



УДК 615.032

ПРИМЕНЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ ФЛУОРОФОРОВ В РАЗРАБОТКЕ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ СИНТЕТИЧЕСКИХ И ПРИРОДНЫХ ПОЛИМЕРОВ

© 2025 г. Д. Ю. Юрьев*,[#], С. В. Ткаченко*, А. Г. Поливанова*,
Ю. К. Крыщенко*, М. С. Ощепков*

* Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Россия, 125047 Москва, Миусская пл. 9

Поступила в редакцию 13.01.2025 г.

После доработки 22.01.2025 г.

Принята к публикации 24.01.2025 г.

Использование флуоресцентных меток представляет собой удобный метод исследования взаимодействия наночастиц с клетками живой материи. Многие исследования, доказывающие быстрое и эффективное поглощение наночастиц клетками, основаны на микроскопических наблюдениях за наночастицами, содержащими флуоресцентные маркеры. Такие методы позволяют изучать не только качественное, но и количественное изменение интенсивности флуоресценции при введении систем доставки в организм. Синтетические красители могут быть интегрированы в структуру полимера (полилактида или модифицированной гиалуроновой кислоты) в процессе получения наночастиц с флуоресцентным маркером, без образования новых химических связей между флуорофором и наночастицей. Однако отслеживание таких систем часто оказывается неэффективным из-за плохой растворимости и диффузии компонентов в биологической среде. Введение флуоресцентных меток с помощью химической модификации функциональных групп полимеров красителями представляется значительно более перспективной альтернативой, так как позволяет получать прочные конъюгаты, которые служат маркерами самой системы. Кроме того, ковалентное связывание флуорофора с полимером позволяет решить такие проблемы, как неточность локализации, связанной с высвобождением метки из наночастицы, и дальнейшее ее проникновение в нецелевые клетки и органеллы.

В данной работе представлен подробный критический обзор методов введения и используемых классов флуоресцентных маркеров для модификации полимеров, на основе молочной, гликолевой и гиалуроновой кислот, используемых для доставки лекарственных средств.

Ключевые слова: PLGA; гиалуроновая кислота, флуоресценция, биосовместимые полимеры

DOI: 10.31857/S0132342325020057, **EDN:** LCGJKJ

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	256
2. СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ФЛУОРОФОРОВ В СВОБОДНОМ ВИДЕ И В СОСТАВЕ НАНОЧАСТИЦ	256

Сокращения: АДН – гидразид адипиновой кислоты; СА – холановая кислота, CDI – 1,1'-карбонилдиимидазол; DBU – диазбициклоундецен; DCC – 1,3-дициклогексилкарбодимид; DMAP – 4-диметиламинопиридин; DMTMM – 4 (4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилморфолина хлорид; DOTA – додекантетрауксусная кислота; DOX – доксорубин, EDC – 1-этил-3-(3-диметиламино-пропил)карбодимид; FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США; GA – гликолевая кислота, HOBt – 1-гидроксисбензотриазол; LA – молочная кислота; MES – 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота; NHS – N-гидроксисукцинимид; PBS – фосфатно-солевой буфер; PFEP – перфторэтилен-пропилен; PGA – полигликолевая кислота; PLGA – сополимер молочной и гликолевой кислот; PLA – полимолочная кислота; PLLA – L-полимолочная кислота; Rh 6G – родамин 6G; TBA-OH – тетрабутиламмония гидроксид; TLR7/8 – толл-подобный рецептор 7/8; АИЭ – агрегационно-индуцированная эмиссия; ГК – гиалуроновая кислота; ДДВ – дважды дистиллированная вода; ДМСО – диметилсульфоксид; ДМФА – диметилформамид; ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; ИК – инфракрасная спектроскопия; МРТ – магнитно-резонансная томография; НЧ – наночастицы; ТГФ – тетрагидрофуран; ТФЭ – тетрафенилэтилен; ТЭА – триэтиламин.

[#] Автор для связи: (эл. почта: iurev.d.i@muctr.ru).

3. ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНО МЕЧЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИДОВ	259
4. ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНО МЕЧЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ	263
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	276
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	276

1. ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день один из наиболее перспективных способов изучения фармакокинетики и фармакодинамики лекарственных препаратов, а также диагностики различных заболеваний, в том числе онкологических, – введение флуоресцентных маркеров в биологическую систему [1–4]. Модификация лекарственных препаратов, антител, пептидов или метаболитов позволяет детально изучить как биохимические, так и патологические процессы [5, 6]. Современные исследования доказывают, что создание наносистем, включающих в себя биологически активную молекулу и полимер, модифицированный флуоресцентным красителем, – эффективный метод для изучения процесса доставки лекарственных препаратов к терапевтической мишени [7].

Бивизуализация – один из наиболее информативных и интенсивно используемых методов в клеточных *in vitro* и органных *in vivo* исследований, поскольку позволяет получать самую ценную информацию на субклеточном уровне: достижение наносистемами целевой группы клеток, проникновение через ГЭБ, распределение внутри клетки, высвобождение и активация молекул действующего вещества и т.п. В большинстве случаев применяются методы флуоресцентной микроскопии, поскольку свет – наиболее просто управляемый метод воздействия с наибольшим потенциалом действия, при этом варьирование используемых флуорофоров и возбуждающих источников света позволяет использовать в одном исследовании более пяти различных меток. Ковалентная модификация лекарственных препаратов, антител, пептидов или метаболитов флуоресцентной меткой позволяет детально изучать как биохимические, так и патологические процессы [8–10]. Однако сегодня предмет интенсивных исследований – создание систем адресной доставки лекарственных средств, позволяющие вводить различные флуорофоры и векторы в поли-

мерную основу, а также загружать в нее лекарственные вещества [11–13]. В качестве такой матрицы могут выступать полимеры на основе молочной, гликолевой и гиалуроновой кислот. Особый интерес представляет сополимер молочной и гликолевой кислот – полилактид-ко-гликолид (poly(lactic-co-glycolic) acid, PLGA) [14–17]. Отметим, что особенность использования PLGA – его высокая биосовместимость, биоразлагаемость, минимальная токсичность и возможность контроля скорости высвобождения лекарственного средства из наночастиц. Кроме того, существует возможность ковалентной модификации карбоксильной группы сополимера для получения функциональных производных, несущих флуорофорную или векторную группы [18–20]. В данном обзоре рассматриваются основные подходы к модификации полимеров флуоресцентными метками, а также спектрально-люминесцентные свойства получаемых конъюгатов и наночастиц.

2. СПЕКТРАЛЬНО-ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ СВОЙСТВА ФЛУОРОФОРОВ В СВОБОДНОМ ВИДЕ И В СОСТАВЕ НАНОЧАСТИЦ

Люминесценция – физическое явление, наблюдаемое для разных природных и искусственных объектов, от кристаллов, светодиодов, экранов радаров до зеленого (или другого цвета) флуоресцентного белка, планктона, грибов, светлячков и т.д. Флуоресцентные молекулы представляют наибольший интерес для научных исследований и практических приложений, поскольку они могут быть легко активированы каким-либо источником света, чаще всего используется возбуждение лазерным светом [21–26]. Свет – очень удобный рабочий инструмент. Он обеспечивает такие ценные преимущества, как низкий расход энергии, возможность дистанционного управления, обратимость использования, четкая локализуемость областей наблюдения и визуализации. Последнее играет ключевую роль в широком распро-

транении флуоресцентных технологий. Существует довольно много типов химических структур, составляющих группу наиболее известных и ценных органических флуорофоров. Они принадлежат к следующим основным химическим флуоресцентным ядрам: нафталина, пирена, ксантена, цианина, кумарина, акридина, арилметана, дипиррометена. Разнообразие химических структур обеспечивает возможность охвата электромагнитного спектра от УФ до ИК диапазона, что позволяет решать самый широкий спектр исследовательских и практических задач.

Несмотря на то, что существует довольно широкий спектр коммерчески доступных флуоресцентных красителей, количество флуорофоров, которые обладают высокими квантовыми выходами в водных средах, относительно мало [26]. Поэтому потенциальное разнообразие красителей, которые можно использовать в биологических системах, довольно ограничено. Что еще более важно, интенсивность флуоресценции многих красителей сильно зависит от свойств среды, в которой они содержатся или растворены, особенно от таких параметров, как pH, фоновая концентрация катионов и биопримеси, и т.д.

Флуоресцентные маркеры можно разделить на три основные группы в зависимости от их химической структуры [27]:

- 1) ароматические углеводороды и их производные (полифенильные углеводороды, углеводороды с конденсированными ароматическими кольцами, углеводороды с арилэтиленовыми и арилацетиленовыми группами);
- 2) соединения, содержащие гетероциклы (производные пятичленных и шестичленных гетероциклов);
- 3) соединения с карбонильной группой.

Флуорофоры, используемые в биологических исследованиях, можно разделить на два основных класса – внутренние и внешние [28]. Внутренние флуорофоры – это те соединения и молекулы, которые встречаются в природных объектах, – нормальные компоненты клеток. К ним относятся ароматические аминокислоты, NADH, флавины, производные пиридоксина и хлорофилл. Внешние флуорофоры добавляются к образцу для обеспечения флуоресценции, когда она отсутствует или для изменения спектральных свойств образца. К внешним флуорофорам относятся

широко используемые цианиновые красители, флуоресцеин, родамин и многие другие вещества.

Отдельного внимания заслуживает тот факт, что спектрально-люминесцентные характеристики флуорофоров крайне важны для решения практических задач по биовизуализации. Главные характеристики флуорофоров – максимумы поглощения и флуоресценции, молярный коэффициент поглощения, квантовый выход флуоресценции, а для флуоресцентных материалов и наночастиц наиболее важной характеристикой становится яркость [29]. Яркость флуорофора определяется как произведение коэффициента экстинкции и квантового выхода. Она имеет огромное значение с практической точки зрения так как напрямую влияет на возможности увидеть меченные наночастицы, органеллы и клетки.

Спектральные характеристики многих часто используемых флуорофоров, а также соединений, представленных в этом обзоре, приведены в табл. 1.

Один из наиболее важных свойств флуоресцентной метки – её фотостабильность [37]. Почти все флуорофоры подвергаются фотообесцвечиванию при непрерывном облучении, особенно во время проведения экспериментов по флуоресцентной микроскопии, где интенсивность света достаточно высока. Флуоресцеин – один из наименее фотостабильных красителей. Коммерчески доступные красители Alexa Fluor [38] – более фотостабильны, и были разработаны для нужд различных экспериментов по визуализации. Химические структуры AlexaFluor не раскрываются. Максимумы эмиссии красителей Alexa Fluor находятся в диапазоне от 442 до 775 нм. На фотостабильность красителя может влиять его локальное окружение. В некоторых случаях фотостабильность повышается при удалении кислорода, а в других случаях кислород не оказывает никакого влияния. В настоящее время не существует общих принципов, которые можно было бы использовать для прогнозирования фотостабильности флуорофоров.

Множество органических молекул обладают флуоресценцией, и многочисленные взаимодействия и процессы могут изменять спектральные характеристики. Флуорофоры могут быть ковалентно присоединены к макромолекулам или нацелены на взаимодействие с определенными

Таблица 1. Спектрально-люминесцентные свойства флуоресцентных маркеров

Флуорофор	$\lambda^{\text{погл}}$, нм	$\lambda^{\text{фл}}$, нм	Φ_f , %	ϵ , л/моль \times см	Φ_f в НЧ, %	Среда
Флуоресцеинамин [30]	488	518	0.8	–	–	Вода
–	492	522	4.0	–	–	Метанол
–	501	520	10	–	–	1-Бутанол
–	493	522	10	–	–	Глицерин
–	503	522	33	–	–	1-Октанол
–	512	535	60	–	–	Ацетонитрил
–	512	536	61	–	–	Ацетон
–	517	534	67	–	–	ДМСО
–	518	534	82	–	–	ДМФА
–	523	542	84	–	–	ДХМ
IR820	820	850	4.4	202 000	–	Метанол
DY-700	707	730	–	140 000	–	–
				230 000		
Индоцианин зеленый [31, 32]	785	815 [31] 822 [32]	2.7 [31] 4.4 [32]	262 100 [31] 202 000 [32]	6.6	PBS
–	–	–	8.4	–	6.9	Этанол : вода
R848	249	328	–	–	–	–
Пирен	335.2	317	32	54 000	–	Циклогексан
BODIPY [33]	493	519	99	79 000	–	EtOH
Cy3	548	561	4	150 000	73.34	PBS
Cy5	658	677	40	250 000	44.5	Этанол
–	656	–	–	–	–	Формамид
–	650	667	27	–	–	PBS
–	656	674	39	–	–	Глицерин
Cy5.5	683	703	27	250 000	50	ДДВ/PBS
Cy7 amine	756	779	30	250 000	–	ДДВ/PBS
Rh 6G родамин 6G	529.8	480	95	116 000	–	EtOH
Rh 123	512	531	90	85 200	46.8	EtOH
Дийод-BODIPY [34]	534	552	4,86	81 800	–	Гексан
–	535	554	3.14	124 000	–	Гептан
–	537	558	3.01	86 000	–	Толуол
–	534	555	3.27	80 000	–	Диоксан
–	536	561	1.12	70 000	–	ДМСО
DiI	549	565	7.0	148 000	14.91	ДДВ/PBS Метанол
Кумарин 6	460	500	78	54 000	91.9	Этанол
ТРЕТРАFN [35, 36]	510	750	52.5	91 600	34	ДДВ

структурами клетки, белками, мембранами, ДНК. Люминесценция может наблюдаться в диапазоне от УФ до ближнего инфракрасного диапазона, и доступны метки как с коротким (нс), так и длительным временем жизни (от мкс до мс). Подходы и технологии, применяемые для конъюгации флуорофоров с наносистемами доставки, очень быстро меняются, и новые зонды позволяют проводить эксперименты, которые ранее казались невозможными.

3. ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ФЛЮОРЕСЦЕНТНО МЕЧЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ПОЛИЛАКТИДОВ

PLGA – это сополимер молочной (LA) и гликолевой (GA) кислот, нашедший широкое применение в биомедицине и использующийся для направленной доставки молекул лекарственных препаратов, белков или других макромолекул с контролируемым высвобождением. PLGA может быть получен путем сополимеризации лактида и гликолида с раскрытием цикла при использовании катализатора на основе олова (рис. 1) [39].

Существует два наиболее распространенных способа получения наночастиц на основе PLGA – двойное или одинарное упаривание эмульсионного растворителя [40]. Одинарное упаривание подразумевает эмульгирование масла в воде, тогда как двойное упаривание подразумевает эмульгирование воды в масле в воде. Двойное эмульгирование подходит для капсулирования растворимых в воде лекарственных средств (пептиды, белки и вакцины), а одинарное эмульгирование для нерастворимых (стероиды).

На размер и биораспределение PLGA наночастиц влияют методы их получения, молекулярная масса самого сополимера, а также добавление поверхностно-активных веществ и других добавок. Было обнаружено, что в зависимости от

соотношения лактида и гликолида, используемых для полимеризации, могут быть получены формы PLGA, имеющие различную механическую прочность, способность к набуханию, скорость гидролиза [41].

После разложения мономерные компоненты каждого полимера выводятся естественным путем. Гликолевая кислота либо выводится почками в неизменном виде, либо, как и молочная кислота, в ходе метаболических превращений поступает в цикл трикарбоновых кислот, где в конечном итоге окисляется до диоксида углерода и воды. Именно эти свойства и обуславливают минимальную токсичность полимера, его биоразлагаемость и высокую биосовместимость. Для разработки новых лекарственных препаратов имеет значение еще и то, что PLGA – полимер, одобренный Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) [42].

Флуорофоры могут быть введены в состав полимерных наночастиц на основе PLGA разными способами: путем физического связывания гидрофобного красителя или с помощью ковалентной модификации полимерной цепи. Достоинство нековалентного метода заключается в простоте и легкости выполнения и в обеспечении высокого процента загрузки в наночастицы [43]. Однако отслеживание таких систем часто оказывается неэффективным из-за плохой растворимости и диффузии компонентов в биологической среде.

Ковалентное же связывание флуорофора и полимера обеспечивает большую химико-биологическую стабильность структуры и предотвращает вымывание маркера [44, 45]. Существует несколько методов ковалентного введения флуоресцентного красителя:

1) прямое введение флуоресцентной метки в процессе полимеризации, обеспечивающее получение флуоресцентно меченого полимера в одну

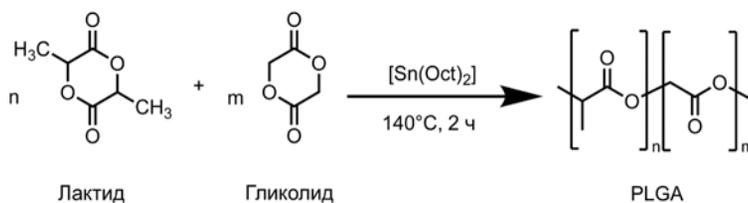


Рис. 1. Сополимеризация PLGA методом раскрытия цикла.

стадию. Однако для данного метода требуются труднодоступные флуоресцентные предшественники или мономеры. Более того, во время стадии полимеризации флуорофор под действием жестких условий (нагрев, экстремальный pH) может изменять свои свойства или разрушаться.

2) метод введения флуоресцентного маркера после полимеризации позволяет избежать вышеуказанных недостатков, поскольку химическое связывание часто протекает в более мягких условиях, чем те, которые требуются для полимеризации.

Для сравнения эффективности отслеживания внутриклеточной доставки доксорубина и паклитаксела группа ученых из нескольких университетов под руководством Ху Р. в 2009 г. изучила особенности PLGA наночастиц с солюбилизированным и ковалентно связанным флуорофором [46]. Первоначально методом единичного эмульгирования синтезировали PLGA наночастицы (рис. 2) с физически инкапсулированным гидрофобным красителем нильский красный. Смесь PLGA и нильского красного в дихлорметане добавляли к раствору поливинилового спирта, после чего гомогенизировали в течение 30 с (для получения частиц размером 300 нм) или 10 мин (для получения частиц размером 100 нм) с помощью ультразвукового зонда. Аналогично были полу-

чены PLGA наночастицы, содержащие паклитаксел и доксорубин. Затем их инкубировали с мезотелиальными клетками (CRL-9444, ATCC) и наблюдали усиление внутриклеточной флуоресценции. Далее получали наночастицы с ковалентно введенным производным флуоресцеина – флуоресцеинамином (рис. 2).

С помощью конфокальной микроскопии было показано, что поглощение клетками наночастиц, содержащих нековалентно присоединенный флуоресцентный маркер, происходит не так эффективно, как сообщалось в более ранних работах. Было обнаружено, что наблюдаемое увеличение флуоресценции частиц с физически инкапсулированным красителем обусловлено высвобождением свободного флуорофора, а не поглощением наночастиц клетками. При химическом связывании наблюдается большая стабильность и эффективность распределения полученных частиц.

В работе Freichels H. и соавт. [47] карбоксильная группа PLGA была модифицирована производным флуоресцеина (I) (рис. 2) в присутствии DMAP и DCC в ТГФ в течение 12 ч при комнатной температуре. Эффективность полученного комплекса флуоресцентных PLGA наночастиц была показана в эксперименте по *in vitro* визуализации. Полученные меченные наночастицы

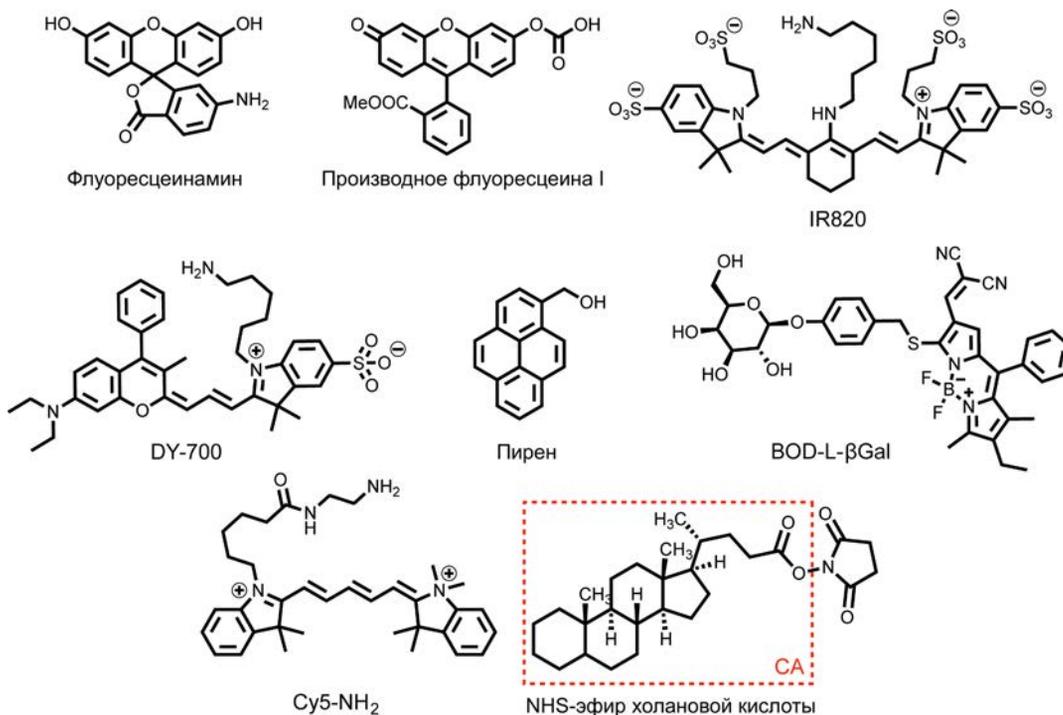


Рис. 2. Структурные формулы соединений, упоминаемых в обзоре.

инкубировали с эндотелиальными клетками почечной вены человека (HUVEC) и наблюдали усиление зеленой флуоресценции в клетках. В дальнейшем исследуемый комплекс предполагается использовать в терапии онкологических заболеваний для нацеливания на микроскладчатые клетки (М-клетки).

Другой класс широко используемых флуорофоров – цианиновые красители, молекулы которых содержат положительный заряд, делокализованный на сопряженной полиметиновой цепи. Они обладают чрезвычайно высокими коэффициентами экстинкции и квантовыми выходами в органических растворителях и неполярных средах [48].

В 2018 г. был предложен синтез флуоресцентного маркера IR820 (рис. 2), содержащего свободную терминальную аминогруппу, которую впоследствии ковалентно модифицировали PLGA [49]. Исследования *in vitro* продемонстрировали низкую цитотоксичность полученных на основе PLGA-IR820 наночастиц. Отслеживание наночастиц *in vivo* для оценки биораспределения зондов показало их локальную стабильность и высокую биосовместимость. Наночастицы, обладали более высокими флуоресцентными свойствами по сравнению со свободным красителем.

Reul R. с сотрудниками предложили синтез конъюгата PLGA и производного DY-700 (рис. 2). На первом этапе PLGA растворяли в дихлорметане в присутствии DCC и *N*-гидроксисукцинимид (NHS) с образованием PLGA-NHS, который затем вводили в реакцию с DY-700 в присутствии триэтиламина в качестве основания с получением флуоресцентно меченного полимера [50]. Наночастицы получали методом испарения эмульсии растворителя. Флуоресцентные наночастицы и свободный краситель вводили мышам внутривенно, и их биораспределение отслеживали в течение суток с помощью визуализации *in vivo* и *ex vivo*. Было обнаружено, что наночастицы концентрировались в печени, тогда как свободный краситель там не накапливался. Конъюгат PLGA-DY-700 показал низкую цитотоксичность по отношению к культурам клеток HUVEC, NIH/3T3 и J774.A1 как *in vitro*, так и *in vivo*.

В 2021 г. группа исследователей из Японии и Китая провела исследование флуоресцентных PLGA наночастиц, содержащих индоциановый

зеленый и пригодных для комбинированной фототермической терапии и иммунотерапии рака предстательной железы [51].

Методом двойного эмульгирования получали наночастицы PLGA, содержащие индоциановый зеленый и толл-подобный рецептор 7/8 (TLR7/8) агониста резиквимода (R848). PLGA и R848 растворяли в хлористом метиле, затем к смеси добавляли раствор красителя. Полученную смесь эмульгировали под действием ультразвука. Далее первичную эмульсию вносили в водный раствор поливинилового спирта и упаривали при перемешивании в течение 4 ч. Целевые наночастицы получали лиофилизацией полученной эмульсии в течение 24 ч. Спектрофотометрически были идентифицированы характерные пики поглощения красителя и R848, подтверждающие эффективную инкапсуляцию компонентов и стабильность спектрального отклика. При облучении лазером в ближней ИК-области изучаемые наночастицы значительно подавляли рост клеточных линий рака простаты человека и мыши. Более того, они значительно увеличивали рост маркеров созревания дендритных клеток костного мозга.

В 2016 г. исследовательской группой под руководством Zhu W. было предложено нанокластерное Au-модифицированное волокно на основе PLGA с флуоресценцией в красной области [52]. Нанокластеры благородных металлов состоят из нескольких десятков атомов и имеют размеры от субнанометровых до 2 нм. Размеры, сравнимые с длиной волны электрона, заставляют их проявлять особые свойства, такие как фотолюминесценция, поверхностный плазмонный резонанс, молекулярное распознавание. Флуоресцентные нанокластеры золота привлекли значительное внимание для обнаружения малых молекул, ионов, белков и ДНК, а также в ферментативном анализе. Волокно изготавливали путем инкапсуляции нанокластеров золота в волокно PLGA, обработанное пероксидом водорода. Нанокластеры стабилизировали бычьим сывороточным альбумином. Флуоресценция таких структур тушится в присутствии оксида азота (II).

В 2018 г. Alwattar A. и его коллеги предложили способ синтеза PLLA наночастиц, модифицированных пиреновым фрагментом (рис. 2), с помощью метода центрифугирования раствора при продувании воздухом [53]. Производные пи-

рена обладают высокими квантовыми выходами и флуоресцируют в синей области спектра. Полимер PLLA-пирен был получен методом полимеризации с раскрытием цикла L-молочной кислоты при использовании гидроксильированного пирена в качестве инициатора и в присутствии DBU как катализатора. Из полимера методом электроформования были получены электропроводящие и флуоресцентные волокна субмикронного размера, которые могут найти применение для *in vitro* мониторинга и электростимуляции.

В исследовании 2020 г., опубликованном группой Chen J.-A., был разработан активируемый β галактозидазой нанозонд для мониторинга в режиме реального времени стареющих клеток и сосудистой сети у мышей с атеросклерозом [54]. PLGA наночастицы были синтезированы путем инкапсуляции недавно разработанного флуоресцентного зонда BOD-L- β Gal (рис. 2). PLGA со средней молекулярной массой 20000 Да растворяли в смеси метанола и ацетона. Далее к раствору добавляли BOD-L- β Gal, эмульгировали в водном ПВС и упаривали растворитель. Нанозонд показал хорошую накопительную способность в артериях, что позволило успешно визуализировать клетки с признаками старения.

В работе Thomsen T. и соавт. было показано, что полилактидные наночастицы с физически включенным BODIPY могут давать ложноотрицательные или ошибочные результаты из-за частичного разрушения и изменения физико-химических свойств наночастиц [55].

Использование наночастиц с ковалентно связанным флуоресцентным маркером, наоборот, обеспечивают надежный подход к мониторингу реакций конъюгации на поверхности клеток. Наночастицы получали осаждением из раствора ацетона, содержащего полилактид с концевыми

кислотными группами и флуоресцентный маркер, в натрий-фосфатный буфер. Для подтверждения гипотезы о выщелачивании флуоресцентных маркеров, нековалентно присоединенных к полимеру, в исследуемые клетки были введены наночастицы с двойной меткой, содержащие как ковалентно, так и физически присоединенные флуоресцентные красители. Для получения последних использовали метод соосаждения PLA с концевыми кислотными группами с BODIPY, а также PLA, модифицированной $\text{Cu}5\text{-NH}_2$ (рис. 2).

