

Оценка концентрации внедренных носителей для адресной доставки лекарств с помощью фотоакустической томографии

© Д.Н. Браташов^{1,2}, П.А. Демина¹, Н.А. Шушунова¹, О.А. Майорова¹, Ю.И. Свенская¹, Е.С. Прихожденко², И.О. Кожевников¹, С.А. Шевцова¹,

¹ Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Научный медицинский центр, Саратов, Россия

² Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Московская область, Россия

e-mail: bratashov.dn@phystech.edu

Поступила в редакцию 26.11.2025 г.

В окончательной редакции 16.02.2025 г.

Принята к публикации 27.03.2026 г.

Исследованы возможности фотоакустической томографии по наблюдению за трансдермальным внедрением полиэлектролитных микрокапсул на модели мышей линии BALB/c и возможности по оценке распределения действующего вещества, в качестве которого выступал белок, меченый красителем Cy7.

Ключевые слова: фотоакустика, фотоакустическая томография, адресная доставка лекарств, полиэлектролитные микрокапсулы, анализ сигналов.

DOI: 10.61011/OS.2026.06.63419.65-25

Введение

Методы фотоакустической визуализации RSOM (Raster-Scan Optoacoustic Mesoscopy) и MSOT (Multispectral Optoacoustic Tomography) обеспечивают визуализацию анатомии лабораторных животных на достаточно большую глубину для оптических методов биомедицинской визуализации. С их помощью можно проводить ангиографические исследования, в том числе с анализом оксигенации крови, изучать развитие и метастазирование опухолей, а также отслеживать распределение контрастных агентов и биоактивных веществ, поглощающих свет в пределах доступного спектрального диапазона прибора [1–6].

Применение фотоакустической визуализации для наблюдения за поведением носителей для адресной доставки лекарств в естественной среде *in vivo* является перспективной альтернативой прижизненной визуализации на биоломинографах, *ex vivo* оценке концентрации действующего вещества в органах и тканях или забору образцов на подобные исследования с помощью локальной биопсии [7–10]. Важным преимуществом систем фотоакустической визуализации является неинвазивность, большая глубина визуализации, особенно при использовании длин волн, соответствующих окнам прозрачности биоткани, и возможность полноценной 3D-визуализации и количественной оценки концентрации при построении достаточно детальных моделей. Немаловажным преимуществом фотоакустических систем также является возможность разделять сигнал от различных хромофоров при съемке объекта на достаточном количестве длин волн [11–15].

В настоящей работе получены данные фотоакустической томографии для одних и тех же животных до и после трансдермального внедрения носителей для адресной доставки лекарств с использованием красителей группы Cy как контрастных агентов. Также мы оценивали возможность разделения сигналов от внедряемого вещества и фоновых сигналов, формируемых натуральными хромофорами в лабораторном животном, без использования спектрального разделения на одной длине волны. Данная задача является важной для разработки компактных приборов фотоакустической визуализации, использующих твердотельные лазеры с одной длиной волны для формирования сигналов.

Методы

Материалы и методы

В ходе экспериментов использовались следующие вещества: хлорид кальция (CaCl_2), карбонат натрия (Na_2CO_3), этанол, этиленгликоль, гидрохлорид поли-L-аргинина (pArg, Mw 15–17 kDa), натриевая соль сульфата декстрана (DsS, Mw 70 kDa), хлорид натрия, бычий сывороточный альбумин (BSA), диметилсульфоксид (DMSO) и фосфатно-солевой буфер (PBS). Все эти материалы были получены от Sigma-Aldrich (США). Cyanine7 NHS ester (Cy7) был приобретен у Lumiprobe (Россия). Во всех экспериментах использовалась деионизованная вода. Эксперименты с животными проводили с линией мышей Balb/c в соответствии с протоколом, одобренным комитетом по этике ФГБОУ ВО Саратовский государственный медицинский университет

им. В.И. Разумовского Минздрава России (протокол № 3 от 07.10.2025 года).

