

Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения
высшего образования «Саратовский национальный исследовательский
государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

На правах рукописи



ГУСЛЯКОВА ОЛЬГА ИГОРЕВНА

**Биораспределение и деградация микронных и субмикронных частиц
ватерита при интрафолликулярном, интратрахеальном и внутривенном
способах введения.**

1.5.2 – Биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:

д.х.н., профессор Горин Дмитрий Александрович,
профессор Сколковского института науки и технологий

Саратов 2024

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	21
1.1 Синтез частиц карбоната кальция	22
1.2 Подходы к функционализации поверхности частиц ватерита	24
1.3 Методы включения биологически активных веществ в структуры носителей «ядро»-полимерная оболочка	26
1.4 Применение <i>in vivo</i> носителей на основе минерального «ядра» без или с полимерной оболочкой	27
1.4.1 Имплантация материалов, содержащих карбонат кальция, для регенерации костей	28
1.4.2 Карбонат кальция как система доставки лекарственных средств	32
<i>Внутривенное введение</i>	32
<i>Энтеральное введение</i>	35
<i>Трансдермальное введение</i>	37
<i>Внутрилегочное введение</i>	39
<i>Внутрибрюшинное введение</i>	41
<i>Интраназальное введение</i>	44
<i>Внутриопухолевое введение</i>	45
1.4.3 Использование частиц карбоната кальция в диагностических целях ..	46
1.5 Выводы	49
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	51
2.1 Материалы	51
2.2 Синтез частиц ватерита	52
2.3 Протоколы конъюгации высокомолекулярных веществ и низкомолекулярных флуоресцентных красителей	56
2.4 Спектрофотометрия	57
2.5 Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния для детекции нафтифина в составе частиц ватерита	60
2.6 Формирование полимерных оболочек на частицах ватерита с иммобилизованным нафтифином	60

2.7 Исследование стабильности ватеритных контейнеров с инкапсулированным нафтифином в различных средах.....	61
2.8 Исследование динамики высвобождения нафтифина из ватеритных матриц-носителей.....	61
2.9 Определение количества фермента барназа, иммобилизованного в частицы ватерита, методом Брэдфорда	62
2.10 Дополнительная функционализация частиц ватерита с иммобилизованным ферментом барназа олигонуклеотидами, специфичными к ЕрСАМ.....	63
2.11 Измерение активности барназы.....	64
2.12 Взаимодействие частиц ватерита с компонентами легочного сурфактанта <i>in vitro</i>	64
2.13 Клеточные линии.....	64
2.14 Оценка цитотоксического эффекта частиц ватерита с иммобилизованной барназой и различным типом оболочки.....	65
2.15 Интернализация носителей на основе частиц ватерита эукариотическими клетками	66
2.16 Исследование антимикотических свойств частиц ватерита с иммобилизованным нафтифином	68
2.17 Эксперименты с животными	69
2.18 Получение бронхоальвеолярного лаважа	70
2.19 Аллографтная модель рака кишечника мыши, индуцированная подкожной инъекцией	70
2.20 Биораспределение частиц ватерита <i>in vivo</i>	71
2.21 Исследование динамики деградации частиц ватерита с иммобилизованным нафтифином в волосяных фолликулах мыши	73
2.22 Прижизненная мультифотонная микроскопия	74
2.23 Время циркуляции порфиразина в кровотоке	75
2.24 Фармакокинетика низкомолекулярного и высокомолекулярного модельных веществ после интратрахеальной инстиляции в составе субмикронных частиц ватерита	76
2.25 Фотодинамическая терапия	77
2.26 Подготовка срезов тканей органов для микроскопии	78
2.27 Сканирующая электронная микроскопия	79
2.28 Конфокальная микроскопия	80

2.29 Атомно-абсорбционная спектроскопия	82
2.30 Статистика – <i>проверить весь пункт</i>	82
ГЛАВА 3. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЧАСТИЦ ВАТЕРИТА В КАЧЕСТВЕ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ПРИ ИНТРАТРАХЕАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ.....	85
3.1 Характеризация частиц ватерита, используемых в экспериментах по их биораспределению после интратрахеального введения	85
3.2 Создание формуляции, включающей в себя частицы ватерита и флуоресцентный конъюгат альбумина и Цианина 7, для визуализации с помощью флуоресцентной томографии	86
3.3 Стабилизация частиц ватерита в компонентах легочного сурфактанта <i>in vitro</i>	88
3.4 Биораспределение частиц ватерита различного диаметра при внутривнегочном введении	94
3.5 Локализация частиц ватерита с размером 0.65 мкм в легких после интратрахеального введения	98
3.6 Фармакокинетика модельных веществ после интратрахеальной инстилляцией	100
3.7 Иммобилизация бактериальной рибонуклеазы в структуру частиц ватерита	102
3.8 Интернализация частиц ватерита с иммобилизованным ферментом барназа, функционализированных олигонуклеотидом	110
3.9 Исследование влияния функционализации частиц олигонуклеотидом на их биораспределение	115
3.10 Выводы к главе 3	122
Глава 4. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СУБМИКРОННЫХ ЧАСТИЦ ВАТЕРИТА С ИММОБИЛИЗОВАННЫМ АГЕНТОМ ДЛЯ ФДТ В РАМКАХ ОНКОТЕРАПИИ.....	125
4.1 Иммобилизация порфиразина в субмикронные частицы ватерита	125
4.2 Сравнительное исследование биораспределения порфиразина при внутривенном введении в свободной форме и в составе субмикронных частиц ватерита	130
4.3 Исследование характера внутриопухолевого распределения частиц ватерита	135
4.4 Моделирование процессов переноса порфиразина из капилляра в интерстиций опухоли.....	142
4.5 Фотодинамическая терапия <i>in vivo</i>	147

4.6 Выводы к главе 4.....	149
ГЛАВА 5. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЧАСТИЦ ВАТЕРИТА В КАЧЕСТВЕТРАНСДЕРМАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ПРИМЕРЕ НАФТИФИНА	152
5.1 Получение субмикронных частиц ватерита с иммобилизованным противогрибковым препаратом нафтифином	152
<i>Candida glabrata</i>	154
5.2 Оценка скорости высвобождения антимикотика из ватеритной матрицы в отсутствии и при наличии полимерных оболочек	158
5.3 Влияние композиции носителей на захват частиц клетками линии NHDF	161
5.4 Исследование противогрибковой активности частиц ватерита с иммобилизованным нафтифином	164
5.5 <i>In vivo</i> исследование деградации ватеритных частиц, содержащих нафтифин	166
5.6 Выводы к главе 5.....	169
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	171
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	174
БЛАГОДАРНОСТИ	176
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	178

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы

Разработка эффективных и безопасных систем доставки лекарственных средств - это одна из наиболее динамично развивающихся в настоящее время областей мультидисциплинарных исследований, целью которых является создания объектов, которые способны адресно доставить терапевтический и/или диагностический агент в интересующую патологическую область организма при минимальном негативном воздействии на другие клетки, ткани и органы [1]. К подобным носителям также могут предъявляться требования обеспечения пролонгации высвобождения иммобилизованных веществ и управления самим процессом высвобождения за счёт изменения параметров химического или физического воздействия: например, таких как рН и ионная сила микроокружения, состав и концентрация ферментов, частота и интенсивность электромагнитного и ультразвукового излучений. Данные воздействия необходимо изучать на трех уровнях: отдельной клетки, ткани, в целом организма. Большую помощь в понимании биофизических аспектов процессов взаимодействия между системами доставки лекарственных средств и целевыми органами, помимо натурального эксперимента, может оказать аппарат математического моделирования. Таким образом, данная тематика соответствует сразу нескольким разделам биофизики: (i) экспериментальное изучение физико-химических механизмов функционирования живых систем в части выявления закономерностей в транспорте вещества, (ii) разработка математических моделей биологических процессов, (iii) исследования в области радиационной биофизики, рассматривающие взаимодействия электромагнитного излучения с биологическими объектами.

Задачи, поставленные перед системами доставки лекарственных средств возникли из потребностей (i) одновременно повышать концентрации используемых терапевтических и диагностических агентов в зоне патологии и снижать побочные эффекты от их применения, (ii) повышать комплаентность за

счет снижения количества вводимых доз или замены сложных схем лечения применением одной формуляции, сочетающей в себе сразу несколько лекарственных средств, (iii) обеспечить мультифункциональность или мультимодальность, (iv) добиться новых свойств, способствующих желаемой фармакокинетике и фармакодинамике вводимого агента. Помимо выполнения функциональных задач от систем доставки лекарственных средств ожидают малую токсичность, биodeградируемость, простоту в получении, длительную стабильность.

Подобные лекарственные носители востребованы в неоадьювантной, адьювантной и паллиативной терапии рака, где обычно используются низкомолекулярные препараты. Хотя их терапевтическая эффективность соответствует тактикам лечения, вводимые дозы, однако, вызывают развитие негативных побочных эффектов, тем самым ограничивая потенциал существующих химиотерапевтических препаратов [2]. Чтобы избежать депонирования низкомолекулярных лекарств в нормальных тканях, вызывающего побочные эффекты, предлагается осуществлять их иммобилизацию на коллоидных частицах размером от 10 нм до субмикронного размера, которые, как полагается, в меньшей степени проникают в нормальные ткани [3]. Это приводит к снижению побочных эффектов, в то время как аномально большие капиллярные поры растущей опухоли позволяют частицам проникать из кровотока в ткань новообразования [2, 4]. На сегодняшний день сообщается о ряде коллоидных носителей, поступивших на рынок для лечения солидных опухолей [5]. Однако терапевтическая эффективность представленных химиотерапевтических нанопрепаратов была улучшена лишь незначительно, в то время как стоимость осталась высокой, что затруднило их внедрение в клиническую практику [6].

Стратегия использования систем доставки лекарственных средств включает в себя, с одной стороны, как можно более длительное избегание адсорбции различных биомолекул, так называемых опсопинов, способствующих захвату

инородных объектов моноклеарной фагоцитарной системой, а с другой – преимущественное накопление в области патологии, проникновение в клетки-мишени и/или интерстициальную жидкость. Основными факторами, контролирующими адресность носителей, являются (i) их физико-химические параметрами (размер, форма, жесткость, поверхностный заряд) [7, 8], (ii) их поверхностная функционализация направляющими векторами для обеспечения специфичной лиганд-рецепторной связи между носителями и клетками пораженных тканей и органов [9, 10], и (iii) патофизиологические особенности пораженной ткани (особенности циркуляции биологических жидкостей в пораженном органе, чрезмерная экспрессия определенных белковых молекул на мембране клеток-мишеней и т.д.) [11, 12]. Принято выделять два типа адресации: пассивную и активную [13]. Пассивная адресация основана на способности вводимого в живой организм объекта накапливаться в той или иной области за счет физиологических процессов. Ярким примером пассивной адресации является накопление наночастиц в опухолевой ткани за счет эффекта повышенной проницаемости сосудов опухоли и удержания (“EPR” эффект), позволяющий объектам преимущественно менее 200 нм проникать через увеличенные просветы между эндотелиальными клетками. Активная же адресация в дополнение к указанному задействует либо специфическое взаимодействие поверхности клетки и носителя, либо навигацию за счет внешних сил, либо комбинацию этих методов.