Во многих приведенных работах синтетические красители добавляют к полимерам на основе молочной кислоты нековалентно, без образования химических связей между флуорофором и полимером. Часть авторов оспаривают эффективность данного способа синтеза флуоресцентных наночастиц из-за плохой растворимости и диффузии компонентов в биологической среде. Поэтому все большую популярность получают методы введения флуоресцентных меток с помощью химического взаимодействия красителей с полимерами.

В работе Oshchepkov M. [25] была осуществлена ковалентная модификация PLGA производными 1,8-нафталимида (II) и (III), содержащими концевую аминогруппу и имеющими морфолиновый или этоксиэтильный заместители в 4-ом положении нафталимидного кольца соответственно (рис. 3). Активация карбоксильной группы полимера PLGA (Resomer® RG 502 H) осуществлялась 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимидом (EDC) и *N*-гидроксисукцинимидом при добавлении диизопропиламина (DIPEA). Полимеры были использованы для получения наночастиц методом испарения эмульсионного растворителя. Наночастицы с обоими красителями имели узкое распределение по размерам (средний диа-

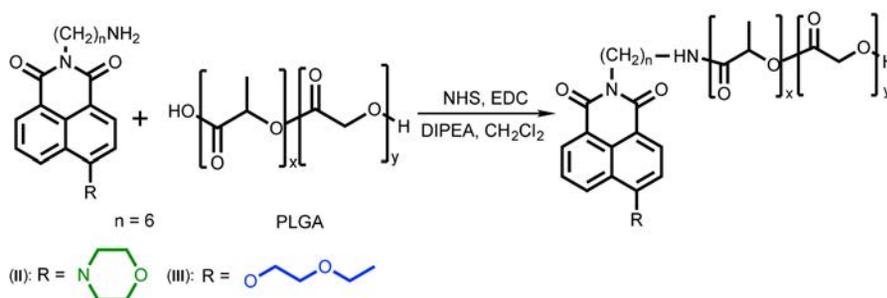


Рис. 3. Ковалентная модификация PLGA производными 1,8-нафталимида.

метр 125–135 нм, PDI ~ 0.150) и отрицательный ξ -потенциал (от -20 до -30 мВ). Красители сохраняли свои оптические свойства в процессах конъюгации и получения наночастиц. Более того, интенсивность флуоресценции не изменяется как в кислых, так и в основных условиях в диапазоне pH = 5.50–9.75, что указывает на возможность их применения для визуализации систем доставки в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Для полученных наночастиц, содержащих флуорофоры (II) и (III), было проведено исследование распределения *in vitro* на живых клетках карциномы молочной железы мыши 4T1. Для отслеживания внутриклеточного распределения наночастиц лизосомы окрашивали красителем LysoTracker Red DND-99 (50 мМ), который селективно метит кислые органеллы, что позволяет определить локализацию лизосом в культивируемых клетках с

помощью флуоресцентной микроскопии. Наночастицы добавляли в среду для культивирования клеток и в течение 1 ч визуализировали живые клетки с использованием конфокальной микроскопии. Наночастицы эффективно интернализировались в клетки 4T1 и частично локализовались с лизосомами. Внутриклеточное распределение наночастиц, меченных флуорофором (III), после 1 ч инкубации показано на рис. 4.

Во время проведения исследования наночастицы не влияли на жизнеспособность клеток. Высокая интенсивность флуоресценции и стабильность красителей, встроенных в полимерную матрицу наночастиц, делают их пригодными для флуоресцентной визуализации с использованием лазерной сканирующей конфокальной микроскопии.

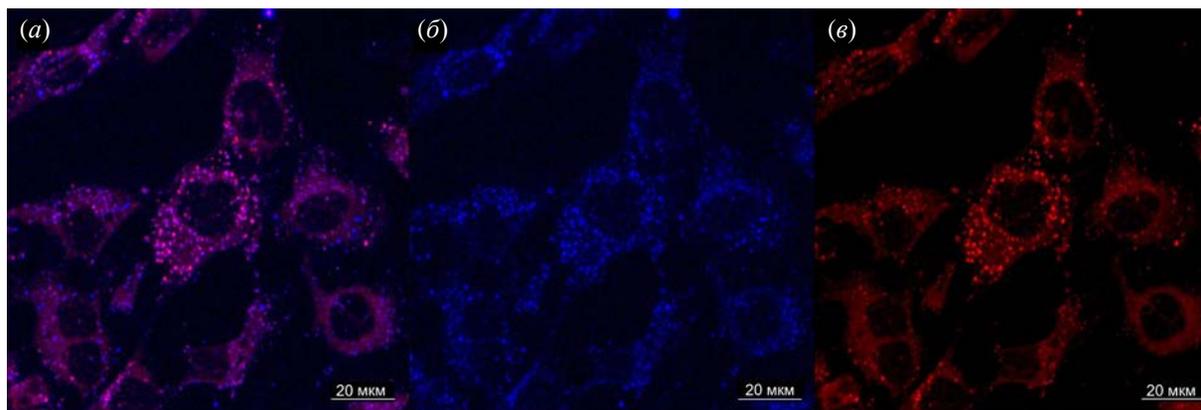


Рис. 4. Конфокальная визуализация клеток 4T1 после инкубации с наночастицами PLGA-III. (а) – Совмещенное изображение; (б) – наночастицы PLGA-III; (в) – лизосомы, окрашенные LysoTracker Red DND-99.

4. ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНО МЕЧЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ НА ОСНОВЕ ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТЫ

Один из перспективных методов доставки лекарственных средств – создание препаратов на основе гиалуроновой кислоты (ГК) [56,57] (рис. 5), что особенно актуально для малорастворимых соединений, так как гидрофильная оболочка частиц на основе ГК позволяет им легко попадать в организм и достигать мишени [58, 59].

Гиалуроновая кислота, представляющая собой анионный несulfатированный гликозаминогликан, широко распространенный в соединительной, эпителиальной и нервной тканях, – один

из главных компонентов внеклеточного матрикса. Она вносит значительный вклад в пролиферацию и миграцию клеток, а также может участвовать в прогрессировании некоторых злокачественных опухолей. Образование злокачественных опухолей сопровождается накоплением ГК в клетках в виде линейного длинноцепочечного полимера, находящегося во внеклеточном матриксе [60–62]. ГК в опухолевых клетках взаимодействует с поверхностными клеточными рецепторами, такими как CD44, RHAMM и ICAM-1, способствуя при этом стимуляции роста, выживания и ангиогенеза в первичных новообразованиях [63]. Концентрация ГК повышается при образовании злокачественных опухолей, поэтому ее можно использовать как

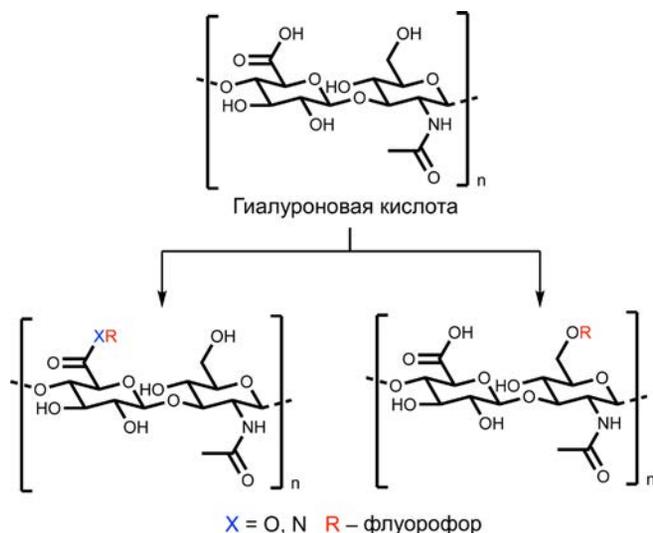


Рис. 5. Способы ковалентной модификации структуры ГК флуоресцентными маркерами.

для диагностики онкологических заболеваний, так и для доставки противоопухолевых средств к мишени [64].

При получении флуоресцентно меченных наночастиц на основе ГК используют различные подходы:

1) нековалентное введение красителя в полимерную матрицу, которое может осуществляться, например, путем получения полимерных мицелл на основе гидрофобизированной ГК, нагруженных флуорофором с достаточно высокой липофильностью.

2) ковалентная модификация полимерной матрицы ГК красителями различной природы, в случае которой для конъюгации в подавляющем большинстве исследований используют карбоксильную группу полимера с получением соответствующих сложноэфирных и амидных производных (рис. 5). Кроме того, краситель может быть введен в структуру ГК посредством первичной спиртовой группы *N*-ацетил-*D*-глюкозаминового звена, что по мнению ряда исследователей выступает более предпочтительным, в виду того, что карбоксильная группа ГК отвечает за ее биологические эффекты (в частности аффинность к рецепторам) и ее модификация может снижать биосовместимость, а также растворимость данной полимерной матрицы и, соответственно, ухудшать ее свойства, как носителя лекарственных препаратов [65].

В целом способ ковалентного введения красителя – безусловно, более эффективный, поскольку обеспечивает лучшие физиологические эффекты доставки, накопления, а также большую устойчивость флуоресцентно меченной полимерной матрицы при циркуляции в крови.

В 2010 г. Choi K. Y. и соавт. было показано, что флуоресцентно меченные наночастицы на основе гидрофобизированной ГК могут накапливаться в очаге опухоли с помощью комбинации пассивных и активных механизмов нацеливания [66]. В ходе данного исследования авторами были получены способные к самосборке и формированию полимерных мицелл амфифильные конъюгаты ГК с 5β-холановой кислотой, меченные цианиновым красителем Cy5.5 (Cy5.5-ГК) (рис. 6a).

Авторами было показано, что при обработке препаратом полимерных мицелл (Cy5.5-НА-NPS) раковых клеток SCC7 (сверхэкспрессирующих CD44-рецептор) в их цитозоле наблюдались сильные сигналы флуоресценции. Напротив, никаких значимых сигналов флуоресценции авторы не наблюдали, при инкубировании наночастиц Cy5.5-ГК с нормальными клетками фибробластов (CV-1) или с избытком клеток SCC7, предварительно обработанных незамещенной ГК, что в совокупности свидетельствует об эффективном внутриклеточном поглощении препарата посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза. Изучение биораспределения наночастиц Cy5.5-ГК осуществляли с помощью неинвазивного

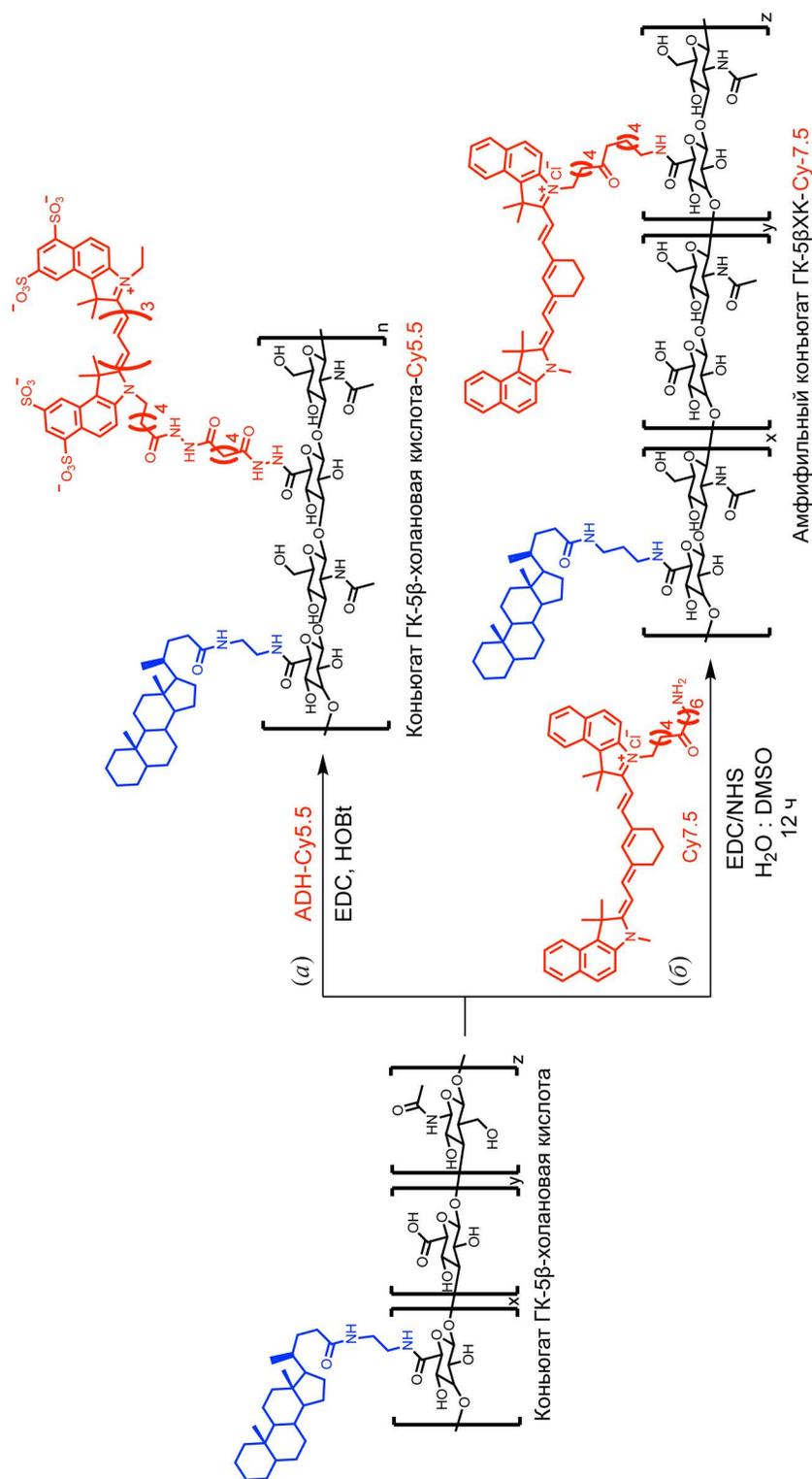


Рис. 6. (а) – Процесс конъюгации ГК с 5β-холановой кислотой и красителем Cy5.5 (ГК); (б) – процесс конъюгации гидрофобизированной 5β-холановой кислотой ГК с красителем Cy7.5.