Синтез BSA, меченного Cyanine 7 NHS-ester (BSA-Cy7)

Конъюгацию белка с красителем проводили по ранее разработанной методике [16]. Краситель Cy7 (5 mg) растворяли в безводном растворе DMSO (1.7 mL). После этого к раствору BSA добавляли раствор Cy7 (15 mL, 4 mg/mL, PBS-буфер, pH 8.3). Смесь перемешивали в течение ночи при температуре +4 °C. Избыток Cy7 убирали путем интенсивного диализа в воде.

Синтез частиц карбоната кальция (CaCO₃)

Частицы карбоната кальция (CaCO₃) были получены по ранее описанной методике [17]. Для этого смешивали 2 mL 0.33 M-раствора CaCl₂ с 2 mL 0.33 M-раствора Na₂CO₃ и 20 mL этиленгликоля. Реакционную смесь инкубировали в течение 3 h при комнатной температуре при перемешивании (700 rpm). Полученные частицы осаждали центрифугированием при 3800 rpm в течение 10 min. Затем их промывали трижды деионизированной водой и этанолом. Завершающим этапом была лиофильная сушка в течение 12 h.

Иммобилизация флуоресцентно-меченого BSA в частицы CaCO₃

Для добавления флуоресцентно-меченого BSA (BSA-Cy7) в частицы CaCO₃ использовали метод адсорбции. К 40 mg сухих частиц CaCO₃ добавляли 1 mL раствора BSA-Cy7 (концентрация 40 mg/mL в PBS, pH 7.4). Смесь инкубировали 15 min при встряхивании (600 rpm). Покрытые флуоресцентно-меченым белком частицы осаждали центрифугированием (3800 g, 1 min), а затем дважды промывали деионизированной водой для удаления несвязанного белка.

Для последующего нанесения полимерных слоев использовали метод послойной адсорбции. Были приготовлены растворы pArg и DsS с концентрацией 1 mg/mL в растворе 0.9 %-NaCl. Цикл адсорбции одного слоя включал поочередное нанесение pArg и DsS. CaCO₃ инкубировали в растворе полимера (1 mg/mL) в течение 10 min при перемешивании со скоростью 600 rpm. Затем частицы центрифугировали при 3800 g в течение 1 min и дважды промывали деионизированной водой. Этот процесс повторялся до формирования трех полимерных бислоев (pArg/DsS)₃. Полученные частицы, покрытые полимерной оболочкой, были высушены на лиофильной сушке в течение 12 h. В результате были получены микрочастицы с оболочками структуры CaCO₃/BSA-Cy7/(pArg/DsS)₃.

Трансдермальное внедрение полиэлектролитных микрокапсул

Водную суспензию сформированных частиц ядро-оболочка внедряли в кожу под действием ультразвука (0.5 W/cm², 1 MHz, 10 min) с помощью прибора УЗТ-1.01Ф (МедТеКо, Россия), как описано ранее [18]. В экспериментах использовалась концентрация 10 mg частиц в 0.2 mL воды.

Измерения фотоакустической томографии и обработка данных

Измерения фотоакустической томографии проводились на установке PhotoSound TriTom (PhotoSound, США) с использованием перестраиваемого лазера EKSPLA PhotoSonus M (EKSPLA, Литва). В экспериментах с носителями для адресной доставки лекарств использовалась длина волны 750 nm, близкая к максимуму поглощения красителя. Полученные изображения восстанавливались ПО TriTom Reconstruction software из сырых фотоакустических данных в трехмерные данные. Скорость звука подбиралась по максимуму контраста базовых двумерных проекций и толщине тонких линий на них для одного из животных и использовалась для восстановления всего набора данных, снятых в течение одной серии измерений, в данной серии экспериментов использовалась скорость 1520 m/s. Дальнейшая обработка данных (восстановление Maximum Intensity Projections и построение изображений) проводилась в пакете Jupyter Notebook из дистрибутива Anaconda Python с использованием библиотек h5py и pandas для импорта данных, parapi для визуализации трехмерных данных, numpy, scipy, matplotlib.pyplot для основной обработки данных и построения двумерных сечений.

