



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2025. Т. 25, вып. 1. С. 76–85

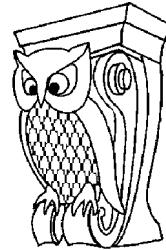
Izvestiya of Saratov University. Physics, 2025, vol. 25, iss. 1, pp. 76–85

<https://fizika.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1817-3020-2025-25-1-76-85>, EDN: MATQYP

Научная статья

УДК 57.089:66.017:665.939.17:577.359



Микрогели, содержащие сывороточный белок, как новый способ терапии заболеваний мочевого пузыря и почек

О. А. Майорова¹✉, О. И. Гуслякова¹, М. С. Савельева¹, О. А. Куликов², О. А. Иноземцева¹

¹Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского, Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

²Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н. П. Огарёва, Россия, 430005, Республика Мордовия, г. Саранск, ул. Большевистская, д. 68

Майорова Оксана Александровна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории «Дистанционно управляемые системы для терапии», oksanaamayorova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6440-3947>, AuthorID: 1001358

Гуслякова Ольга Игоревна, научный сотрудник лаборатории «Дистанционно управляемые системы для терапии», olga.gusliakova17@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8387-0711>, AuthorID: 1051902

Савельева Мария Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории «Дистанционно управляемые системы для терапии», mssaveleva@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2021-0462>, AuthorID: 938218

Куликов Олег Александрович, доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии с курсом фармацевтической технологии, oleg-kulikov-84@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0739-3981>, AuthorID: 757521

Иноземцева Ольга Александровна, кандидат химических наук, заместитель руководителя по инновациям Научного медицинского центра, inozemtseva@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8898-8169>, AuthorID: 15371

Аннотация. Исследование охватывает биофизические аспекты применения эмульсионных микрогелей, стабилизированных изолятом сывороточного белка, для адресной доставки лекарств в органы мочевыделительной системы. Изучение профиля высвобождения модельного вещества Цианина 7, иммобилизованного в эмульсионные микрогели, продемонстрировало пролонгированный характер высвобождения в течение 72 ч. Было изучено влияние эмульсионных микрогелей на выживаемость различных культур клеток (нормальных фибробластов (L929) и клеток почек (Hek239), почечной карциномы (Renca) и карциномы мочевого пузыря (T24)), которая показала зависимость уровня цитотоксичности от типа клеток. При этом особая повышенная чувствительность к микрогелям была выявлена у культуры Hek239. Был также исследован характер накопления и распределения эмульсионных микрогелей у лабораторных мышей в зависимости от пути их введения: внутрипузырном или внутривенном. Эффективность накопления микрогелей в органах мочевыделительной системы (почки или мочевой пузырь) оценивалась по *in vivo* биораспределению методом прижизненной флуоресцентной визуализации. При системном введении супензий микрогелей наблюдалось их селективное накопление не только в печени, но и в почках. Внутрипузырное введение позволяло поддерживать высокую локальную концентрацию меченых Цианином 7 микрогелей в мочевом пузыре не менее 2 ч. Гистологический анализ срезов мочевого пузыря подтвердил безопасность микрогелей на основе изолята сывороточного белка для доставки лекарств в мочевой пузырь и почки. Данная система доставки на основе разработанных эмульсионных микрогелей открывает новые перспективы лечения заболеваний мочевыделительной системы с использованием как системного введения, так и малоинвазивных внутрипузырных инстилляций.

Ключевые слова: внутрипузырная инстилляция; мочевыделительная система; изолят сывороточного белка; системы доставки лекарственных средств; эмульсионные микрогели

Благодарности: Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-75-10042).

Для цитирования: Майорова О. А., Гуслякова О. И., Савельева М. С., Куликов О. А., Иноземцева О. А. Микрогели, содержащие сывороточный белок, как новый способ терапии заболеваний мочевого пузыря и почек // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Физика. 2025. Т. 25, вып. 1. С. 76–85. <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2025-25-1-76-85>, EDN: MATQYP

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

Microgels containing whey protein as a new way of treating bladder and renal diseases

О. А. Майорова¹✉, О. И. Гуслякова¹, М. С. Савельева¹, О. А. Куликов², О. А. Иноземцева¹

¹Saratov State University, 83 Astrakhanskaya St., Saratov 410012, , Russia

²National Research Ogarev Mordovia State University, 68 Bolshevikskaia St., Saransk 430005, Republic of Mordovia, Russia

Oksana A. Mayorova, oksanaamayorova@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0002-6440-3947>, AuthorID: 1001358
Olga I. Gusliakova, olga.gusliakova17@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8387-0711>, AuthorID: 1051902
Mariia S. Saveleva, mssaveleva@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0003-2021-0462>, AuthorID: 938218
Oleg A. Kulikov, oleg-kulikov-84@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0739-3981>, AuthorID: 757521
Olga A. Inozemtseva, inozemtsevaoa@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-8898-8169>, AuthorID: 15371

Abstract. Background and Objectives: This study covers the biophysical aspects of the use of emulsion microgels stabilized with whey protein isolate (WPI) for targeted drug delivery to the urinary system. Emulsion microgels were prepared by the ultrasonic homogenization method which leads to denaturation of the WPI adsorbed on the water-oil interface and formation of WPI microgel layer at the oil droplet. **Materials and Methods:** The study of the release profile of the model substance Cyanine 7 immobilized in emulsion microgels has demonstrated a prolonged pattern over 72 hours. The effect of emulsion microgels on the viability of various cell cultures (normal fibroblasts (L929), kidney cells (Hek239), renal carcinoma (Renca) and bladder carcinoma (T24)) has been studied, which has shown a dependence of the cytotoxicity level on the cell type. The Hek239 cells have demonstrated particularly increased sensitivity to emulsion microgels. **Results:** The accumulation and distribution behaviour of emulsion microgels in laboratory mice have also been studied depending on the route of their administration: intravesical or intravenous. The efficiency of targeting the microgels for urinary system components of the urinary system (kidney or bladder) has been assessed by biodistribution using *in vivo* fluorescence imaging. Systemic administration has demonstrated selective accumulation not only in the liver but also in the kidneys. Intravesical administration has made it possible to maintain a high local concentration of Cyanine 7 in the bladder at least during 2 h. Histological analysis has validated the safety of WPI-based microgels for delivery into the bladder and kidney. **Conclusions:** The presented delivery system based on the developed emulsion microgels opens up new prospects for the treatment of diseases of the urinary system using both systemic administration and minimally invasive intravesical instillations.