метода флуоресцентной визуализации в ближнем инфракрасном диапазоне после внутривенного введения мышам с опухолями. Было установлено, что независимо от размера частиц (237–424 нм), значительное количество препарата находилось в течение двух дней в кровотоке и избирательно накапливались в опухоли, причем наночастицы Су5.5-ГК с меньшими размерами были способны достигать опухоли более эффективно, чем более крупные частицы.

В исследовании 2016 г. Kelkar S.S. с соавт. получали аналогичные наночастицы на основе гидрофобизированной 5 β -холановой кислотой ГК, для которых в качестве флуоресцентной метки использовали другой краситель цианинового ряда – Су7.5 (рис. 6б) [67]. Для получения наночастиц авторы использовали ГК разной молекулярной массы (10 и 100 кДа), а также три степени замещения гидрофобным фрагментом (0, 10 и 30 %-мольн.). В зависимости от этих параметров были получены препараты с переменным размером частиц, который варьировался от 50 до 400 нм.

Кинетику и энергозависимый механизм клеточного поглощения полученных препаратов исследовали на клеточных линиях рака молочной и предстательной железы (MDA-MB 231 и PC-3, соответственно). Было установлено, что более высокие показатели поглощения достигаются при более длительном времени инкубации (4 и 8 ч по сравнению с 1 ч), а также при температуре 37°C, но не при 4°C, что указывает на энергозависимый механизм эндоцитоза. Кроме того, все исследованные препараты демонстрировали низкую цитотоксичность (выживаемость клеток более 80%).

Исследования поглощения наночастиц в присутствии избытка немодифицированной ГК показали, что предварительная обработка клеток ГК с молекулярной массой 100 кДа снижала уровень поглощения наночастиц до 50%, в то время как при обработке клеток низкомолекулярной ГК (10 кДа) такой тенденции не наблюдалось. Такой характер действия ГК с большей молекулярной массой авторы объясняют возможным поливалентным механизмом ее связывания с рецепторами.

Cho H.-J. с соавт. в исследовании 2011 г. использовали флуоресцентно меченные наночастицы на основе ГК для доставки доцетаксела – эффективного противоопухолевого препарата второго по-

коления (рис. 7) [68]. Доцетаксел, как и некоторые другие цитостатики, используемые в клинической практике, обладает плохой растворимостью в воде, что обуславливает его низкую биодоступность. Кроме того, по данным клинического использования препарата, его применение опасно из-за возможного снижения числа нейтрофилов в крови (нейтропения), поражения опорно-двигательного аппарата и появления гиперчувствительности [69]. Доставка доцетаксела осуществлялась посредством его загрузки в гидрофобное ядро полимерных мицелл на основе ГК, гидрофобизированной фрагментом церамида. Внутривенное введение доцетаксела в виде мицеллярного препарата позволило решить проблему его низкой биодоступности и токсичности для организма, при этом использование флуоресцентной метки на основе Су5.5 дало возможность визуализировать процесс распределения доцетаксела в клетках. Для введения флуоресцентной метки в структуру ГК авторы использовали аналогичный метод Choi K. Y. [66].

В исследовании 2015 г. Huang Y. был описан новый метод получения флуоресцентных частиц, представляющих собой конъюгат катионного полимера и анионного фрагмента ГК, содержащего доксорубин (Dox) [70], который далее был смешан и лиофилизирован с флуоресцентным полимером (PFEP) (рис. 8).

Эффективное тушение флуоресценции PFEP достигается благодаря переносу электронов с PFEP на молекулу доксорубина. После того, как данный комплекс подвергается воздействию гиалуронидазы или поглощается опухолевыми клетками посредством специфического связывания между ГК и CD44 рецептором, ГК гидролизуются, высвобождая при этом доксирубицин, что приводит к восстановлению флуоресценции PFEP. Кроме того, степень разгорания флуоресценции количественно коррелирует с концентрацией гиалуронидазы, что позволяет оценить степень связывания доксорубина с мишенью.

Родамин 6G (Rh 6G) и его производные обладают рН-управляемой флуоресценцией, обусловленной активацией карбонильной группы в спиролактоне в кислых средах (опухолевые клетки), в то время как в нейтральной и щелочной средах (нормальные клетки) она очень мало интенсивна. В работе Zhao X. и соавт. 2016 г. был предложен

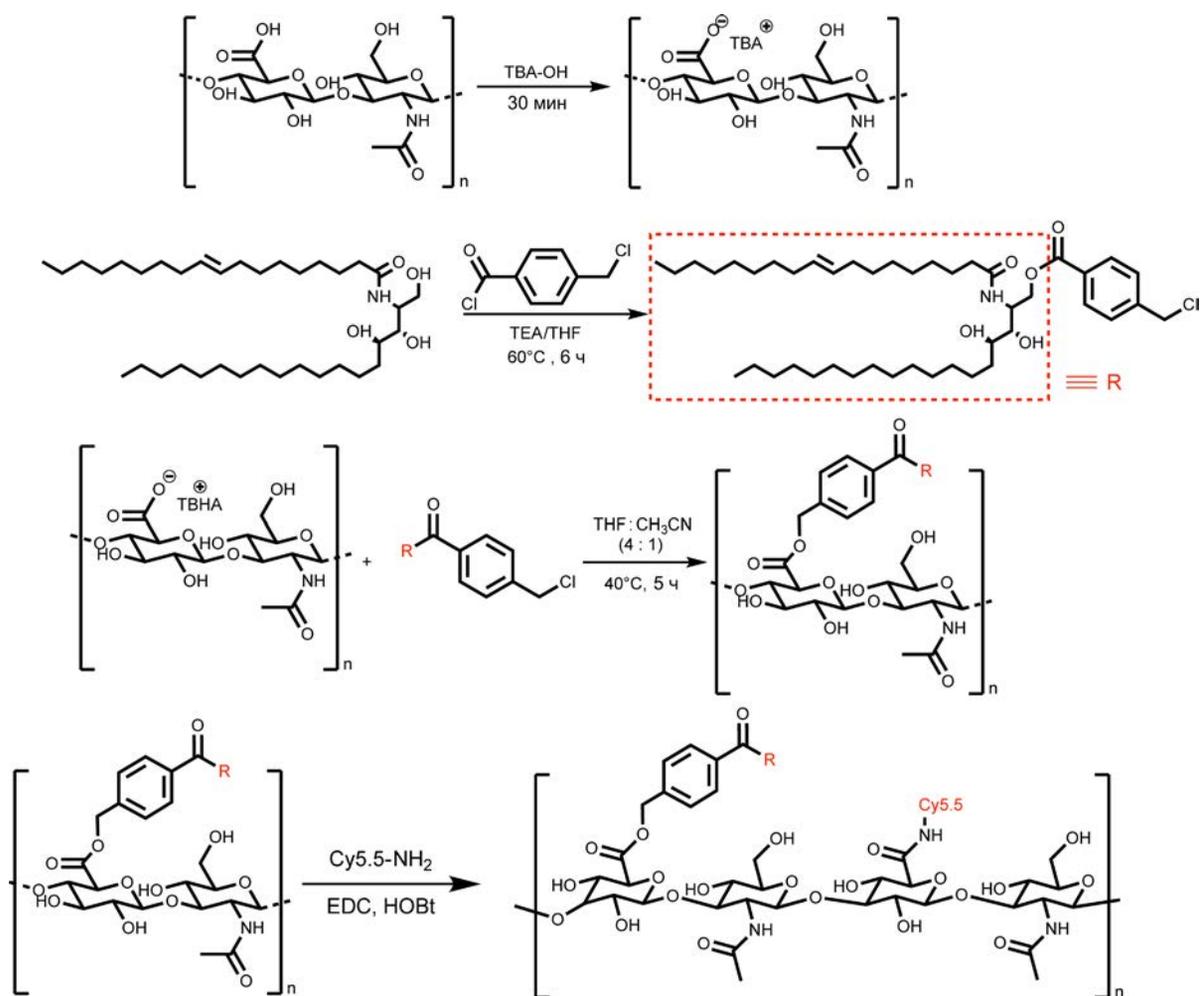


Рис. 7. Модификация ГК керамидом.

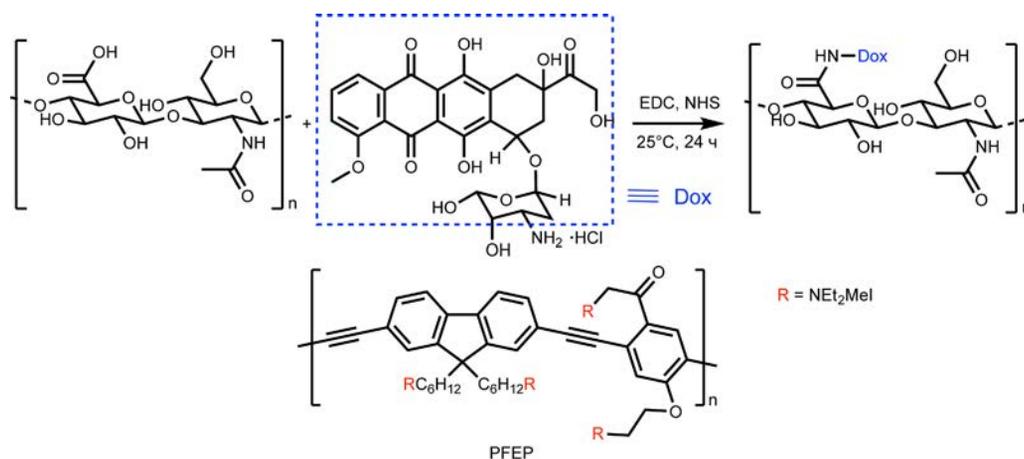


Рис. 8. Схема синтеза конъюгата ГК с флуоресцентным полимером (PFEP).

синтез наночастиц ГК с рН-зависимой флуоресценцией (рис. 9) [71]. Биологически активный компонент (фолиевая кислота) и флуоресцентный маркер модифицировали этилендиамином, и полученные амины конъюгировали с ГК карбодиимидным методом. Наночастицы с инкапсулированным доксорубицином, демонстрировали отличную цитосовместимость и эффективность препарата в отношении клеток HeLa (наблюдалось значительное разгорание флуоресценции).

В 2016 г. Li S. и соавт. опубликовали исследование, продемонстрировавшее, что флуоресцентный наногель на основе ГК высоко эффективен для доставки цитохрома С в опухолевые клетки молочной железы [72]. Наногель, содержащий

модифицированную ГК, был получен наноосаждением и фотоактивируемой клик-реакцией с L-цистин-диметакриламидом, обеспечивающим высокую стабильность и быстрое высвобождение белка внутри клеток опухоли (рис. 10).

После УФ облучения наблюдается автофлуоресценция наногеля. Тетразольные производные, выступающие продуктами фотоклик-реакции, выполняют роль флуоресцентного маркера. Примечательно, что нагруженные цитохромом С наногели, в которых он сохраняет свою биологическую активность, показали высокое сродство к глутатиону.

В 2016 г. группой Shi H. были синтезированы наночастицы на основе ГК, содержащей флуорофор – дийодстирол-BODIPY, который вво-

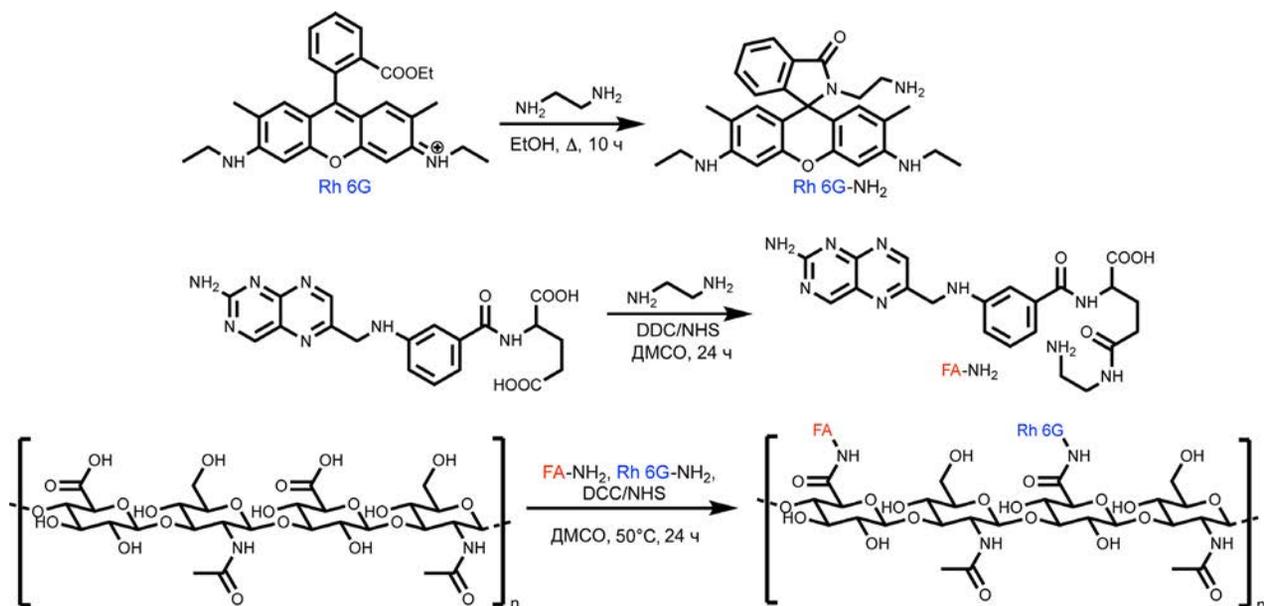


Рис. 9. Схема модификации фолиевой кислоты и флуоресцентного маркера этилендиамином, и введение их в состав ГК.

