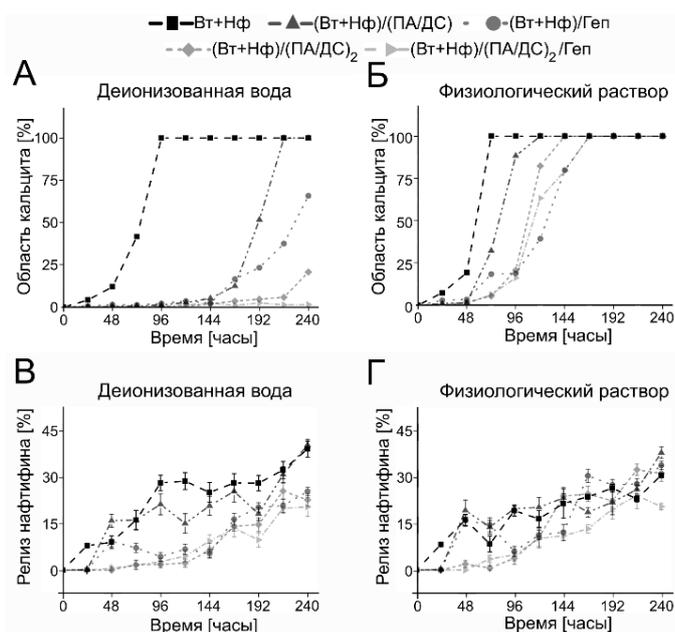


Рисунок 9. Кинетика трансформации частиц ватерита с иммобилизованным нафтифином гидрохлоридом в отсутствие и при наличии полимерных оболочек при инкубировании в (А) деионизованной воде и (Б) физиологическом растворе. Кинетика высвобождения нафтифина гидрохлорида из ватеритной матрицы в отсутствие и при наличии полимерных оболочек при инкубировании в (В) деионизованной воде и (Г) физиологическом растворе. На графиках отображены средние значения \pm стандартная ошибка [28].

Во-первых, для все типов образцов было установлено, что при инкубации контейнеров в физиологическом растворе процесс перекристаллизации ускорялся. Во-вторых, наличие даже одного слоя полимера значительно увеличивает длительность трансформации частиц ватерита в кальцит как в воде, так и в физиологическом растворе. В-третьих, при инкубировании в физиологическом растворе наибольшую степень защиты ватеритных структур обеспечивают оболочки с максимальным количеством слоев, а именно (ПА/ДС)₂ и (ПА/ДС)₂/Геп.

На Рисунке 9 В-Г представлены кривые высвобождения нафтифина гидрохлорид из ватеритных матриц в отсутствие и при наличии полимерных оболочек при инкубировании в деионизованной воде и физиологическом растворе соответственно. Как видно из обоих

графиков, наименьший выход лекарственного препарата достигается при адсорбции на поверхность ватеритных частиц максимального количества полимерных слоев, то есть наличие (ПА/ДС)₂ и (ПА/ДС)₂/Геп позволяет дольше сохранять нафтифин гидрохлорид в структуре частиц ватерита. Статистический анализ результатов показал, что кинетика высвобождения нафтифина гидрохлорида из частиц, покрытых (ПА/ДС)₂ и (ПА/ДС)₂/Геп значительно отличается от динамики чистых образцов и покрытых (ПА/ДС) на всех временных интервалах при инкубировании в деионизованной воде ($p < 0.01$). Для случая инкубирования в физиологическом растворе статистически значимая разница существует только между кинетикой высвобождения из непокрытой ватеритной матрицы и с максимальным количеством слоев (ПА/ДС)₂/Геп ($p < 0.05$).

Важным этапом исследований было определение композиции, обеспечивающей наилучший захват частиц клетками линии NHDF. На основе трехмерной флуоресцентной микроскопии были подсчитывали частицы, захваченные клетками. Среднее количество интернализированных частиц на клетку для групп (Вт+Нф), (Вт+Нф)/Геп, (Вт+Нф)/(ПА/ДС)₂ и (Вт+Нф)/(ПА/ДС)₂/Геп составляет 2.57, 2.67, 1.68 и 2.62 соответственно. Таким образом, модификация поверхности частиц ватерита с иммобилизованным нафтифином повлияла на поглощение носителей, но не так сильно, как ожидалось.