Keywords: intravesical instillation; urinary system; whey protein isolate; drug delivery systems; emulsion microgels

Acknowledgments: The research was supported by the Russian Science Foundation (project No. 21-75-10042).

For citation: Mayorova O. A., Gusliakova O. I., Saveleva M. S., Kulikov O. A., Inozemtseva O. A. Microgels containing whey protein as a new way of treating bladder and renal diseases. *Izvestiya of Saratov University. Physics*, 2025, vol. 25, iss. 1, pp. 76–85 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1817-3020-2025-25-1-76-85>, EDN: MATQYP

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

Введение

Заболевания мочевыделительной системы, такие как инфекции мочевого пузыря и заболевания почек, тесно взаимосвязаны. Отсутствие должного лечения или прогрессирование в хроническую форму заболевания одного из органов может негативно сказаться на всей системе в целом. Инфекции часто проникают из нижних отделов мочевыделительной системы в мочеточники и почки. Например, прогрессирование цистита может привести к острому пиелонефриту [1, 2]. Кроме того, существует корреляция между дисфункцией мочевыводящих путей и воспалением, а также риском развития рака мочевого пузыря и почек [3–5]. Несвоевременное начало лечения снижает иммунный ответ, что может привести к опасным для жизни последствиям. Поэтому решающее значение имеет комплексное лечение мочевыделительной системы. Распространенные методы лечения часто включают пероральное или внутривенное введение антибактериальных препаратов в высоких дозах [6–9]. Однако эти подходы не всегда дают адекватные терапевтические результаты из-за естественных функций мочевого пузыря и наличия физиологического барьера [10–13]. Это требует применения больших доз препарата, что в конечном итоге, приводит к системной токсичности и многочисленным побочным реакциям [10, 14].

Для минимизации общей токсичности лекарств и сокращения требуемых доз разрабатываются альтернативные методы доставки. Например, для терапии заболеваний мочевого пузыря используется локальная доставка лекарств в орган – внутримочевыдильная инстилляция. Такой способ введения лекарственных препаратов позволяет повысить дозу активного вещества в области воспаления и в то же время уменьшить возможную системную токсичность и побочные эффекты на организм. Другим способом повышения эффективности лечения, которое в настоящее время широко развито, является создание микроразмерных систем для адресации препаратов. Такие системы способны эффективно влиять на распространение инкапсулированных лекарственных средств в органах. Эмульсионные микрогели сейчас активно изучаются в области терапии органов мочевыделительной системы [15, 16]. Эмульсионные системы типа «масло-воде», позволяющие инкапсулировать как гидрофобные, так и гидрофильные лекарственные препараты, обладают рядом преимуществ для адресной доставки. В зависимости от конкретной цели можно создавать микроэмulsionи с точными физическими и химическими свойствами, включая размер частиц, площадь поверхности, ζ -потенциал и эффективность доставки лекарственного средства в различные органы [15, 17–



19]. Кроме того, растворимость, проницаемость и всасывание инкапсулированных лекарственных средств напрямую зависят от химического состава внешнего слоя, который стабилизирует микроэмulsionи [20–22]. Стабилизация масляных капель с помощью биополимеров с сильными мукоадгезивными свойствами, таких как изолят сывороточного белка (ИСБ), позволяет микроконтейнерам адгезироваться на уротелии, тем самым продлевая удержание лекарственного средства в очаге воспаления [16, 23]. Это делает микрогели на основе ИСБ перспективной системой для воздействия на различные компоненты мочевыделительной системы и требует детального изучения.

В настоящей работе мы изучили скорость высвобождения модельного вещества Цианина 7 из эмульсионных микрогелей (ЭМ), стабилизированных изолятом сывороточного белка. Мы исследовали их токсичность на различных типах клеточных культур, а именно на нормальных фибробластах (L929) и клетках почек (Hek239), почечной карциноме (Renca) и карциноме мочевого пузыря (T24). Кроме того, мы оценили кинетику перераспределения разработанных микрогелей *in vivo* с применением флуоресцентной томографии при внутривенном и внутрипузырном методах введения. Также мы проанализировали их влияние на морфологическое состояние целевых органов (мочевого пузыря и почек) с помощью классического гистологического анализа.

1. Материалы и методы

1.1. Материалы

Льняное масло было предоставлено местным поставщиком OLEOS® (Россия), изолят сывороточного белка (ИСБ, WPI) был произведен компанией California Gold Nutrition® (США). NHS-эфир Цианина 7 (Су7) был приобретен в компании Lumiprobe (Россия). Диметилсульфоксид (ДМСО), этанол 96% и изопропиловый спирт (ИПС) были приобретены в компании ЭкоХимАналит (Россия), парафин-паралласт (Normal) был приобретен в компании МиниМед (Россия). NaCl был приобретен у компании Sigma-Aldrich (США). Гематоксилин и эозин были приобретены у компании Биовитрум (Россия).

Модифицированная среда Eagle (DMEM), среда Roswell Park Memorial Institute (RPMI-

1640), фетальная бычья сыворотка (FBS), пенициллин-стрептомицин (10 000 ед/мл), физиологический раствор с фосфатным буфером без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} и трипсин-ЭДТА (0.25%) с добавлением фенолового красного были приобретены у компании Gibco (Paisley, Великобритания). Для МТТ-анализа жизнеспособности клеток использовался тетразолийбромид тиазолилового синего производства ДиаЭМ (Россия).

Деионизованная вода Milli-Q (18.2 мкСм/см) была получена из системы фильтрации Millipore (Merck, Германия) и использовалась во всех экспериментах.