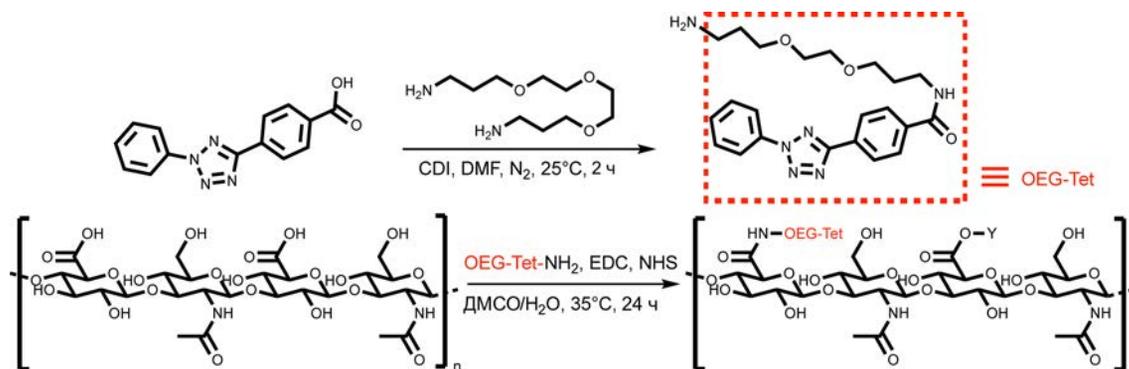


Рис. 10. Схема модификации ГК для доставки цитохрома С.

дили в структуру ГК карбодиимидным методом (рис. 11) [73].

Заметное снижение роста раковых клеток достигалось благодаря специфическому нацеливанию на мишень наноконъюгатов, содержащих противоопухолевые препараты. При попадании в лизосомы клеток НСТ-116 они подвергаются дезагрегации, что приводит к восстановлению флуоресценции, в то время как это невозможно в молекуле дийодстирол-BODIPY ввиду агрегации. Таким образом, в экспериментах *in vitro* и *in vivo* было продемонстрировано, что такие наночастицы обладают высоким потенциалом для фотодинамической терапии онкологических заболеваний.

В 2017 г. Beldman T.J. и соавт. были исследованы процессы атеросклеротического воспаления

и изучена способность наночастиц ГК, содержащих желчную кислоту, ослаблять проявления заболевания [74]. Модифицированные наночастицы на основе ГК получали взаимодействием аминоконъюгированной ГК с холановой кислотой (СА) (рис. 2). Пути метаболизма наночастиц, области их концентрирования и высвобождения действующего вещества отслеживали с помощью флуоресцентных меток на основе Cy5.5 или Cy7 (рис. 12).

Для модификации желчной кислотой ГК была переведена в форму амида со свободной NH₂-группой, к которой присоединяли карбоксильную группу флуоресцентных красителей.

В работе 2017 г. под руководством Wang H. были получены бимодальные (МРТ и ИК) самособирающиеся наночастицы на основе ГК, мо-

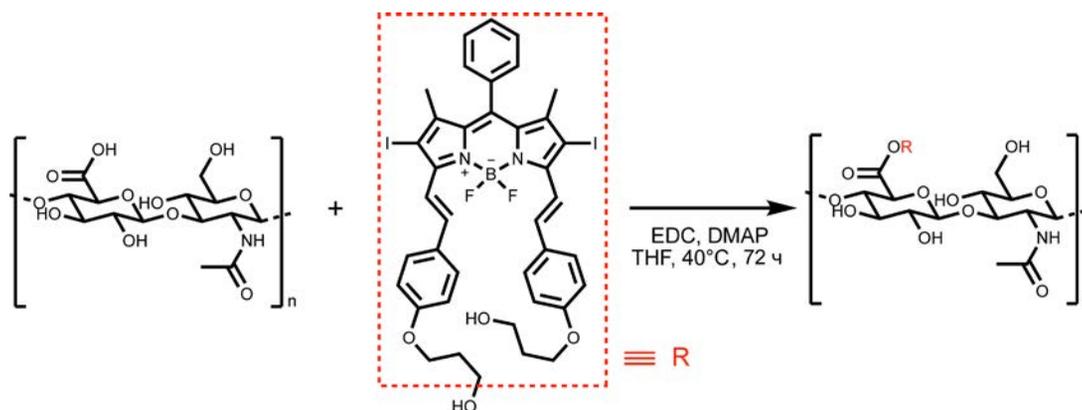


Рис. 11. Схема синтеза ГК, содержащей дийодстирол-BODIPY.

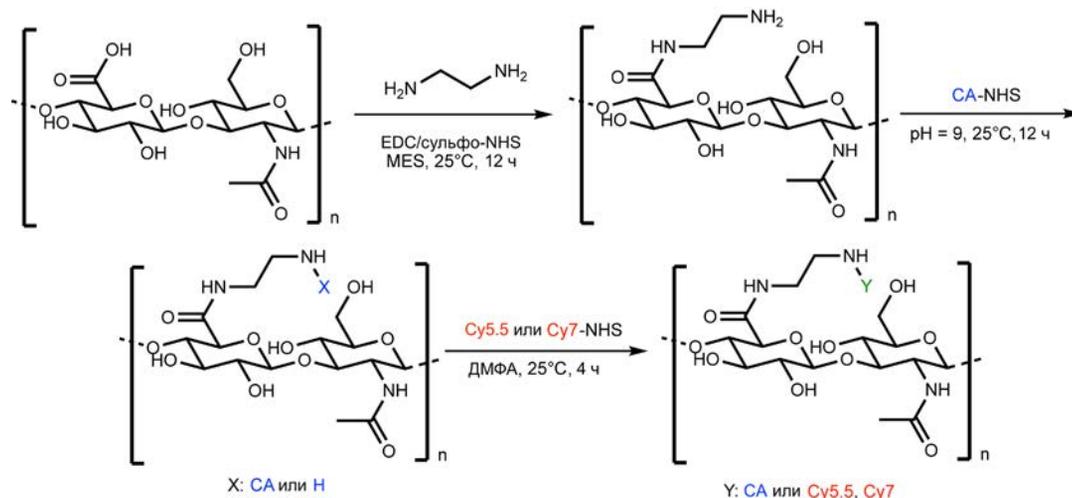


Рис. 12. Модифицирование ГК холановой кислотой (СА).

дифицированной циклодекстрином (CD), позволяющим формировать клатраты, и амантадин-модифицированными визуальными агентами (Gd-DOTA и цианиновый краситель Cy7) [75]. Флуорофор модифицировали амантадином в присутствии триэтиламина в ДМФА. Gd-DOTA получали из тетраксетана, который активировали, превращая в сложный эфир, и вводили в реакцию с амантадином (рис. 13).

Наночастицы получали смешиванием и обработкой ультразвуком модифицированных амантадином компонентов с ГК, содержащей циклодекстрин, в натрий-фосфатном буфере. Использование двойной системы детекции наночастиц методами ИК и МРТ обеспечивает высокое пространственное разрешение и чувствительность визуализации.

Achbergerova E. с соавт. в 2018 г. было проведено сравнительное исследование двух типов мицеллярных препаратов на основе гидрофобизированной олеиновой кислотой ГК, в которых флуоресцентный краситель – ципат – был либо ковалентно связан с полимерной мат-

рицей, либо встроен в нее за счет гидрофобных взаимодействий [65]. Ковалентную модификацию ГК флуорофором и гидрофобным фрагментом в данном исследовании осуществляли с использованием гидроксильных фрагментов полисахарида, сохранив при этом карбоксильные группы ГК незамещенными, при этом краситель вводили на первой стадии и далее проводили взаимодействие с олеиновой кислотой (рис. 14).

Физиологическую активность препаратов сравнивали на моделях мышей BALB/c (рак молочной железы 4T1). Было показано, что независимо от способа введения флуоресцентной метки в мицеллярные наночастицы, необходимо более 24 ч после внутривенного введения, чтобы обнаружить флуоресцентный сигнал в опухолях, при этом очаги опухолей четко визуализировались в течение двух последующих недель без повторного введения препарата. Интенсивность сигнала флуоресценции мицелл с ковалентно связанным ципатом была в 2–3 раза выше, чем у мицелл, нагруженных красителем.

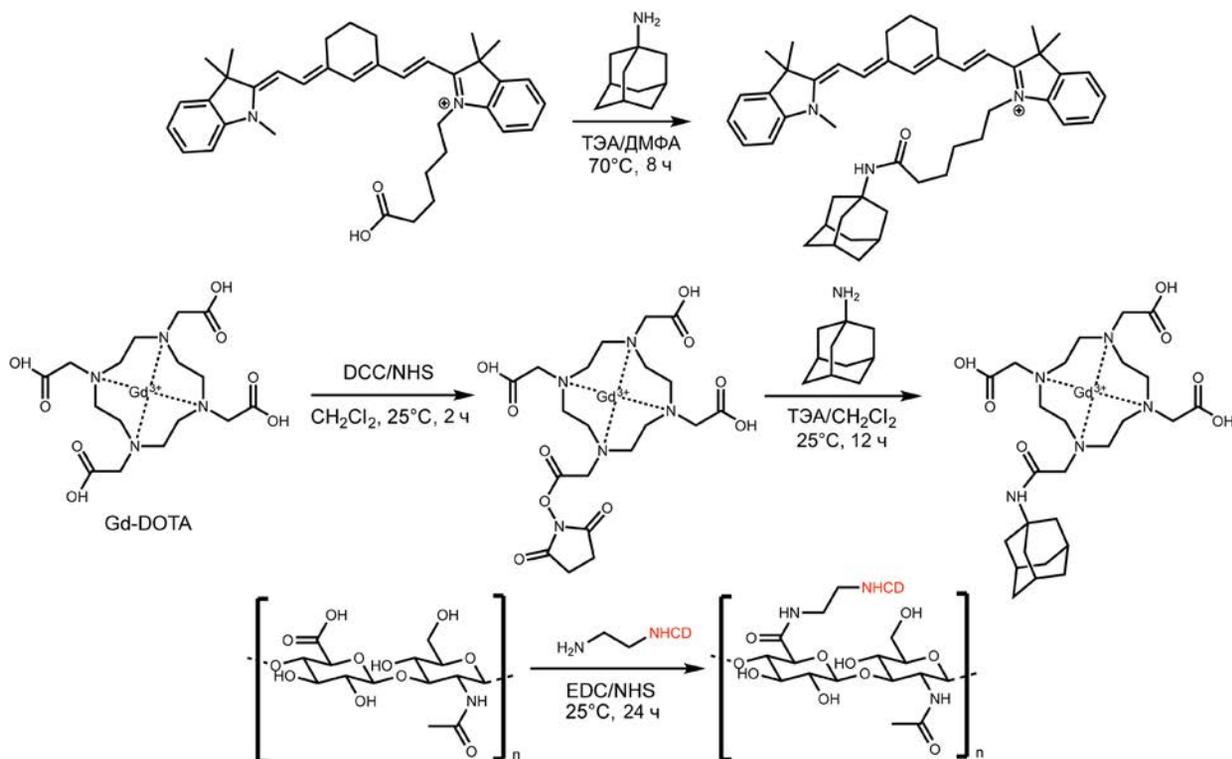


Рис. 13. Схема синтеза ГК, модифицированной циклодекстрином (CD) и амантадин-модифицированными агентами (Gd-DOTA и цианиновый краситель Cy7).

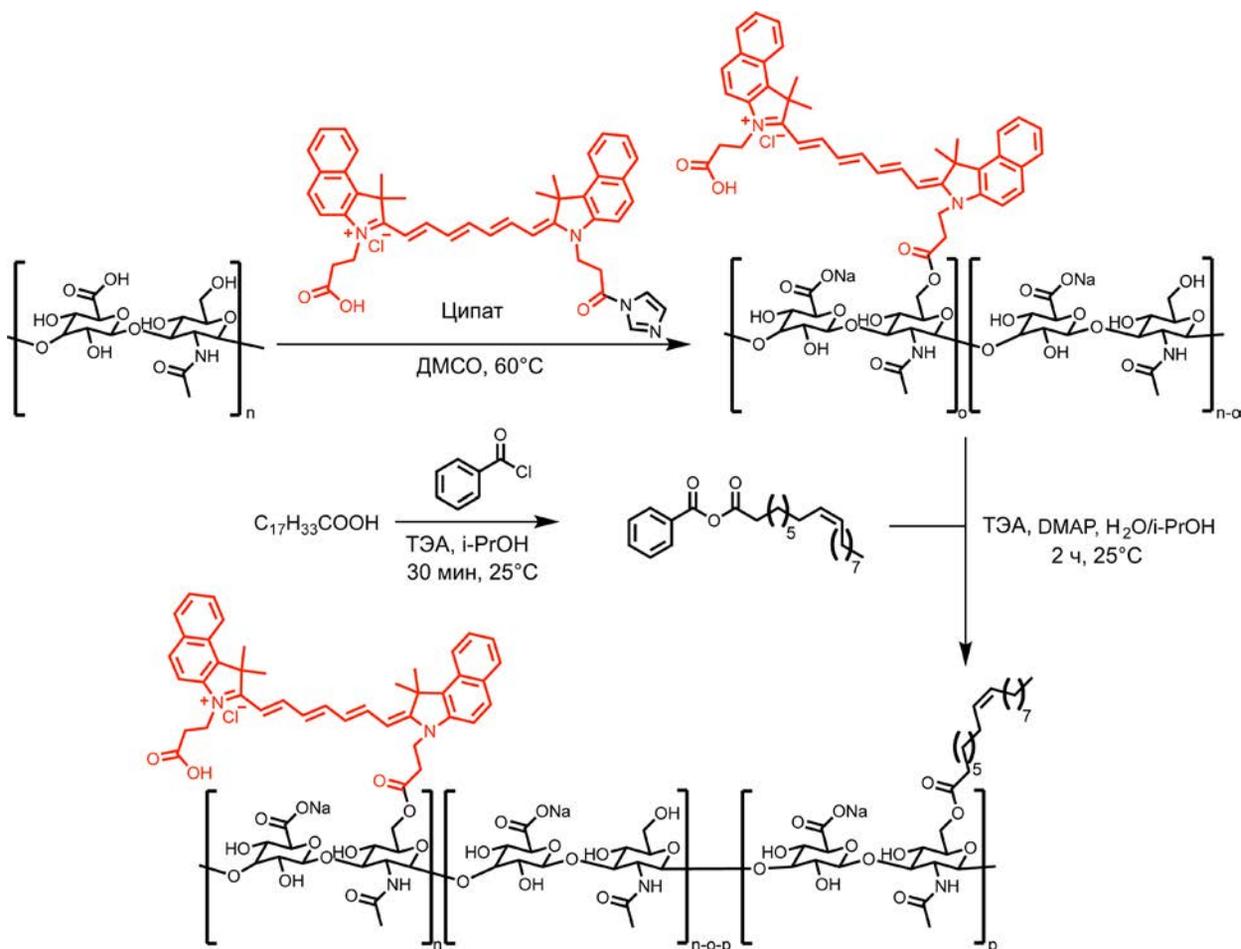


Рис. 14. Схема синтеза ГК, модифицированной олеиновой кислотой и ципатом.