Результаты и обсуждение

В ходе проведенных экспериментов изучена возможность визуализации распределения носителей для адресной доставки лекарств при трансдермальной доставке при помощи фотоакустической томографии на разных длинах волн. Использование красителя Cy7 с поглощением в окне прозрачности биоткани позволяет визуализировать трехмерное распределение внедренных носителей. Используемые носители для адресной доставки лекарств стабилизированы бислоями (pArg/DsS)₃ и будут медленно деградировать в организме до разрушения этого биоразлагаемого покрытия. Фотоакустическая томография снималась практически сразу после внедрения микрокапсул, промежутки между окончанием процесса внедрения и съемкой данных для томографии составлял несколько минут. Согласно данным предыдущих исследований биodeградация данного типа носителей для адресной доставки лекарств занимает существенно более продолжительное время, в данный короткий промежуток времени возможна только некоторая десорбция самих

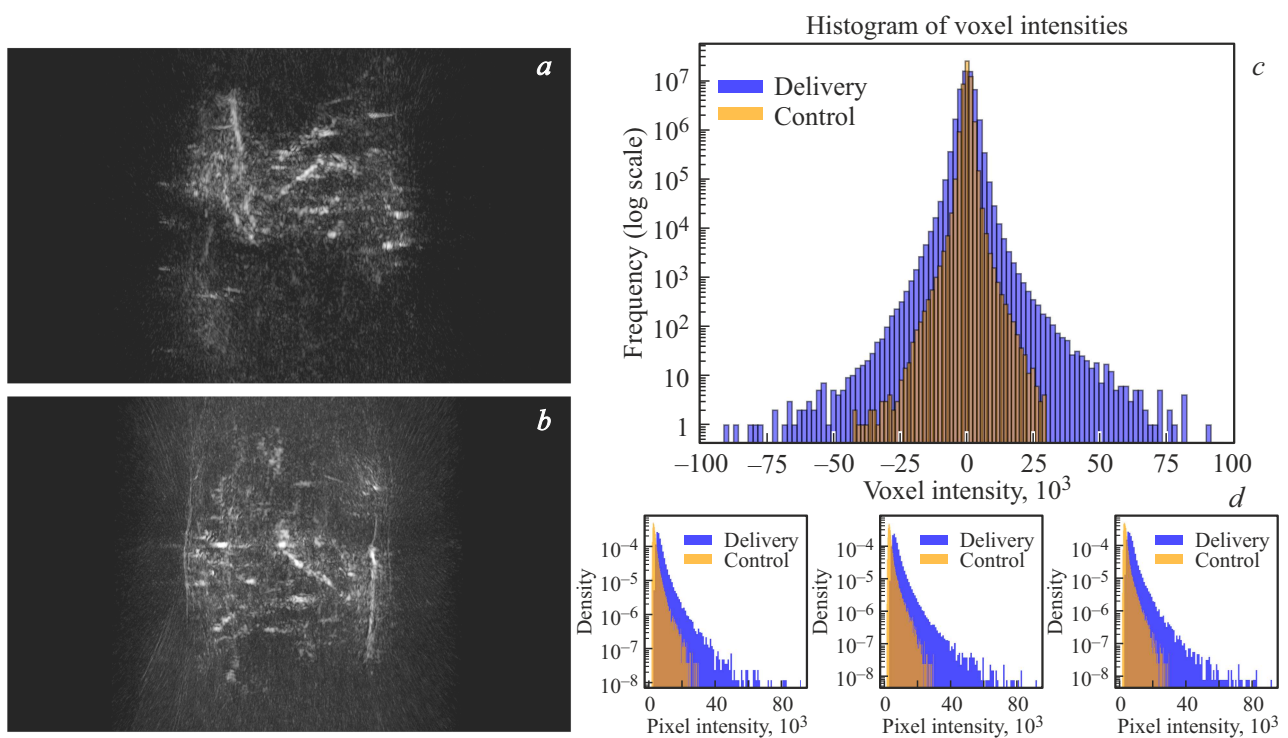


Рис. 1. Трехмерные изображения животного до внедрения полиэлектролитных микрокапсул (*a*) и изображение животного сразу после внедрения (*b*). Гистограммы интенсивностей трехмерных данных (*c*) для животного с внедренными носителями (Delivery) и контрольного животного (Control), и такие же гистограммы для трех проекций максимальной интенсивности в плоскости xy , xz , yz (*d*).