На настоящий момент разработано большое число различных систем доставки лекарственных средств: липосомы [14], дендримеры [15], полимерные частицы [16] и капсулы [17], мицеллы [18], твердые липидные наночастицы [19], неорганические микро- и наночастицы [20]. Хотя указанные носители лекарств имеют несколько полезных применений, ни одно из них не является идеальным. Во-первых, некоторые из них обладают выраженной цитотоксичностью и гемолитическим действием [21], несмотря на значительный прогресс в этом направлении [22]. Во-вторых, низкая грузочная емкость (соотношение массы

инкапсулированного вещества к массе контейнера выраженное в процентах) в случае твердых неорганических наночастиц и белковых конъюгатов. В-третьих, стабильность во времени и узкий температурный интервал хранения. В-четвертых, высокая стоимость производства, плохо масштабируемый синтез с громоздкими протоколами существующих носителей делает упомянутые системы доставки лишь объектом научных исследований без перспективы быстрого внедрения в практику.

Одним из примеров неорганических частиц, используемых в исследованиях по доставке различных терапевтических и диагностических агентов к органам с патологией, являются частицы карбоната кальция в полиморфной модификации ватерит. Частицы ватерита обладают рядом свойств, позволяющих рассматривать их как перспективные носители лекарственных средств. К ним относятся: биосовместимость, высокая степень загрузки за счет пористой структуры, возможность растворения в слабокислых средах ($\text{pH} < 5.5$), способность обеспечить длительное высвобождение иммобилизованного вещества. Медленное высвобождение препарата происходит в течение процессов растворения и перекристаллизации в кальцит, так как кристаллическая форма ватерита является наименее стабильной фазой карбоната кальция. Ватерит медленно растворяется и/или перекристаллизуется в кальцит при контакте с водными растворами. Большое число работ посвящено результатам иммобилизации широкого спектра биологически активных веществ и лекарственных средств (белков [23], ферментов [24], РНК [25], синтетических лекарственных препаратов [26], в том числе и противогрибковых [27], неорганических наночастиц [28]) внутрь и на поверхность частиц ватерита. Многие научные группы показали эффективность использования частиц ватерита как системы доставки лекарственных средств и различных контрастных агентов для проведения терапии и диагностики при пероральном, парентеральном и наружном применении. Изучение биораспределения частиц ватерита в организме при введении под действием физиологических процессов

и их динамики деградации является ключевым фактором в разработке лекарственных форм, обеспечивающих как эффективную терапию и/или диагностики, так и безопасность применения таких формуляций.

Цель и задачи исследования

Несмотря на наличие большого количества работ, посвященных особенностям и преимуществам использования частиц ватерита в качестве системы доставки лекарств, существуют области, требующие дальнейших исследований. В частности, остаются открытыми важные вопросы биораспределения частиц ватерита в организме при интрафолликулярном, интратрахеальном и внутривенном способах введения под действием биофизических процессов и динамики их деградации, являющиеся ключевыми факторами в разработке стратегий применения и способов введения лекарственных форм, обеспечивающих как эффективную терапию и/или диагностику, так и безопасность применения таких формуляций, поэтому **целью данной диссертационной работы** являлось выяснение биофизических закономерностей распределения и деградации частиц ватерита при пассивной адресации (i) в легкие в результате интратрахеального введения, (ii) в привитую подкожно аденокарциному при внутривенном введении, (iii) в волосяные фолликулы при наружной аппликации.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить **следующие задачи:**

- Получение и определение физических и химических параметров частиц ватерита с различным размером (от 500 нм до 3 мкм). Изучение морфологии и распределения по размерам получаемых частиц, эффективности инкапсуляции как модельных веществ, так и биологически активных / терапевтических веществ, кинетики их высвобождения в различных средах, влияния компонентов микроокружения на кинетику процесса диссоциации и перекристаллизации частиц ватерита.

- Оценка возможности замедления процессов перекристаллизации и высвобождения иммобилизованного вещества при нанесении различного числа полимерных слоев на поверхность частиц ватерита с целью управления транспортом веществ в органах и тканях организма.
- Изучение эффективности интернализации и цитотоксичности частиц ватерита без и с различными оболочками на культурах эукариотических клеток (клетки человеческой карциномы легких A549, нормальные человеческие дермальные фибробласты NHDF).
- Сравнительное изучение эффективности подавления роста дрожжеподобных грибов рода *Candida* иммобилизованным в частицы ватерита (1.0 ± 0.4 мкм) и свободным препаратом нафтифин.
- Экспериментальное изучение физико-химических механизмов, обуславливающих биораспределение флуоресцентного красителя (Цианин 7), агента фотодинамической терапии (порфиразин) или самих частиц ватерита после интратрахеальной инстилляцией, внутривенной инъекции и интрафолликулярного введения, соответственно. Определение локализации в целевом органе/тканях вводимых ватеритных носителей микроскопическими методами исследования.
- Численное моделирование распространения молекул порфиразина из капилляра в интерстиций опухоли после быстрого высвобождения из частиц ватерита по сравнению с частицами на основе сополимера молочной и гликолиевой кислот.
- Проведение сравнительного исследования эффективности применения облучения светодиодным источником света с длиной волны 640 нм в дозе 150 Дж/см^2 в рамках фотодинамической терапией (ФДТ) подкожно привитой опухоли после внутривенного введения порфиразина как в свободной форме, так и в составе частиц ватерита.

Объект и предмет исследования

В настоящей работе объектом исследования выступают частицы ватерита, рассматриваемые в качестве перспективной системы доставки лекарственных средств в опухоль, легкие и придатки кожи. Предметом исследования является пассивная адресация ватеритных носителей, наблюдение их накопления в целевом органе/тканях, обусловленное физиологическими условиями и процессами, характерными для рассматриваемых органов и тканей.

Методы исследования

Информационную базу составляют статьи в периодических изданиях и научных сборниках, монографические работы, материалы научных конференций по исследуемой проблеме.

При проведении исследований использовались:

- методы спектрофотометрического анализа;
- методы микроскопии (сканирующая электронная и конфокальная лазерная сканирующая микроскопии) как получаемых частиц, так и клеточных культур, криосрезов тканей;
- метод флуоресцентной томографии, применяемый как *in vivo*, так и *ex vivo*;
- метод спектроскопии гигантского комбинационного рассеяния для определения состава получаемой лекарственной формы;
- метод атомно-адсорбционной спектроскопии;
- метод фотодинамической терапии.

Научная новизна

1. Показана возможность доставки и распределения частиц ватерита субмикронного размера (0.65 ± 0.17 мкм) в альвеолярной части легких мыши при интратрахеальном введении в следствии преимущественного влияния процесса диффузии на движение частиц малого размера в потоке и малых чисел Стокса.
2. Показана успешная доставка фермента барназа в составе формуляции на основе частиц ватерита (300 – 500 нм) с оболочкой

функционализированной аптамером к EpCAM в альвеолярную часть легких после интратрахеальной инстилляцией и удержание в целевом органе за счет лиганд-рецепторного взаимодействия.

3. Показано замедление процесса диссоциации и перекристаллизации частиц ватерита (0.65 ± 0.17 мкм) при взаимодействии с компонентами бронхоальвеолярного лаважа мыши *in vitro* в следствии связывания с поверхностью частиц и препятствования покиданию ионов Ca^{2+} .
4. Изучены и объяснены биофизические закономерности адгезии частиц ватерита с агентом фотодинамической терапии (порфиразином) к эндотелию капилляров опухоли в следствии аномалий сосудистой сети, характеризующихся медленной скоростью кровотока и извилистой архитектурой, с последующим высвобождением лекарственного средства, которое частично распространяется из капилляра в интерстиций опухоли.
5. Построена математическая модель и проведено численное моделирование зависимости создаваемой концентрации порфиразина в интерстиции опухоли на фиксированном расстоянии от капилляра ($r = 50$ мкм) от времени. Проведено сравнение с ранее представленной моделью медленно высвобождающих частиц на основе сополимера молочной и гликолиевой кислот.
6. Подтверждена большая эффективность ингибирования роста дрожжеподобных грибов рода *Candida* в случае использования частиц ватерита с иммобилизованным нафтифином по сравнению со свободной формой данного антимикотика за счет эффекта длительного высвобождения.
7. Изучены биофизические закономерности проникновения и постепенной деградация частиц ватерита, содержащих противогрибковый препарат, по всей длине волосяного фолликула мыши после нанесения суспензии частиц на кожу и внедрения опосредованного применением терапевтического ультразвука (с частотой 1 МГц, мощностью 0.5 Вт/см², длительностью воздействия 3 минуты).

Научная и практическая значимость

В настоящей работе приведены результаты изучения биораспределения частиц ватерита при различных способах введения (интратрахеальном, внутривенном и трансфолликулярном), обосновано их преимущество с позиции биофизических процессов, протекающих в здоровых и патологических тканях и органах, определены методики обеспечивающие эффективную локализацию в целевых органах. В частности, был определен оптимальный средний диаметр частиц ватерита (0.65 ± 0.17 мкм) для эффективной аккумуляции флуоресцентного сигнала в легких в течение нескольких дней (не менее 72 часов) после интратрахеальной инстилляцией за счет способности частиц проникать и распределяться в альвеолярной области. Предварительные оценки также показали превосходство частиц ватерита субмикронного размера в связи с преимущественным влиянием процессов диффузии при прохождении частицами воздухоносных путей и размещении в дистальных областях легких.

Была успешно продемонстрирована альтернативная стратегия доставки лекарств в паренхиму опухоли при внутрисосудистом введении, не основанная на эффекте повышенной проницаемости и удержания (EPR). Частицы ватерита с лекарством (порфиразин) пассивно накапливались в аномальной сосудистой сети опухоли, характеризующейся медленной скоростью кровотока, после внутривенной инъекции. Указанные частицы прикреплялись к эндотелию капилляров и высвобождали лекарственное средство, которое распространялось из капилляра в интерстиций опухоли. Быстрое высвобождение лекарства из частиц ватерита в данной ситуации представляло собой ключевое преимущество в рамках представленной концепции.