1.2. Получение эмульсионных микрогелей

Эмульсионные микрогели, стабилизированные ИСБ-Су7, были приготовлены в соотношении ИСБ:масло – 1 : 3 (по массе) в соответствии с протоколом, описанным [16]. Водную фазу готовили путем растворения ИСБ в 0.9% NaCl в концентрации 5% (по массе). ИСБ, конъюгированный с Су 7 (ИСБ-Су7), был приготовлен по протоколу, описанному нами ранее [16]. Смесь гидрофильной и гидрофобной фаз в соотношении 1 : 3 гомогенизировали с использованием ультразвукового гомогенизатора Bandelin Sonopuls HD 2070 (Германия) в течение 1 мин при частоте 20 кГц и высокой плотности 1 Вт/см². После завершения гомогенизации полученные эмульсионные микрогели центрифугировали при 12000 об/мин в течение 5 мин для отделения дисперсионной среды, при этом водную фазу отбирали и сохраняли для дальнейшего спектрофотометрического анализа. Оставшуюся масляную фазу заливали эквивалентным объемом свежего физиологического раствора 0.9% NaCl и повторно гомогенизировали. Полученные эмульсионные микрогели хранили в холодильнике при температуре +4°C.

Для определения количества ИСБ-Су7, содержащегося в полученных эмульсионных микрогелях, супернатанты после центрифугирования анализировали спектрофотометрически с помощью микропланшетного ридера CLARIO Star Plus (BMG Labtech, Германия). Для этого супернатанты разбавляли эквивалентным объемом этанола (70%) для растворения остаточного масла и осаждения остаточного белка. Смесь центрифугировали при 12000 об/мин, затем отделяли жидкую фазу. Затем измеряли оптическую плотность полученного раствора в 96-луночных микропланшетах Costar в диапазоне 200–1000 нм.



Максимум поглощения для ИСБ-Су7 был зарегистрирован при 680 нм. Количество ИСБ-Су7 в растворах рассчитывали с помощью соответствующего градуировочного графика. Эффективность загрузки (LC, %) ИСБ-Су7 в эмульсиях рассчитывали по формуле

$$LC(\%) = \frac{M_{\text{исход}} - M_{\text{раст}}}{M_{\text{раст}}} \cdot 100\%, \quad (1)$$

где $M_{\text{исход}}$ – количество Су7 в исходном растворе ИСБ-Су7; $M_{\text{раст}}$ – общее количество Су7 в растворах, полученных после фильтрации эмульсионных микрогелей.

1.3. Оптическая микроскопия

Расчет среднего размера капель эмульсии проводили методом оптической визуализации с использованием инвертированного микроскопа Olympus IX73 (Olympus, Япония) и объектива 40×. Для этого было проанализировано не менее 100 измерений и 5 изображений для каждого образца. Для обработки изображений и статистики использовалось программное обеспечение Image J [24]. Результаты были представлены в следующем виде: среднее значение ± стандартное отклонение.

1.4. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия

Флуоресцентные свойства подготовленных образцов эмульсии исследовали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа (КЛСМ) Leica TCS SP8 X (Leica Microsystems, Германия), оснащенного твердотельными лазерами с диодной накачкой. Образцы снимали через объектив 20×/0.70 NA. Флуоресценция Су7 возбуждалась лазером с длиной волны 671 нм, излучение регистрировалось при длине волны 730–795 нм (зеленый цвет на изображениях).

1.5. Исследование высвобождения Су7 в модельной среде *in vitro*

В исследованиях кинетики выделения *in vitro* использовался физиологический раствор 0.9% NaCl.

Модельную среду (1 мл) добавляли к 1 мл суспензии эмульсионных микрогелей, помещенной в пробирку типа Эппендорф объемом 2 мл. Образцы инкубировали в термощайкере (Thermo Scientific, США) при комнатной температуре (+22°C) и непрерывном встряхивании (600 об/мин). В определенные моменты времени

образцы вынимались из термощайкера и подвергались центрифугированию в течение 3 мин при 12000 об/мин. В результате происходило разделение раствора эмульсионных микрогелей на водную и масляную фазы. Из образцов отбирали 1 мл водной фазы с помощью шприцевой иглы. После этого в пробирку с образцом добавляли 1 мл свежей модельной среды, интенсивно перемешивали на вибрационном встряхивателе Vortex (Elmi, Латвия) до однородного состояния и возвращали в термощайкер.

Полученные пробы разбавляли 1 мл этанола (70%) для растворения остаточного масла и осаждения остаточного белка. Смесь центрифугировали при 12000 об/мин, затем отделяли жидкую фазу и анализировали спектрофотометрически с помощью микропланшетного ридера CLARIO Star Plus (BMG Labtech, Германия). Для каждой временной точки проводили 3 независимые измерения. Для определения концентраций высвобождаемого коньюгата ИСБ-Су7 измеряли оптическую плотность полученных растворов в 96-луночных микропланшетах Costar в диапазоне 200–1000 нм (максимум поглощения для ИСБ-Су7 – 680 нм).

1.6. Клеточные эксперименты

Для предварительной оценки безопасности эмульсионных микрогелей в живой системе в качестве модели *in vitro* были использованы следующие клеточные линии: нормальные фибробласти мыши (L929), первичные эмбриональные клетки почек человека (Hek 239), эпителиальные клетки карциномы почки мыши (RenCa) и эпителиальные клетки карциномы мочевого пузыря человека (T24). Для культивирования клеток RenCa и T24 использовали среду RPMI-1640 с 10% FBS и 1% пенициллин-стрептомицином. Среду DMEM (10% FBS, 1% пенициллин-стрептомицин) использовали для культивирования L929 и Hek 239. Среду заменяли каждые 3 дня, а клетки выдерживали в увлажненном инкубаторе при 5% CO₂ и 37°C. Культивирование проводилось в соответствии с протоколом ATCC [25].

1.7. Тесты на цитотоксичность

Клеточные линии L929, Hek 239, RenCa и T24 культивировали в 96-луночных планшетах (5 · 10³ клетки на лунку) и инкубировали 12 ч при 5% CO₂ и 37°C. Затем в лунки добавляли эмульсию микрогелей в концентрациях 10, 50, 100 и 200 частиц на клетку в 300 мкл питательной

среды. Через 72 ч после инкубации культуральную среду с микрогелями удаляли. В каждую лунку добавляли по 100 мкл свежей питательной среды с 10%-ным исходным раствором для МТТ (5 мг/мкл в буфере DPBS). Затем планшет инкубировали при 37°C в течение 3 ч. Далее из каждой лунки удаляли среду с МТТ и добавляли в каждую лунку по 100 мкл ДМСО (инкубация при 37°C в течение 15 мин). Оптическую плотность измеряли при длине волны 554 нм с помощью спектрометра ClarioSTAR Plus (BMG Labtech, Ортенберг, Германия).