носителей (плохо внедренной части) в иммерсионную среду томографа.

Поскольку разрешения прибора $\sim 100 \mu\text{m}$ не хватает для того, чтобы видеть отдельные носители, мы видим интегральное распределение красителя (и самих носителей) по объему животного. Четко видна локализация объектов в области вблизи кожи животного на спине, где проводилось внедрение носителей. В качестве контроля мы использовали тех же животных до внедрения и более крупную группу животных, на которых исследовалось распределение фоновых фотоакустических сигналов. Явным отличием внутри контрольной группы была только хорошая видимость селезенки у одного из животных, не участвовавших в эксперименте с Су7. Контрольные животные демонстрируют низкий уровень фотоакустического сигнала (рис. 1, *a*, 2, *a*). В основном на данных фотоакустической томографии видны крупные сосуды в основании лапы и хвоста животного и содержимое пищеварительного тракта. После внедрения интенсивность сигналов существенно увеличивается, появляется ряд ярких объектов, которые соответствуют областям внедрения большого количества микрокапсул (рис. 1, *b*). В то же время гистограмма изображения, и для полного набора вокселей (рис. 1, *c*) и для восстанавливаемых на рис. 2 проекций (рис. 1, *d*), не демонстрирует бимодального разделяемого распределения. Основным отличием в гистограмме являются более выраженные хвосты рас-

пределения интенсивностей и увеличение асимметричности (что проявляется в увеличении статистических параметров кривизны распределения и эксцесса). Для разделения сигналов от капсул и фоновых сигналов от собственных люминофоров животного мы в итоге использовали пороговый метод с порогом интенсивности 27000 а.е. Данный порог лежит выше максимальной интенсивности сигналов контрольного измерения животного до внедрения (фонового распределения интенсивности фотоакустического сигнала), но часть распределения ниже порога теряется. Данный недостаток можно исправить с помощью морфологической операции расширения, прикрепляя менее яркие пиксели к выделенной по высокому порогу области, пока все внедренные объекты не будут выделены. В целом предложенный метод позволяет в значительной мере подсветить на изображениях внедряемые объекты (рис. 2, *b*) и оценивать количество внедренного вещества, появление новых ярких объектов, соответствующих внедренному веществу на приборах, для которых недоступно спектральное разделение сигналов в силу использования простых лазеров, работающих на одной частоте. Следует учитывать, что предложенный метод дает для количества и объемов внедренного вещества скорее оценку снизу, в силу того что теряется часть распределения, перекрывающаяся по интенсивности с фоновыми присутствовавшими изначально хромофорами.

