

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра биотехнологии

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ Т. Г. Волова

« _____ » _____ 2020 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Исследование влияния полимерных микрочастиц с 5-фторурацилом на
культуру клеток HeLa

Руководитель

подпись

доцент, к.б.н.

должность, учёная степень

А.А. Шумилова

инициалы, фамилия

Выпускник

подпись

А.О. Маршанцева

инициалы, фамилия

Красноярск 2020

Содержание

ВВЕДЕНИЕ	3
Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	5
1.1. Системы доставки лекарств.....	5
1.2. Полимерные микроносители и препараты.....	8
1.3. Культуры клеток, как система оценки действия препаратов.....	12
1.4. Полигидроксиалканоаты в качестве микроносителей лекарственных препаратов	14
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	21
2.1. Материалы исследования	21
2.1.1. Культура клеток <i>HeLa</i>	21
2.2. Методы исследования	22
2.2.1. Получение микрочастиц на основе ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГВ с добавлением 5-фторурацила.....	22
2.2.2. Характеристика сконструированных микрочастиц.....	23
2.2.3. Исследование оттока лекарственного препарата <i>in vitro</i>	24
2.2.4. Культивирование клеток <i>HELA</i>	24
2.2.5. Исследование цитотоксичности и эффективности действия полученных частиц в культуре клеток.....	25
2.2.6. Статистический анализ данных.....	26
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	27
3.1. Характеристика полимерных микрочастиц на основе ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГВ в комплексе с 5-фторурацилом.....	27
3.2. Исследование выхода 5-фторурацила из микрочастиц ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГВ.....	30
3.3. Эффективность действия сконструированных форм противоопухолевого препарата.....	32
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ	38

ВВЕДЕНИЕ

Проблема онкологических заболеваний остается приоритетной для современного общества, медицины и биологии. По данным Международного агентства по изучению рака (МАИР), ежегодно в мире регистрируется более 12 млн. новых случаев рака и около 6,2 млн смертей от него. Ежегодный темп прироста злокачественных новообразований составляет примерно 2%, что превышает на 0,3-0,5% рост численности населения мира. Неутешителен прогноз экспертов ВОЗ: онкологическая заболеваемость во всем мире возрастет к 2050 г. до 24 млн случаев, а смертность до 16 млн. ежегодно регистрируемых случаев [1].

Лекарственные средства занимают важное место в лечении злокачественных новообразований. В настоящее время, системы для доставки химиотерапевтических средств очень разнообразны (липосомы, иммунолипосомы, трансферосомы, мицеллы, дендимеры, наночастицы, нанотрубы, мультифункциональные системы для доставки ЛС и др.) и каждая имеет свои преимущества и недостатки. В основном большинство систем синтетического происхождения могут образуют токсические продукты в организме, которые вызывают различные осложнения. Поэтому актуально создание более натуральных, экономически выгодных и биосовместимых систем для доставки терапевтических средств.

На сегодняшний день среди биоматериалов, применяемых в медицине и активно изучаемых в фармакологии, выделяют природные полимеры, синтезируемые микроорганизмами – полигидроксиалканоаты (ПГА). Важнейшей их особенностью являются биосовместимость и биоразрушаемость [2].

ПГА биосовместимы преимущественно из-за гидроксимасляной кислоты, которая является составляющей клеточных мембран животных, а контролируемая и медленная деградация этих полимеров позволяет получать на

их основе системы доставки лекарственных препаратов. Наиболее интересным является факт о возможности управления кинетикой высвобождения лекарственного препарата с помощью изменения химической структуры ПГА для достижения максимальной доставки лекарства.

В связи с этим **цель** данной работы – получение и исследование микрочастиц на основе ПЗГБ и сополимера ПЗГБ/ЗГВ с противоопухолевым препаратом 5-фторурацилом.

Для достижения цели были сформулированы **следующие задачи**:

1. Эмульсионным методом получить микрочастицы на основе ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГВ, нагруженных 5-фторурацилом;
2. Охарактеризовать свойства полученных микрочастиц (морфология частиц, средний диаметр, поверхностный заряд микрочастиц) в зависимости от мономерного состава ПГА;
3. Исследовать выход противоопухолевого препарата 5-фторурацила из микрочастиц на основе ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГВ *in vitro*;
4. Исследовать цитостатический эффект полимерных микрочастиц, содержащих 5-фторурацил в культуре клеток HELA в зависимости от нагрузки препарата.

Глава 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Системы доставки лекарств

На современном этапе развития фармакологии одним из приоритетных направлений является разработка новых подходов к созданию лекарственных систем пролонгированного действия с возможностью адресной доставки лекарственного препарата. Системы доставки лекарств (СДЛ) представляют собой систему "лекарственный препарат - носитель", которая вводится в организм с целью пролонгирования действия препарата и обеспечения направленного транспорта препарата к очагу патологического процесса в организме. Такие системы составляют важнейшую группу систем полимерного строения.

Постепенное попадание лекарственного вещества (ЛВ) в организм в малых дозах позволяет устранить многие недостатки свободных ЛВ, ведь скорость попадания можно регулировать, изменяя строение системы [4]. Лечение традиционными формами лекарственных препаратов (таблетки, мази, капсулы, растворы) становится менее эффективным в виду того, что эти формы не рассчитаны на длительное пребывание в организме, они быстро выводятся или метаболизируются. В организме биологически активные соединения (БАС) распределяются в соответствии с их физико-химическими свойствами, и только в редких случаях в пораженный орган попадает около 10% введенного, часто токсического по отношению к здоровым тканям лекарства [5]. В связи с этим в последнее время проводятся интенсивные исследования, которые направлены на разработку полимерных систем с контролируемым высвобождением препаратов, способных доставлять ЛВ непосредственно к органам и клеткам-мишеням.

Лекарственные формы с пролонгированным или постоянным высвобождением обеспечивают постоянную концентрацию вещества в плазме крови в течение продолжительного времени при сократимой частоте введения ЛС, тем самым снижая вероятность появления токсических концентраций в крови и увеличивая длительность стабильного терапевтического эффекта.

К первым попыткам создания такой лекарственной формы можно отнести изменение растворимости с помощью добавления в состав таблетки или капсулы специального фармакологически нейтрального вещества - наполнителя, который значительно удлинял время всасывания препарата. Кроме того, использовались такие лекарственные формы, как эмульсии и суспензии, которые длительно «переваривались» в ЖКТ, и благодаря этому время высвобождения и всасывания действующего вещества значительно увеличивалось. Аналогичные результаты достигались и при использовании специальных оболочек из целлюлозы, которые помимо увеличения времени высвобождения позволяли контролировать также место высвобождения (рН зависимые оболочки). Эти лекарственные формы достаточно широко используют в настоящее время. Иногда применяют буккальные системы доставки с использованием полиэтилена или карбоксиметилцеллюлозы в качестве вещества-носителя, замедляющего скорость высвобождения. Такие системы позволяют высвободиться препарату как в ротовой полости, так и в кишечнике после его проглатывания.

Относительно новые успешные системы доставки - таблетки или капсулы с осмотическими насосами. Основное их преимущество - способность обеспечить кинетику «нулевого порядка» в течение длительного времени. В настоящее время целый ряд препаратов (дилтиазем, нифедипин, метопролол, оксibuтинин, диклофенак, преднизолон) в таких лекарственных формах находится на разных этапах доклинического и клинического исследований [6].

Лекарственные препараты, снабженные системой доставки, имеют ряд преимуществ по сравнению со свободными препаратами - увеличивается

время выведения лекарственного препарата из организма пациента; улучшается фармакинетика, у многих лекарств появляется способность пересекать мембранные и гематоэнцефалические барьеры; повышается растворимость гидрофобных лекарств; снижается риск возникновения побочных эффектов высокотоксичных препаратов на организм [7]. Новые лекарственные системы защищают лекарственные препараты от деградации и позволяют избегать высоких стартовых концентраций препарата и уменьшить число процедур при систематическом лечении [7].

В большинстве случаев препарат в системе доставки находится в свободном состоянии в порах конструкции [8][9], но также может быть конъюгирован с макромолекулами полимера посредством химической связи, которая влияет на скорость высвобождения лекарства [10]. В связи с этим, чаще всего, при депонировании препаратов используют химические последовательности небольшой длины, так называемые «линкерные участки» (связующее звено) [11]. Чаще всего, в качестве носителей в таких лекарственных системах, используют хорошо изученные полимеры – декстран, поли-N-винилпироллидон, поли-N-(2-гидроксипропил) метакриламид, в которые введены звенья или функциональные группы, используемые для связывания ЛВ. Линкерными группами могут служить моно- и олигосахара, фолиевая кислота, лектины, поли – L-лизины, а также антитела [12].

Механизм постепенного дозирования лекарственного вещества из системы может быть реализован за счет различных факторов. Чаще всего это распад химической связи между полимерным носителем и лекарственным веществом; диффузионное проникновение через слой полимера; выход активного вещества за счет деградации (эрозии) полимерной системы; выход активного вещества при набухании системы (гидрогелевые системы) [4][7].

Идеальная лекарственная система должна быть инертной, биосовместимой, механически прочной и стабильной, с высокой биодоступностью и растворимостью лекарства, должна исключать

возможность неконтролируемого высвобождения препарата, быть легко имплантируемой и извлекаемой, должна транспортировать лекарство в место действия, иметь быстрый терапевтический эффект, при этом не должна вызывать дискомфорта у пациента, просто изготавливаться, стерилизоваться и должна быть применима для широкого спектра лекарственных препаратов [13]. Использование различных материалов для депонирования ЛВ позволит варьировать скорость распада полимерного матрикса и, соответственно, управлять кинетикой выхода препарата.