1.8. Эксперименты с животными

Экспериментальные манипуляции с лабораторными животными проводились в соответствии с протоколом № 7, утвержденным комитетом по этике Саратовского государственного медицинского университета 7 февраля 2023 года, и Женевской конвенцией (Международное руководство по проведению биомедицинских исследований с участием животных, 1985). Эксперимент проводился на самках мышей линии Balb/c (возраст 6–8 недель, вес 20–25 г). Животные были разделены на 3 группы, по 3 мыши в каждой:

1-я экспериментальная группа – системное введение (внутривенная инъекция);

2-я экспериментальная группа – внутрипузырное введение;

3-я контрольная группа – интактные животные.

Перед всеми экспериментальными процедурами животных анестезировали внутрибрюшно путем инъекции смеси из 50 мкл Золетила (40 мг/кг, Virbac SA, Carros, Франция) и 10 мкл 2% раствора Рометара (10 мг/кг, Spofa, Чехия).

Исследование биораспределения эмульсионных микрогелей *in vivo*

Флуоресцентная визуализация *in vivo* была проведена с целью изучения распределения эмульсионных микрогелей у животных. 50 мкл эмульсионных микрогелей, суспендированных в 0.9% растворе NaCl с концентрацией $50 \cdot 10^6$ частиц, вводили животным через хвостовую вену и внутрипузырно. Флуоресцентную визуализацию биораспределения микрогелей *in vivo* проводили с использованием системы визуализации IVIS SpectrumCT *In Vivo* (PerkinElmer, Уолтем, Массачусетс, США), длина волны возбуждения/излучения 745/800 нм. За каждой мышью наблюдали до введения и в определенные временные

точки после введения суспензии микрогелей (30 мин и 2 ч). Результаты были проанализированы с использованием программного обеспечения Living Image 4.7.3.

Гистологические исследования

По завершению экспериментов, был проведен гистологический анализ для определения патологических изменений в мочевом пузыре и почках через 5 дней после введения эмульсии микрогелей через хвостовую вену и внутрипузырную инстилляцию. Животных подвергали эвтаназии в результате передозировки анестетика. Для гистологического исследования были извлечены необходимые образцы тканей, которые фиксировали в нейтральном формалине в течение 24 ч. Затем образцы высушивали дегидратированным изопропиловым спиртом, заливали в парафин и изготавливали микросрезы тканей толщиной 5 мкм. Микросрезы окрашивали гематоксилином и эозином (Биовитрум, Россия). Морфологическая оценка срезов проводилась с помощью световой микроскопии.

2. Результаты и их обсуждение

2.1. Характеризация эмульсионных микрогелей и скорости высвобождения из них Цианина 7

Микрогели по типу эмульсии «масло-в-воде», стабилизированные ИСБ, были приготовлены с использованием ранее разработанного протокола [16]. Стабилизирующие и эмульгирующие свойства ИСБ хорошо зарекомендовали себя для приготовления эмульсионных систем [26, 27].

Для возможности визуализации эмульсионных микрогелей методом КЛСМ, в состав оболочки микрогелей был включен ИСБ, конъгироанный с флуоресцентным красителем Су7. Су7 также был выбран из-за удобства его использования для прижизненной биовизуализации. Средний диаметр эмульсионных капель, стабилизированных ИСБ, по данным оптической микроскопии составил 3.7 ± 0.2 мкм. Эффективность инкапсуляции Су7 в эмульсионные микрогели составила $55.5 \pm 0.1\%$. Согласно данным КЛСМ (рис. 1, А), полученные эмульсионные микрогели обладают яркой флуоресценцией, четко визуализируется оболочка ИСБ, окрашенная Су7 (зеленый цвет). Отчетливо видна граница раздела фаз между масляной и водной фазами, на которой локализован амфи菲尔ный ИСБ-Су7 (рис. 1, А), что подтверждает образование эмульсионной системы «масло-в-воде».

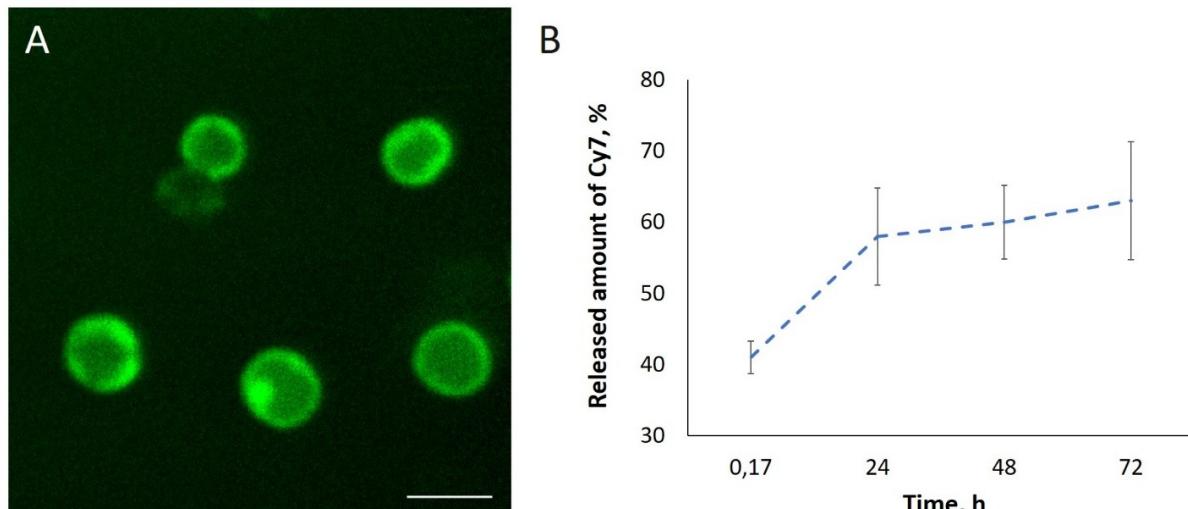


Рис. 1. КЛСМ изображение эмульсионных микрогелей, стабилизированных ИСБ-Су7. Масштабная линейка 3 мкм (А). Кинетика высвобождения Су7 из микрогелей в физиологическом растворе (0.9% NaCl). Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение, рассчитанного по трем измерениям для каждого образца (В) (цвет онлайн)
 Fig. 1. CLSM image of emulsion microgels stabilized with WPI-Cy7. The scale bar corresponds to 3 μ m (A). Kinetics of Cy7 release from microgels in physiological solution (0.9% NaCl). Data are presented as the mean \pm standard deviation calculated from three measurements for each sample (B) (color online)

Изучение поведения эмульсионных микрогелей в моделируемых средах, таких как физиологический раствор, имеет большое значение для понимания особенностей их применения для терапии мочевыделительной системы. Для оценки стабильности исследуемой системы был изучен процесс высвобождения коньюгата ИСБ-Су7 из оболочек эмульсионных микрогелей при их инкубации в физиологическом растворе 0.9% NaCl в течение 72 ч (+22°C, 600 об/мин). Высвобождение ИСБ-Су7, который входит в состав оболочек микрогелей, является индикатором процесса их деградации.