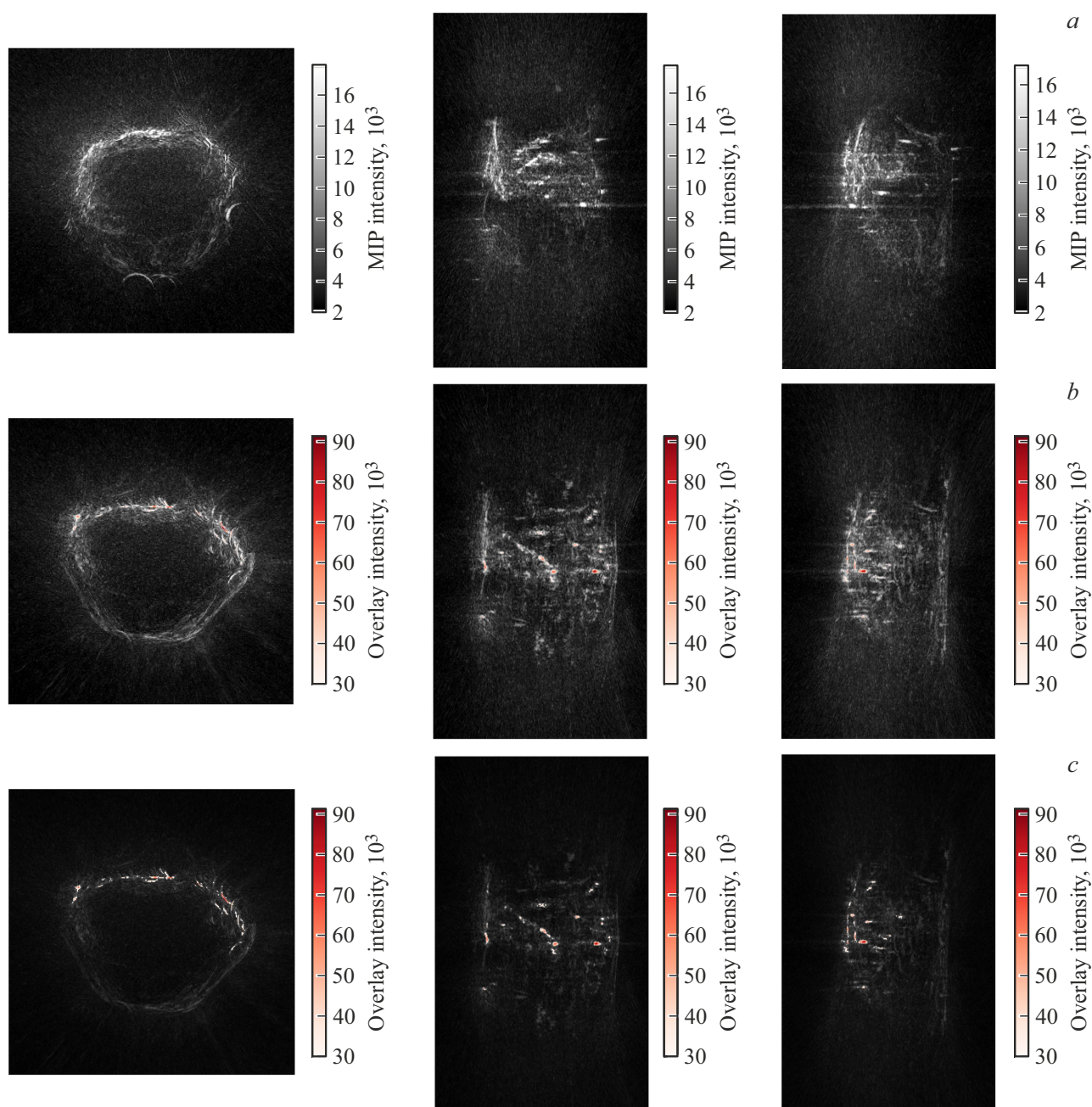


Рис. 2. Проекция изображения контрольного животного (*a*) и животного с внедренными носителями для адресной доставки с использованием одинаковых с (*a*) значений псевдоцвета для одинаковых интенсивностей (*b*) и с притушенными для наглядности изображениями фотоакустических сигналов, формируемых животным. На изображениях (*b*) и (*c*) в формате оверлея показан сигнал, формируемый носителями для адресной доставки.

Выводы

Трансдермальное внедрение носителей для адресной доставки лекарств приводит к заметному повышению уровня фотоакустического сигнала за счет красителя, внедренного в состав носителей. Разрешение прибора не позволяет выделить сигнал от отдельных носителей, в то же время в области внедрения носителей наблюдается практически в два раза более высокий уровень

фотоакустических сигналов по сравнению с контрольными животными и сигналом в том же животном до внедрения. Это свидетельствует о том, что фотоакустическая томография позволяет наблюдать внедрение носителей и распределение действующего вещества при его стандартных концентрациях для внедрения даже при отсутствии спектрального разделения сигналов от естественных хромофоров и действующего вещества, а при достаточных концентрациях действующего вещества

оценивать снизу количество внедренного хромофора даже при отсутствии явного бимодального распределения интенсивностей.