В зависимости от способа введения СДЛ можно подразделить на:

1. хирургически имплантируемые полимерные системы (пластины, пленки, губки, таблетки, микрочипы, сосудистые стенты, глазные, зубные и ортопедические имплантаты)
2. инъекционные имплантаты (гели, микросферы, микрокапсулы, эритроциты, липосомы, наносферы, нанокapsулы) [3].

В последние годы особенно возрос интерес инъекционным микро- и наноразмерным полимерным системам в виде микросфер, нанотрубок, наночастиц, а также к керамическим и углеродным наночастицам (фуллерены), дендримерам [14][15].

Разработка СДЛ охватывает практически все области медицины (эндокринология, пульмонология, кардиология, онкология и т.д.). В настоящее время на основе биodeградируемых носителей создаются новые лекарственные формы анестетиков, антидепрессантов, гормонов, контрацептивных, противораковых, противовоспалительных и противовирусных препаратов, вакцины, а также лекарственные формы с инкапсулированными ДНК для генной терапии [7][16].

Следует отметить, что в мире уже существуют сертифицированные системы, используемые в качестве переносчиков лекарств, а на фармацевтическом рынке – несколько десятков препаратов на основе полимерных носителей.

1.2. Полимерные микроносители и препараты.

В 1967 г. Van Wezel предложил метод культивирования клеток на поверхности полимерных шариков-частиц "микроносителей". Этот метод, названный впоследствии методом микроносителей, давал возможность суспензионного выращивания субстратзависимых клеток, поддерживаемых в условиях *in vitro*. Суть метода заключалась в том, что клетки совершали адгезивный контакт с поверхностью микроносителя и впоследствии пролиферировали, находясь на поверхности этих частиц. Первый микроноситель клеток животных был создан на основе поперечно-сшитого декстрана. С этого момента началась разработка различных типов микроносителей. Вскоре был предложен декстрановый микроноситель, который может нести положительный или отрицательный заряд, который создается путем специальной дополнительной обработки поверхности носителя.

Увеличение числа полимеров, используемых для создания микро- и наночастиц, а также разработка более рациональных способов их доставки к клеткам-мишеням в настоящее время все больше привлекают внимание исследователей. Наибольший интерес связан с возможностью использования таких систем доставки в терапии онкологических заболеваний [18]. Полимерный матрикс обеспечивает защиту цитостатика и позволяет неустойчивым молекулам ЛВ в сохранности достигать локального участка воздействия. Неоспоримым преимуществом является то, что многократная доза химиотерапевтического лекарственного вещества может быть введена с помощью одной единственной инъекции [19].

Количество работ в данной области растет с каждым годом. Согласно данным базы ScienceDirect (Elsevier) при запросе «drug delivery systems, particles, cancer» количество научных статей превышает 40 000 (февраль, 2020 г.). При этом большая половина опубликованных статей приходится на последние 3 года. Ученые по всему миру представляют успешные работы по снижению токсичности цитостатических препаратов с помощью

специализированных носителей на основе полилактидов, полигликолидов, полилактидгликолидов, полигидроксиалканоатов, поликапролактона, полиэтиленгликоля, п्लуроников, гиалуроновой кислоты, белков, включая альбумин, трансферрин и многие другие.

К полимерным системам доставки лекарств относят: липосомы, мицеллы, дендримеры, микро- и наночастицы. Липосомальные формы доставки ЛП, представляют собой замкнутые пузырьки, образованные одним или несколькими бислоями липидов. В таких системах ЛП гидрофильной природы заключены во внутреннее пространство, а гидрофобные – в липидную мембрану. Однако существенным недостатком липосом является их чувствительность к микросреде (температура, pH и др.). Примеры коммерческих липосомальных форм противоопухолевых препаратов: Doxil и Myocet с доксорубицином; Daunoxome (липосомальная форма даунорубицина). Мицеллы – самособирающиеся амфифильные частицы, термостабильные, способные образовывать устойчивые коллоидные системы.

Полимерные микро- и наноносители ЛВ, по сравнению с липосомами и дендримерами более стабильны в биологических средах и способны доставлять различные препараты одновременно разными способами введения (пероральное, местное, ингаляционное и др.)

Среди наиболее распространенных и изученных цитостатических препаратов, инкапсулируемых в матрикс носителя, можно выделить следующие: «Паклитаксел» - для лечения рака яичников, молочной железы, легких и саркомы Капоши; «Цисплатин» - для лечения сарком, карцином, лимфом и опухоли зародышевых клеток; «Доксорубицин» - для лечения рака яичников, мочевого пузыря и легких; «Камптотецин» - для лечения распространенного колоректального рака и рака яичников [20]; «5-фторурацил» - для лечения рака молочной железы и колоректального рака (рак толстой и прямой кишки).

Если еще раз затронуть тему онкологических заболеваний, то к примеру, рак толстой кишки диагностируется более чем у 1 млн человек, смертность от

данного вида рака составляет около 50%, причем, примерно в 70% случаев опухоль возникает в ободочной кишке, в 30% случаев - в прямой кишке [18]. Особо высокий уровень заболеваемости наблюдается в США, Европе и России. Наиболее эффективными противоопухолевыми препаратами при данной патологии до настоящего времени остаются фторпроизводные пиримидина, в частности фторурацил.

5-фторурацил (5ФУ) - противоопухолевый препарат из группы антиметаболитов, антагонистов пиримидинов. Это - цитостатический агент, ингибирующий процесс деления клеток путём блокирования синтеза ДНК и образования структурно несовершенной РНК. Под воздействием 5ФУ клетки, находящиеся в разных фазах клеточного цикла, тормозятся перед вступлением в фазу S и, предположительно, вместе вступают в нее, вместе достигая фазы митоза G2, наиболее чувствительной к повреждающим воздействиям [21]. Основная мишень для действия 5ФУ - тимидилатсинтаза, ключевой фермент в процессе синтеза ДНК, катализирующий реакцию образования *de novo* тимидилата, предшественника тимидин-трифосфата, нуклеотида, необходимого для синтеза ДНК. Введение 5ФУ вызывает дефицит дезокси-тимидин-монофосфата (dTMP), из-за чего быстро делящиеся раковые клетки погибают. 5ФУ встраивается в клеточную РНК в процессе ее синтеза вместо уридин-монофосфата, что приводит к нарушению стабильности молекулы РНК, ошибкам при синтезе белков, необходимых для жизнедеятельности клетки и сохранения пространственной структуры ДНК [21].

При анализе литературы было отмечено большое количество научных работ, связанных с исследованием противоопухолевого действия различных полимерных систем доставки 5-фторурацила: с помощью сополимера метакриловой кислоты и 2-этилгексилакрилата с депонированным в него 5-фторурацилом исследовался цитостатический эффект ЛП на клетки НСТ-116(клетки рака толстой кишки (клетки рака толстой кишки) [22]; были созданы имплантаты на основе хитозан-полимерной пленки, насыщенной 5-фторурацилом, и исследована возможность введения этих пленок

интравитреально [23]; исследованы лекарственные средства на основе низкомолекулярного полиэтилена, содержащего 5-фторурацил в качестве действующего вещества; созданы композиции на основе биополимеров-загустителей альгината натрия и сукцината хитозана с 5-фторурацилом, обладающие вязкостными характеристиками, соответствующими для нанесения на текстильный материал для направленной доставки препаратов к очагу поражения [24]; были разработаны наночастицы на основе ПЗГБ-со-ЗГВ/ПЛА для доставки 5-фторурацила и оксалиплатина с целью повышения противораковой эффективности [25].

Таким образом, развитие современных методов биотехнологии и биомедицины дает возможность обеспечить пролонгированное и контролируемое действие лекарственных препаратов в соответствии с реальной потребностью живого организма, а также предотвращать их токсичность и иммуногенность.

1.3. Культуры клеток, как система оценки действия препаратов.

Клеточные культуры с каждым годом находят все большее применение в самых разнообразных областях биологии, медицины и сельского хозяйства. Их используют при решении таких общебиологических проблем, как выяснение механизмов дифференцировки и пролиферации, взаимодействия клеток со средой, адаптации, старения, биологической активности, злокачественной трансформации и многих других. Важная роль отводится клеточным культурам в биотехнологии при производстве вакцин и биологически активных веществ. Культуры клеток применяются для диагностики и лечения наследственных заболеваний, в качестве тест-объектов при испытании новых фармакологических веществ, а также для сохранения генофонда исчезающих видов животных и растений [26].

Все больше исследовательских групп использует в своей работе данные, полученные в стандартных условиях эксперимента на клеточной культуре. Так, доклинические испытания лекарственных веществ *in vitro* прогрессивно вытесняют работы с изолированными тканями и

уменьшают количество необходимых экспериментов на животных. В системе доклинического исследования лекарственных препаратов первым этапом является оценка токсичности соединения для культуры клеток и лабораторных животных.

Преимуществами такого исследования являются:

1. Способность оценить большое количество веществ в различных дозировках за короткий срок;
2. В исследовании *in vitro* возможно использование клеток человека, что позволяет свести к минимуму возможность получения негативных результатов при клинических испытаниях, так как положительные результаты, полученные на материале животных, не всегда адекватно экстраполируются на организм человека;
3. Клеточные культуры обладают высокой воспроизводимостью, высокой чувствительностью.

Как правило, в процессе исследования токсичности соединений изучают влияние различных концентраций препарата на морфологию клеток. Однако в связи с тем, что различные типы и линии клеток неодинаково чувствительны к воздействию лекарственных препаратов, оценку их эффективности нередко проводят с использованием нескольких типов и линий клеток. Использование нескольких культур клеток позволяет более достоверно осуществлять оценку токсичности существующих и новых лекарственных соединений.