В исследовании 2020 г. Qi В. с соавт. изучали влияние молекулярной массы гиалуроновой кислоты и структуры красителя, используемых при получении соответствующих флуоресцентно меченных конъюгатов, на способность последних селективно накапливаться в очаге опухоли и повышать эффективность интраоперационной визуализации рака поджелудочной железы [76]. Авторами были исследованы два типа красителей: Cy7.5 и IRDye800, которые ковалентно конъюгировали с ГК трех разных молекулярных масс: 5, 20 и 100 кДа. Конъюгацию проводили классическим способом посредством активации карбоксильной группы ГК карбодиимидом с последующим взаимодействием с аминогруппой красителя (рис. 15).

Исследование физиологической активности полученных конъюгатов проводили на моделях мышей с инфильтрирующей протоковой аденокарциномой поджелудочной железы. Было по-

казано, что каждый конъюгат способен в разной степени визуализировать интрапанкреатическую опухоль. Независимо от молекулярной массы ГК, биораспределение ее конъюгатов с Cy7.5 осуществляется преимущественно в печень, селезенку и кишечник. Для IRDye800-конъюгатов ГК с молекулярными массами 5 и 20 кДа наблюдалось снижение флуоресцентного сигнала в печени и селезенке при одновременном его увеличении в опухоли в 14 раз по сравнению со здоровой поджелудочной железой. В то же время, для IRDye800-конъюгатов ГК с молекулярной массой 100 кДа было характерно преимущественное накопление в печени и селезенке. Эти результаты объясняются разницей в физико-химических свойствах и, прежде всего, различной способностью полученных конъюгатов к самоагрегации и взаимодействию с транспортными белками крови, что определяет направленность их транспорта.

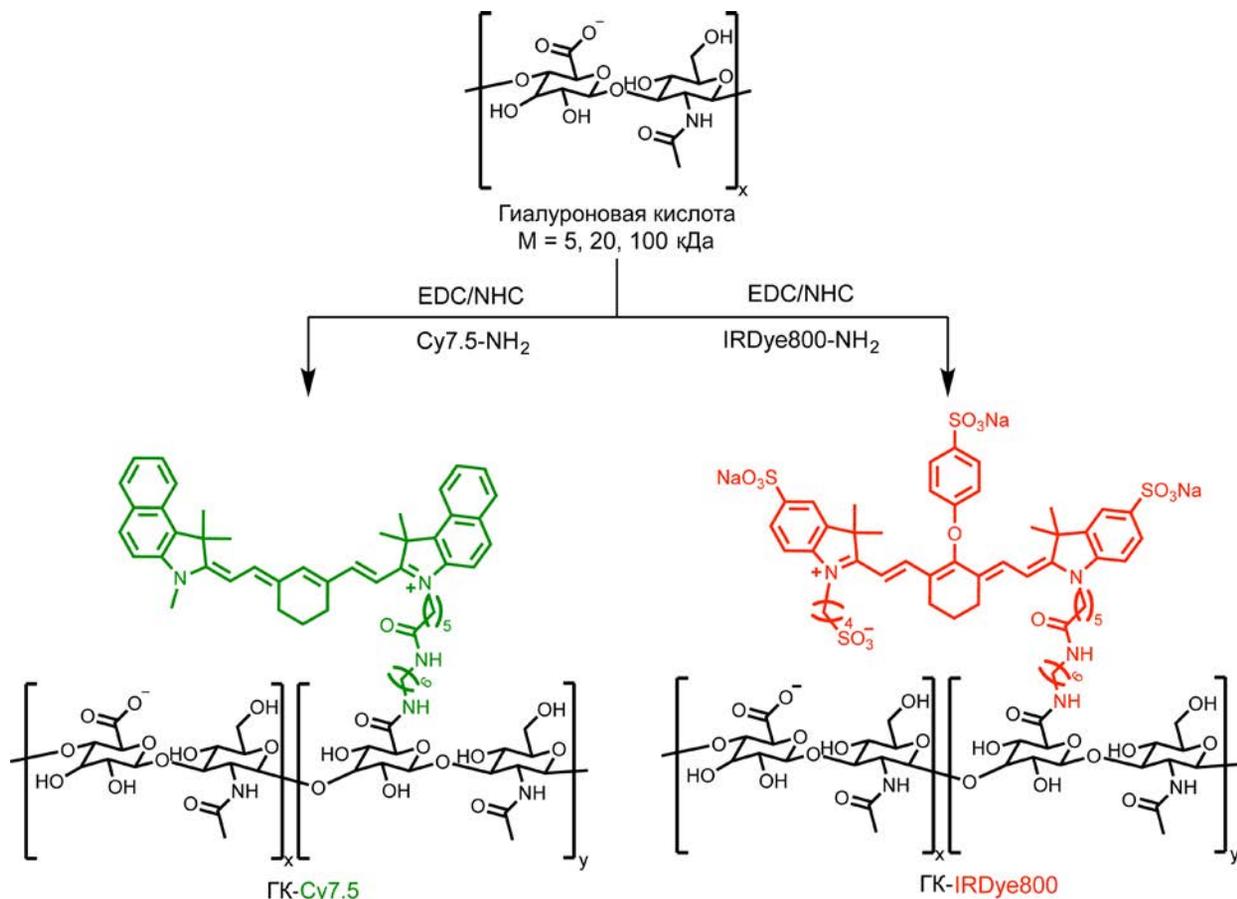


Рис. 15. Схема синтеза конъюгатов ГК с флуоресцентными красителями Cy7.5 и IRDye800.

Как известно, микроокружение опухоли, в отличие от нормальных тканей, обладает некоторыми типичными физиологическими особенностями, включая слабокислое значение pH, высокий уровень глутатиона, а также сверхэкспрессию ряда ферментов. Эти различия дают возможность создавать системы контролируемой направленной доставки лекарств, чувствительные к pH и окислительно-восстановительному статусу биоматериала. Разработка таких систем доставки на основе различных полимерных матриц для преодоления недостатков традиционных лекарственных форм привлекает все больший интерес. В этой связи созданию pH- и "редокс"-чувствительных систем доставки на основе ГК в последние годы также уделяется особое внимание. В частности, целью исследования 2016 г. под руководством Lin C.-J. – разработка окислительно-восстановительных и pH-чувствительных наночастиц ГК с пептидом и доксорубицином [77]. Противоопухолевый препарат был присоединен к

ГК через цис-аконитильную и дисульфидную связи (рис. 16). Этот конъюгат – амфифильный и мог легко самоорганизовываться в водном растворе. После сборки гидрофильные наночастицы покрывали защитной оболочкой, что позволило избежать воздействия ретикуло-эндотелиальной системы. Наличие цис-аконитильной связи привело к стократному увеличению скорости гидролиза при изменении pH с 7.5 до 5.5, что обуславливает эффективное высвобождение препарата в кислой среде эндосом или лизосом. При введении дисульфидных связей, конъюгат лекарственного средства и полимера оставался стабильным во внеклеточной жидкости с низкой концентрацией глутатиона. После попадания во внутриклеточное пространство с высоким содержанием глутатиона, дисульфидные связи расщеплялись, что привело к высвобождению молекул лекарственного средства [78]. Для визуализации *in vivo* был выбран флуорофор Cy5.5, который нековалентно

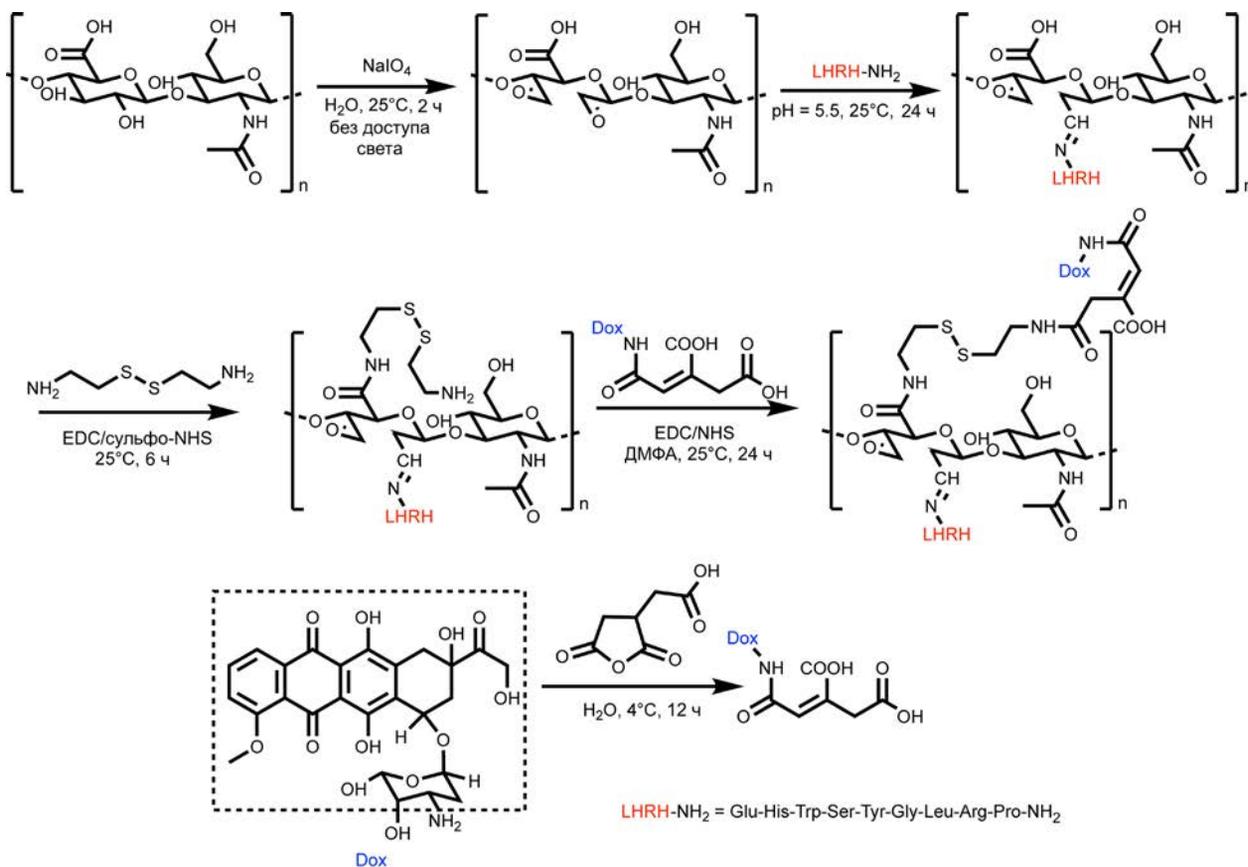


Рис. 16. Схема синтеза наночастиц ГК с пептидом и доксорубицином.

инкапсулировали в наночастицы с помощью гидрофобных взаимодействий.

В исследовании 2021 г., проведенном Quagliarello V. с соавт., было показано, что борсодержащие производные ГК, – малотоксичная платформа, способная к двойному pH- и “редокс”-чувствительному высвобождению лекарств с преимущественным накоплением в солидных опухолях, при этом печень – единственный значительный вторичный орган накопления [79]. Борированное производное ГК получали посредством активации карбоксильной группы ГК (200 кДа) 4-(4,6-диметокси-1,3,5-триазин-2-ил)-4-метилморфолина хлоридом (DMTMM) и последующим взаимодействием с 3-аминофенилбороновой кислотой, при этом модификации подвергали каждую четвертую дисахаридную единицу (24% карбоксильных групп). Для получения флуоресцентно меченой полимерной матрицы борированное производное ГК конъюгировали с флуоресцеинамином с помощью многокомпонентной реакции Пассерини-Уги. В качестве терапевтического агента

авторы использовали кверцетин, аддукт которого с полимерной матрицей получали в PBS при pH = 8 (рис. 17).

Исследованное сложноэфирное производное борированной ГК с кверцетином стабильно при нейтральном или слабоосновном pH, но может расщепляться даже при умеренном подкислении (pH 5–6) или воздействии стехиометрических количеств перекиси водорода. В опытах *in vivo* на мышах линии BALB/c Nude было показано, что данное пролекарство значительно накапливается только в опухолях (до 40% от введенной дозы через 24 ч) и в печени. Кроме того, введение конъюгата кверцетин-борированной ГК значительно замедляло рост опухоли дозозависимым образом с гораздо более высокой эффективностью (до 4 раз), чем эквивалентные дозы свободного кверцетина.