Было проведено исследование антимикотических свойств новой формы противогрибкового препарата с целью определения чувствительности дрожжей линии *Candida albicans*, а также выявление отличий в динамике роста культуры дрожжей при инкубировании со свободным нафтифином гидрохлоридом и иммобилизованным в пористые частицы ватерита. Начиная с концентрации 62.5 мкг/мл, частицы ватерита загруженные антимикотиком намного успешнее подавляют рост клеток *C. albicans* по сравнению со свободным препаратом после 36 часов инкубирования. Наиболее выраженный антимикотический эффект наблюдался при концентрации 125 мкг/мл. Такие результаты можно объяснить длительным высвобождением нафтифина из ватеритной матрицы в среду. Таким образом, частицы ватерита с иммобилизованным нафтифином гидрохлоридом были постоянным источником новых молекул противогрибкового вещества во время эксперимента, в отличие от раствора лекарства, который был добавлен один раз. Таким образом, использование Вт+Нф обеспечивало пролонгирование противогрибкового действия, увеличивая эффективность подавления роста грибов примерно в 2 раза по сравнению с раствором нафтифина.

Последним этапом данного исследования было подтверждение возможности доставки частиц ватерита с иммобилизованным нафтифином в волосяные фолликулы мышей, используя методику, разработанную ранее группой Ю. И. Свенской на крысах [29], в которой для улучшения проникновения в глубокие слои кожи были использованы спирт для очищения и обезжиривания, а также воздействие терапевтическим ультразвуком. На рисунке 10 представлены СЭМ изображения волосяных фолликул мыши выдернутых из кожи до, сразу после, через 24, 48, 72, 96 и 120 часов после введения частиц.

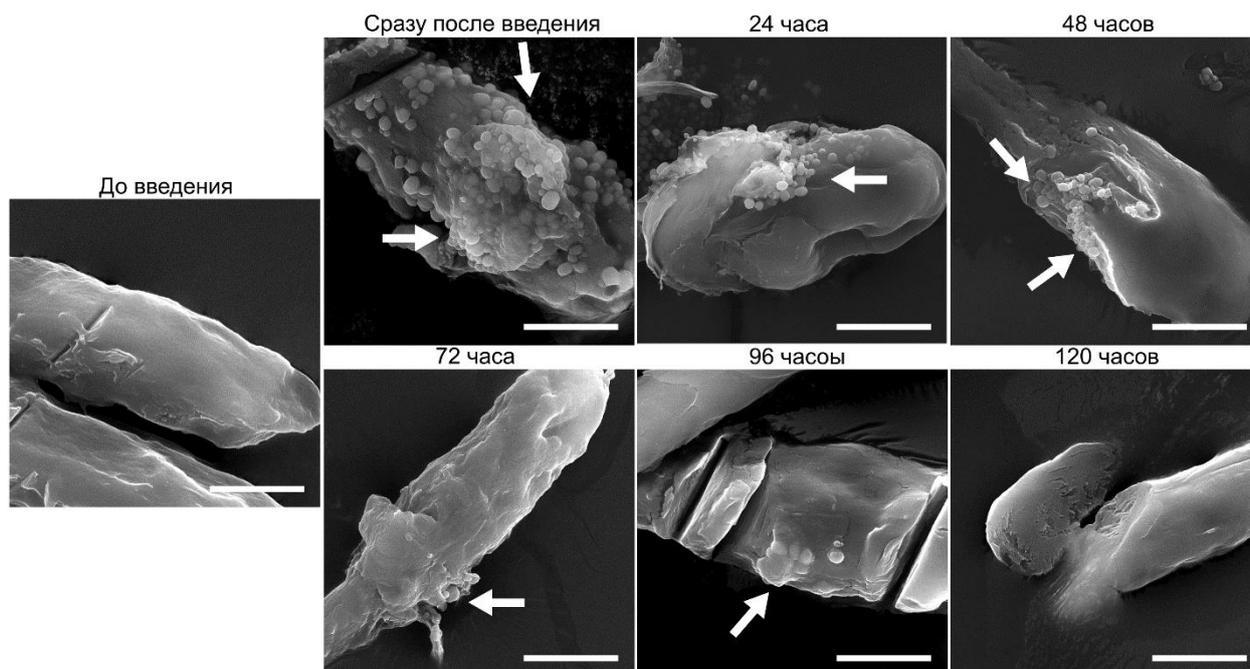


Рисунок 10. СЭМ изображения волосяных фолликул мыши выдернутых из кожи до, сразу после, через 24, 48, 72, 96 и 120 часов после введения частиц. Белыми стрелками отмечено расположение частиц ватерита в волосяном фолликуле. Масштабный отрезок составляет 20 мкм [28].