В настоящее время разработан способ оценки токсичности *in vitro*, состоящий в последовательном тестировании на каждом образце клеточной культуры до 4-х биохимических показателей токсического действия с сохранением жизнеспособности клеточного монослоя. Этот способ позволяет существенно сократить затраты используемого клеточного материала и времени, и одновременно повысить точность количественной токсикологической оценки препаратов *in vitro*. К примеру, было исследовано токсическое воздействие на клетки

антисептиков и ряда других фармакологических препаратов разного химического строения, влияние низкоинтенсивного циклотронного и постоянного электромагнитного полей, влияние светового излучения синей, зеленой и красной частей спектра. Проводились работы по исследованию влияния тканевых жидкостей (сыворотки крови, жидкости из пузырей от ожогов и обморожений, бронхолегочного лаважа) в культурах клеток, цитопатогенного действия *in vitro* вирусов гриппа и эффекта противовирусного препаратов.

Безусловно, эксперименты на животных крайне важны для сохранения здоровья человека, но эти исследования являются трудоемкими и дорогостоящими, а также они травмируют подопытных животных и приводят к их гибели. Поэтому сегодня вполне обоснованны усилия ученых, направленные на максимальное сокращение количества животных и замену их альтернативными моделями и тест-системами в условиях *in vitro*.

Всемирная организация здравоохранения, международное медико-биологическое общество не только одобряют, но и настоятельно рекомендуют и поддерживают использование альтернативных моделей и методов. Эксперименты в условиях *in vitro* становятся повседневной практикой в деятельности научно-исследовательских институтов экологического и гигиенического профиля, органов, контролирующих состояние окружающей среды.

1.4. Полигидроксиалканоаты в качестве микроносителей лекарственных препаратов

Полигидроксиалканоаты (ПГА) являются микробными полиэфирами, которые способны синтезировать бактерии в условиях ограниченного роста (например, в отсутствие таких питательных элементов, как N, P, S, O, или Mg, но при наличии источников углерода в избытке). Эти полимеры накапливаются в виде внутриклеточных включений, которые могут достигать до 90 % от веса сухих клеток, и используются бактериями как запасные питательные вещества [18].

ПГА представляют класс полимеров, образованных гидроксипропановыми кислотами, которые имеют структуру HO-R-COOH, где R является алкильной группой, имеющей состав C_nH_{2n}. В зависимости от величины алкильной группы ПГА подразделяются на коротко-, средне- и длинноцепочечные. К числу наиболее распространенных и изученных относятся короткоцепочечные полимеры: гомополимер поли(3-гидроксипропаната) (П(ЗГБ)) и образованные на его основе сополимеры с различным включением 3-гидроксипропаната (П(ЗГБ-со-ЗГБ)) или 4-гидроксипропаната (П(ЗГБ-со-4ГБ)); и среднецепочечные: сополимеры с различным включением 3-гидроксипропаната (П(ЗГБ-со-ЗГП)).

Данные классы полиэфигов привлекают к себе внимание за счет наличия уникальных свойств—биоразрушения и биосовместимости [18].

До экстракции из бактериальной клетки ПГА представлены аморфным материалом в виде гранул. Однако после обработки растворителями и выделения ПГА из бактерий происходит частичная кристаллизация полимера, которая может достигать 50%. Следовательно, кинетика деградации этого типа ПГА, как правило, медленнее, чем у производных α-гидроксикислот (полилактидов, полигликолидов, полилактидгликолидов (ПМК/ПГК/ПМГК)) как в условиях *in vitro*, так *in vivo* благодаря наличию частично кристаллической структуры.

Перспективным представляется использование ПГА в качестве микроносителей ЛП. Наиболее интересным является факт о возможности управления кинетикой высвобождения лекарственного препарата с помощью изменения химической структуры ПГА для достижения максимальной доставки препарата. К примеру, разложение короткоцепочечных ПГА происходит за счет поверхностной эрозии, что делает их привлекательными для использования в качестве полимерных носителей лекарственных средств [18].

Кроме этого, короткоцепочечные ПГА могут образовывать поры на поверхности микрочастиц, что обеспечивает быстрое высвобождение лекарства независимо от скорости деградации полимера. Так, ранее в работе Gangrade было установлено, что с увеличением содержания 3-ГВ в полимерной цепи (от 9 до 24 мол.%) возрастал отток препарата, что объяснялось изменением поверхности частиц с образованием пор [27]. Недавно также было подтверждено увеличение оттока противоопухолевого препарата эллиптицина в зависимости от содержания 3-ГВ в полимерной цепи [28]. С другой стороны, сополимеры среднецепочечных ПГА имеют низкую температуру плавления и кристалличность, а следовательно, они также имеют преимущества для использования в качестве лекарственных носителей [18].

Большинство работ, посвященных изучению систем доставки препаратов на основе ПГА, ограничено использованием одного или двух типов носителей, без учета влияния химического состава полимера на свойства микрочастиц. Как правило, опубликованные результаты исследования свойств микрочастиц приведены на примерах гомополимера ПЗГБ и сополимера ПЗГБ/3ГВ с невысокими включениями 3-ГВ.

Поли(3-гидроксibuтират) – это основной и первый описанный полимер из группы ПГА. Он является полимером 3-оксимасляной кислоты и встречается в качестве запасного вещества в большом количестве микроорганизмов. Будучи биополимером, он включает в себя только R-форму оксимасляной кислоты и является частично кристаллическим полиэфиром: выделенный из бактерий ПЗГБ имеет кристалличность от 55% до 80%. Это является полезным свойством, так как для таких материалов легче контролировать их физико-химические свойства, в то время как у аморфных соединений подобных свойств не наблюдается [29].

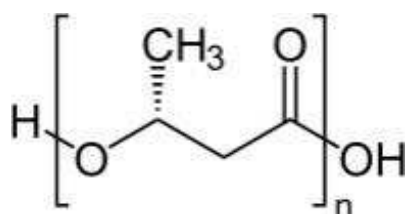


Рисунок 1.1. - Структурная формула поли(3-гидроксибутирата)

Существует множество работ, описывающих микрочастицы из ПЗГБ, в качестве системы доставки ЛП.

Одним из примеров может служить работа Филатовой Е.В. (2019), в которой исследователем были получены микросферы из поли-3-гидроксибутирата для доставки нескольких лекарственных препаратов (дексаметазон, доксорубин, метотрексат, паклитаксел, этопозид, хлорамбуцил).

Данный полимерный носитель показал высокую скорость ингибирования роста культуры клеток рака молочной железы человека линии MFC-7, дополнением так же является то, что созданные лекарственная форма препаратов на основе ПЗГБ обладают длительным контролируемым высвобождением при сохранении высокой эффективности, а также являются малотоксичными по сравнению с чистыми традиционными препаратами в свободной форме.

В качестве примера других работ могут выступать статьи, описывающие моделирование и исследование микрочастиц из ПЗГБ с лекарственными препаратами на основе растительных природных экстрактов – куркумина [30], каррагинана [31]. Синтез микрочастиц из поли-3-гидроксибутирата, нагруженных куркумином и каррагинаном, проводился с использованием модифицированного эмульсионного метода (масло/вода). Экспериментальная диффузия куркумина и каррагинана из микросфер на основе ПЗГБ была высокой (48 мг/мл при 15% нагрузке микрочастиц от массы полимера для куркумина и 41 мг/мл при 10% нагрузке микрочастиц от массы полимера для каррагинана).

В качестве других примеров, доказывающих дальнейшие перспективы исследования такого полимера, как ПЗГБ, могут служить работы иностранных ученых. G.C. Vazzo с соавторами описывал приготовление методом испарения эмульсии композитных микрочастиц ПЗГБ / хитозан с включением таких ЛП, как пироксикам и кетопрофен. Были получены микрочастицы резервуарного типа, состоящие из ПЗГБ микрочастиц, заключенных в матрицу хитозана. Именно в таких микрочастицах наблюдалось снижение эффекта разрыва и длительного высвобождения ЛП, особенно при использовании более высоких концентраций хитозана [32].

Помимо работ с самим полимером в качестве основы для микрочастиц, ПЗГБ используется в качестве композита для многих материалов, из которых в дальнейшем получают микрочастицы и другие системы доставки: ПЗГБ/ПЭГ, ПЗГБ/полиэтиленфосфат, ПЗГБ/капролактон [33].

Одним из важных и легкодоступных материалов для конструирования микрочастиц, помимо ПЗГБ, является его сополимер ПЗГБ/ЗГВ с невысокими включениями З-ГВ. Можно сказать, что это полимер несколько не уступает своему предшественнику по свойствам и качеству микрочастиц, сделанных из него, а так же по количеству работ, описывающих изготовление микрочастиц с ЛП и исследование их свойств [5]. Благодаря превосходным физико-химическим характер ПЗГБ/ЗГВ в биологической среде, сополимер становится интересной платформой для длительного высвобождения лекарств, например, для инкапсулирования противоопухолевых лекарств для лечения рака.

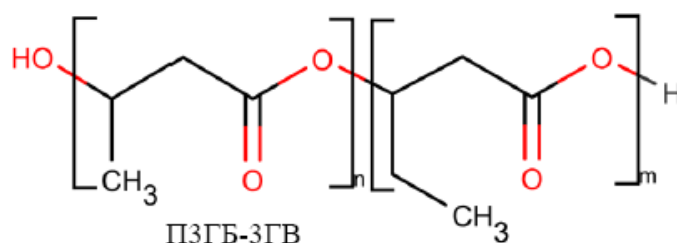


Рисунок 1.2. - Структурная формула поли(3-гидроксибутирата-со-3-гидроксивалерата)

Примерами различных работ с сополимером могут служить статьи, как и отечественных ученых, так и зарубежных. Marli Luiza Tebaldi с соавторами описывала в своей работе изготовление микрочастиц на основе ПЗГБ/ЗГВ различными методами:

1. радикальной полимеризации (радикальная полимеризация — процесс получения ВМС из низкомолекулярных соединений без выделения побочных продуктов, где активный центр — свободно-радикальная частица;
2. LRP для получения конъюгатов, реагирующих на стимулы [34].