В исследовании 2022 г, проведенном Yan K. с соавт. были получены чувствительные к глутатиону и способные к флуоресценции за счет эффекта агрегационно-индуцированной эмиссии (АИЭ) мицеллярные препараты на основе ГК

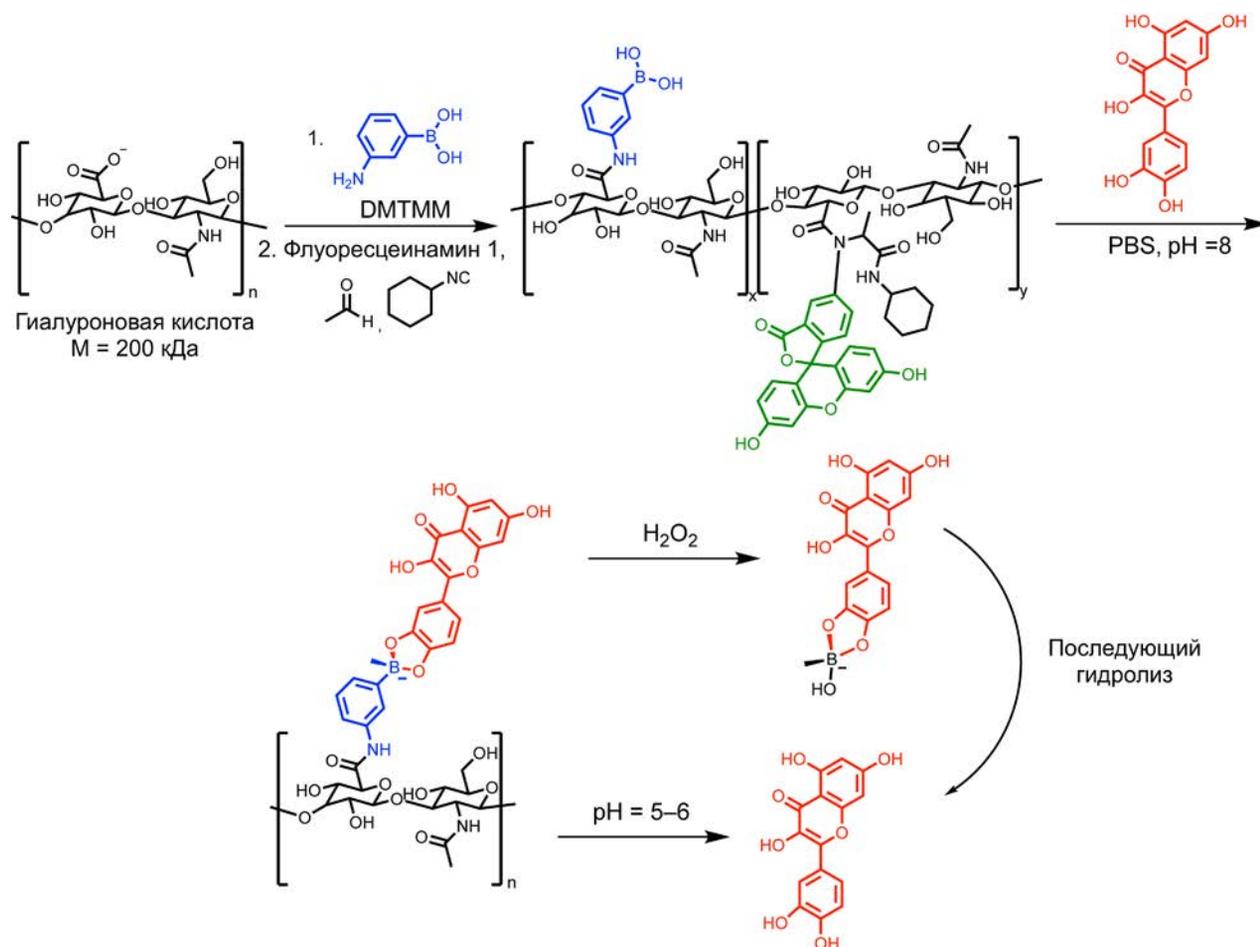


Рис. 17. Получение борированного флуоресцентно меченного производного ГК для контролируемой доставки кверцетина.

для доставки доксорубина [80]. В качестве структурного фрагмента, чувствительного к глутатиону, в целевых производных ГК выступала дисульфидная связь цистаминового спейсера между полисахаридной цепью и тетрафенилэтиленом (ТФЭ) (рис. 18). ТФЭ, выступая типичной молекулой, обладающей АИЭ эффектом, обеспечивал визуализацию полученных наночастиц и, кроме того, за счет достаточно высокой липофильности способствовал гидрофобизации полимерной матрицы ГК, необходимой для загрузки доксорубина при формировании полимерных мицелл. Синтез целевого производного ГК осуществляли последовательным введением фрагмента цистамина и карбоксил-функционализированного тетрафенилэтилена.

Диссоциация исследованных полимерных мицелл, нагруженных доксорубином, инициируется в ответ на высокий уровень глутатиона в клетках опухоли, при этом происходит восста-

новление дисульфидных связей в полимерной матрице, потеря гидрофобного фрагмента и утрата способности к агрегации и удерживанию лекарственного препарата, что приводит к его быстрому высвобождению преимущественно во внутриклеточной среде опухоли. В исследованиях *in vitro* представленные выше полимерные мицеллы, нагруженные доксорубином, демонстрировали значительно более высокий коэффициент внутриклеточного высвобождения в CD44 позитивных клетках, по сравнению CD44 негативными. В опытах *in vivo* на моделях мышей линии NOD-SCID с опухолью яичника ES2 было продемонстрировано, что лечение мицеллярным препаратом доксорубина на основе ГК-ТФЭ в течение 21 дня способствует замедлению роста опухоли в среднем в 3.5 раза. Системное высвобождение доксорубина из полимерных мицелл во время циркуляции в кровотоке имеет незначительный уровень, при котором весь препарат

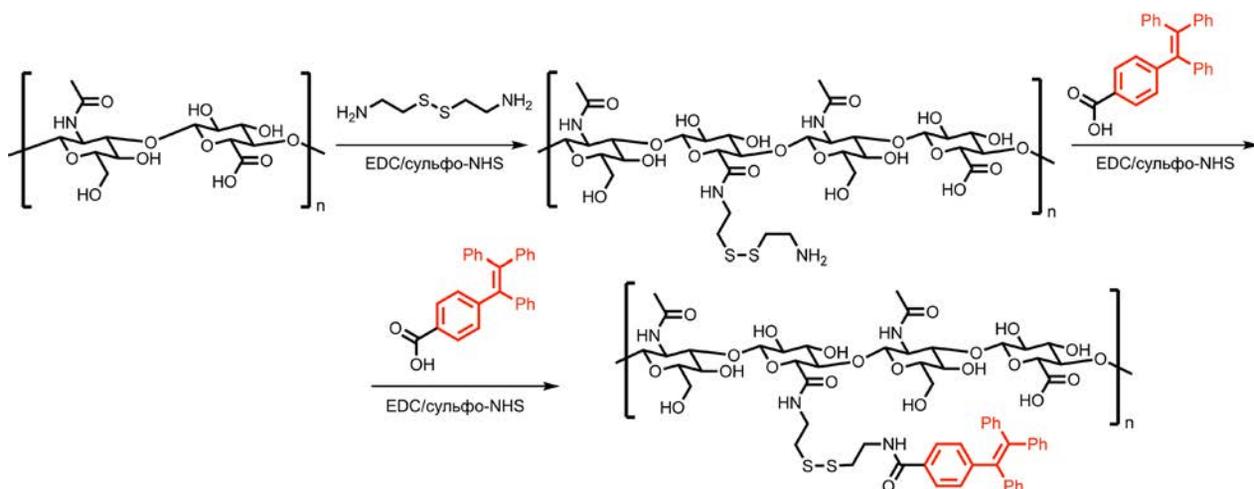


Рис. 18. Получение глутатион-чувствительного флуоресцентно меченного производного ГК.

преимущественно метаболизирует в печени и не оказывает токсического влияния на жизненно важные органы. Кроме того, авторами было установлено, что полимерные мицеллы на основе ГК ТФЭ, не загруженные доксорубицином, не обладают выраженной токсичностью и достаточно безопасны для применения.

В другом исследовании 2022 года, Zheng J. с соавторами продемонстрировали возможность использования флуоресцентно меченных красителем Cy5.5 производных гиалуроновой кислоты в составе тераностических композиций, чувствительных к глутатиону, для ранней диагностики и лечения туберкулеза. Целевые наночастицы были получены на основе двух типов производных

гиалуроновой кислоты: HA-Cys-MA, включающего фрагмент цистеина и метакриловой кислоты, и HA-Lys-Tet, содержащего фенолитетразольный фрагмент, конъюгированный с карбоксильной группой гиалуроновой кислоты через лизинового линкер. Формирование композитных наночастиц на основе этих производных осуществляли посредством УФ-индуцированной клик-реакции, после чего их физически нагружали рифампицином (RIF) в качестве терапевтического агента и ковалентно сшивали по карбоксильной группе ГК с красителем Cy5.5 путем амидирования в присутствии карбодиимида (EDC) и N-гидроксисукцинимид (NHS). Полученный нанокомпозитный препарат (RIF@Cy5.5-HA-NG) (рис. 19) продемонстрировал

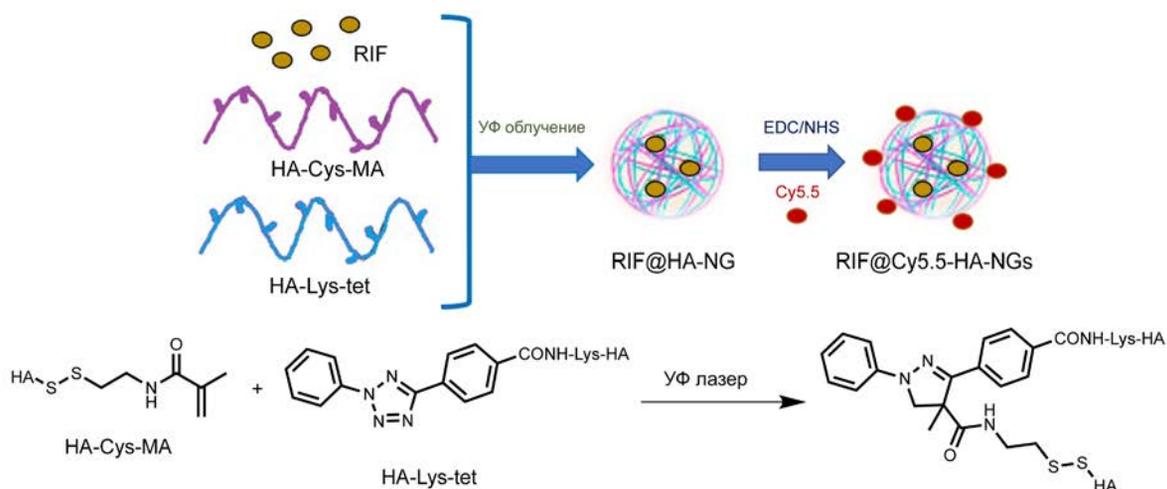


Рис. 19. (а) – Общая схема получения глутатион-чувствительных флуоресцентных наночастиц на основе производных гиалуроновой кислоты, красителя Cy5.5 и рифампицина для диагностики и лечения туберкулеза. (б) – УФ-индуцированная клик-реакция между производными гиалуроновой кислоты в ходе формирования композитных наночастиц.

in vivo (на модели мышей) способность к селективной визуализации *M. tuberculosis* в составе гранулём и эффективное подавление их жизнедеятельности за счет пролонгированного высвобождения рифампицина.

Представленные результаты демонстрируют, что наряду с векторными свойствами, ГК служит эффективной платформой для конструирования разнообразных систем доставки лекарственных препаратов и флуорофоров для диагностики и терапии заболеваний.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доставка молекул лекарственных препаратов с помощью наносомальных форм позволяет добиться не только их минимальной токсичности для организма, но и максимальной эффективности воздействия на мишень, а также позволяет доставлять малорастворимые соединения. Однако для изучения их распределения в организме пациента, для точной оценки высвобождения в клетках или активации загруженного в них лекарства, для предсказания терапевтического ответа или для получения информации для дальнейшей оптимизации терапевтических режимов с целью совершенствования терапии необходимо использование современных методов анализа, в том числе и флуоресцентной микроскопии. В представленном обзоре рассмотрены примеры систем доставки с возможностью флуоресцентной биовизуализации на основе двух видов полимеров – PLGA и гиалуроновой кислоты.

В отличие от свободных красителей, полимерные наночастицы с флуоресцентной меткой могут содержать несколько флуорофоров, что приводит к более яркому излучению, инкапсуляция маркера в макромолекулярную структуру способна улучшить стабильность красителя, уменьшить его фотообесцвечивание, придать биосовместимость и увеличить время нахождения флуоресцентно меченного агента в организме. Синтетические красители можно интегрировать в полимерную матрицу нековалентно, например, лиофилизацией мономера с флуоресцентной меткой, без образования химических связей между флуорофором и наночастицей. Однако отслеживание таких систем часто оказывается менее эффективным из-за достаточно ощутимой диффузии компонентов в биологической среде. Введение

флуоресцентных маркеров с помощью химического взаимодействия с функциональными группами полимеров представляется более перспективной альтернативой, так как позволяет получать более прочные и стабильные конъюгаты.