Также данное исследование показало ряд преимуществ использования частиц ватерита в качестве носителей противогрибкового препарата нафтифина для адресации в глубокие слои кожи через волосяные фолликулы. С помощью сканирующей электронной микроскопии было наглядно продемонстрировано проникновение частиц ватерита на всю глубину волосяного фолликула и их

медленная деградация, что рассматривается как способность обеспечить доставку лекарственного препарата в глубокие слои дермы.

Одним из наиболее значимых практических результатов настоящей работы является подтверждение того факта, что, субмикронные пористые частицы ватерита способны обеспечить значимые преимущества при выборе тактик лечения различных заболеваний. Так, например, в разработке стратегии терапии различных заболеваний легких можно опираться на иммобилизацию лекарственного вещества в частицы ватерита, как матрицу-носитель, и высвобождение лекарства только после достижения дыхательной части. Ряд заболеваний легких, включая хроническую обструктивную болезнь легких и острое поражение легких, имеют значительную долю воспаления в этих областях как компонент их патофизиологии. Кроме того, взаимодействие с компонентами легочного сурфактанта будет вызывать медленное высвобождение лекарства, что может быть полезно при лечении хронических заболеваний легких, таких как эмфизема. Формуляция с направляющим вектором, включающая в себя частицы ватерита, в качестве ядра, и фермент барназа, в качестве компонента оболочки, могут быть эффективны при лечении раковых заболеваний и вирусных инфекций, включая коронавирусные заболевания человека. Результаты, полученные при исследовании накопления частиц ватерита в опухоли после внутривенного введения с последующим быстрым высвобождением лекарственного средства (порфиразином), могут быть использованы в усовершенствовании тактик проведения терапии онкологических заболеваний препаратами, характеризующимися высокой токсичностью, так как подобные формуляции способны обеспечить локально в опухоли высокую концентрацию иммобилизованного лекарственного средства.

Достоверность подтверждается хорошей воспроизводимостью полученных результатов, их соответствием данным, полученным другими авторами и опубликованным в современной литературе, а также фактом прохождения их критического рассмотрения рецензентами перед публикацией. Достоверность

экспериментальных результатов была обеспечена применением современной измерительной аппаратуры, сертифицированной в соответствии с международными стандартами качества, и использованием стандартизированных методик проведения измерений. Все выявленные и сформулированные в работе закономерности основаны на строгом анализе полученных результатов с помощью принятых математико-статистических методов обработки данных.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Частицы ватерита диаметром 0.65 ± 0.17 мкм, содержащие комплекс бычьего сывороточного альбумина и флуоресцентного красителя (Цианин 7), обеспечивают флуоресцентный сигнал в легких с интенсивностью $51.3 \pm 1.4\%$ от общей интенсивности флуоресценции по органам (легкие, печень, почки, желудок и кишечник), благодаря способности достигать альвеолярного пространства в следствии преимущественного влияния процесса диффузии на движение частиц малого размера в респираторной части легких, по сравнению с частицами ватерита диаметром 1.35 ± 0.16 мкм и 3.15 ± 0.60 мкм, движение которых управляется суперпозицией сил гравитации и инерции прямо пропорциональными квадрату аэродинамического диаметра частиц, обеспечивающими $30.2 \pm 1.4\%$ и $29.1 \pm 1.1\%$ интенсивностей флуоресцентных сигналов, соответственно, через 72 часа после интратрахеальной инстилляций.
2. Интратрахеальная инстиллюция суспензии носителей (30×10^6) на основе ватеритных частиц диаметром 0.55 ± 0.12 мкм, содержащих на поверхности олигонуклеотид специфичный к ЕрСАМ, обеспечивает распределение и удержание в течение одного часа в альвеолярном пространстве в 1.8 раз больше носителей (поверхностная концентрация частиц 2.3×10^3 мм⁻²) по сравнению с введением носителей, не обладающих векторными молекулами на поверхности (поверхностная концентрация частиц 1.3×10^3 мм⁻²) в

следствие улучшения адгезии за счет образования лиганд-рецепторной связи между вводимыми частицами и клетками эндотелия легких.

3. Частицы ватерита (0.47 ± 0.14 мкм) с иммобилизованным агентом фотодинамической терапии (порфиразином) при внутривенном введении способны накапливаться в сосудах опухоли, индуцированной подкожной инъекцией клеток колоректальной карциномы (СТ26.WT) в области бедра мыши, и обеспечивать доставку $23.1 \pm 2.4\%$ от введенной дозы порфиразина на массу животного за счет изменения биофизических параметров кровотока в опухолевой кровеносной сети, а именно снижения скорости кровотока и аномального извилистого строения сосудистой сети.
4. Частицы ватерита (1.0 ± 0.4 мкм) с иммобилизованным противогрибковым препаратом нафтифина гидрохлоридом, суспензированные в 70% водном растворе этилового спирта и наносимые *in vivo* на поверхность кожи мышей в области спины с использованием несфокусированного терапевтического ультразвука (с частотой 1 МГц, мощностью 0.5 Вт/см^2 , длительностью воздействия 3 минуты), во-первых, проникают и распределяются по всей глубине волосяного фолликула, во-вторых, подвергаются биодеградации в течении, как минимум, четырех дней.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы были представлены на российских и международных конференциях:

1. 7-я Международная конференция «Nanoparticles, Nanostructured Coatings and Microcontainers: Technology, Properties, Applications» (12-15 мая 2016 г., Томск, Россия);
2. 21-й Международный симпозиум «Surfactants in Solution» (5-11 июня, 2016 г., Джинан, КНР);
3. Объединенная конференция Американского сообщества клеточной биологии и Европейской организации молекулярной биологии 2017 (ASCB-EMBO/ 2017 Meeting) (2-6 декабря 2017 г., Филадельфия, США);

4. Юбилейная конференция по медицинской микологии и микробиологии (11-12 апрель, 2018 г., Москва, Россия);
5. 6-й Международный симпозиум «Оптика и биофотоника», Saratov Fall Meeting 2018 (24-28 сентября 2018 г., Саратов, Россия);
6. 7-й Международный симпозиум «Оптика и биофотоника», Saratov Fall Meeting 2019 (23-27 сентября 2019 г., Саратов, Россия);
7. Британско-российская школа-семинар «Patient-tailored biomaterials for tissue regeneration, combating microbial contamination and drug delivery» (2–4 октября 2019 г., Ланкастер, Великобритания).

Личный вклад

Личный вклад автора состоит в самостоятельном выполнении представленных в диссертации экспериментальных исследований и расчетов, а именно синтез, визуализация и характеристика исследуемых носителей, определение эффективности загрузки и высвобождения из ватеритных контейнеров модельных и терапевтических веществ, визуализации как отдельных биологических тканей методами лазерной сканирующей конфокальной и сканирующей электронной микроскопии, так и всего организма в целом методами флуоресцентной томографии. Постановка исследовательских задач и обсуждение результатов проведены под руководством профессора Д.А. Горина (Сколковский институт науки и технологий, г. Москва). Экспериментальные исследования проводились совместно с сотрудниками и на оборудовании лаборатории «Дистанционно управляемые системы для тераностики» (Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»). Исследования, направленные на определение оптимальных параметров частиц ватерита для обеспечения доставки лекарственных средств в нижние отделы легких, были проведены совместно с профессором Ратгерс (Университет штата Нью-Джерси) Эндрю Гоу и научным сотрудником отделения медицины

университета Пенсильвании Е.Н. Аточиной-Вассерман. Сравнительное исследование эффективности локализации и удержания носителей на основе ватеритных частиц в отсутствие и присутствии векторных молекул на поверхности после интратрахеальной инстилляции было выполнено совместно с профессором Сколковского института науки и технологий А.М. Ященком. Изучение изменения характера биораспределения препарата для ФДТ при его иммобилизации в субмикронные частицы ватерита и внутривенном введении было выполнено совместно с сотрудниками лаборатории оптической тераностики Нижегородского государственного университета имени Н.И. Лобачевского при научной консультации профессора А.В. Звягина и научного сотрудника Б.В. Парахонского. Применение ватеритных контейнеров для доставки противогрибкового препарата в волосяные фолликулы было выполнено совместно со старшим научным сотрудником лаборатории «Дистанционно управляемые системы для тераностики» СГУ Ю.И. Свенской.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ, из них 5 статей в журналах перечня, рекомендованного ВАК, включая 4 работы, относящиеся к Q1 (WoS), 7 тезисов докладов на научных российских и международных конференциях.

Конкурсная поддержка работы

Исследования, представленные в диссертации, выполнены при финансовой поддержке следующих проектов: «Дистанционно управляемые наноструктурированные системы для адресной доставки и диагностики» в рамках гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих учёных в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования (договор №14.Z50.31.0004 от 4 марта 2014); «Субмикронные мезопористые частицы ватерита для трансдермальной доставки

биологически активных веществ» в рамках гранта РФФИ №17-73-20172; «Фотоакустические технологии для ранней тераностики метастатических опухолей» в рамках гранта Правительства Российской Федерации для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих учёных в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования (договор №14.Z50.31.044 от 5 февраля 2018); стажировка в Ратгерс (университет штата Нью-Джерси) в рамках победы на Всероссийском открытом конкурсе для назначения стипендии Президента РФ для обучающихся за рубежом в 2019/2020 учебном году; стипендия Президента Российской Федерации для молодых ученых и аспирантов, осуществляющих перспективные научные исследования и разработки по приоритетным направлениям модернизации российской экономики.

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из введения, 5 глав, заключения, списка литературы, включающего 264 источника. Общий объем диссертации составляет 196 страниц, включая 63 рисунка и 4 таблицы.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Структуры «ядро»-полимерная оболочка на основе карбоната кальция являются привлекательными объектами для разработки систем адресной доставки лекарств, а также материалов для регенеративной терапии благодаря простоте получения и уникальным свойствам. Различные полиморфные модификации карбоната кальция позволяют изменять размер, форму и пористость частиц, что влияет на формирование полимерной оболочки на их поверхности. Оболочка контейнера защищает биологически активное содержимое от воздействия окружающей среды или, в случае токсичности, наоборот, предотвращает побочные эффекты. Варьирование состава оболочки позволяет управлять ее проницаемостью и другими свойствами, например, чувствительностью к различным физическим воздействиям (свету, ультразвуку, магнитному полю и т. д.), обеспечивая возможность контролируемого высвобождения содержимого. Полимеры (белки, ферменты), лекарственные препараты и наночастицы можно иммобилизовать внутри и на поверхность пористых частиц карбоната кальция методами соосаждения или адсорбции, что влечет за собой изменения свойств поверхности (электрокинетический потенциал, шероховатость и т. д.).