В работе Grece A.Senhorini ученые описывали получение микрочастиц на основе ПЗГБ/ЗГВ, нагруженных андиробным маслом, а так же исследовали характеристики полученных микрочастиц. Масло андироба, извлеченное из семян *Carapaguianensis*, обладает инсектицидными и лечебными свойствами. Микрочастицы были приготовлены с использованием простой эмульсии с последующим выпариванием растворителя. Исследования показали, что произошло изменение пиков кристалличности используемого полимера из-за присутствия масла. Увеличение измеренных дифракционных пиков указывает на то, что аморфная структура андиробного масла также вносит вклад в аморфные части полимера. Эти наблюдения предполагают, что масло диспергируется в полимерной матрице в форме микрочастиц.

Поведение микрочастиц на основе ПЗГБ/ЗГВ *in vivo* может значительно зависеть от характеристик, таких как средний размер, форма, поверхностный электрический заряд и способность взаимодействовать с сывороточными белками, стимулируя иммунологические реакции [35]. В связи с этим, исследования, связанные с поведением микрочастиц на основе ПЗГБ/ЗГВ *in vivo*, должны проводиться с учетом всех различных вышеупомянутых характеристик для того, чтобы минимизировать вероятность ошибок и неточностей в результатах экспериментов.

На основе проведенного анализа научной литературы показано современное состояние работ, посвященных изучению систем доставки лекарственных препаратов на основе ПГА.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

Для исследований были взяты образцы гомогенного полимера 3-гидроксимасляной кислоты ПЗГБ молекулярной массой 723 кДа; $T_{пл}=197,7^{\circ}\text{C}$, $T_{к}=90^{\circ}\text{C}$, $S_x=72\%$, а так же образцы его сополимера поли-3-гидроксибутирата-3-гидроксивалерата ПЗГБ/ЗГВ, с процентным содержанием гидроксивалерата 12% молекулярной массой 840 кДа; $T_{пл}=173^{\circ}\text{C}$, $T_{к}=78^{\circ}\text{C}$.

Полимеры были получены в Лаборатории новых биоматериалов Сибирского Федерального Университета. Полимер и сополимер синтезированы с использованием штамма - продуцента *Cupriaviduseutrophus* по запатентованной технологии [18], их экстрагировали из биомассы хлороформом. Осаждение из экстрактов проводили гексаном.

Для исследования был взят лекарственный препарат антиметаболит урацила - 5-фторурацил (5-ФУ) производства Sigma- Aldrich. Механизм действия на опухолевые клетки определяется метаболическим превращением его в 5-фтор-дезоксидеоксиуридин-монофосфат и 5-фторуридинатрифосфат. 5-фтор-дезоксидеоксиуридин-монофосфат - конкурентный ингибитор фермента тимидинсинтетазы, что ведет к блокированию синтеза ДНК в опухолевых клетках. Фторурацил подавляет синтез РНК, путем включения 5-фторуридинатрифосфата в ее структуру, вместо уридина трифосфата.

2.1.1. Культура клеток HeLa

HeLa – это клеточная линия, которая была получена в 1951 году после взятия клеточного опухоли шейки матки Генриетты Лакс методом биопсии. Линии клеток HeLa считаются бессмертными, из-за устойчивости к среде и быстрому размножению. Эти клетки, имитирующие организм человека *in vitro* («в пробирке»), «вечны» — они могут бесконечно делиться,

результаты исследований с их использованием достоверно воспроизводятся в разных лабораториях. На своей поверхности они несут достаточно универсальный набор рецепторов, что позволяет использовать их для исследования действия различных веществ, от простых неорганических до белков и нуклеиновых кислот; они неприхотливы в культивировании и хорошо переносят заморозку и консервацию. Основное преимущество HeLa - неукротимый рост на простых питательных средах, что позволяет проводить масштабные исследования при минимуме затрат.

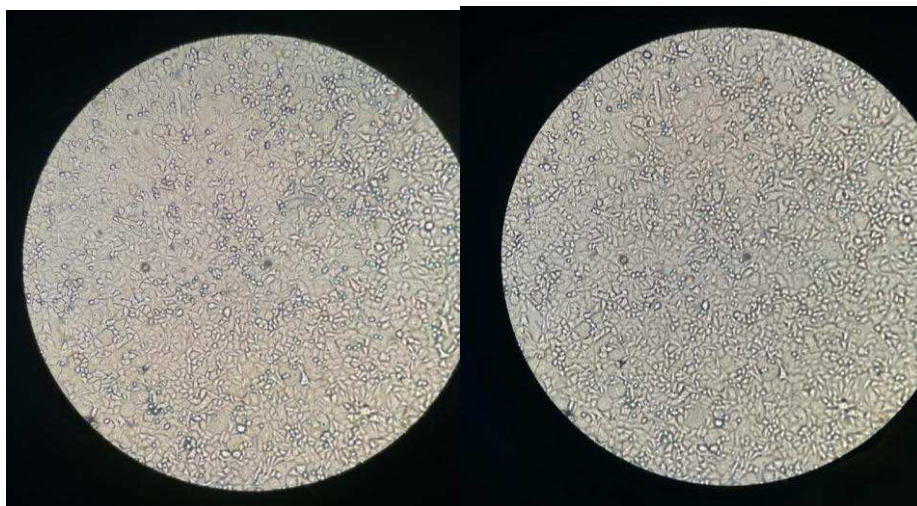


Рисунок 2.1. - Культура клеток HeLa

2.2. Методы исследования

2.2.1. Получение микрочастиц на основе ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГВ с добавлением 5-фторурацила

Эмульсионный метод получения полимерных микрочастиц основан на испарении растворителя из эмульсии. Для получения микрочастиц в 2 % раствор ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГВ (200 мг полимера/сополимера в 10 мл дихлорметана) добавляли 0,5 и 1 мл метилового спирта с содержанием лекарства равным 5 и 10 % от массы полимера. Затем постепенно вливали готовый раствор полимера с лекарственным препаратом в 100 мл 0,5 % водного раствора поливинилового спирта (ПВС). Полученную эмульсию оставляли на сутки при постоянном механическом перемешивании до полного испарения растворителя. Микрочастицы собирали

центрифугированием в течение 5 мин (10000 об/мин), промывали дистиллированной водой и высушивали в термостате при 37 °С.

2.2.2. Характеристика сконструированных микрочастиц

Морфологию микрочастиц изучали с применением сканирующей электронной микроскопии на микроскопах S-5500 (Hitachi, Япония).

Выход микрочастиц рассчитывали в процентах от массы использованного для их получения полимера/сополимера:

$$Y = \frac{W_m}{W_p} \cdot 100\%$$

где W_m – масса полученных микрочастиц, мг;

W_p – масса использованного полимера, мг.

Поверхностный заряд микрочастиц был охарактеризован величиной электрокинетического потенциала (дзета-потенциала), которая определяется электрофоретической подвижностью частиц в суспензии с применением уравнения Генри на анализаторе частиц Zetasizer Nano ZS. Измерения проводили в автоматическом режиме по стандартной методике, рекомендуемой производителем.

Величину включения лекарственных препаратов в полимерную матрицу определяли спектрофотометрированием по его исходной и остаточной концентрации в эмульсии при излучении на длине волны 230 нм (спектрофотометр Cary 60 UV-Vis, Agilent Technologies, США).

Эффективность инкапсулирования (EE) препарата в полимерной матрице рассчитывали по формуле:

$$EE = \frac{W_{total} - W_{free}}{W_{total}} \cdot 100\%$$

где W_{total} – исходная масса препарата, мг;

W_{free} – масса препарата, не включенная в полимерную матрицу, мг.

2.2.3. Исследование оттока лекарственного препарата *in vitro*

Полученные из ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГВ микрочастицы, нагруженные лекарственным препаратом, стерилизовали УФ-излучением в течение 20 мин и помещали в стерильные центрифужные пробирки с крышкой в 10 мл ФСБ (рН 7,3); пробирки экспонировали в термостате при 37 °С (n = 3). Пробы отбирались по истечении 3 часов; 6 часов; 1; 3; 7; 10; 14 суток. Для определения количества препарата, вышедшего в среду, анализировали пробы, предварительно осадив микрочастицы центрифугированием (10000 об/мин, 5 мин) на спектрофотометре Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies, США). Выход препарата DR в фосфатном буфере определяли по формуле:

$$DR = \frac{r}{e} \cdot 100\%$$

где e – величина включения препарата в полимерной матрице, мг/мл;

r – выход препарата, мг/мл.

2.2.4. Культивирование клеток HELA

Клетки HELA культивировали в DMEM с высоким содержанием глюкозы с добавлением 10 %-го раствора эмбриональной бычьей сыворотки и 1 %-го раствора пенициллина/стрептомицина (100 ЕД). Клетки содержали в инкубаторе с 5 % CO₂ при 37 °С до конфлюэнтности (Sanyo MCO-17AIC, Япония). Перед посевом, клетки были отделены с помощью обработки раствором трипсин-ЭДТА (3 мл; 0,05 % в СФБ) в течение 5 минут. Затем добавляли культуральную среду (3 мл), чтобы остановить активность трипсина. Суспензию клеток центрифугировали (3000 об/мин, 5 мин) и клеточный осадок ресуспендировали в среде (2 мл). Клетки подсчитывали с использованием гемоцитометра (BlauBrand, Германия).

