

# Цитотоксичность субмикронных ватеритных носителей, содержащих антимикотик, под воздействием терапевтического ультразвука.

Верховский Роман<sup>1</sup>, Ленгерт Екатерина<sup>1</sup>, Козлова Анастасия<sup>1</sup>, Свенская Юлия<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов, Россия

## Cytotoxicity of antimycotic-loaded submicron vaterite carriers under therapeutic ultrasound treatment

Roman Verkhovskii<sup>1</sup>, Ekaterina Lengert<sup>1</sup>, Anastasiia Kozlova<sup>1</sup>, Yulia Svenskaya<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Saratov State University, Saratov, Russia

### Введение

Системы доставки лекарственных средств (ЛС) на основе субмикронных частиц ватерита представляют большой интерес для современной фармакологии, благодаря сочетанию уникальных физико-химических свойств [1]. Эффективность их применения, как для доставки ЛС внутрь фолликула [2], так и для внутриклеточной доставки ЛС, неоднократно была продемонстрирована в ходе *in vitro* и *in vivo* исследований [3]. Высвобождение ЛС из носителя происходит под действием факторов окружающей среды в процессе растворения и перекристаллизации частицы ватерита в кальцит. Последние исследования показали возможность применения терапевтического ультразвука (УЗ) для ускорения процессов деградации носителей ЛС [4]. Однако, захваченные клеткой твердые частицы ватерита могут выступать в роли соносенсибилизатора [5], что приводит к увеличению их цитотоксичности под действием УЗ.

### Цель исследования

Оценить эффективность интернализации ватеритных носителей, содержащих антимикотик «Гризеофульвин» (Гф), клеточной линией фибробластов мыши (L929), и оценить их цитотоксичности при наличии/отсутствии УЗ воздействия в сравнении со свободной формой антимикотика.

### Материалы и методы

Оценка эффективности интернализации субмикронных частиц ватерита, содержащих Гф, а также их цитотоксичности при наличии/отсутствии УЗ воздействия осуществлялась методом визуализирующей проточной цитометрии (ВПЦ) с использованием флуоресцентных красителей Родамина Б (окраска частиц ватерита), акридинового оранжевого (АО - окраска ядер жизнеспособных клеток), йодид пропидия (PI - окраска ядер погибших клеток).

### Результаты

Эффективность интернализации субмикронных частиц ватерита, содержащих антимикотик Гф, клетками L929 оценивали спустя 8 часов совместной инкубации. Более 50% клеток, инкубированных с частицами, добавленными в количестве 5 частиц на клетку, захватили одну и более частиц (рис. 1). Увеличение числа частиц до 10 приводило к двукратному увеличению числа клеток, захватывающих три и более частиц (рис. 1). Полученные данные свидетельствуют о **высокой эффективности интернализации частиц ватерита и возможности их применения для внутриклеточной доставки ЛС.**