В последнее время использование модифицированных наночастиц в биомедицинских целях становится все более распространенным. Как правило, эти частицы обладают различной степенью токсичности за счет активной поверхности. Поэтому в настоящее время крайне важна разработка новых систем, способных минимизировать вредное воздействие. Одним из возможных подходов является использование биоразлагаемых и биосовместимых носителей [29]. Частицы на основе липидов обычно используются в качестве носителей для фармацевтических препаратов. В настоящее время существует ограниченное число одобренных липосомальных составов [30, 31]. Однако недостатки липосомальных структур, такие как низкая эффективность загрузки, ограниченная стабильность в организме и склонность к утечке содержимого,

привели к тому, что полимерные частицы привлекают все больше внимания в качестве новых систем доставки [29]. Эндогенные материалы, такие как карбонат кальция, имеют большой потенциал для использования в качестве материалов для доставки благодаря их превосходной биосовместимости [32]. Кроме того, практически отсутствует риск индуцированной токсичности из-за деградации частиц, поскольку их ионы уже присутствуют в организме в высоких концентрациях. Известно, что растворимость карбоната кальция увеличивается в кислой среде [33]. Чувствительность к pH в сочетании с биосовместимостью делает карбонат кальция очень интересным для биомедицинских исследований в качестве платформы для нанотехнологической доставки различных молекул в биологические системы. Например, при нейтральном физиологическом pH частицы карбоната кальция практически не высвобождают инкапсулированное вещество, однако быстро высвобождают его при кислом значении pH в опухоли (pH <6,5), что используется для терапии рака [34]. Однако, чтобы оценить потенциал биомедицинского применения карбоната кальция, в этой главе необходимо обобщить имеющиеся разрозненные данные о его применении *in vivo*.

1.1 Синтез частиц карбоната кальция

Существующие подходы к синтезу нано/микрочастиц карбоната кальция можно разделить на две основные категории: химические [35–37] и биологические, включающие в себя синтез карбоната кальция растениями [38, 39] и микроорганизмами [40–42] (Рисунок 1). Кроме того, химические подходы включают синтез с использованием эмульсий [33, 43] и реакции соосаждения [44, 45]. Самый простой способ синтеза нано/микрочастиц CaCO₃ – спонтанное осаждение путем смешивания эквимольных растворов солей, содержащих ионы кальция и карбоната [44, 46]. Для более глубокого понимания механизма роста CaCO₃ и выявления экспериментальных условий кристаллизации частиц ватерита было проведено значительное число исследований и достигнуты определенные успехи [47]. Концентрация ионов Ca²⁺ и CO₃²⁻, pH, температура, интенсивность перемешивания определяют тип получаемой полиморфной

модификации CaCO_3 , размер частиц, их стабильность и морфологию [32, 36, 37, 48]. Получить частицы карбоната кальция с заданными свойствами можно путем изменения параметров, влияющих на количество центров зародышеобразования и скорость зарождения кристаллов [49]. Проведены исследования влияния различных добавок как неорганической [42, 49], так и органической природы [33, 50, 51] на скорость роста, размер и морфологию частиц. Изменяя состав растворителя (соотношение этиленгликоля и воды) и другие параметры синтеза [36], можно получить частицы CaCO_3 различной геометрии (сферической, эллипсоидной, кубической). Таким образом, на основе принципов, регулирующих роль добавок в процессах зародышеобразования и роста кристаллов, возможна разработка систем доставки на основе CaCO_3 с индивидуальной морфологией и размером, о чем сообщается в значительном количестве публикаций [52–56]. Однако субмикронные частицы ватерита считаются более подходящими для биомедицинских применений, поскольку эти частицы могут более эффективно поглощаться клетками, чем их микронные аналоги. Значительная пористость и площадь поверхности делают нано/микрочастицы ватерита перспективными для адсорбции различных лекарств и биомолекул.

Следует отметить, что, несмотря на ряд преимуществ, существуют и недостатки использования карбоната кальция с точки зрения его физических свойств - размера, морфологии, растворимости и нестабильности в воде, включая способность загружать и высвобождать различные биологически активные вещества [57]. Например, особенно сложно контролировать морфологию частиц CaCO_3 в субмикрометровом масштабе. В природе карбонат кальция встречается в виде трёх основных полиморфных модификаций — кальцита, ватерита, арагонита, как правило, представляющих собой кристаллы размером от 3 до 50 микрон [37].



Рисунок 1 – Подходы к получению минеральных частиц карбоната кальция.

Изображение создано с использованием ресурса BioRender.com

1.2 Подходы к функционализации поверхности частиц ватерита

Поскольку первичный контакт между клетками и частицами происходит посредством поверхностного взаимодействия, контролировать указанное взаимодействие возможно за счет изменения свойства поверхности частиц [58]. Но модификация поверхности карбоната кальция является сложной задачей, поскольку этот материал может растворяться при кислом рН или превращаться в более стабильные полиморфы в буферах и растворителях. В работах [56, 59] были рассмотрены наиболее распространенные методы, используемые для функционализации частиц карбоната кальция.

Методы функционализации поверхности можно разделить на три отдельные категории: химическая модификация силановыми связующими агентами или ковалентной связью [60], послойная адсорбция противоположно заряженных полиэлектролитов на поверхности частиц [61] и использование добавок в процессе образования частиц [62]. Связывание силановых агентов с поверхностью карбоната кальция является эффективным методом и происходит

путем конденсационной полимеризации, приводящей к реакции гидроксильных групп на поверхности частиц с силанизирующим агентом. Сообщалось, что силанизация предотвращает агрегацию частиц и улучшает их химическую стабильность [63]. Одним из преимуществ является наличие поверхностных силанольных групп, которые могут легко вступать в реакцию с различными связующими агентами, ковалентно прикрепляя лиганды к поверхности частиц. Однако, с другой стороны, силанизация меняет свойства поверхности частиц, что может влиять на взаимодействие с клеткой и способность к биодegradации. Сообщалось и об иных методах функционализации, основанных на ковалентном связывании [64, 65]. Для успеха химической модификации необходимо иметь высокую концентрацию активных групп на поверхности частиц, иначе реакции не пройдут.

Другой метод модификации поверхности частиц основан на физической адсорбции полиэлектролитов. Например, в послойном методе [66–68] частицы ватерита были использованы в качестве темплатов для последовательной адсорбции противоположно заряженных полиэлектролитов. Основная цель этого метода – формирование полый полимерной капсулы после растворения твердого «ядра». Однако, если частица ватерита не подвергается растворению, то такие частицы носят название стуктуры «ядро-оболочка» [36, 69], которые могут обладать полифункциональностью – пористое «ядро» способно нести инкапсулированное лекарство, а «оболочка» обеспечивает функциональность, например, чувствительность к микроокружению или различным внешним воздействиям, способность визуализировать или локализовать носителя. Кроме того, могут быть использованы различные добавки в процессе приготовления для функционализации полученных частиц карбоната кальция. Сообщается, что такие сополимеры, как поли(этиленгликоль)-поли(L-аспарагиновая кислота) (ПЭГ-ПАСпК), одновременно сопровождают минерализацию частиц карбоната кальция и обеспечивают поверхностную защиту частиц молекулами ПЭГ [62].

1.3 Методы включения биологически активных веществ в структуры носителей «ядро»-полимерная оболочка

Обеспечение высокой эффективности загрузки при капсулировании функциональных наночастиц или молекул в пористые частицы позволяет совершенствовать носители биологически активных веществ для адресной доставки и разрабатывать более эффективные функциональные материалы. Еще один сложный аспект, который необходимо учитывать при разработке эффективных систем доставки лекарств, связан с включением и высвобождением молекул из их внутреннего объема. Инкапсуляция фармацевтических молекул защищает их от окружающей среды до тех пор, пока они не будут высвобождены [70], а также обеспечивает сайт-специфическую биодоступность [71]. Существует три подхода к загрузке различных веществ/наночастиц в пористые носители CaCO_3 . Активные соединения могут соосаждаться при синтезе CaCO_3 , проникая в его поры в процессе образования кристаллов [72–78].

Другой подход – адсорбция инкапсулированного вещества методом постзагрузки из раствора на поверхность уже синтезированных частиц карбоната кальция [79]. При этом заполнение пор синтезированных ядер может достигаться либо путем физической адсорбции молекул лекарства, либо путем инфильтрации. В последнем подходе для загрузки гидрофобных лекарств можно использовать органические растворители. Однако в этом случае трудно добиться высокой полезной нагрузки из-за сильных взаимодействий между растворимым веществом и растворителем, которые снижают адсорбцию лекарственного средства на частицах CaCO_3 . Одним из наиболее перспективных подходов к загрузке, контролируемому высвобождению и доставке различных биомолекул является приготовление микрокапсул, состоящих из противоположно заряженных полиэлектролитов, нанесенных на «ядра» - частицы CaCO_3 [80], содержащие биоактивное вещество.

Достижение контролируемой высокоэффективной загрузки неорганических наночастиц/полимеров в пористые частицы субмикронного и микронного размера возможно с использованием подхода, основанного на циклах замораживания/оттаивания [81]. Метод основан на выдавливании частиц или больших молекул фронтом кристаллизации [82] в пористую матрицу частиц ватерита. Процесс был протестирован на загрузке наночастиц золота, магнетита и бычьего сывороточного альбумина в биосовместимые частицы карбоната кальция. Контролируемая загрузка наночастиц в частицы ватерита была продемонстрирована во время каждого цикла замораживания-оттаивания. Количество эффективных циклов замораживания-оттаивания для увеличения загрузочной емкости увеличивается с уменьшением размера частиц ватерита.

1.4 Применение *in vivo* носителей на основе минерального «ядра» без или с полимерной оболочкой

Карбонат кальция (CaCO_3) имеет широкое биомедицинское применение благодаря своей простоте получения, низкой стоимости, безопасности, биосовместимости, чувствительности к pH и медленной биодegradации. В последнее время возрос интерес к его применению в качестве систем доставки различных групп лекарств. Управление растворением за счет варьирования pH, а также возможность функционализации поверхности частиц CaCO_3 с помощью векторных агентов придают им уникальное свойство, которое можно использовать в системах адресной доставки. Кроме того, из-за медленной деградации матрицы CaCO_3 эти носители можно использовать в качестве систем замедленного высвобождения для удержания лекарств в патологических тканях в течение длительного времени после введения [33].