Зависимость массовой концентрации Су7, высвобожденного в процессе инкубирования в физиологическом растворе из эмульсионных микрогелей в физиологическом растворе 0.9% NaCl показана на рис. 1, В. Кинетика высвобождения красителя показывает стабильный и продолжительный процесс высвобождения Су7 и составляет ~60% через 72 часа после начала эксперимента.

Таким образом, можно сделать вывод, что эмульсионные микрогели, стабилизированные ИСБ, способны удерживать 40% модельного вещества в течение как минимум 72 ч. Поэтому во всех экспериментах *in vitro* и *in vivo* использовались только свежеприготовленные эмульсионные микрогели.

2.2. Исследование цитотоксичности микрогелей на основе ИСБ

Следующим этапом исследования была оценка цитотоксичности эмульсионных микрогелей ИСБ-Су7 (соотношение 0, 10, 50, 100 и 200 частиц на клетку) для различных типов клеток (рис. 2). В качестве модели были выбраны клеточные линии фибробластов мыши L929, первичная культура Hek239, а также опухолевые клеточные линии RenCa и T24.

Показано, что разработанные эмульсионные микрогели на основе ИСБ-Су7 обладают низкой цитотоксичностью для различных типов культур даже при высокой концентрации (рис. 2). Снижение метаболической активности менее 70%, говорящее о существенном токсическом действии [28], достоверно регистрировалось только для нормальных клеток почки при добавлении микрогелей во всех исследованных соотношениях микрогелей на клетку.

2.3. Динамика биораспределения и миграции флуоресцентного красителя Су7, инкапсулированного в микрогели, после их внутривенного введения и внутривыпирной инстилляции

На следующем этапе исследования была детально оценена эффективность накопления и миграция флуоресцентного сигнала в органах мочевыделительной системы с использованием

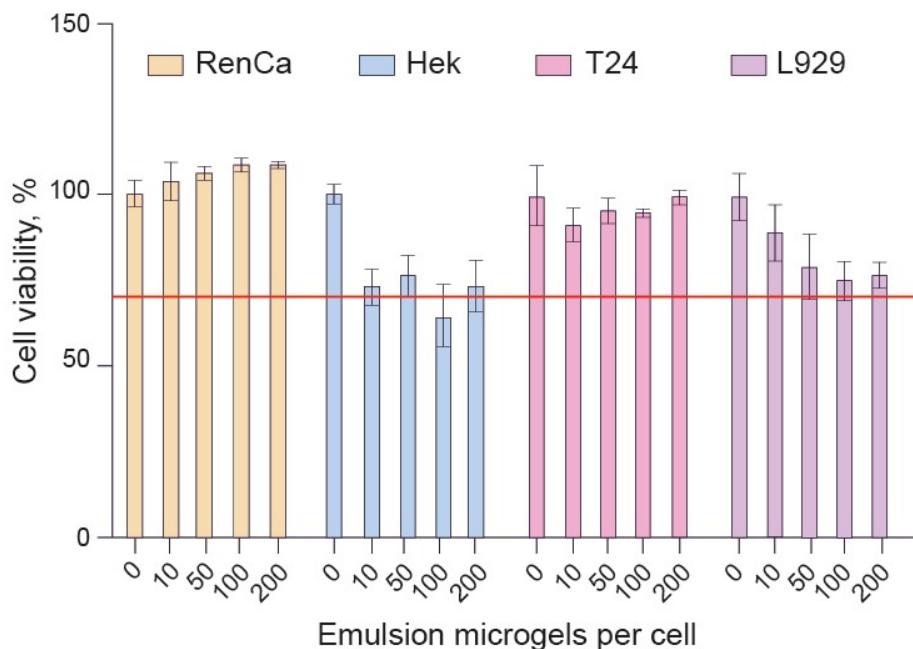


Рис. 2. Оценка цитотоксичности эмульсионных микрогелей ИСБ-Су7 для различных клеточных линий. Данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение, рассчитанного по шести независимым измерениям для каждого образца (цвет онлайн)

Fig. 2. Cell viability of different cell lines when incubated with emulsion microgels WPI-Cy7. Data are presented as the mean \pm standard deviation calculated from six measurements for each sample (color online)

различных методов введения микрогеля: системного (внутривенного) и целенаправленного (внутрипузырного) (рис. 3).

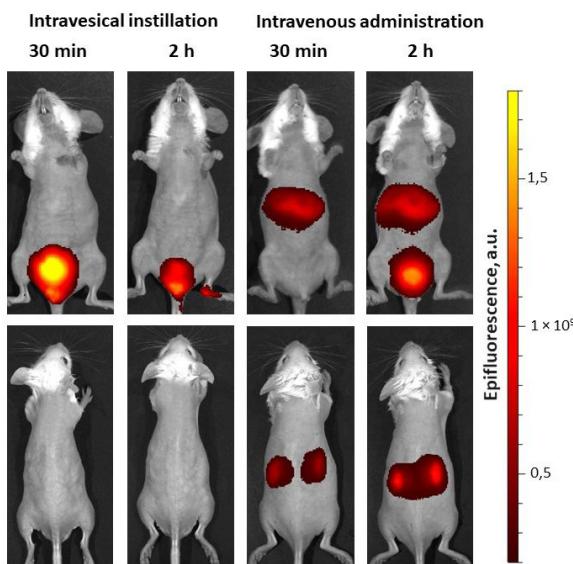


Рис. 3. Биораспределение суспензии эмульсионных микрогелей, стабилизированных ИСБ-Су7, после внутривенного и внутрипузырного введения *in vivo* (цвет онлайн)
Fig. 3 Biodistribution of microgel suspensions stabilized by WPI-Cy7 after intravenous and intravesical administration *in vivo* (color online)

У животных, получавших суспензию микрогелей внутрипузырно, яркий флуоресцентный сигнал был сосредоточен главным образом в области мочевого пузыря в течение как минимум 2 ч с тенденцией к снижению флуоресценции, связанной, главным образом, с мочеиспусканием.