Получение новых модифицированных форм PLGA и гиалуроновой кислоты, имеющих дополнительную функционализацию, – актуальная задача современной органической химии, нанотехнологии и широкого ряда медико-биологических исследований. Благодаря созданию новых наносистем на их основе появляется возможность эффективного применения флуоресцентной микроскопии и адресной доставки лекарственных препаратов для лечения социально значимых заболеваний.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания (FSSM-2025-0002).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований, выполненных кем-либо из авторов данной работы, с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Все авторы внесли равноценный вклад в написание статьи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhou J., Ren T.-B., Yuan L. // *Chin. Chem. Lett.* 2024. V. 123. P. 110644–110655. <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2024.110644>
2. Zhang M., Jin L., Zhu Y., Kou J., Liu B., Chen J., Zhong X., Wu X., Zhang J., Ren W. // *Chin. Chem. Lett.* 2024. V. 34. P. 110772–110780. <https://doi.org/10.1016/j.cclet.2024.110772>

3. Wu P., Zuo J., Han Z., Peng X., He Z., Yin W., Feng H., Zhu E., Rao Y., Qian Z. // *Biosens. Bioelectron.* 2025. V. 271. P. 117039–117050.
<https://doi.org/10.1016/j.bios.2024.117039>
4. Mei Y., Pan X., Pan J., Zhang M., Shen H. // *J. Mol. Struct.* 2022. V. 1248. P. 131358–131370.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2021.131358>
5. Oshchepkov M., Tkachenko S., Popov K., Semyonkin A., Yuriev D., Solovieva I., Melnikov P., Malinovskaya J.A., Oshchepkov A., 2024. V. 231. P. 112386–112397.
<https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2024.112386>
6. Li X. // *ACS Nano.* 2022. V. 16. P. 5778–5794.
<https://doi.org/10.1021/acsnano.1c10892>
7. Xie Q. // *ACS Appl. Bio Mater.* 2022. V. 5. P. 711–722.
<https://doi.org/10.1021/acsabm.1c01139>
8. Yue Y., Zhao T., Wang Y., Ma. K. // *Chemical Science.* 2022. V. 1. P. 218–224.
<https://doi.org/10.1039/D1SC05484H>
9. Patterson K.N., Romero-Reyes M.A., Heemstra J.M. // *ACS Omega.* 2022. V. 7. P. 33046–33053.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.2c03085>
10. Sharick J.T., Atieh A.J., Gooch K.J., Leigh J.K. // *J. Biomed. Material.* 2023. V. 111. P. 389–403.
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.37460>
11. Khan M.I. // *ACS Appl. Bio Mater.* 2022. V. 5. P. 971–1012.
<https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00002>
12. Liu R. // *Chin. Chem. Lett.* 2023. V. 34. P. 107518–107530.
<https://doi.org/10.1016/j.ccllet.2022.05.032>
13. Liu P., Chen G., Zhang J. // *Molecules.* 2022. V. 27. P. 1372–1385.
<https://doi.org/10.3390/molecules27041372>
14. Pardeshi S.R., Nikam A., Chandak P., Mandale V., Naik J.B. // *Int. J. Polymer. Mat. Polymer. Biomat.* 2023. V. 72. P. 49–78.
<https://doi.org/10.1080/00914037.2021.1985495>
15. Makalew B.A., Abrori S.A. // *OpenNano.* 2025. V. 21. P. 100225–100241.
<https://doi.org/10.1016/j.onano.2024.100225>
16. Hou R., Zeng J., Sun H. // *Allergy Med.* 2025. V. 3. P. 100028–100050.
<https://doi.org/10.1016/j.allmed.2024.100028>
17. Sun B., Li R., Ji N., Liu H., Wang H., Chen C., Bai L., Su J., Chen J. // *Mater. Today Bio.* 2025. V. 30. P. 101443–101457.
<https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2025.101443>
18. Malinovskaya J. // *Int. J. Mol. Sci.* 2023. V. 24. P. 627–651.
<https://doi.org/10.3390/ijms24010627>
19. El-Hammadi M.M., Arias J.L. // *Nanomaterials.* 2022. V. 12. P. 354–370.
<https://doi.org/10.3390/nano12030354>
20. Zashikhina N. // *Polymers.* 2022. V. 14. P. 1677–1690.
<https://doi.org/10.3390/polym14091677>
21. Zielińska A. // *Molecules.* 2020. V. 25. P. 3731–3746.
<https://doi.org/10.3390/molecules25163731>
22. Kaffashi B., Davoodi S., Ollaei E. // *Int. J. Pharm.* 2016. V. 508. P. 10–21.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.05.009>
23. J. Bujdák. // *Springer.* 2017. P. 419–465
24. Oshchepkov A. // *Adv. Opt. Mater.* 2021. V. 9. P. 2001913.
<https://doi.org/10.1002/adom.202001913>
25. Oshchepkov M. // *Mendeleev Commun.* 2020. V. 30. P. 747–749.
<https://doi.org/10.1016/j.mencom.2020.11.019>
26. Teska P.J., Qutaishat S. // *Am. J. Infect. Control.* 2014. V. 42. S46.
<https://doi.org/10.1016/j.ajic.2014.03.120>
27. Wang C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. V. 116. P. 15817–15822.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1905924116>
28. Lakowicz J.R. // Boston, MA: Springer US. 2006. P. 27–61.
29. Robin M., O'Reilly R. // *Polym. Int.* 2014. V. 64. P. 174–182.
<https://doi.org/10.1002/pi.4842>
30. Mchedlov-Petrosyan N., Cheipesh T., Roshal A. // *J. Physical Chem.* 2019. V. 123. P. 88860–8870.
<https://doi.org/10.1021/acs.jpca.9b05812>
31. Russin T., Altinoglu E., Adair J. // *J. Phys. Condens. Matter.* 2010. V. 22. P. 334217–33429.
<https://doi.org/10.1088/0953-8984/22/33/334217>
32. Klehs K., Spahn C., Endesfelder U. // *Chemphyschem.* 2014. V. 15. P. 637–741.
<https://doi.org/10.1002/cphc.201300874>
33. Ulrich G., Ziessel R. // *Angewandte Chem. Internat. Ed.* 2008. V. 47. P. 1184–1201.
<https://doi.org/10.1002/anie.200702070>
34. Zhou Q., Zhou M., Wei Y. // *Physical Chem. Chem. Physics.* 2017. V. 2. P. 1516–1525.
<https://doi.org/10.1039/C6CP06897A>
35. Geng J. // *Small Weinh. Bergstr. Ger.* 2013. V. 9. P. 2012–2019.
<https://doi.org/10.1002/smll.201202505>
36. Li K., Qin W., Ding D. // *Sci. Rep.* 2013. V. 3. P. 115001164.
<https://doi.org/10.1038/srep01150>

37. Zheng Q., Lavis L.D. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2017. V. 39. P. 32–38.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.04.017>
38. Berlier J. E., Rothe A., Buller G. // *J. Histochem. Cytochem.* 2003. V. 51. P. 1699–1712.
<https://doi.org/10.1177/002215540305101214>
39. Surya N., Bhattacharyya S. // *Pharmacy & Pharmacol.* 2021. V. 9. P. 334–345.
<https://doi.org/10.19163/2307-9266-2021-9-5-334-345>
40. Zambaux M.F. // *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* 1998. V. 50. P. 31–40.
[https://doi.org/10.1016/s0168-3659\(97\)00106-5](https://doi.org/10.1016/s0168-3659(97)00106-5)
41. Gentile P., Chiono V., Carmagnola I., Hatton P.V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2014. V. 15. P. 3640–3659.
<https://doi.org/10.3390/ijms15033640>
42. Lü J.-M. // *Exp. Rev. Mol. Diagn.* 2009. V. 9. P. 325–341.
<https://doi.org/10.1586/erm.09.15>
43. Li S., Johnson J., Peck A., Xie Q. // *J. Transl. Med.* 2017. V. 15. P. 561–673.
<https://doi.org/10.1186/s12967-016-1115-2>
44. Palao-Suay R. // *Acta Biomater.* 2017. V. 57. P. 70–84.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.05.028>
45. Yuan A. // *Biomaterials.* 2015. V. 51. P. 184–193.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.01.069>
46. Xu P. // *Mol. Pharm.* 2009. V. 6. P. 190–201.
<https://doi.org/10.1021/mp800137z>
47. Freichels H., Danhier F., Pr eat V., Lecomte P., J er ome C. // *Int. J. Artif. Organs.* 2011. V. 34. P. 152–160.
<https://doi.org/10.5301/ijao.2011.6420>
48. Bou S., Klymchenko A.S., Collot M. // *Mater. Adv.* 2021. V. 2. P. 3213–3233.
<https://doi.org/10.1039/D1MA00110H>
49. Mendoza G. // *Nanoscale.* 2018. V. 10. P. 2970–2982.
<https://doi.org/10.1039/C7NR07345C>
50. Reul R. // *Polym. Chem.* 2012. V. 3. P. 694–702.
<https://doi.org/10.1039/C2PY00520D>
51. Lin, W. // *Int. J. Nanomedicine.* 2021. V. 16. P. 2775–2787.
<https://doi.org/10.2147/IJN.S301552>
52. Zhu W., Li H., Wan A., Liu L. // *J. Fluoresc.* 2017. V. 27. P. 287–292.
<https://doi.org/10.1007/s10895-016-1956-3>
53. Alwattar A. // *Polym. Int.* 2019. V. 68. P. 360–368.
<https://doi.org/10.1002/pi.5712>
54. Hohrenk L.L. // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. P. 1898–1907.
<https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b04095>
55. Thomsen T., Ayoub A.B., Psaltis D., Klok H.-A. // *Biomacromolecules.* 2021. V. 22. P. 190–200.
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00969>
56. Choi K.Y., Saravanakumar G., Park J.H., Park K. // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2012. V. 99. P. 82–94.
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.10.029>
57. Ossipov D.A. // *Exp. Opin. Drug Deliv.* 2010. V. 7. P. 681–703.
<https://doi.org/10.1517/17425241003730399>
58. Saravanakumar G. // *J. Control. Release.* 2009. V. 140. P. 210–217.
<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.06.015>
59. Sun P., Zhang Y., Shi L., Gan Z. // *Macromol. Biosci.* 2010. V. 10. P. 621–631.
<https://doi.org/10.1002/mabi.200900434>
60. Toole B.P. // *Clin. Cancer Res.* 2009. V. 15. P. 7462–7468.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0479>
61. Misra S. // *FEBS J.* 2011. V. 278. P. 1429–1443.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08071.x>
62. McBride W.H., Bard J.B. // *J. Exp. Med.* 1979. V. 149. P. 507–515.
<https://doi.org/10.1084/jem.149.2.507>
63. Cerroni B., Chiessi E., Margheritelli S., Oddo L., Paradossi G. // *Biomacromolecules.* 2011. V. 12. P. 593–601.
<https://doi.org/10.1084/jem.149.2.507>
64. Qhattal H.S.S., Liu X. // *Mol. Pharm.* 2011. V. 8. P. 1233–1246.
<https://doi.org/10.1021/mp2000428>
65. Achbergerov a E. // *Carbohydr. Polym.* 2018. V. 198. P. 339–347.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.082>
66. Choi K.Y. // *Biomaterials.* 2010. V. 31. P. 106–114.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.030>
67. Kelkar S.S., Hill T.K., Marini F.C., Mohs A.M. // *Acta Biomater.* 2016. V. 36. P. 112–121.
<https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.03.024>
68. Cho H.-J. // *Biomaterials.* 2011. V. 32. P. 7181–7190.
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.06.028>
69. Zhao L. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2009. V. 49. P. 989–996.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2009.01.016>
70. Huang Y. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2015. V. 7. P. 21529–21537.
<https://doi.org/10.1021/acsami.5b06799>
71. Zhao X., Jia X., Liu L. // *Biomacromolecules.* 2016. V. 17. P. 1496–1505.
<https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b00102>

72. Li S., Zhang J., Deng C. // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2016. V. 8. P. 21155–21162. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b05775>
73. Shi H. // J. Mater. Chem B. 2015. V. 4. P. 113–120. <https://doi.org/10.1039/C5TB02041G>
74. Beldman T.J. // ACS Nano. 2017. V. 11. P. 5785–5799. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b01385>
75. Wang H. // Talanta. 2017. V. 171. P. 8–15. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.04.046>
76. Qi B. // Theranostics. 2020. V. 10. P. 3413–3429. <https://doi.org/10.7150/thno.40688>
77. Lin C.-J. // Biomaterials. 2016. V. 90. P. 12–26. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.03.005>
78. Li K. // Biomaterials. 2015. V. 39. P. 131–144. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2014.10.073>
79. Quagliariello V. // Mater. Sci. Eng. C. 2021. V. 131. P. 112475. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112475>
80. Yan K., Feng Y., Gao K., Shi X. // J. Colloid Interface Sci. Academic Press. 2022. V. 606. P. 1586–1596. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.08.129>
81. Zheng Z., Long X., Chen H. // Sec. Nanobiotechnology. 2022. V. 9. P. 151–160. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.845179>

Application of Organic Fluorophores in the Development of Drug Delivery Systems Based on Synthetic and Natural Polymers

D. Y. Yuriev^{*,#}, S. V. Tkachenko^{*}, A. G. Polivanova^{*},
Y. K. Kryshchenko^{*}, and M. S. Oshchepkov^{*}

[#] E-mail: iurev.d.i@muctr.ru

^{*} Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Miusskaya pl., 9, Moscow, 125047 Russia

The application of fluorescent markers in the study of nanoparticle interaction with living matter cells has proven to be a highly effective method. Numerous studies have demonstrated the rapid and efficient uptake of nanoparticles by cells, with the use of fluorescent markers in microscopic observations playing a pivotal role. These methods facilitate not only the observation of qualitative changes in fluorescence intensity but also the quantitative assessment of changes occurring during the introduction of delivery systems into the body. Synthetic dyes can be integrated into the structure of a polymer (polylactide or modified hyaluronic acid) during the production of nanoparticles with a fluorescent marker, without the formation of new chemical bonds between the fluorophore and the nanoparticle. However, the tracking of such systems is often inefficient due to poor solubility and diffusion of the components in the biological environment. Conversely, the incorporation of fluorescent tags via chemical modification of the functional groups of polymers with dyes appears to be a far more promising alternative, as it allows the production of strong conjugates that serve as markers of the system itself. Furthermore, the covalent binding of fluorophores to the polymer addresses problems such as the inaccuracy of localization associated with the release of the tag from the nanoparticle and its further penetration into non-target cells and organelles.

This review presents a detailed critical evaluation of the methods of introduction and the classes of fluorescent markers used to modify polymers, based on lactic, glycolic and hyaluronic acids, for the purpose of drug delivery.

Keywords: PLGA, hyaluronic acid, fluorescence, biocompatible polymers