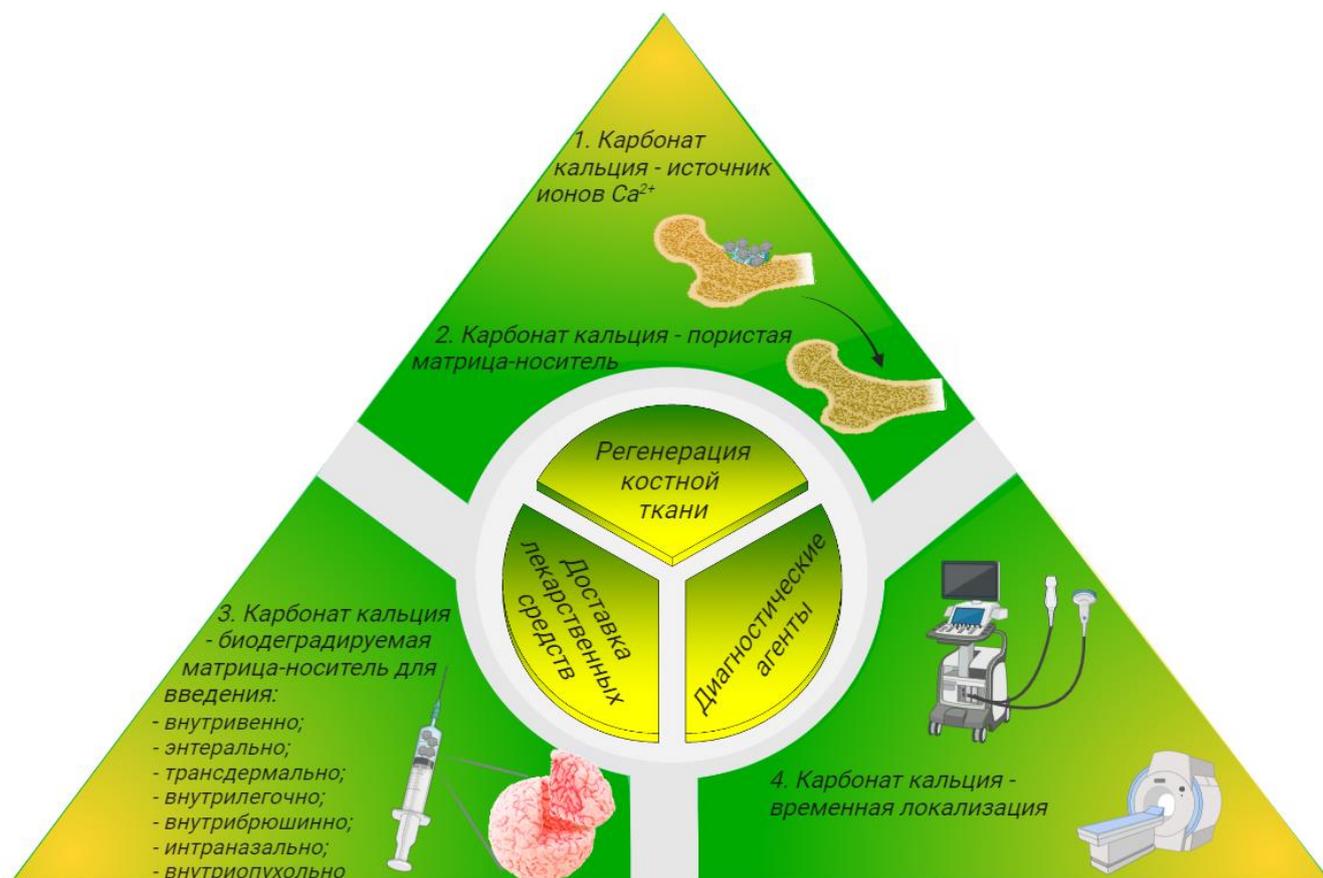


Рисунок 2 – Направления использования минеральных частиц карбоната кальция. Изображение создано с использованием ресурса BioRender.com

1.4.1 Имплантация материалов, содержащих карбонат кальция, для регенерации костей

Использование карбоната кальция в области костной регенерации достаточно широкого изучено. В исследованиях применяют как материалы природного происхождения, так и полученные в ходе химического синтеза. В обзорной статье А. Neto и J. Ferreira [83] систематизированы данные большого числа работ, направленных на изучение влияния различных форм $CaCO_3$ на процесс восстановления костной ткани *in vitro* и *in vivo*. Среди трансплантатов природного происхождения авторы выделяют кораллы [84, 85] и части скелета морских рыб [86], в основном состоящие из арагонита. Достоинствами таких материалов являются пористая структура, механическая прочность, биосовместимость [87]. Для ускорения процесса регенерации используют комбинацию $CaCO_3$ имплантатов и мезенхимальных стволовых клеток [88–90]

и/или факторов роста [91–93] (рисунок 3). Интересной представляется работа [94], в которой авторы сравнивают скорость и качество восстановления костной ткани при использовании композита на основе полимолочной кислоты (PLA) и механически измельченного порошка арагонита и ватерита, полученного из жемчуга на модели дефекта критического размера лучевой кости кролика. Результаты показывают, что в группе животных, получивших трансплантацию композитного материала, по сравнению с животными, получившими только полимерный трансплантат, процесс восстановления костной ткани идет значительно быстрее. Однако плотность новых костных элементов в случае использования композита, содержащего арагонит, превышает данное значение для композита с ватеритом.

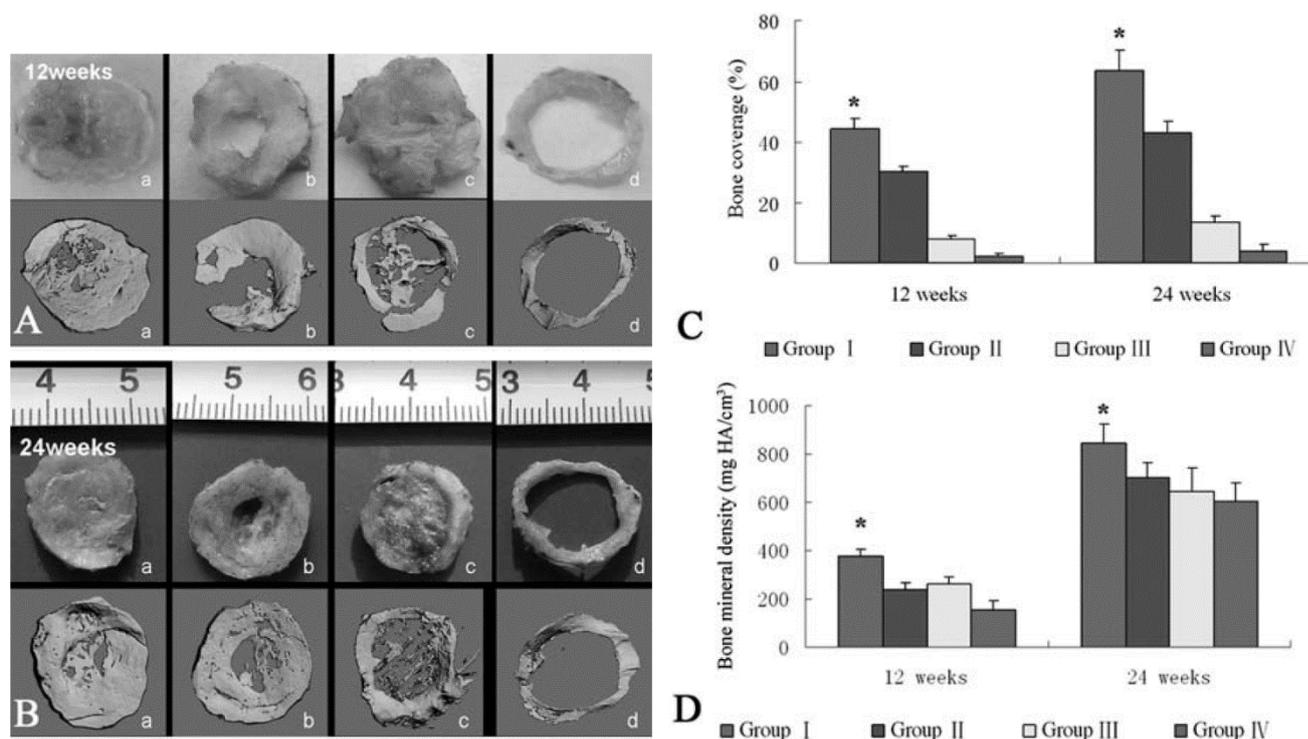


Рисунок 3 – Общий вид (верхняя панель) и 3D-микроКТ-изображения (нижняя панель) восстанавливающихся орбитальных дефектов через 12 недель (a) и 24 недели (b) после имплантации. Количественный микроКТ-анализ выявил статистически значимое увеличение покрытия костной ткани (c) и минеральную плотность вновь регенерированной кости (d) в группе I (* $p < 0,05$) по сравнению с другими группами через 12 и 24 недели (столбцы ошибок обозначают стандартное отклонение, $n=4$). Дефекты обрабатывали одним из

следующих препаратов: композит коралл/ВМСС, трансфицированные adv-ВМР2 (группа I), композит коралл/ВМСС (группа II), только биокоралл (группа III), или остались без лечения (группа IV). [93]

В последнее время исследователи также обратили внимание на возможность химического получения CaCO_3 для улучшения регенерации костной ткани. Так, в работе [95] было исследовано влияние дополнительной модификации аллогرافта ватеритными микросферами и мезенхимальными стволовыми клетками. Исследователи сделали вывод, что использование такого материала при подкожном его размещении ведет к увеличению синтеза коллагена I типа и остеокальцина, а также с помощью микро-КТ было показано увеличение соотношения площади поверхности к объему новой костной ткани, увеличение количества кусочков кости на квадратный миллиметр. В работе М. Saveleva и др. [96] показано, что при подкожной имплантации полимерных скаффолдов, полученных методом электроспрея с последующей минерализацией частицами ватерита, воспалительные реакции в прилегающих тканях выражены значительно слабее, чем при имплантации скаффолда из одного полимера. Колонизация клетками фибробластов через 21 день наблюдалась только для минерализованного скаффолда с иммобилизованной дубильной кислотой (рисунок 4). Еще одним примером успешного использования композитного материала с целью ускорения инфильтрации клетками является использование сфер из сополимера молочной и гликолиевой кислот (PLGA), содержащих внутри аморфный карбонат кальция, модифицированный полифосфатом [97]. При гистологическом исследовании извлеченных после 8 недель имплантации PLGA микросфер, содержащих CaCO_3 , было обнаружено, что весь объем был колонизирован клетками в отличие от чистых микросфер, чей объем остался незаполненным.