2.2.5. Исследование цитотоксичности и эффективности действия полученных частиц в культуре клеток

Эффективность действия разработанных препаратов оценена в культуре опухолевых клеток HeLa. Для эксперимента были приготовлены полимерные микрочастицы из ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГВ с различной нагрузкой препаратами. При внесении микрочастиц в культуру клеток в виде суспензии концентрация инкапсулированного 5-фторуроцила составила: 0,43 и 0,34 мг/мл. Для этого клетки HeLa помещали в культуральные планшеты из расчета 1×10^4 клеток/мл в каждую лунку. Для контроля в культуру клеток была внесена свободная форма 5-фторурацила в концентрации 0,43 и 0,34 мг/мл. В качестве среды использовали DMEM, содержащую 10 % раствор эмбриональной бычьей сыворотки и раствор антибиотиков (стрептомицин 100 мкг/мл, пенициллин 100 ЕД/мл). Суспензию стерильных частиц в 100 мкл фосфатного буфера вводили в каждую лунку 24-луночного планшета. Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе (New Brunswick Scientific, США) в 5 %-й атмосфере CO₂ при 37 °С. Смену среды проводили ежедневно в течение 3 дней.

Жизнеспособность клеток в культуре HELA оценивали в реакции с МТТ, основанной на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать МТТ до формазана, что характеризует активность митохондрий и количество живых клеток и косвенно отражает способность клеток к пролиферации на матриксах. Для этого в лунку с каждым типом полимера было добавлено по 50 мкл 5 % раствора МТТ и 950 мкл полной питательной среды. Через 3,5 часа культивирования среду с раствором МТТ заменяли DMSO для растворения образовавшихся кристаллов МТТ-формазана. Через 30 мин супернатант был перенесен в 96-луночный планшет (Corning, США) и проведено измерение оптической плотности при длине волны 540 нм на микропланшетном фотометре Bio-Rad 680 (Bio-Rad Laboratories Inc., США). Количество клеток оценивали по калибровочному графику.

Также жизнеспособность клеток в культуре HeLa исследовали с помощью двойного окрашивания клеток красителями акридиновым оранжевым (АО) и бромидом этидия (БЭ). Окрашивание клеток проводили в соответствии с процедурой, ранее описанной Liu et al. Клетки изначально фиксировали 1% - ным раствором формалина при комнатной температуре. Культуру промывали раствором DPBS, 70% спиртом. Деградация РНК была достигнута с использованием 0,2 мл РНКазы, которую добавили к культуре клеток и инкубировали при 37 ° С в течение 30 минут. Далее добавляли растворную смесь, содержащую АО (100 мкг / мл) и ЭБ (100 мкг / мл) в соотношении 1:1. Морфологический анализ и подсчет клеток проводили на третий день с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DM6000B (LeicaCamera AG, Wetzlar, Germany).

2.2.6 Статистический анализ данных

Статистическая обработка результатов была проведена с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel. Результаты представлены как средние арифметические со стандартным отклонением.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Характеристика полимерных микрочастиц на основе ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГВ в комплексе с 5-фторурацилом

С применением эмульсионного метода получена серия микрочастиц на основе ПЗГБ и его сополимера ПЗГБ/ЗГВ с различным содержанием противоопухолевого 5-фторурацила 5 и 10% от массы полимера.

По результатам сканирующей электронной микроскопии доказано, что микрочастицы из образцов ПГА различного химического состава, имели некоторые отличия по размерам и структуре.

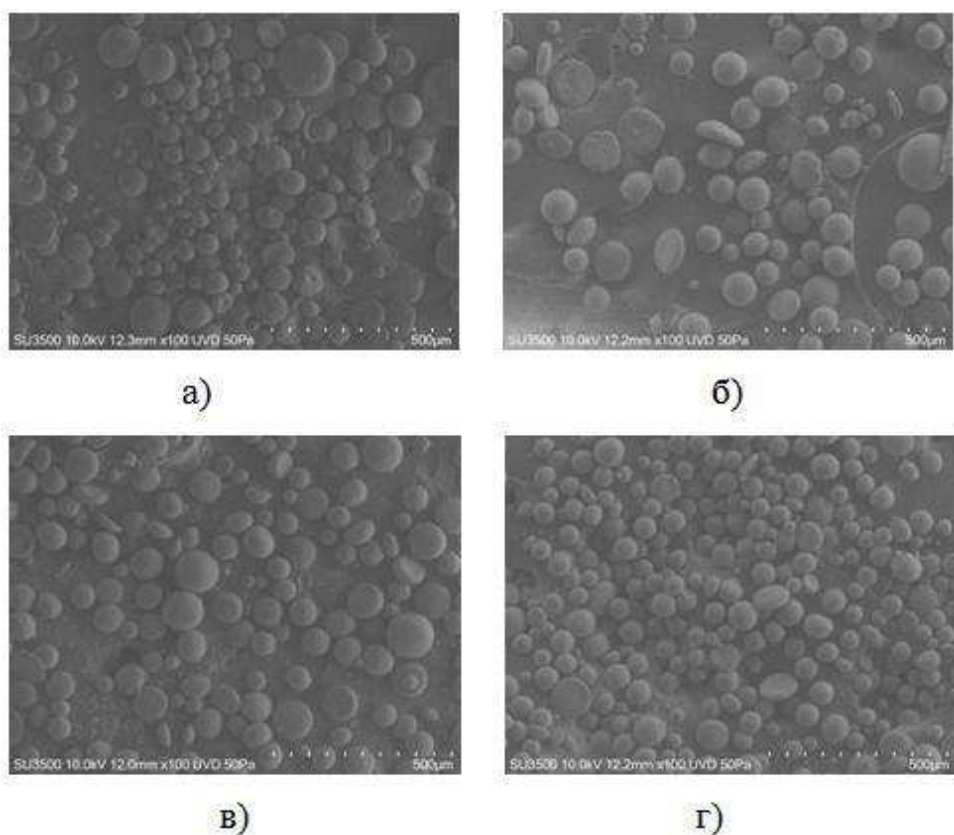


Рисунок 3.1. - СЭМ-снимки микрочастиц на основе ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГВ, нагруженные лекарственным препаратом; а – ПЗГБ/5% 5-фторурацила, б – ПЗГБ/10% 5-фторурацила, в – ПЗГБ/ЗГВ/5% 5-фторурацила, г – ПЗГБ/ЗГВ/10% 5-фторурацила. Маркер 500 мкм.

Микрочастицы из гомополимера ПЗГБ имели гетерогенную форму от круглой-сферической до плоской и овальной, в отличие от круглых и меньших по размеру частиц ПЗГБ/ЗГВ.

При меньшем увеличении установлено, что микрочастицы ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГВ имела рельефную, пористую поверхность и практически не отличались друг от друга (Рисунок 3.2.).

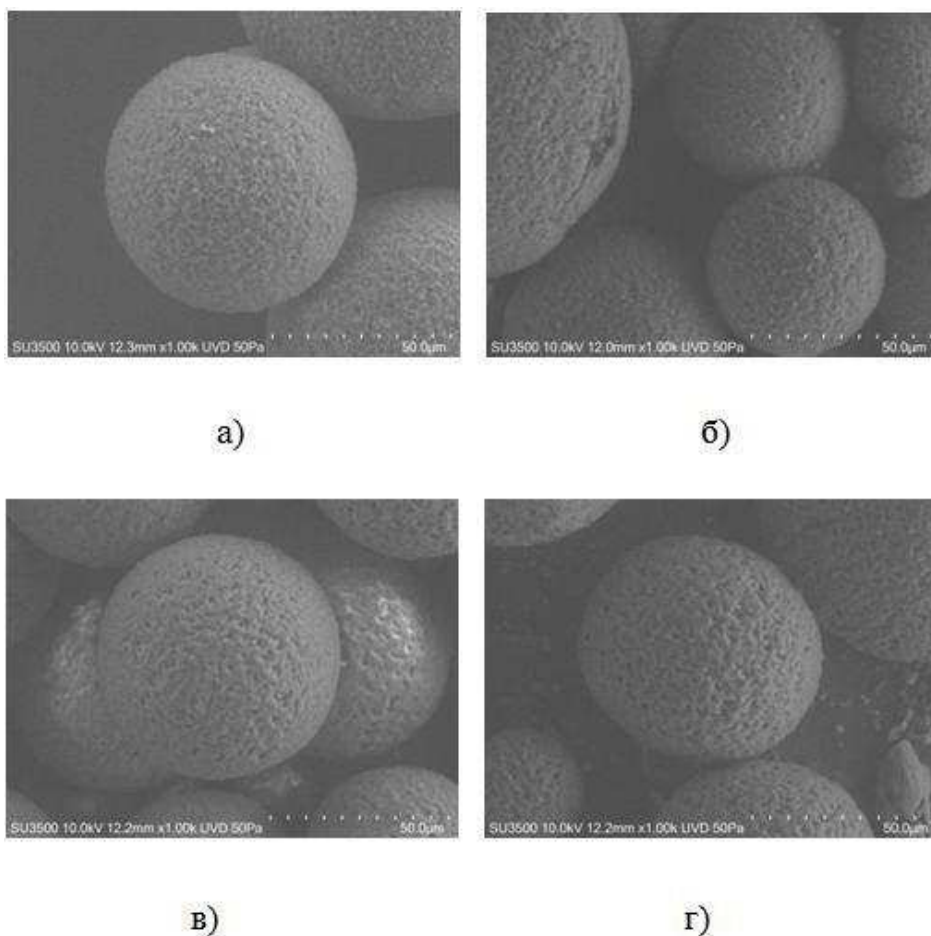


Рисунок 3.2. - СЭМ-снимки микрочастиц на основе ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГВ, нагруженные лекарственным препаратом; а – ПЗГБ/5% 5-фторурацила, б – ПЗГБ/10% 5-фторурацила, в – ПЗГБ/ЗГВ/5% 5-фторурацила, г – ПЗГБ/ЗГВ/10% 5-фторурацила. Маркер 50 мкм.