Как видно из представленных изображений частицы ватерита с иммобилизованным нафтифином гидрохлоридом проникают по всей глубине волосяного фолликула и полностью растворяются через 120 часов. Основная масса частиц растворяется в течение 72 часов тем самым обеспечивая высвобождение лекарственного препарата во внутренних тканях волосяного фолликула. Таким образом, использование пористых частиц ватерита для терапии грибковых заболеваний кожи позволит доставить лекарственный препарат в самые глубокие слои кожи и обеспечить длительное и непрерывное высвобождение лекарства.

В заключении сформулированы основные результаты и выводы, полученные в ходе выполнения исследований, вошедших в диссертационную работу.

Основные результаты и выводы

1. Исследованы частицы ватерита размером 0.65 ± 0.17 , 1.35 ± 0.12 3.15 ± 0.60 мкм с позиции распределения в легких после интратрахеальной инстилляцией. Частицы трех размеров достигали легких и, как следствие, доставляли иммобилизованное вещество (конъюгат бычьего сывороточного альбумина и Цианина 7), в тело животных. При этом частицы размером 0.65 ± 0.17 мкм обеспечили самую эффективную аккумуляцию флуоресцентного сигнала в органе-мишени в течение 72 часов. Достижение такими частицами альвеолярного пространства было подтверждено с помощью флуоресцентной микроскопии криосрезов целевого органа. Кроме того, частицы размером 0.65 ± 0.17 мкм обеспечили самое продолжительное время удержания флуоресценции в легких и характерную фармакокинетику для систем доставки лекарственных средств с пролонгированным высвобождением в сосудистую сеть.
2. Полного растворения и перекристаллизации частиц ватерита диаметром 0.65 ± 0.17 мкм при взаимодействии с компонентами бронхоальвеолярного лаважа не происходит после 6 суток со-инкубации *in vitro*, в то время как полный переход

- частиц карбоната кальция из ватеритной в кальцитную полиморфную модификацию при инкубации в воде и физиологическом растворе составляет менее суток, что может быть объяснено адсорбцией и формированием «короны» на поверхности частиц ватерита компонентами легочного флюида (белками, фосфолипидами).
3. Продемонстрирован подход к повышению эффективности использования барназы, вызывающего гибель раковых клеток за счет возможности многократной загрузки частиц ватерита (0.55 ± 0.12 мкм) и модификации их поверхности вектором специфичным к ЕрСАМ для адресации.
 4. Рассчитанная на основе анализа гистологических срезов тканей легких средняя поверхностная концентрация частиц после введения показывает, что наличие на поверхности векторных молекул позволяет сохранить в целевом органе больше носителей (2.3×10^3 мм⁻²) по сравнению с немодифицированными носителями (1.3×10^3 мм⁻²).
 5. Контейнеры на основе частиц ватерита размером 0.47 ± 0.14 мкм с лекарством (порфиразин) пассивно накапливаются в аномальной сосудистой сети опухоли, характеризующейся медленной скоростью кровотока, после внутривенной инъекции. Эти контейнеры прикрепляются к эндотелию капилляров и высвобождают лекарственное средство, которое частично уносится с током крови, а частично распространяется из капилляра в интерстиций опухоли. Быстрое высвобождение лекарства из контейнера представляет собой ключевое преимущество в рамках представленной концепции.
 6. С помощью численного моделирования изменения концентрации вещества $C(r,t)$ от времени при фиксированном расстоянии от капилляра ($r = 50$ мкм) продемонстрировано и объяснено быстрое высвобождение порфиразина из частиц ватерита, что обеспечивает концентрацию вещества в 20 раз большую в интерстиции опухоли через 3 часа по сравнению с медленно высвобождающимися частицами на основе PLGA.
 7. Фотодинамическая терапия через 3 часа после внутривенного введения суспензии частиц ватерита, содержащих порфиразин, привела к достоверному снижению скорости роста опухоли более чем на 50% по сравнению с терапией, включающей только воздействие светом или только внутривенные инъекции свободного порфиразина и в составе частиц ватерита.
 8. Применение пористых частиц карбоната кальция гарантирует длительное высвобождение загруженного препарата и время его высвобождения может быть увеличено за счет адсорбции полимеров на поверхность частиц. Так, максимальное увеличение времени высвобождения было достигнуто при нанесении наибольшего числа слоев, то есть использование оболочки, содержащей два бислоя полиаргенина и декстрана сульфата и терминальный слой гепарина.
 9. Иммобилизация нафтифина в частицы ватерита способна обеспечить непрерывное фунгицидное и фунгистатическое действие в месте поражения за счет высокой емкости загрузки частиц ($4.9 \pm 1.2\%$ мас.) и длительного высвобождения препарата из своей структуры.