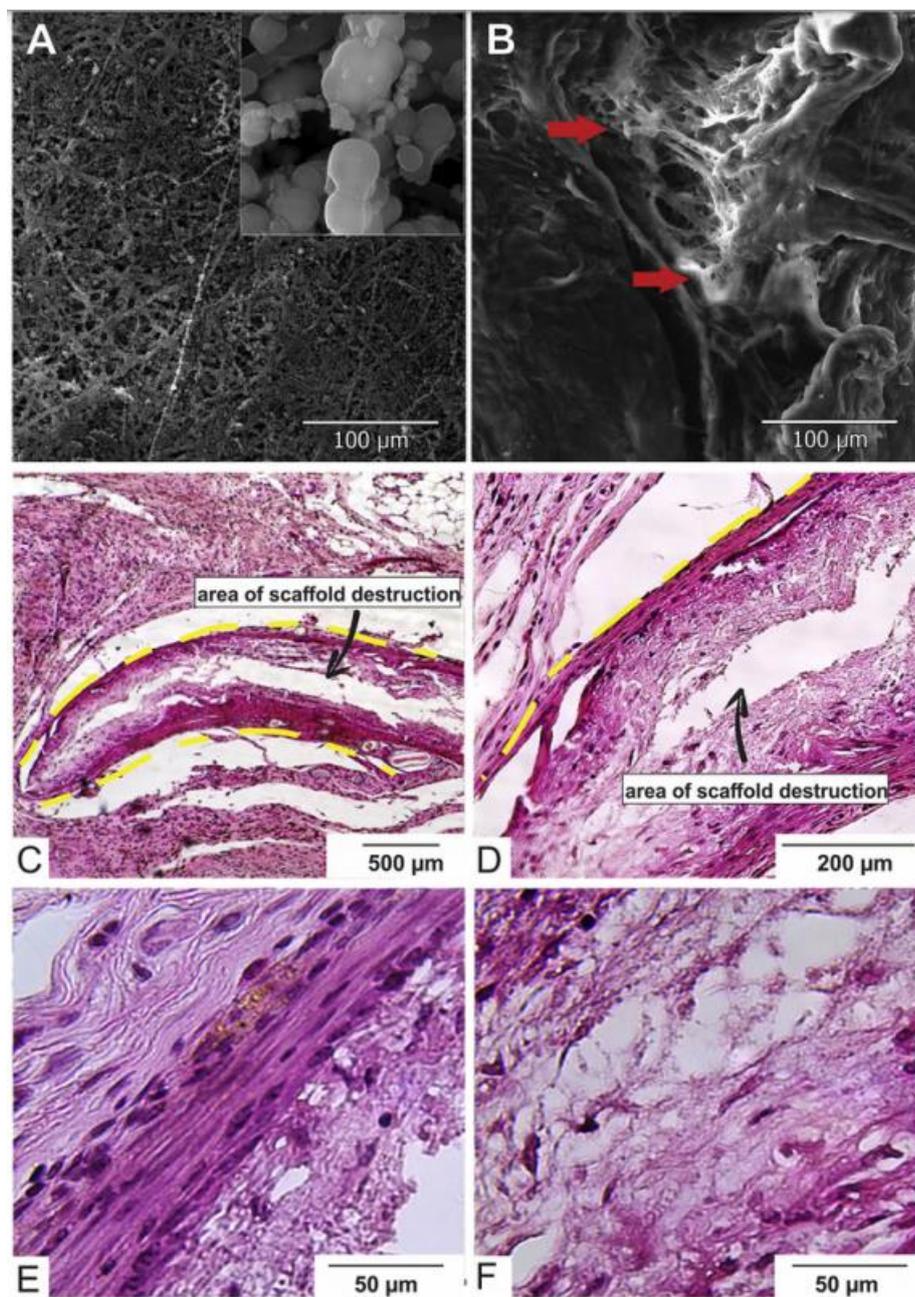


Рисунок 4 –СЭМ-изображения скаффолда PCL/CaCO₃ + TA (A), скаффолда PCL/CaCO₃ + TA, эксплантированного после подкожной имплантации крысе (B), красные стрелки указывают область разрушения скаффолда. Колонизация клетками скаффолда PCL/CaCO₃ + TA и трансформация тканей в области имплантации через 21 день после имплантации (B–E). Желтые пунктирные линии обозначают границу раздела биологических тканей и скаффолда; черные стрелки указывают место разрушения каркаса[96]

Все упомянутые результаты свидетельствуют об остеокондуктивности материалов на основе как природного, так и синтетического карбоната кальция. Увеличить потенциал имплантатов на основе карбоната кальция возможно за счет со-культивирования мезенхимальных стволовых клеток и/или иммобилизации различных факторов роста, благодаря уникальной пористой структуре и низкой токсичности данного материала.

1.4.2 Карбонат кальция как система доставки лекарственных средств

Внутривенное введение

Инъекция непосредственно в кровеносный сосуд является одной из самых распространенных методик введения вещества в организм. В работе [98] было изучено биораспределение наноразмерных частиц карбоната кальция, покрытых несколькими видами конъюгатов фосфолипидов и полиэтиленгликоля, несущих в себе флуоресцентно-меченый пептид, после внутривенного введения мышам с ксенографтными опухолями немелкоклеточного рака легких (рисунок 5). Использование частиц вне зависимости от вида оболочки обеспечило преимущественное накопление пептида в опухоли через 4 часа после введения. Также было показано значительно более эффективное торможение роста опухоли при осуществлении терапии с помощью частиц CaCO_3 , нагруженных пептидом по сравнению с введением свободного пептида. Стабильное торможение роста опухоли на модели мышинной колоректальной карциномы на протяжении 20 дней после внутривенной инъекции было также показано в работе [99]. В данном исследовании была использована многокомпонентная система доставки на основе наноразмерных частиц карбоната кальция, покрытых липидным слоем. Разработанные частицы способны нести в себе высокомолекулярное (супероксиддисмутаза) и низкомолекулярное (паклитаксел) вещество одновременно, что обеспечивает синергетический терапевтический эффект.

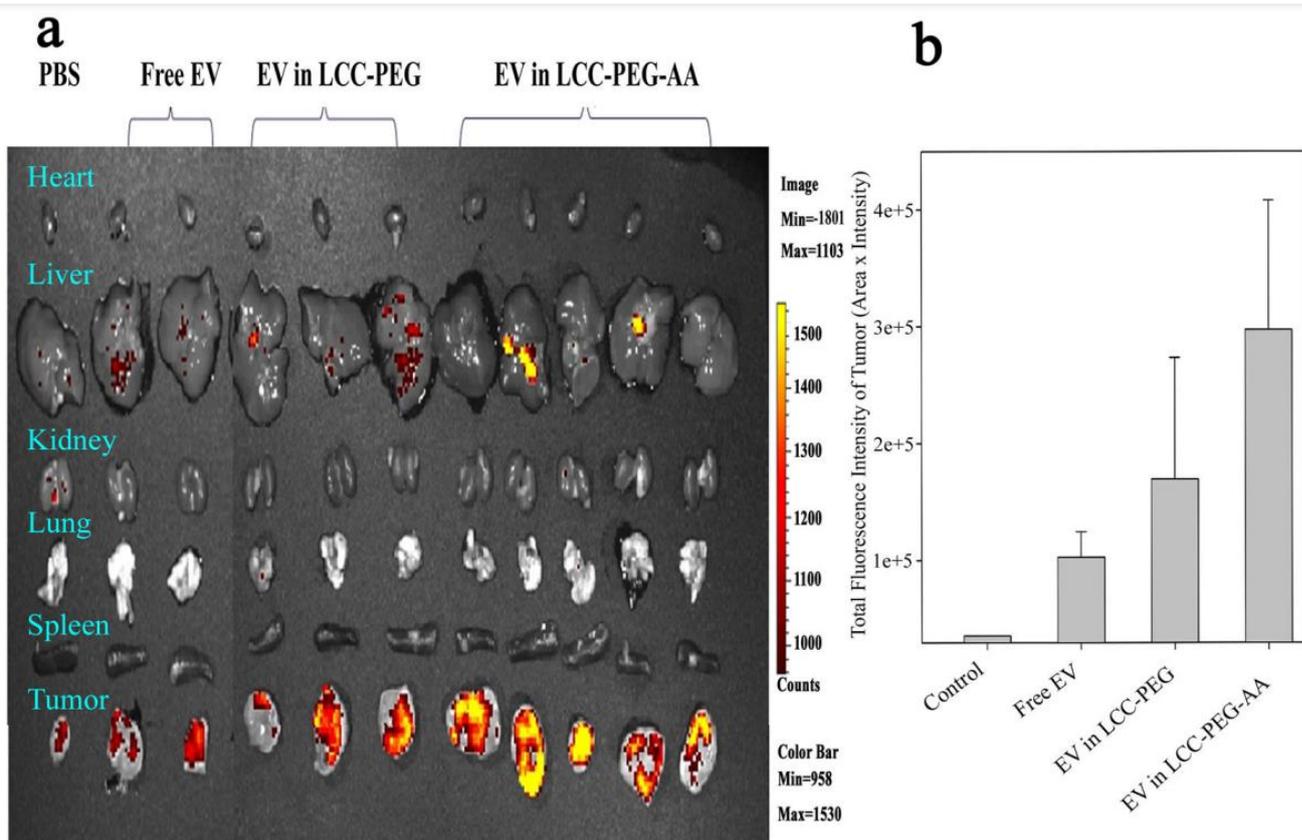


Рисунок 5 – Распределение пептида EV в тканях. (а) Основные органы были взяты у мышей с опухолью H460 через 4 часа после внутривенного введения пептида Alexa-488-EV, инкапсулированного в наночастицах LCC-PEG или LCC-PEGAA. Визуализация выполнялась с использованием системы визуализации IVIS 100. Количественную оценку общей интенсивности флуоресценции (площадь опухоли × интенсивность флуоресценции) опухолей из каждой группы мышей оценивали с использованием программного обеспечения Image J (b) [98]

В описанных выше работах были использованы однократные инъекции, в то же время в работе [100] терапевтический эффект (угнетение роста опухоли) наблюдался при многократных внутривенных инъекциях (каждые два дня) наночастиц (120 nm) карбоната кальция, покрытых полиакриловой кислотой с иммобилизованным доксорубицином. В работе [101] представлен эффект от действия смеси приготовленных отдельно наночастиц (300-500 nm) карбоната кальция с эпирубицином и мелиттином и дополнительно модифицированных

аптамером при внутривенном введении мышам с подкожно привитой ректальной карциномой. По мнению авторов, совместная доставка данных противораковых препаратов способствует более эффективному подавлению роста опухоли нежели свободный эпирубицин.

Определенный интерес представляет работа [102], в которой адресация разработанных частиц, состоящих из карбоната кальция, магнетита, покрытого полидопамином, и индоцианина зеленого, в опухоль осуществляется за счет внешнего магнитного поля. Авторы предлагают совместную реализацию фотодинамической и фототермальной терапии благодаря такой конструкции носителя. Основными результатами данной работы являются: (i) эффективная аккумуляция вводимых внутривенно частиц под воздействием локального магнитного поля; (ii) локальное увеличение температуры в зоне накопления носителей (карцинома молочной железы, привитая подкожно) после облучения лазером (808 нм) до 59.3°C; (iii) эффективное торможение роста опухоли в группе животных, в которой была использована магнитная адресация частиц карбоната кальция, модифицированных магнетитом, покрытым полидопамином, и загруженных индоцианином зеленым, с последующим лазерным воздействием по сравнению с введением физиологического раствора, раствора индоцианина зеленого с последующим лазерным воздействием и разработанных частиц без применения лазерного излучения.

