**Мультимодальные системы визуализации живых объектов посредством биоинтернализации**

***Калинова А.Е., Кузнецова Л.И., Анисимов Р.А., Ломова М.В.***

*Студентка, 1 курс магистратуры*

*ФГБОУ ВО «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского», Институт физики, Саратов, Россия*

*E-mail: s\_kalinova03@mail.ru*

Развитие медицины и разработка новых тераностических методов было бы невозможным без наличия различных мониторинговых систем. Осуществлять in vivo мониторинг удобно при помощи флуоресцентной визуализации благодаря её высокой чувствительности, а также маленькому размеру используемых меток [1]. Одним из видов флуоресцентных красителей являются асимметрические и симметрические цианины, причём первые предпочтительнее за счёт уменьшения чувствительности к фоновым помехам и улучшения проникновения в ткани благодаря сдвигу в длинноволновую область [2]. Цианины являются безопасными для человека и обладают низкой токсичностью. Благодаря изменяющимся свойствам красителей в зависимости от условий синтеза, длины волны возбуждения становится перспективным направление по формированию систем, состоящих из нескольких красителей.  В связи с этим, целью нашей работы стало исследование свойств изменения флуоресценции для цианинов Cy5.5, Cy7 и Cy7.5 в зависимости от их объёмных соотношений, процессов связывания с белками, анализ in vitro полученных систем ко-визуализации.

Для формирования конъюгатов бычьего сывороточного альбумина (BSA) и цианинов (Sulfo-Cyanine5.5, Sulfo-Cyanine7, Sulfo-Cyanine7.5 NHS-esters) использовали буфер из NaHCO3 и Na2CO3 с предельно допустимым pH=9.0. Спиртовые растворы красителей смешивали по два в объёмных соотношениях 2:1, таким образом, получили 6 различных комплексов. Полученные растворы комплексов прикапывали к раствору белка в буфере в тёмную склянку и перемешивали при температуре 5 °C в течение 12 часов, после чего содержимое колбы в мембранном мешке в химическом стакане с деионизованной водой ставили на диализ на 3 дня.

Спектрофотометрический анализ поглощения (диапазон 500-1000 нм) и флуоресценции (длины волн возбуждения выбрали на 684, 708 и 769 нм) проводили для чистых красителей, полученных комплексов и их конъюгатов с BSA на спектрофотометре CLARIOstar (Offenburg, Germany). Флуоресценция вышеописанных образцов проводилась также с помощью биолюминографа Fluor I In Vivo (NeoScience, Daejeon, South Corea) и ПО NEOImage. Анализ проводился в красном канале с ближним инфракрасным фильтром, инфракрасном канале с соответствующим фильтром и зелёном канале с красным фильтром.

Мультимодальные частицы анализировались на проточном цитометре ImageStream X MkII. Для этого лиофилизированный субмикронный эллипсоидальный ватерит, полученный реакций соосаждения растворов CaCl2 и Na2CO3 в среде глицерина, покрыли защитной оболочкой из белка BSA, после чего замораживали образцы с конъюгатами в течение 6 часов. Выборка на каждый образец составила не менее 1000 клеток 4T1.

*Работа выполнена в рамках проекта РНФ 23-13-00373 Механизм противоопухолевого действия переменного негреющего магнитного поля in vitro и in vivo.*

**Литература**

1. Berger C, Gremlich HU, Schmidt P, Cannet C, Kneuer R, Hiestand P, Rausch M, Rudin M. In vivo monitoring the fate of Cy5.5-Tat labeled T lymphocytes by quantitative near-infrared fluorescence imaging during acute brain inflammation in a rat model of experimental autoimmune encephalomyelitis // J Immunol Methods. 2007. Vol. 323. Iss. 1. P. 65-77.

2. Xin Yan, Xinqian Chen, Zhiying Shan, and Lanrong Bi. Innovative Cyanine-Based Fluorescent Dye for Targeted Mitochondrial Imaging and Its Utility in Whole-Brain Visualization // ACS Omega. 2024. Vol. 9. Iss. 2. P. 2585-2596.