Финансирование работы

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 25-19-00828, <https://rscf.ru/project/25-19-00828/>.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] L. Li, L.V. Wang. *BME Front.*, **2021**, 9823268 (2021). DOI: 10.34133/2021/9823268
- [2] X. Zhang, Y. Wu, L. Chen, J. Song, H. Yang. *Chem. Biomed. Imaging.*, **1**, 99–109 (2023). DOI: 10.1021/cbmi.3c00009
- [3] Q. Fu, R. Zhu, J. Song, H. Yang, X. Chen. *Adv. Mater.*, **31**, 1805875 (2019). DOI: 10.1002/adma.201805875
- [4] P.K. Upputuri, M. Pramanik. *J. Biomed. Opt.*, **22** (4), 041006 (2016). DOI: 10.1117/1.JBO.22.4.041006
- [5] Y. Gu, Y. Sun, X. Wang, H. Li, J. Qiu, W. Lu. *Bioeng. Transl. Med.*, **8** (2), e104198 (2023). DOI: 10.1002/btm2.10419
- [6] H. Kye, Y. Song, T. Ninjbadgar, C. Kim, J. Kim. *Sensors*, **22** (14), 5130 (2022). DOI: 10.3390/s22145130
- [7] C. Moore, F. Chen, J. Wang, J.V. Jokerst. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **144**, 78–89 (2019). DOI: 10.1016/j.addr.2019.07.003
- [8] J. Xia, C. Kim, J. Lovell. *Curr. Drug Targets*, **16** (6), 571–581 (2015). DOI: 10.2174/1389450116666150707100328
- [9] J. Kim, S. Choi, C. Kim, J. Kim, B. Park. *Pharmaceutics*, **16** (10), 1240 (2024). DOI: 10.3390/pharmaceutics16101240
- [10] C. Moore, J.V. Jokerst. *Theranostics*, **9** (6), 1550–1571 (2019). DOI: 10.7150/thno.32362
- [11] V. Grasso, H.W. Hassan, P. Mirtaheri, R. Willumeit-Römer, J. Jose. *Front. Signal Process.*, **2**, 984901 (2022). DOI: 10.3389/frsip.2022.984901
- [12] Y. Wu, F. Zeng, Y. Zhao, S. Wu. *Chem. Soc. Rev.*, **50** (14), 7924–7940 (2021). DOI: 10.1039/D1CS00358E
- [13] W.M. MacCuaig, M.A. Jones, O. Abeyakoon, L.R. McNally. *Radiol. Imaging Cancer*, **2** (6), e200066 (2020). DOI: 10.1148/rycan.2020200066
- [14] T.D. Le, S.-Y. Kwon, C. Lee. *Photonics*, **9** (3), 176 (2022). DOI: 10.3390/photonics9030176
- [15] S. Tzoumas, V. Ntziachristos. *Philos. Trans. R. Soc. A*, **375** (2107), 20170262 (2017). DOI: 10.1098/rsta.2017.0262
- [16] O.A. Mayorova, O.A. Sindeeva, M.V. Lomova, O.I. Gusliakova, Y.V. Tarakanchikova, E.V. Tyutyayev, S.I. Pinyaev, O.A. Kulikov, S.V. German, N.A. Pyataev, D.A. Gorin, G.B. Sukhorukov. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine.*, **28**, 102184 (2020). DOI: 10.1016/j.nano.2020.102184
- [17] B.V. Parakhonskiy, A. Haase, R. Antolini. *Angew. Chemie Int. Ed.*, **51**, 1195–1197 (2012). DOI: 10.1002/anie.201104316
- [18] Y.I. Svenskaya, E.A. Genina, B.V. Parakhonskiy, E.V. Lengert, E.E. Talnikova, G.S. Terentyuk, S.R. Utz, D.A. Gorin, V.V. Tuchin, G.B. Sukhorukov. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **11** (19), 17270–17282 (2019). DOI: 10.1021/acsami.9b04305