Сами частицы карбоната кальция способны обеспечивать некоторые биологические эффекты помимо способности осуществлять адресную доставку терапевтических агентов. Так, например, в работе [103] внутривенное введение наноразмерных частиц карбоната кальция обеспечивает асимптотическое увеличение pH ксенографтной фибросаркомы до значения 7.4. Согласно гипотезе, выдвигаемой в данной работе, ежедневное введение наночастиц CaCO₃ значительно снижает темп роста опухоли, а прекращение таких инъекций полностью меняет тренд и ведет к ускорению росту опухоли. Аналогичный эффект был отмечен и в работе [64].

Энтеральное введение

В медицинской практике наиболее распространенным и удобным для пациента способом введения лекарственного препарата является энтеральный (пероральный). Однако, для самого препарата это самый длительный и сложный путь, который сопровождается естественными потерями активного вещества до достижения рецепторов. Механизмы всасывания включают в себя (i) пассивную диффузию через клеточные мембраны кишечной стенки (является основным механизмом всасывания синтетических лекарственных средств), (ii) фильтрацию через поры эпителия кишечника (вода, электролиты и малые гидрофильные молекулы), (iii) активный транспорт с использованием специализированных механизмов клеточных мембран и молекул-переносчиков (гидрофильные полярные молекулы, неорганические ионы, аминокислоты, пиримидины), а также (iv) пиноцитоз для крупных молекул или комплексов лекарственных веществ [104].

Необходимость применения систем доставки лекарственных средств на основе частиц карбоната кальция при пероральном введении может быть обусловлена не только желанием обеспечить рациональную адресацию какого-либо терапевтического агента, но и потребностью непосредственно в источнике кальция при лечении патологий, связанных с недостатком этого иона в организме. Был проведен ряд исследований различными группами, изучающий биодоступность кальция при включении в рацион животных, в том числе человека, измельченного порошка природного карбоната кальция (из жемчужин). Так, в работе [105] были получены результаты, свидетельствующие, что уровень кальция в сыворотки крови крыс после кормления измельченным природным карбонатом кальция значительно больше в случае использования мелких частиц (2.187 нм) по сравнению с большими частицами (7.363 нм). Однако общее количество кальция, поступившего в системный кровоток в течение 6 часов после кормления, примерно одинаково. Авторы связывают данный эффект с большей скоростью растворения частиц маленького размера.

Также было отмечено, что сами частицы не были обнаружены в системном кровотоке, а лишь только продукт растворения измельченного порошка – ионы кальция. Аналогичный результат был получен в исследованиях на людях [106]. Использование наноструктурированного порошка (84 нм) карбоната кальция у здоровых добровольцев вело к значительно более быстрому повышению уровня кальция, снижению интактного паратиреоидного гормона в сыворотке крови по сравнению с использованием микроразмерного порошка (29.4 мкм). Особый интерес представляют результаты работы [107], в которой показано, что добавка из наноразмерного карбоната кальция приводит к значительному увеличению минеральной плотности бедренной кости, к максимальной жесткости бедренной и губчатой кости у крыс с удаленными яичниками по сравнению с использованием ионов кальция в качестве пищевой добавки.

В работе [108] представлено использование химически синтезированных наночастиц (150-350 нм) карбоната кальция, покрытых гиалуроновой кислотой и несущих в себе инсулин при пероральном пути введения диабетическим крысам. При сравнении биологического эффекта, а именно падения уровня глюкозы в крови, от подкожной инъекции свободного инсулина и перорального введения инсулина, иммобилизованного в наночастицы CaCO_3 , было показано, что использование частиц карбоната кальция позволяет растянуть гипогликемический эффект по времени. Так, минимальное значение уровня глюкозы в крови при подкожной инъекции инсулина достигалось за 2 часа, а при пероральном введении инсулина в составе частиц карбоната кальция - через 3 часа, кроме того скорость восстановления уровня глюкозы в случае использования наночастиц карбоната кальция была значительно меньше (рисунок 6).

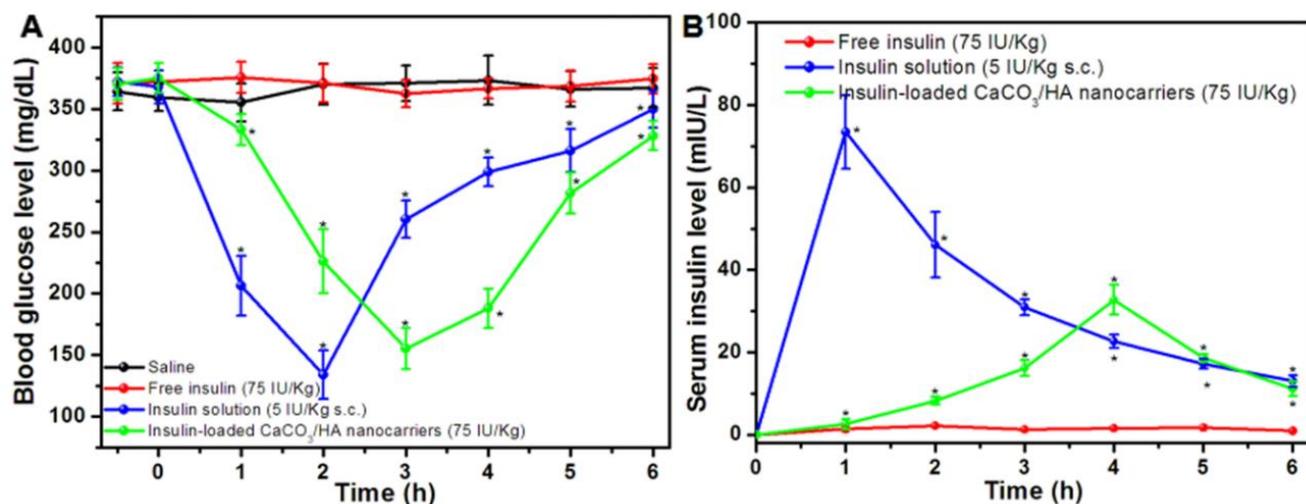


Рисунок 6 – Уровень глюкозы в крови (А) и уровень инсулина в плазме (В) у крыс с диабетом после перорального введения нагруженных инсулином наноносителей CaCO₃/HA, физиологического раствора и раствора свободного инсулина по сравнению с подкожной инъекцией (п/к) раствора инсулина (n=5, *P) <0,05, **P<0,01) [108]

Трансдермальное введение

Трансдермальная доставка представляет собой привлекательную альтернативу энтеральной доставке лекарств и подкожным инъекциям [109]. В настоящее время на кожу наносят вещества не только для локального терапевтического воздействия, но и для доставки лекарственных средств в системный кровоток [110].

Фолликулярная доставка CaCO₃, опосредованная сонофорезом с помощью терапевтического ультразвука (1 МГц) была рассмотрена в работе Ю. Свенской и др. [111]. Комбинация частиц карбоната кальция и ультразвукового излучения позволяет наполнить фолликулы кожи у крыс по всей длине (рисунок 7). Время деградации частиц карбоната кальция в фолликулах составляет 12 дней. Создание депо-систем на минеральных носителях возможно при использовании лазерной абляции с одновременным включением наночастиц магнетита [112]. Минеральные частицы, содержащие нафтифин, также эффективно проникают в фолликулы, что открывает перспективы его использования при лечении кожных заболеваний [27]. Инкапсуляция препарата гризеофульвин в пористые частицы

ватерита обеспечивает доставку и накопление в коже антимикотика, что открывает многообещающие возможности для местной противогрибковой терапии, обеспечивающей целенаправленную доставку терапевтического агента к пораженному участку кожи [113].