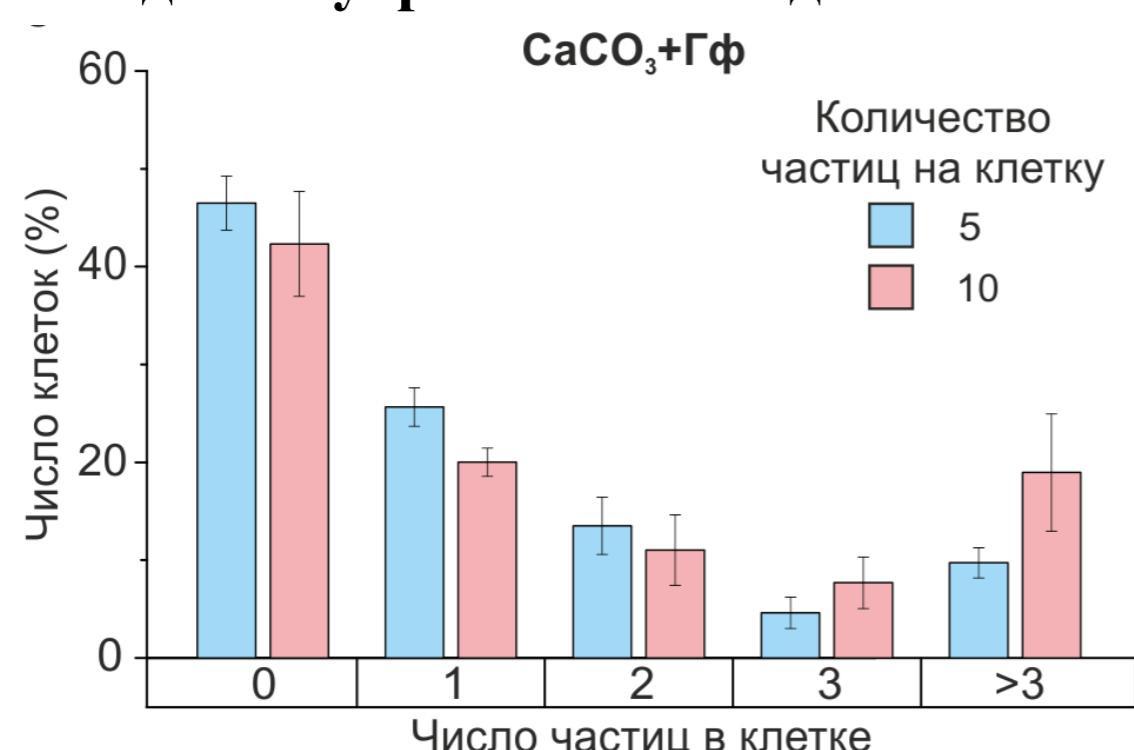


Рис. 1. Процент клеток, захвативших 0, 1, 2, 3 и более частиц ватерита, содержащих Гф, спустя 8 ч совместной инкубации.

Цитотоксичность субмикронных частиц ватерита, содержащих Гф, при наличии/отсутствии УЗ воздействия в сравнении со свободной формой антимикотика оценивали на культуре клеток L929 спустя 24 ч совместной инкубации. Для этого клетки ресуспензировали в фосфатно-солевом буфере, помещали в полиакриламидную лунку и подвергали воздействию терапевтического УЗ (частота 1 МГц, плотность мощности 0,5 Вт/см<sup>2</sup>) в течение 2 мин (рис 2). Затем суспензию клеток окрашивали комбинацией красителей АО/PI и исследовали методом ВПЦ.

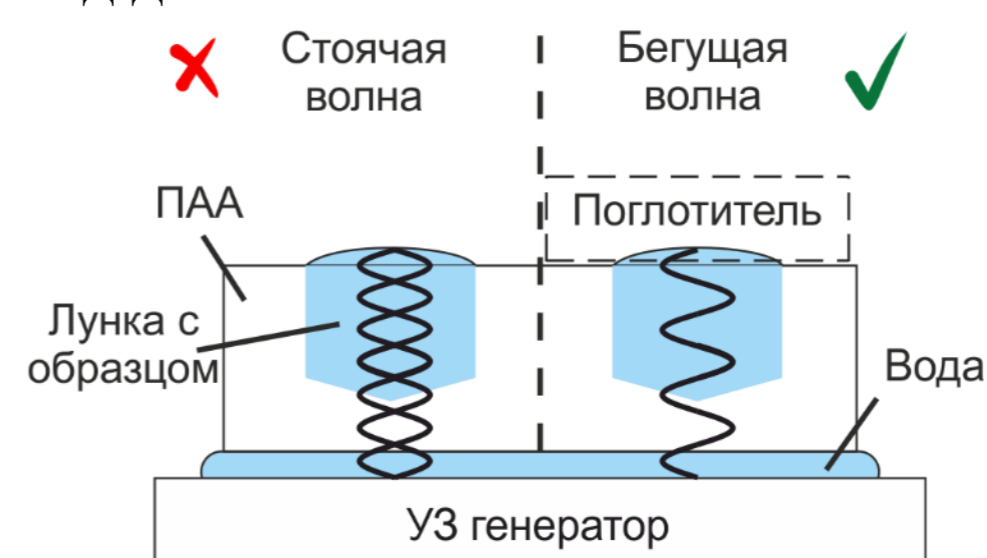


Рис. 2. Схема ультразвукового воздействия на суспензию клеток.

В результате установили, что капсулированная форма Гф, также, как и свободный антимикотик, во всех исследуемых концентрациях **не оказывают влияния на выживаемость клеточной линии L929 в отсутствие УЗ воздействия** (рис. 3). **Воздействие терапевтического УЗ на суспензию клеток привело к незначительному снижению выживаемости клеток L929, инкубированных с 10 частицами на клетку или эквивалентной концентрацией препарата** (рис. 3). Вероятно, это обусловлено увеличением числа клеток, захвативших частицы ватерита, выступающие в роли твердофазного соносенсибилизатора внутри клетки, либо присутствием внутри и на поверхности клетки кристаллов Гф, гидрофобная поверхность которых может служить центром нуклеации кавитационных пузырьков – главного фактора, вызывающего повреждение клеточной мембраны под воздействием УЗ.