Список литературы

1. Yoo J.-W. et al. // Nature Reviews Drug Discovery – 2011. – Т. 10 – № 7 – С.521–535.
2. Lavan D.A. et al. // Nature biotechnology – 2003. – Т. 21 – № 10 – С.1184–1191.
3. Wu J. // Journal of personalized medicine – 2021. – Т. 11 – № 8 – С.771.
4. Kirpotin D.B. et al. // Cancer research – 2006. – Т. 66 – № 13 – С.6732–6740.
5. Fay F. et al. // Immunotherapy – 2011. – Т. 3 – № 3 – С.381–394.
6. Vaupel P. et al. // Cancer research – 1989. – Т. 49 – № 23 – С.6449–6465.
7. Raghunand N. et al. // The British journal of radiology – 2003. – Т. 76 – С.11–22.
8. Bertrand N. et al. // Advanced drug delivery reviews – 2014. – Т. 66 – С.2–25.
9. Tiwari G. et al. // International journal of pharmaceutical investigation – 2012. – Т. 2 – № 1 – С.2.
10. Yu T. et al. // ACS Nano – 2011. – Т. 5 – № 7 – С.5717–5728.
11. Shaabani E. et al. // International journal of molecular sciences – 2021. – Т. 22 – № 2 – С.831.
12. Powell K.C. et al. // International Journal of Pharmaceutics – 2017. – Т. 521 – № 1–2 – С.8–18.
13. Biradar S. et al. // Journal of nanoscience and nanotechnology – 2011. – Т. 11 – № 8 – С.6868–6874.
14. German S. et al. // Scientific reports – 2018. – Т. 8 – № 1 – С.17763.
15. Ma M. et al. // Recent patents on nanotechnology – 2010. – Т. 4 – № 3 – С.164–170.
16. Svenskaya Y. et al. // Biophysical Chemistry – 2013. – Т. 182 – С.11–15.
17. Gusliakova O. et al. // Frontiers in Pharmacology – 2018. – Т. 9 – № JUN – С.1–13.
18. Carvalho T.C. et al. // International Journal of Pharmaceutics – 2011. – Т. 406 – № 1–2 – С.1–10.
19. ГОСТ Р 54597-2011/ISO/TR 27628:2007 "Воздух рабочей зоны. Ультрадисперсные аэрозоли, аэрозоли наночастиц и наноструктурированных частиц. Определение характеристик и оценка воздействия при вдыхании."
20. El-Sherbiny I.M. et al. // Global Cardiology Science and Practice – 2015. – Т. 1 – № 2.
21. Копас Т. // International Journal of Biological Macromolecules – 2021. – Т. 169 – С.290–301.
22. Groneberg D.A. et al. // Respiratory medicine – 2003. – Т. 97 – № 4 – С.382–387.
23. Abakumova T. et al. // ACS Applied Nano Materials – 2022. – Т. 5 – № 8 – С.10744–10754.
24. Izquierdo M.A. et al. // Journal of Material Chemistry B – 2015. – Т. 3 – № 6 – С.1089–1096.
25. Parakhonskiy B. et al. // Applied Materials Today – 2021. – Т. 25 – С.101199.
26. Papadopoulou V. et al. // International journal of pharmaceutics – 2006. – Т. 309 – С.44–50.
27. Ogino T. et al. // Geochimica et Cosmochimica Acta – 1987. – Т. 51 – № 10 – С.2757–2767.
28. Gusliakova O. et al. // Materials Science & Engineering C – 2021. – Т. 119 – С.111428.
29. Svenskaya Y. et al. // ACS applied materials & interfaces – 2019. – Т. 11 – № 9 – С.17270–17282.