В то же время при системном (внутривенном) введении микрогелей на основе ИСБ через хвостовую вену флуоресцентный сигнал накапливался в основном не только в печени, но и в почках. Ко второму часу исследования, наблюдалась тенденция к постепенному увеличению флуоресцентного сигнала в печени и почках, а также миграция сигнала в область мочевого пузыря. Такая тенденция, вероятно, связана с началом деградации и выведения компонентов микрогелей через мочевыделительную систему.

Обнаруженный феномен накопления микрогелей на основе ИСБ в почках после системного введения является нетипичным биораспределением для эмульсий типа «масло-в-воде» микронного размера [29–31]. В целом представленные результаты свидетельствуют о том, что ИСБ является хорошим кандидатом для адресной терапии заболеваний мочевыделительной системы



при различных способах введения их в организм [16, 32].

2.4. Морфологическое состояние мочевого пузыря и почек через 5 дней после введения микрогелей через хвостовую вену и внутрипузырную инстилляцию

Поскольку гелевые эмульсии представляют собой масляные частицы микронного размера, то их безопасность при внутривенном введении остается чрезвычайно важной из-за риска эмболизации кровеносных сосудов [33, 34]. В связи с этим на последнем этапе исследования была

проведена оценка морфологического состояния органов мочевыделительной системы – мочевого пузыря и почек.

Гистологический анализ был проведен на 5-й день после введения микрогелей в организм. Этого времени достаточно, чтобы оценить как острое, так и замедленное воздействие микрогелей на ткани. Результаты гистологического исследования представлены на рис. 4. В тканях исследуемых органов не наблюдалось деструктивных или ишемических изменений, связанных с эмболизацией. Также не было выявлено признаков развития воспалительного процесса или

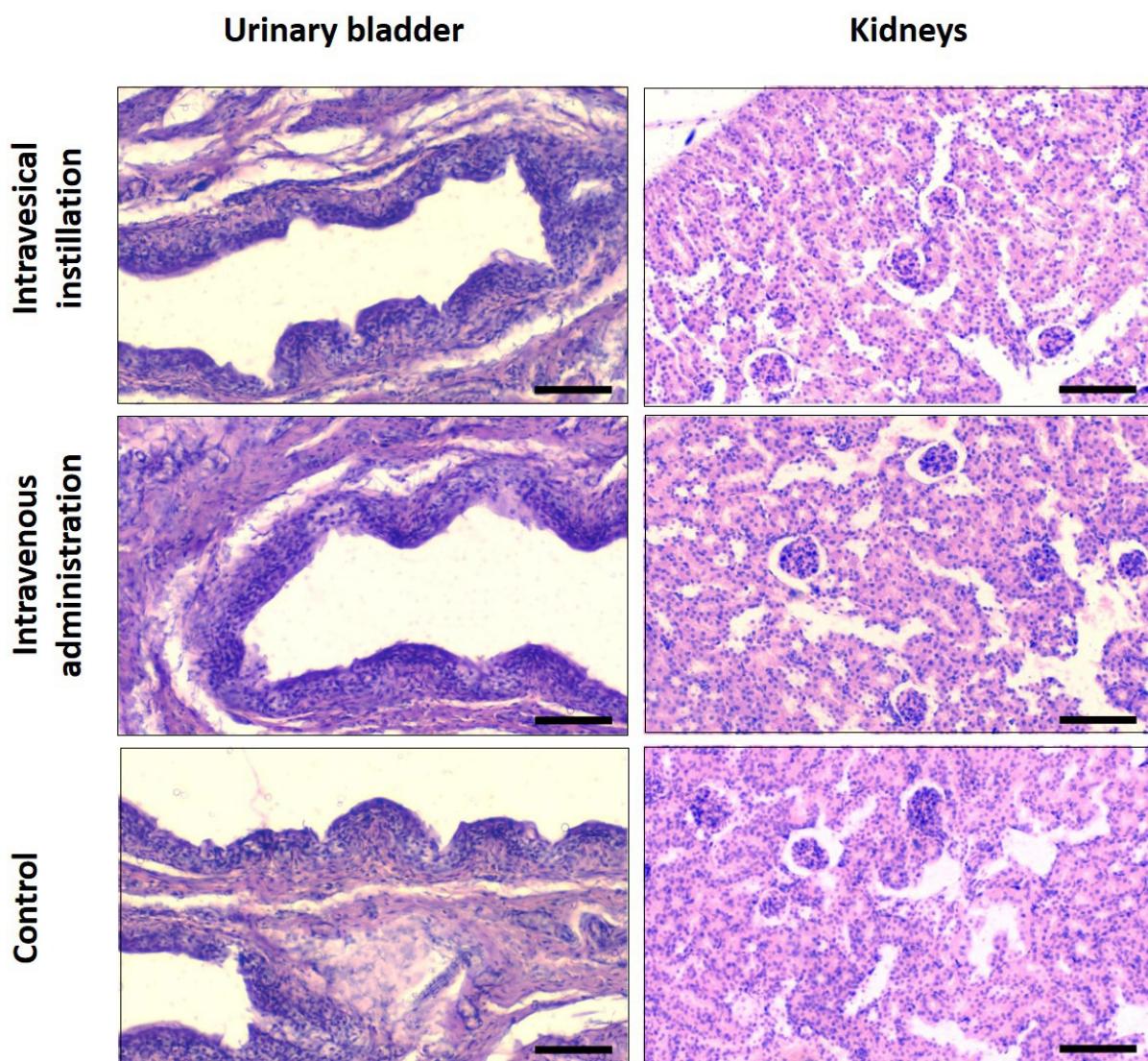


Рис. 4. Изображения гистологических срезов тканей мочевого пузыря и почек интактных мышей (контроль) и мышей через 5 дней после внутривенного и внутрипузырного введения эмульсионных микрогелей ИСБ-Су7. Толщина микрорезцов составляет 5 мкм; масштабная линейка 200 мкм (цвет онлайн)

Fig. 4. Histological images of bladder and kidney tissues of the intact mice (control) and mice 5 days after intravenous and intravesical injection of emulsion microgels WPI-Cy7. The thickness of the microsections is 5 μ m; the scale bar is 200 μ m (color online)

иммунного ответа. Все исследованные ткани и органы имели нормальное морфологическое состояние, сопоставимое с тканями интактных животных.