Важным показателем, определяющим тканеспецифичность и возможность проникновения частиц через биологические барьеры, является размер и размерное распределение частиц. Диаметр микрочастиц на основе гомополимера находился в диапазоне от 79 до 90 мкм, для частиц ПЗГБ/ЗГВ от 69 до 76 мкм. С увеличением количества 5-фторурацила в частицах отмечено повышение их среднего диаметра, независимо от состава.

Таблица 3.1. Средний диаметр микрочастиц в зависимости от нагрузки лекарственным препаратом

Полимер	Исходная концентрация ЛП, % от массы полимера	Средний диаметр микрочастиц, мкм
ПЗГБ	5	79,46±5,10
	10	90±3,93
ПЗГБ/ЗГВ	5	69,64±3,12
	10	76,33±4,23

Величина дзета(ζ)-потенциала является не менее важной характеристикой свойств микрочастиц, определяющей стабильность, или коагуляцию частиц в дисперсии, за счет электрокинетического взаимодействия между частицами. Согласно литературным данным, абсолютное значение ζ -потенциала свыше 30 мВ обеспечивает хорошую, а свыше 60 мВ отличную физическую стабильность. При этом абсолютное значение ζ -потенциала, равное 5 мВ, указывает на склонность частиц к быстройагломерации. При исследовании ζ -потенциала микрочастиц из ПГА в деионизированной воде получены следующие результаты: микрочастицы, полученные из гомополимера ПЗГБ, имели ζ -потенциала равный -15,3Мв и -8,7Мв в зависимости от нагрузки ЛП (10% и 5% соответственно)

Микрочастицы, полученные из сополимера ПЗГБ/ЗГВ имели ζ -потенциала равный -12,2 Мв и -10,7Мв в зависимости от нагрузки ЛП (10% и 5% соответственно) (рисунок 3.3.)

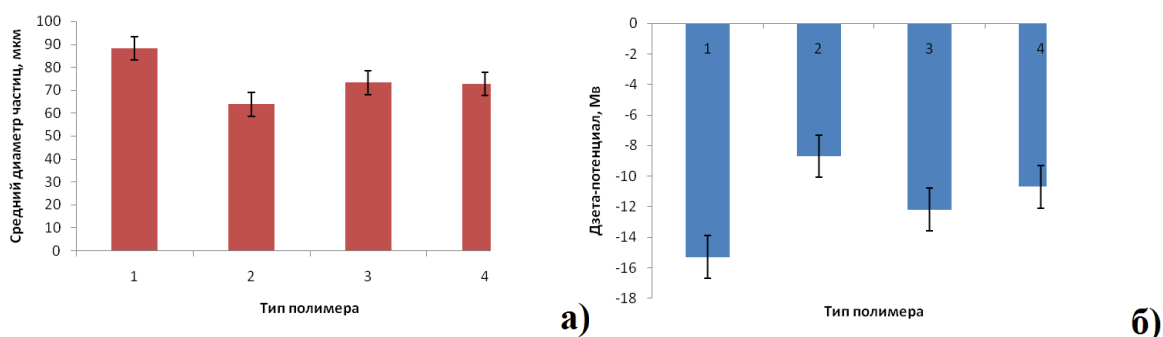


Рисунок 3.3. - Средний диаметр (а) и ζ -потенциал (б) микрочастиц на основе ПГА различного химического состава с разной нагрузкой лекарственного препарата: 1 – ПЗГБ/10% 5-фторурацила, 2 – ПЗГБ/5% 5- фторурацила, 3 – ПЗГБ/ЗГВ/10% 5-фторурацила, 4 – ПЗГБ/ЗГВ/5% 5- фторурацила.

Полученные результаты свидетельствуют о существовании зависимости ζ -потенциала частиц от мономерного состава ПГА. Доказано, что частицы из сополимеров обладают более низкими значениями ζ -потенциала относительно гомополимера, что определяет их лучшую стабильность.

3.2. Исследование выхода 5-фторурацила из микрочастиц ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГВ

Для исследования оттока препарата *in vitro* выбран фосфатный солевой буфер (ФСБ, рН 7,4) в качестве модельной среды, отвечающей общим характеристикам плазмы крови человека.

Эффективность инкапсулирования (ЭИ) микрочастиц с 5- фторурацилом, увеличивалась при увеличении степени включения препарата, при этом максимальное значение ЭИ составило $57\pm 0,5$ % для микрочастиц из ПЗГБ нагруженных 10% ЛП от массы полимера, и $68\pm 0,2$ % для микрочастиц из ПЗГБ/ЗГВ, нагруженных 10% ЛП от массы полимера (таблица 3.2).

Таблица 3.2 – Характеристики микрочастиц, содержащих 5-фторурацил в различной концентрации

Препарат	Полимер	Исходная концентрация, % от массы полимера	Эффективность инкапсулирования, %
5-фторурацил	ПЗГБ	5	$56\pm 0,6$
		10	$57\pm 0,5$
	ПЗГБ/ ЗГВ	5	$67\pm 0,7$
		10	$68\pm 0,2$

В первые часы наблюдения выход 5-фторурацила составил в среднем $10\pm 0,8$; $20\pm 1,3$; $18\pm 0,9$; $21\pm 1,1$ % от включенного для микрочастиц, нагруженными 5 и 10 % ЛП от массы ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГВ, соответственно (рисунок 3.4.) Максимальный отток к концу эксперимента характерен для микрочастиц из ПЗГБ/ЗГВ с нагрузкой препарата 10% от массы полимера, и составил 33% от включенного. Отток 5-фторурацила из микрочастиц из ПЗГБ, нагруженных 10% от массы полимера, не превышал 28%.

Минимальный отток характерен для микрочастиц из ПЗГБ с нагрузкой лекарственного препарата 5% от массы полимера.

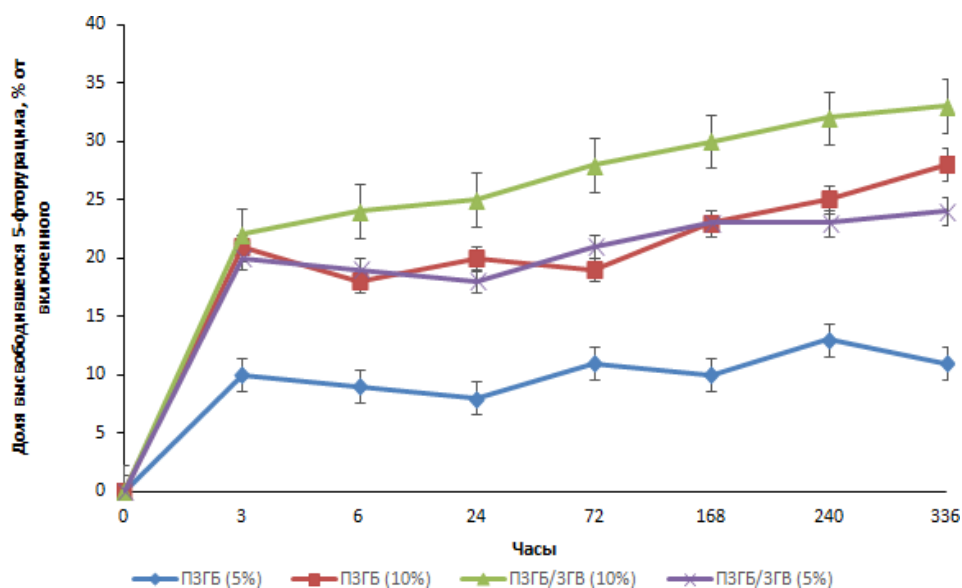


Рисунок 3.4. - Кривые высвобождения 5-фторурацила из микрочастиц на основе ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГВ

Доказана возможность включения в состав ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГВ – носителей противоопухолевых препаратов с удовлетворительными показателями эффективности инкапсулирования, оттока препаратов, что позволяет сделать вывод о перспективности данного класса полимеров для создания лекарственных форм пролонгированного действия.

3.3. Эффективность действия сконструированных форм противоопухолевого препарата

Оценку эффективности ПЗГБ-микрочастиц, нагруженных противоопухолевым препаратом, проводили в культуре клеток HeLa, относительно свободного препарата в аналогичной концентрации: 0,43 и 0,34 мг/мл, используя МТТ-тест, который позволяет оценить количество жизнеспособных клеток и специфическую гибель клеток, индуцированную каким-либо агентом. Также оценивали эффективность с помощью окрашивания клеток красителями акридиновым оранжевым (АО) и бромидом этидия (БЭ) (для подсчета соотношения живых и мертвых клеток).

На первом этапе исследована противоопухолевая активность лекарственного препарата 5-фторурацила разной концентрации на клеточной культуре HeLa. Ниже представлены результаты оценки эффекта свободной формы 5- фторурацила (5% и 10% от массы полимера) на культуру HeLa, по сравнению с контрольной группой без внесения препарата.