Основные результаты диссертации изложены в работах

Статьи:

- C1. **Gusliakova, O.**, Atochina-Vasserman, E. N., Sindeeva, O., Sindeev, S., Pinyaev, S., Pyataev, N., ... & Gow, A. J. Use of submicron vaterite particles serves as an effective delivery vehicle to the respiratory portion of the lung //Frontiers in pharmacology. – 2018. – Т. 9. – С. 559. (Q1, IF 4.4)
- C2. **Гуслякова, О. И.**, Ленгерт, Е. В., Аткин, В. С., Тучин, В. В., & Свенская, Ю. И. Спектральный мониторинг процесса иммобилизации препарата нафтифин в субмикронные частицы ватерита //Оптика и спектроскопия. – 2019. – Т. 126. – №. 5. – С. 620-626. (Q4, IF 0.7)
- C3. **Gusliakova, O.**, Verkhovskii, R., Abalymov, A., Lengert, E., Kozlova, A., Atkin, V., Olga Nechaeva, Anna Morrison, Valery Tuchin & Svenskaya, Y. Transdermal platform for the delivery of the antifungal drug naftifine hydrochloride based on porous vaterite particles //Materials Science and Engineering: C. – 2020. – С. 111428. (Q1, IF 8.4)
- C4. Parakhonskiy B. V., Shilyagina N. Y., **Gusliakova O.I.**, Volovetskiy A.B., Kostyuk A.B., Balalaeva I.V., Klapshina L.G., Lermontova S. A., Tolmachev

V., Orlova A., Gorin D.A., Sukhorukov G.B., Zvyagin A.V. A method of drug delivery to tumors based on rapidly biodegradable drug-loaded containers // *Applied Materials Today*. – 2021. – Т. 25. – С. 101199. (Q1, IF 8.3)

C5. Abakumova T. O., **Gusliakova O. I.** et al. Barnase-Loaded Vaterite Nanoparticles Functionalized by EpCAM Targeting Vectors for the Treatment of Lung Diseases // *ACS Applied Nano Materials*. – 2022. – Т. 5. – №. 8. – С. 10744-10754. (Q1, IF 5.4)

Тезисы докладов конференции:

T1. **Gusliakova O.**, Size-dependent biodistribution of vaterite particles in the mice lungs // 7th International Conference “Nanoparticles, Nanostructured Coatings and Microcontainers: Technology, Properties, Applications” (12-15 May, 2016, Tomsk, Russia) – устный доклад

T2. **Gusliakova O.**, Polymorphism of Calcium Carbonate Microparticles Incubated with Rat Large and Small Aggregate Pulmonary Surfactant – Fraction // 21st International Symposium on Surfactants in Solution (5-11 June, 2016, Jinan, China) – устный доклад

T3. **Gusliakova O.**, Use of submicron vaterite particles serves as an affective delivery vehicle to the respiratory portion of the lung // ASCB-EMBO / 2017 Meeting (2-6 December, Philadelphia, USA) – постерный доклад

T4. **Gusliakova O.**, Immobilization of the antifungal drug Naftifine in the porous vaterite particles // Conference on Mycology and Microbiology (11-12 April, 2018, Moscow, Russia) – постерный доклад

T5. **Gusliakova O.**, Immobilization of antifungal agent “Naftifine” in porous calcium carbonate particles // 6th International Symposium “Optics and Biophotonics”, Saratov Fall Meeting 2018 (24-28 September, 2018, Saratov, Russia) – постерный доклад

T6. **Gusliakova O.**, In vivo study of vaterite particle biodistribution and pharmacokinetics of fluorescent dye adsorbed on it after instillation to mice lungs // 7th International Symposium “Optics and Biophotonics”, Saratov Fall Meeting 2019 (23-27 September, 2019, Saratov, Russia) – постерный доклад

T7. **Gusliakova O.**, Submicron vaterite particles are promising drug carriers in treatment of pulmonary disease // UK-Russia Workshop “Patient-tailored biomaterials for tissue regeneration, combating microbial contamination and drug delivery” (2nd – 4th October, 2019, The Storey, Lancaster, UK) – постерный доклад.

Подписано в печать 08.10.2024.
Формат 60x84 ¹/₁₆. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Объем 1,0 печ. л. Тираж 50 экз. Заказ 52532.

Типография «Техно-Декор»
Саратов, ул. Московская, 160
тел.: (845-2) 77-08-48