Представленные данные свидетельствуют о безопасности применения микрогелевых эмульсий на основе ИСБ для внутривыпирного или внутривенного введения в выбранной дозировке.

Выходы

Проведенное исследование было сосредоточено на характеризации микрогелей типа «масло-в-воде», стабилизированных ИСБ, и изучении скорости высвобождения инкапсулированного флуоресцентного вещества из их оболочек, а также на безопасности разработанных систем *in vitro* и биологического их распределения *in vivo*. Эмульсионные микрогели обладали ярким флуоресцентным сигналом от ИСБ-Су7, формирующему их оболочку, и были способны удерживать 40% модельного вещества в течение как минимум 72 ч при инкубации в физиологическом растворе.

Исследование цитотоксичности синтезированных микрогелей выявило отсутствие значительного негативного влияния для клеток линий L929, Renca и T-24. Однако клеточная линия Нек 239 (нормальные клетки почки) демонстрировали повышенную чувствительность и снижение метаболитической активности при всех исследованных концентрациях.

Изучение биораспределения после системного введения белым мышам выявило накопление микрогелей не только в печени, но и в почках, что является нетипичным для других систем типа «масло-в-воде». Внутривыпирное введение продемонстрировало потенциал направленной терапии при заболеваниях мочевого пузыря.

Гистологический анализ органов мочевыделительной системы белых мышей через 5 дней после введения подтвердил безопасность микрогелей на основе ИСБ. В мочевом пузыре и почках не наблюдалось эмболических осложнений, воспалительных реакций или морфологических аномалий, даже несмотря на выявленный цитотоксический эффект для линии Нек 239 в *in vitro* эксперименте. Это подчеркивает потенциальную клиническую значимость микрогелей на основе ИСБ для терапии органов мочевыделительной системы, их безопасность как для внутривыпирного, так и для внутривенного введения в протестированной дозировке.

Список литературы / References

1. Kolman K. B. Cystitis and Pyelonephritis. *Prim. Care Clin. Off. Pract.*, 2019, vol. 46, pp. 191–202. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2019.01.001>
2. Jansåker F., Li X., Vik I., Frimodt-Møller N., Knudsen J. D., Sundquist K. The Risk of Pyelonephritis Following Uncomplicated Cystitis: A Nationwide Primary Healthcare Study. *Antibiotics*, 2022, vol. 11, iss. 12, art. 1695. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121695>
3. Jhamb M., Lin J., Ballow R., Kamat A. M., Grossman H. B., Wu X. Urinary tract diseases and bladder cancer risk: A case-control study. *Cancer Causes Control*, 2007, vol. 18, pp. 839–845. <https://doi.org/10.1007/s10552-007-9028-2>
4. Kantor F., Hartge P., Hoover R. N., Narayana A. S., Sullivan J. W., Fraumeni J. F. Urinary tract infection and risk of bladder cancer. *Am. J. Epidemiol.*, 1984, vol. 119, pp. 510–515. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a113768>
5. Maisonneuve P., Agodoa L., Gellert R., Stewart J. H., Buccianti G., Lowenfels A. B., Wolf R. A., Jones E., Dsiney A. P., Briggs D., McCredie M., Boyle P. Cancer in patients on dialysis for end-stage renal disease: An international collaborative study. *Lancet*, 1999, vol. 354, pp. 93–99. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(99\)06154-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(99)06154-1)
6. Gupta K., Hooton T. M., Naber K. G., Wullt B., Colligan R., Miller L. G., Moran G. J., Nicolle L. E., Raz R., Schaeffer A. J., Soper D. E. International Clinical Practice Guidelines for the Treatment of Acute Uncomplicated Cystitis and Pyelonephritis in Women: A 2010 Update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clin. Infect. Dis.*, 2011, vol. 52, pp. e103–e120. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq257>
7. Rădulescu A., Mădan V., Aungurenci A., Bratu O., Farcaș C., Dinu M., Mischianu D. Antibiotic resistant urinary tract infections in an urology ward. *Rom. J. Mil. Med.*, 2015, vol. 118, pp. 20–22.
8. Pietrucha-Dilanchian P., Hooton T. M. Diagnosis, Treatment, and Prevention of Urinary Tract Infection. *Microbiol. Spectr.*, 2016, vol. 4, no. 6, art. uti-0021-2015. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0021-2015>
9. Kallen A. J., Welch H. G., Sirovich B. E. Current Antibiotic Therapy for Isolated Urinary Tract Infections in Women. *Arch. Intern. Med.*, 2006, vol. 166, iss. 6, pp. 635–639. <https://doi.org/10.1001/archinte.166.6.635>
10. Hsu C., Chuang Y., Chancellor M. B. Intravesical drug delivery for dysfunctional bladder. *Int. J. Urol.*, 2013, vol. 20, pp. 552–562. <https://doi.org/10.1111/iju.12085>
11. Ramakrishnan V. M., Eswara J. R. Basic Bladder Physiology and Anatomy. In: Stiffel J. T., Dray E. V., eds. *Urological Care for Patients with Progressive Neurological Conditions*. Cham, Springer, 2020, pp. 7–15. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23277-1_2
12. Min G., Zhou G., Schapira M., Sun T.-T., Kong X.-P. Structural basis of urothelial permeability barrier function as revealed by Cryo-EM studies of the 16 nm uroplakin particle. *J. Cell Sci.*, 2003, vol. 116, pp. 4087–4094. <https://doi.org/10.1242/jcs.00811>