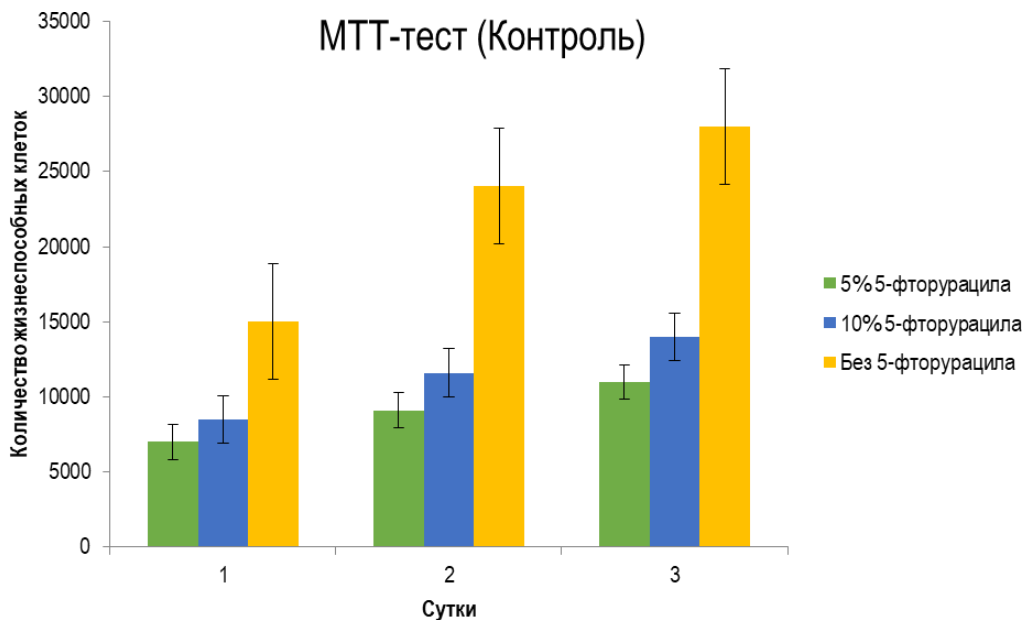


Рисунок 3.5. - МТТ-тест: влияние концентрации свободного 5-фторурацила на количество жизнеспособных клеток в культуре HeLa: концентрация препарата – 0,43 и 0,34 мг/мл

Второй этап заключался в исследовании цитостатического эффекта микрочастиц, нагруженных 5-фторурацилом в разной степени.

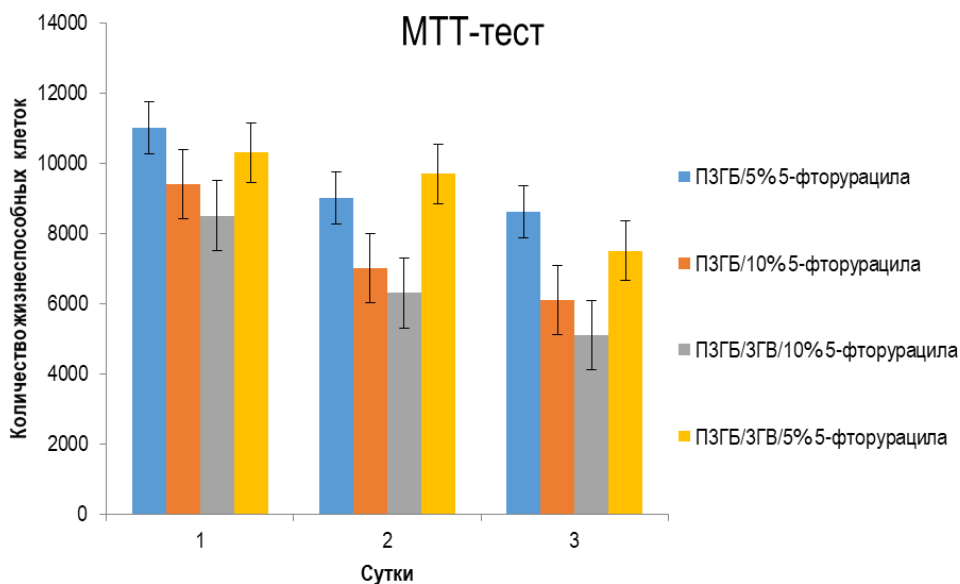


Рисунок 3.6. – МТТ-тест: влияние концентрации депонированного 5- фторурацила в полимерные микрочастицы (на основе ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГВ) на количество жизнеспособных клеток в культуре HeLa: концентрация препарата – 0,43 и 0,34 мг/мл

Отмечено пролонгированное действие в течение трех суток микрочастиц на основе взятых полимеров с 5-фторурацилом. Наибольшим цитостатическим эффектом обладали микрочастицы из ПЗГБ/ЗГВ с включением 5-фторурацила 10% от массы полимера, количество живых клеток к концу эксперимента с этими микрочастицами составило 5100. Наименьший цитостатический эффект имели частицы из ПЗГБ с включением 5-фторурацила 5% от массы полимера, количество живых клеток к концу эксперимента составило 8600.

Полученные данные подтверждены результатами, проведенными на следующем этапе при двойном окрашивании клеток красителями акридиновым оранжевым (АО) и бромидом этидия (БЭ) до и после внесения 5-фторурацила (рисунок 3.7. и рисунок 3.8.). Окрашивание обеспечивается одновременной двухцветной флуорисценцией, АО является одним из наиболее важных флуоресцентных красителей, которые могут окрашивать ядро в неповрежденной клеточной мембране, в то время как БЭ окрашивает клетки, потерявшие целостность клеточной мембраны.

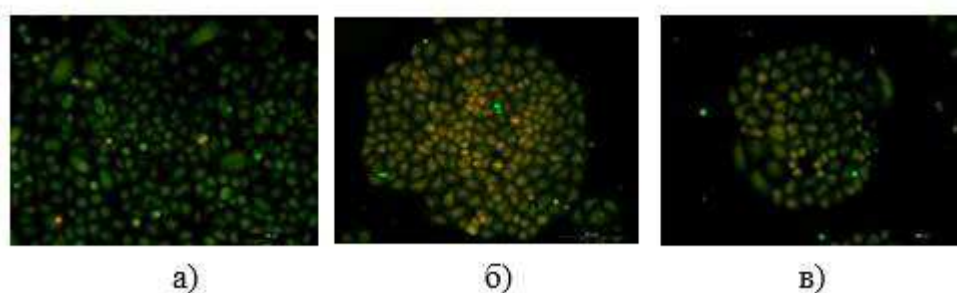


Рисунок 3.7. – Клетки HeLa, окрашенные с помощью АО/БЭ в присутствии свободного 5-фторурацила с различной концентрацией спустя 72 часа инкубирования (флуоресцентный фильтр); а- контроль, б- 5% 5- фторурацила, в- 10% 5-фторурацила

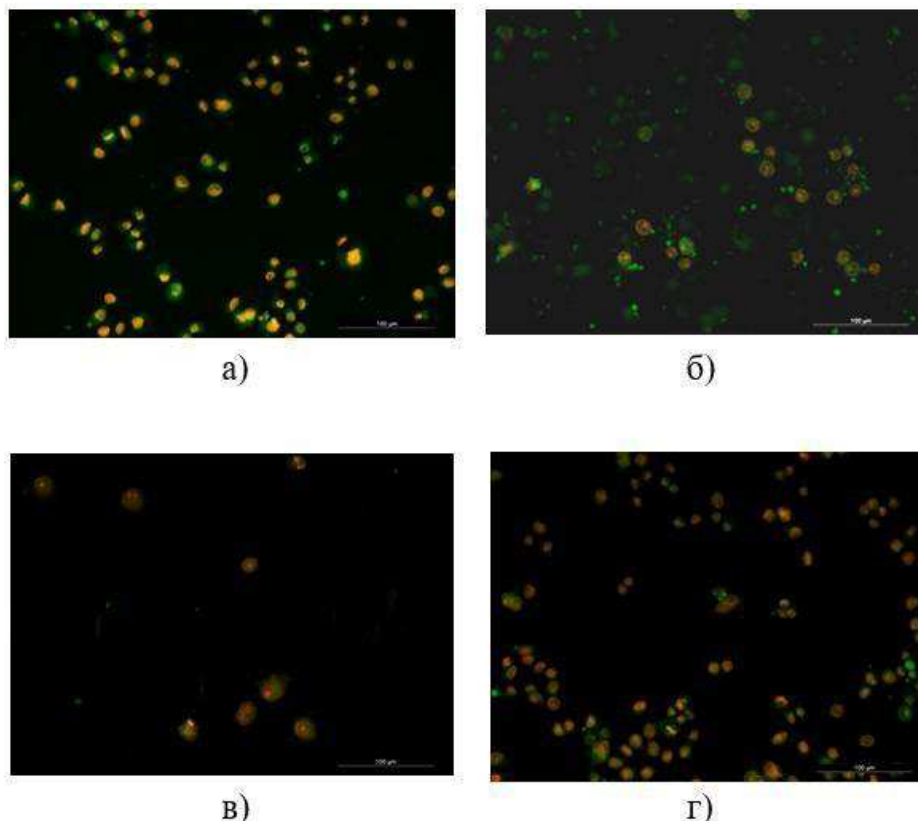


Рисунок 3.8. - Клетки HeLa, окрашенные с помощью АО/БЭ с полимерными микрочастицами на основе ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГВ с 5- фторурацилом с различной концентрацией спустя 72 часа инкубирования (флуоресцентный фильтр); а - ПЗГБ 5% 5-фторурацила, б – ПЗГБ 10% 5- фторурацила, в – ПЗГБ/ЗГВ 5% 5-фторурацила, г – ПЗГБ/ЗГВ 10% 5- фторурацила.