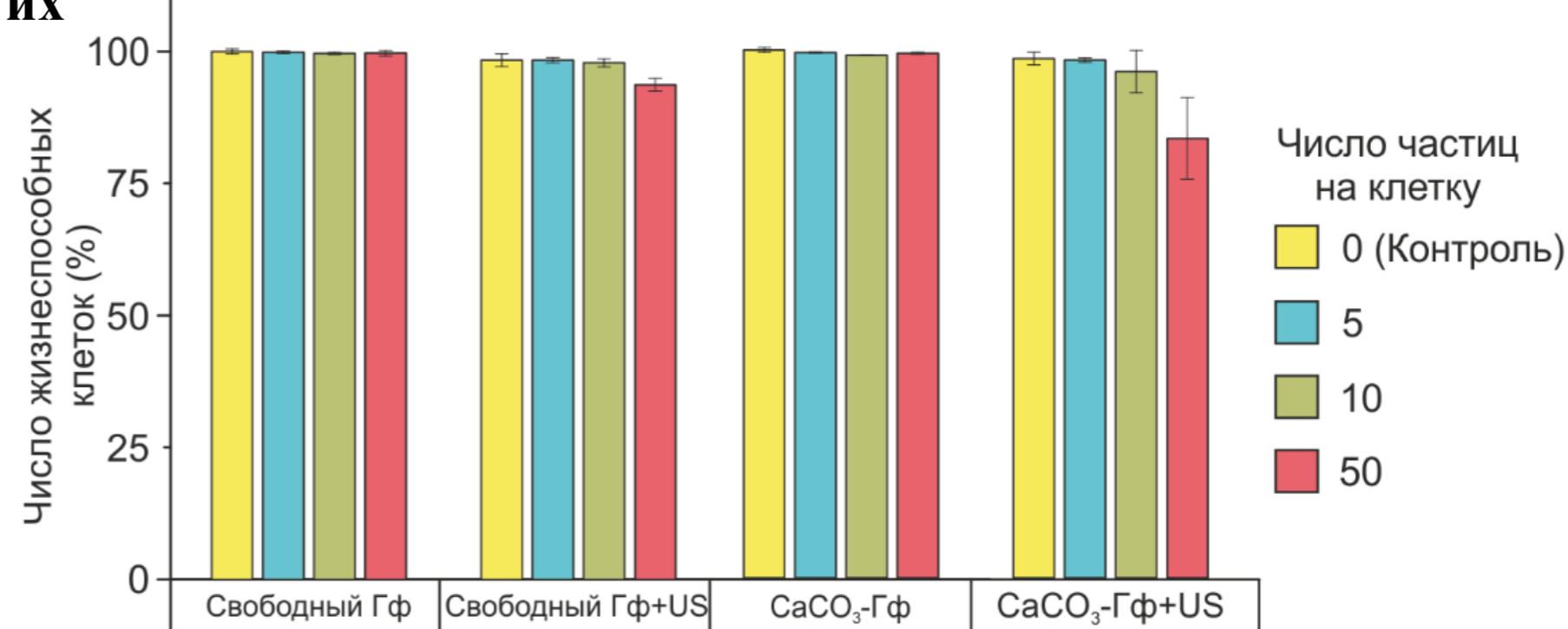


Рис. 3. Выживаемость культуры клеток L929 в зависимости от концентрации ватеритных носителей, содержащих Гф, или соответствующей концентрации свободного препарата при наличии/отсутствии УЗ воздействия.

### Библиография

- Svenskaya Y. I. et al. A simple non-invasive approach toward efficient transdermal drug delivery based on biodegradable particulate system //ACS applied materials & interfaces. – 2019. – Т. 11. – №. 19. – С. 17270-17282.
- Lengert E. et al. Mesoporous carriers for transdermal delivery of antifungal drug //Materials Letters. – 2019. – Т. 248. – С. 211-213.
- Verkhovskii R. A. et al. Cellular Uptake Study of Antimycotic-Loaded Carriers Using Imaging Flow Cytometry and Confocal Laser Scanning Microscopy //Optics and Spectroscopy. – 2020. – Т. 128. – №. 6. – С. 799-808.
- Y.I. Svenskaya, E.A. Genina, V. V. Tuchin. Sonophoretic acceleration of degradation process for vaterite particles delivered into the hair follicles // Izv. Saratov Univ. New Ser. Phys. – 2021. – V. 21. – № 1. – P. 80–85.
- X. Qian, Y. Zheng, Y. Chen. Micro/Nanoparticle-Augmented Sonodynamic Therapy (SDT): Breaking the Depth Shallow of Photoactivation // Advanced Materials. – 2016.