13. Irwin D. E., Kopp Z. S., Agatep B., Milsom I., Abrams P. Worldwide prevalence estimates of lower urinary tract symptoms, overactive bladder, urinary incontinence and bladder outlet obstruction. *BJU Int.*, 2011, vol. 108, pp. 1132–1138. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2010.09993.x>
14. Tyagi P., Tyagi S., Kaufman J., Huang L., Miguel F. de Local Drug Delivery to Bladder Using Technology Innovations. *Urol. Clin. North Am.*, 2006, vol. 33, pp. 519–530. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2006.06.012>
15. Fang J., Wu P., Fang C., Chen C. Intravesical delivery of 5-aminolevulinic acid from water-in-oil nano/submicron-emulsion systems. *J. Pharm. Sci.*, 2010, vol. 99, pp. 2375–2385. <https://doi.org/10.1002/jps.22006>
16. Saveleva M. S., Lobanov M. E., Gusliakova O. I., Plastun V. O., Prikhodchenko E. S., Sindeeva O. A., Gorin D. A., Mayorova O. A. Mucoadhesive Emulsion Microgels for Intravesical Drug Delivery: Preparation, Retention at Urothelium, and Biodistribution Study. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 2023, vol. 15, iss. 21, pp. 25354–25368. <https://doi.org/10.1021/acsami.3c02741>
17. Chen T.-Y., Tai Y.-Y., Chang L.-C., Wu P.-C. Fabrication, optimisation and evaluation of cisplatin-loaded nanostructured carriers for improved urothelium permeability for intravesical administration. *J. Microencapsul.*, 2021, vol. 38, pp. 405–413. <https://doi.org/10.1080/02652048.2021.1957037>
18. Cannon J. B., Shi Y., Gupta P. Emulsions, microemulsions, and lipid-based drug delivery systems for drug solubilization and delivery—Part I: Parenteral applications. In: Liu R., ed. *Water-insoluble drug formulation*. CRC Press, 2018, pp. 211–245. <https://doi.org/10.1201/9781315120492-10>
19. Singh Y., Meher J. G., Raval K., Khan F. A., Chaurasia M., Jain N. K., Chourasia M. K. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. *J. Control. Release*, 2017, vol. 252, pp. 28–49. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2017.03.008>
20. Simovic S., Prestidge C. A. Nanoparticle layers controlling drug release from emulsions. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2007, vol. 67, pp. 39–47. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.01.011>
21. Buyukozturk F., Benneyan J. C., Carrier R. L. Impact of emulsion-based drug delivery systems on intestinal permeability and drug release kinetics. *J. Control. Release*, 2010, vol. 142, pp. 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.10.005>
22. Ming Y., Xia Y., Ma G. Aggregating particles on the O/W interface: Tuning Pickering emulsion for the enhanced drug delivery systems. *Aggregate*, 2022, vol. 3, iss. 2, art. e162. <https://doi.org/10.1002/agt2.162>
23. Tyagi P., Wu P.-C., Chancellor M., Yoshimura N., Huang L. Recent Advances in Intravesical Drug/Gene Delivery. *Mol. Pharm.*, 2006, vol. 3, pp. 369–379. <https://doi.org/10.1021/mp060001j>
24. Schneider C. A., Rasband W. S., Eliceiri K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods*, 2012, vol. 9, pp. 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
25. *Animal Cell Culture Guide*. Available at: <https://www.atcc.org/resources/culture-guides/animal-cell-culture-guide> (accessed September 1, 2024).
26. Ostojić S., Pavlović M., Živić M., Filipović Z., Gorjanović S., Hranisavljević S., Dojčinović M. Processing of whey from dairy industry waste. *Environ. Chem. Lett.*, 2005, vol. 3, pp. 29–32. <https://doi.org/10.1007/s10311-005-0108-9>
27. Armetha V., Hariyadi P., Sitanggang A. B., Yuliani S. The stability of whey protein-stabilized red palm oil emulsion from a rheological perspective. *Ann. Univ. Dunarea Jos Galati. Fascicle VI – Food Technol.*, 2022, vol. 46, pp. 35–49. <https://doi.org/10.35219/foodtechnology.2022.2.03>
28. Standard I. *Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity*. Geneve, Switzerland, International Organization for Standardization, 2023, pp. 1–11.
29. Sakaeda T., Hirano K. O/W Lipid Emulsions for Parenteral Drug Delivery. III. Lipophilicity Necessary for Incorporation in Oil Particles Even After Intravenous Injection. *J. Drug Target.*, 1998, vol. 6, pp. 119–127. <https://doi.org/10.3109/10611869808997887>
30. Hippalgaonkar K., Majumdar S., Kansara V. Injectable Lipid Emulsions—Advancements, Opportunities and Challenges. *AAPS PharmSciTech*, 2010, vol. 11, pp. 1526–1540. <https://doi.org/10.1208/s12249-010-9526-5>
31. Chansri N., Kawakami S., Yamashita F., Hashida M. Inhibition of liver metastasis by all-trans retinoic acid incorporated into O/W emulsions in mice. *Int. J. Pharm.*, 2006, vol. 321, pp. 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.05.008>
32. Huang X., Ma Y., Li Y., Han F., Lin W. Targeted Drug Delivery Systems for Kidney Diseases. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2021, vol. 9, art. 683247. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.683247>
33. Minamiguchi K., Tanaka T., Nishiofuku H., Fukuoka Y., Taiji R., Matsumoto T., Saito N., Taguchi H., Marugami N., Hirai T., Kichikawa K. Comparison of embolic effect between water-in-oil emulsion and microspheres in transarterial embolization for rat hepatocellular carcinoma model. *Hepatol. Res.*, 2020, vol. 50, pp. 1297–1305. <https://doi.org/10.1111/hepr.13561>
34. Tao S., Lin B., Zhou H., Sha S., Hao X., Wang X., Chen J., Zhang Y., Pan J., Xu J., Zeng J., Wang Y., He X., Huang J., Zhao W., Fan J.-B. Janus particle-engineered structural lipiodol droplets for arterial embolization. *Nat. Commun.*, 2023, vol. 14, art. 5575. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-41322-6>

Поступила в редакцию 12.05.2024; одобрена после рецензирования 01.07.2024;
принята к публикации 02.09.2024; опубликована 31.03.2025

The article was submitted 12.05.2024; approved after reviewing 01.07.2024;
accepted for publication 02.09.2024; published 31.03.2025