Инкубация клеток HeLa с 5-фторурацилом в инкапсулированной и свободной формах (0,34 и 0,43 мг/мл) спустя 72 часа в стандартных условиях (37 °С, 5 % CO₂) вызывала апоптоз и некроз клеток. На фотографиях флуоресцентного окрашивания мы видим живые клетки, имеющие зеленое ядро, ранние апоптотические клетки, имеющие ярко-зеленое конденсированное ядро с фрагментацией хроматина. Кроме того, в большом количестве можем наблюдать поздние апоптотические клетки, которые конденсируются с фрагментарным хроматином и окрашены желто-оранжевым или красным цветом, в то время как мертвые клетки имеют ярко-оранжевое или красное гомогенное ядро. Стоит отметить, что именно в эксперименте с микрочастицами мы смогли пронаблюдать более выраженный апоптоз клеток в сравнении с экспериментом, где использовалась свободная форма 5-фторурацила.

ВЫВОДЫ

1. Эмульсионным методом получены и исследованы микрочастицы на основе ПЗГБ и ПЗГБ/ЗГВ с противоопухолевым препаратом 5-фторурацилом с нагрузкой 5 и 10% от массы полимера.
2. Доказано, что инкапсулированный лекарственный препарат и присутствие в составе молекул ПГА мономеров 3-гидроксивалерата влияет на размер частиц (от $69,64 \pm 3,12$ до $76,33 \pm 4,23$ мкм) и ζ -потенциал (от $-12,2$ Мв до $-10,7$ Мв)
3. Установлено, что на эффективность инкапсулирования (ЭИ) микрочастиц и выход 5-фторурацила влияет химический состав микрочастиц. Количество вышедшего препарата из микрочастиц ПЗГБ составило $56 \pm 0,6$ и $57 \pm 0,5\%$ в зависимости от нагрузки ЛП 5 и 10% от массы полимера соответственно, и $67 \pm 0,7$ и $68 \pm 0,2\%$ из микрочастиц ПЗГБ/ЗГВ в зависимости от нагрузки ЛП 5 и 10% от массы полимера соответственно.
4. В культуре опухолевых клеток Hela по результатам МТТ-теста и двойного окрашивания акридиновым оранжевым и бромидом этидия установлено, что полученные микрочастицы ПГА с 5-фторурацилом подавляют активность клеток, обладают выраженным пролонгированным действием и могут быть использованы для систем контролируемой доставки лекарственных препаратов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Golivets T.P., Kovalenko B.S., Analysis of world and russian trends in cancer incidence in the twenty-first century / B.S. Kovalenko B.S. // Сетевой журнал «Научный результат» Серия «Медицина и фармация». – 2015.
2. Коровина М.А. Разработка методологии и технологии создания лечебных текстильных и гидрогелевых аппликаций для направленной местной доставки лекарств при лучевой терапии онкологических заболеваний: теория и практика / Диссертация на соискание ученой степени доктора технических наук. – 2011.
3. Шарафутдинов М. Г. Шарафутдинов Общая Онкология: учебно-методическое пособие для врачей и студентов / М. Г. Шарафутдинов, В. В. Родионов, С.В. Панченко, В.С. Морозов. – 2013.
4. Ольхов А.А. Смеси на основе термопластического полиуретана и полигидроксibuтирата / А.А. Ольхов, А.Л. Иорданский, О.В. Стоянов и др. // Вестник Казанского технологического университета. – 2014.
5. Валугев Л. Полимерные системы для контролируемого выделения биологически активных соединений / Л. Валугев, Т. Валугева, И. Валугев [и др.] // Успехи биологической химии. – 2003. – Т. 28.
6. Аляутдин Р.Н., Фармакология / учебник под ред. Р. Н. Аляутдина. – 2015.
7. Kim T.H. Regylated recombinant human epidermal growth factor (rhEGF) for sustained release from biodegradable PLGA microspheres / T. Kim, H. Lee, T. Park // Biomaterials. – 2002.
8. Freiberg S. Polymermicrospheres for controlled drug release / S. Freiberg, X. Zhu // Int. J. Pharm. – 2004.
9. Medvecky L. Study of Controlled Tetracycline Release from Porous Calcium Phosphate Polyhydroxybutyrate Composites / L. Medvecky, R.Stulajterova, B. Briancin // Chem. Pap. – 2007.

10. Marcucci F. Active targeting with particulate drug carriers in tumor therapy: fundamentals and recent progress / F. Marcucci, F. Lefoulon // Drug Discov. Today. – 2004.
11. Furgenson D. Structural optimization of a "smart" doxorubicin-polypeptide conjugate for thermally targeted delivery to solid tumors / D. Furgenson, M. Dreher, A. Chilkoti // J. of Controlled Release. – 2006.
12. Torchilin V. Multifunctional nanocarriers / Advanced Drug Delivery Reviews – 2006.
13. Brannon-Peppas L. Polymers in controlled drug delivery / L. Brannon-Peppas // Medical Plastics and Biomaterials. – 1997.
14. Dutta R.C. Drug carriers in pharmaceutical design: promises and progress / R. Dutta // Curr. Pharm. Des. – 2007.
15. Kingsley J. Nanotechnology: a focus on nanoparticles as a drug delivery system / J. Kingsley, H. Dou, J. Morehesd [et al] // J. Neuroimmune Pharmacol. – 2006.
16. Goforth R. Immune stimulatory antigen loaded particles combined with depletion of regulatory T-cells induce potent tumor specific immunity in a mouse model of melanoma / R. Goforth, A. Salem, X. Zhu [et al] // Cancer Immunol Immunother. – 2009.
17. Медведева Н.В. Нанобиотехнологии и нанобиомедицина / Н.В. Медведева, О.М. Ипатова, Ю.Д. Иванов [и др.] // Биомедицинская химия. – 2006.
18. Шершнева А.М. Полимерные микрочастицы на основе полигидроксиалканоатов: получение, характеристика, применение / Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. – 2015.
19. Филатова Е.В. Лекарственные системы противоопухолевого действия на основе микросфер из поли-3-оксибутирата / Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук. – 2019.

20. Winzenburg G. Biodegradable polymers and their potential use in parenteral veterinary drug delivery systems / G. Winzenburg, C. Schmidt, S. Fuchs // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2004.
21. Водолажский Д.И. Усиление цитотоксического действия 5-фторурацила при сочетанном применении с ультразвуком / Н.А. Назаралиева, Т.И. Моисеенко, Е.М. Франциянц, Д.С. Потемкин, Н.Г. Васильченко, А.П. Меньшенина // *Известия вузов. Северо-кавказский регион. Естественные науки.* – 2018.
22. Кузнецова Д.А. Получение хитозан-альгинатных микрочастиц, нагруженных 5-фторурацилом и фолиевой кислотой как субстанции для комплексного препарата для химиотерапии / А.А. Красноштанова А.А. // *Norwegian Journal of development of the International Science* №26. – 2019.
23. Голясная Н.В. Влияние противоопухолевых препаратов на первичные культуры клеток больных колоректальным раком / Ю.В. Иванов, Н.К. Жижин // *Клиническая практика* № 2. – 2016.
24. Коровина М.А. Разработка методологии и технологии создания лечебных текстильных и гидрогелевых аппликаций для направленной местной доставки лекарств при лучевой терапии онкологических заболеваний: теория и практика/ Диссертация на соискание ученой степени доктора технических наук. – 2011.
25. Somayeh H. Co-delivery of 5-fluorouracil and oxaliplatin in novel poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate acid)/poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for colon cancer therapy/ E. Moghimipour, M. Rezaei, S. Saremy, F. Abedin Dorkoosh // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2019.
26. Романова М. А. Изучение цитотоксичности биологически активных соединений на культуре клеток / А. Ш. Додонова // *Молодой ученый.* – 2016.

27. Gangrade N. Poly(hydroxybutyrate-hydroxyvalerate) microspheres containing progesterone: Preparation, morphology and release properties / N. Gangrade, J.C. Price // *J. Microencapsul.* – 1991.
28. Marcucci F. Active targeting with particulate drug carriers in tumor therapy: fundamentals and recent progress / F. Marcucci, F. Lefoulon // *Drug Discov. Today.* – 2004.
29. Еропкин М.Ю. Культуры клеток как модельная система в биохимико-токсикологических исследованиях / Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора биологических наук. – 2004.
30. Aguilar-Rabiela A. Modeling the release of curcumin from microparticles of poly(hydroxybutyrate) [PHB] / E. Hernández-Cooper, J. Otero, et al. // *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2020.
31. N. Pettinelli et al. / *International Journal of Biological Macromolecules.* – 2020.
32. Bazzo G.C. Effect of preparation conditions on morphology, drug content and release profiles of poly(hydroxybutyrate) microparticles containing piroxicam / G.C. Bazzo, E. Lemos-Senna, et al. // *J Braz Chem Soc.* – 2008.
33. Barouti G. Advances in drug delivery systems based on synthetic poly(hydroxybutyrate) (co)polymers / C. Jaffredo, S.M. Guillaume // *Progress in Polymer Science.* – 2017.
34. Tebaldi M.L. Poly(-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV): Current advances in synthesis methodologies, antitumor applications and biocompatibility / A.L. Chaves Maiab, F. Polettoc, F. Vieira de Andrade, D. C. Ferreira Soares // *Journal of Drug Delivery Science and Technology.* – 2019.
35. Зернов А.Л. Микрочастицы из биосинтетических полиоксипропионатов для пролонгированного высвобождения белков / Диссертационная работа на соискание ученой степени кандидата биологических наук. – 2017.


Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт
Базовая кафедра биотехнологии
кафедра

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 Т. Г. Волова
подпись инициалы, фамилия

«26» июня 20 19 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 Биология
код и наименование специальности

Исследование влияния полимерных микрочастиц с 5-фторурацилом на
культуру клеток HeLa
тема работы

Научный
руководитель:


подпись, дата

Доцент, к.б.н.
должность, ученая степень

А.А. Шумилова
инициалы, фамилия

Выпускник


подпись, дата

А.О. Маршанцева
инициалы, фамилия