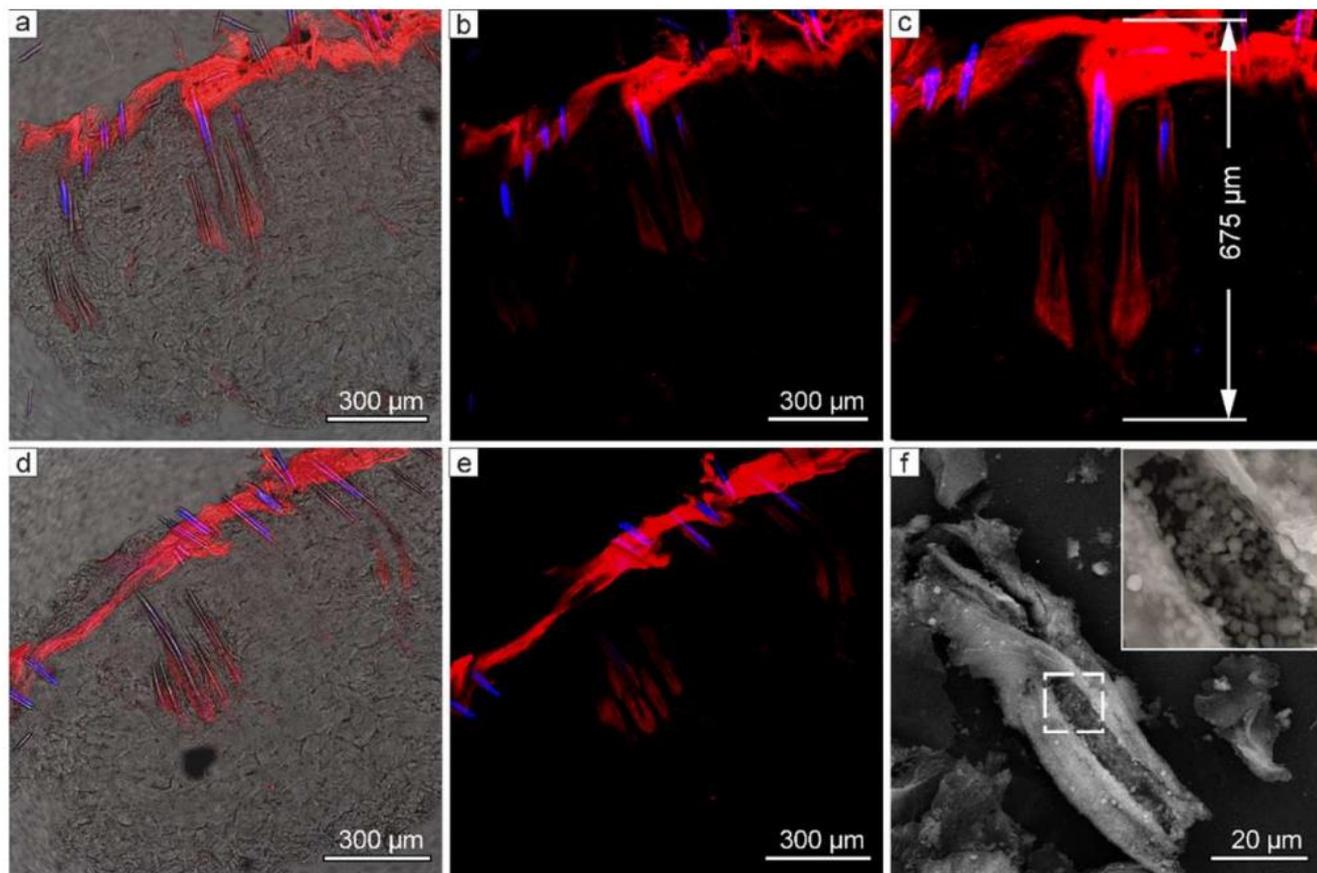


Рисунок 7 – КЛСМ-изображения замороженных срезов кожи (a-e) и СЭМ-изображение разрушенных корневых влагалищ выщипанного волоса (f), демонстрирующие *in vivo* интрафолликулярное проникновение субмикронных частиц карбоната кальция, нагруженных Ци7. Синий сигнал флуоресценции соответствует автофлуоресценции стержней волос, зарегистрированной в диапазоне 420–490 нм при возбуждении 405 нм, тогда как красный сигнал указывает на распределение Ци7, обнаруженное в диапазоне 750–795 нм при возбуждении 670 нм. Изображения (a,b) и (d,e) представляют собой два последовательных среза замороженной кожи крысы толщиной 20 мкм, содержащих одну и ту же группу фолликулов и демонстрируют доставку Ци7 в самую глубокую область волосяного фолликула – волосяную луковицу: (a,d) – наложение трансмиссионного и флуоресцентного изображений, (b,e) –

флуоресцентные изображения. Изображение (с) представляет собой увеличенную область изображения (b), позволяющую четко определить глубину проникновения частиц карбоната кальция, нагруженных Ци7. Вставка на изображение (f) представляет собой увеличенную область основного изображения, отмеченную белым квадратом.

В исследованиях Мегумо Хигаки [114] использование частиц карбоната кальция (300-500 нм) с иммобилизованным инсулином позволило обеспечить длительный эффект падения уровня глюкозы в крови как здоровых животных, так и животных, больных диабетом. Было проведено сравнение фармакокинетики инсулина в крови после трансдермального нанесения частиц с инсулином (наноинсулин) и подкожной инъекции свободного инсулина. Максимальная концентрация инсулина в крови животных после подкожной инъекции наступала через 0.3 часа и падала до нуля к 3 часам в отличие от использования наноинсулина, когда максимальное количества данного вещества было определено через 4 часа после нанесения, а падение к нулевому значению происходило через 8 часов. За счет наблюдаемого эффекта авторы делают вывод о том, что наноинсулин способен проникать сквозь роговой слой и эпидермис, достигать дермы и затем выходить в кровоток, хотя и отмечается, что точные механизмы проникновения пока еще не известны.

Внутрилегочное введение

Доставка лекарств в нижние дыхательные пути легких - давняя и желанная цель. Нацеленность именно на дальние отделы легких обусловлена: (i) большой площадью поверхности взаимодействия (суммарная площадь поверхностей альвеол у взрослого человека составляет 70-140 м² в сравнении с воздухопроводными путями, чья площадь составляет 2-3 м²), (ii) самой малой толщиной раздела между воздушным пространством и просветом капилляра, иными словами, самым узким барьером для диффузии, (iii) мощной разветвленной сетью капилляров, которые прилегают к более чем 500

миллионам альвеол, отсутствием большого количества деградирующих ферментов [115]. Кроме того, доставка соединений в респираторную часть является важной целью при многих патологиях легких, для терапии которых большое значение имеет дизайн систем доставки, специально нацеленных на дистальные отделы легких.

Распределение вдыхаемых частиц в легких зависит от ряда физических сил (таких как инерция, гравитация и броуновское движение) и биофизических взаимодействий (таких как взаимодействие с жидкостью выстилки легких и клетками эпителиальной поверхности). Размер частиц играет решающую роль (рисунок 8). И только достаточно маленькие частицы (<1 мкм) достигают дистальной альвеолярной части. Однако, мелкие частицы более подвержены риску выдоха и могут иметь характеристики слишком быстрого растворения в зависимости от их взаимодействия со слизистой оболочкой легких, а также меньшей нагрузкой активным компонентом (лекарством) [116, 117]. Помимо обеспечения глубокого проникновения, доставка терапевтических агентов в легкие с помощью систем доставки на основе твердых частиц способна обеспечить устойчивое высвобождение лекарственного средства в интересующей области.

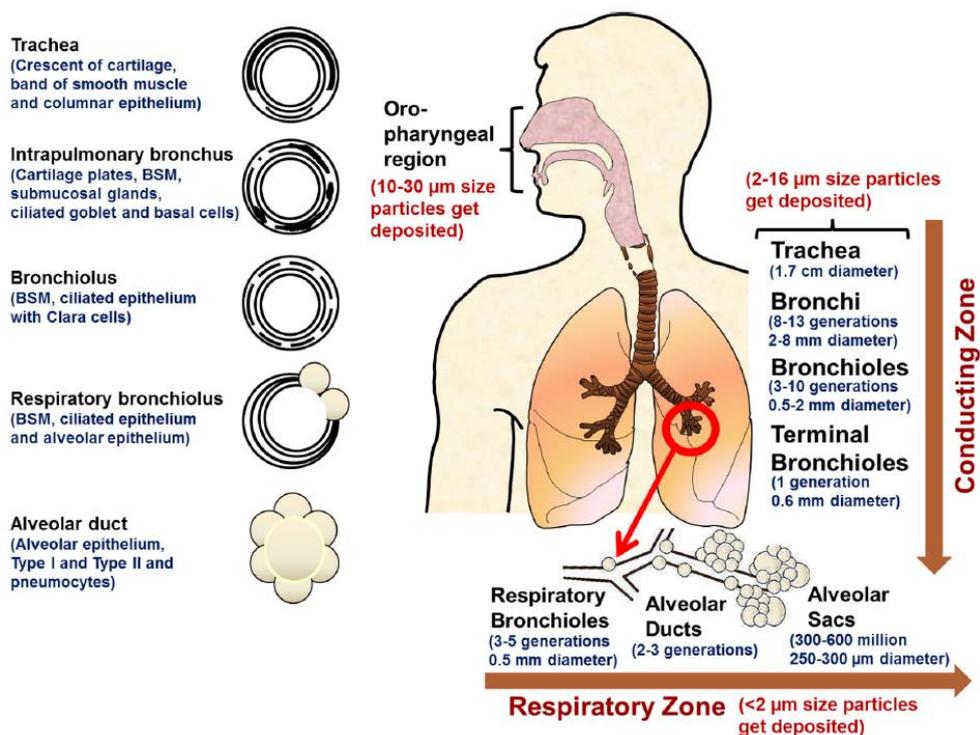


Рисунок 8 – Размеры воздухоносных путей легкого взрослого человека и строение стенки дыхательных путей с ветвлениями по данным трахеобронхиального дерева Вейбеля [118].

На основе аморфного карбоната кальция успешно осуществлена доставка пептидов [119] с сохранением их нативной структуры. Биодоступность кальцитонина после аэрозольной доставки крысам в виде композитных микрочастиц, нагруженных кальцитонином и альфа-1-антитрипсином, была в 4 раза выше, чем у раствора кальцитонина (рисунок 9). В работе [23] сравнивалась глубина проникновения носителей на основе карбоната кальция трех размеров. Полученные результаты свидетельствуют о том, что только субмикронные частицы (0.65 мкм) могут проникать в дистальные отделы легких. Данная работа также показывает возможность доставки лекарств в системный кровоток.

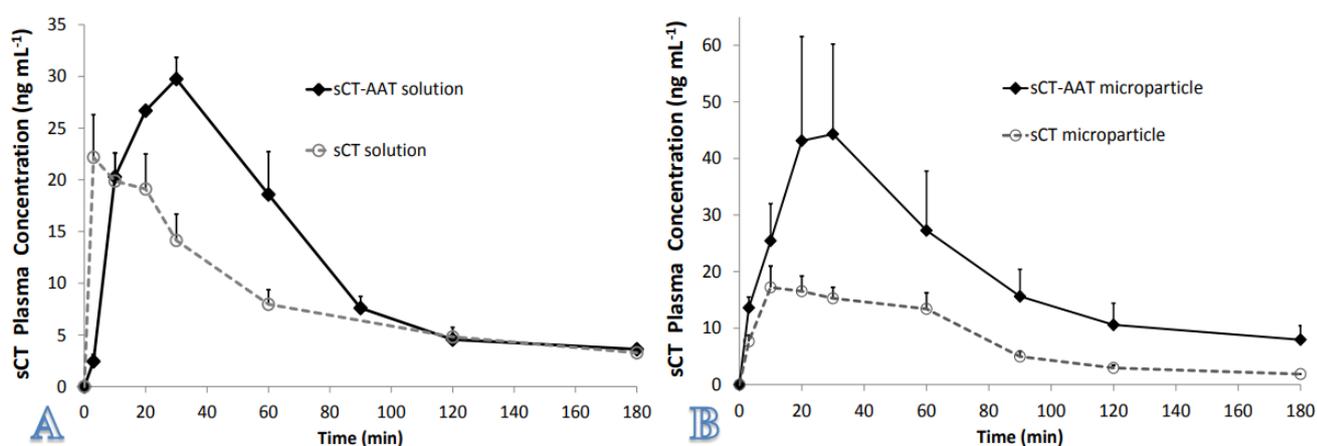


Рисунок 9 – Профили зависимости концентрации sCT (кальцитонина) в плазме от времени после: А) введение раствора sCT небулайзером; В) введение композитных микрочастиц, нагруженных sCT, небулайзером (среднее значение \pm стандартное отклонение). Доза 100 мкг кг⁻¹ [119]

Внутрибрюшинное введение

Внутрибрюшинный путь введения лекарств лабораторным животным является обычной практикой во многих исследованиях моделей заболеваний *in vivo*. Данный способ инъекции прост в выполнении, быстр, подходит для экспериментов, предполагающих выполнение курса лечения, и оказывает низкое

стрессовое воздействие на лабораторных грызунов [120]. Брюшная полость является отличным входом в системный кровоток для веществ после внутрибрюшинного введения. Его большая площадь поверхности, наличие микроворсинок на мезотелиальных клетках и обширное кровоснабжение способствуют быстрой абсорбции веществ после внутрибрюшинного введения [121]. Кроме того, лимфатический транспорт веществ в значительной степени способствует их полному переносу из брюшной полости в системный кровоток [122].

В работе [123] представлены результаты успешной трансфекции клеток органов брюшной полости (желудок, печень, почки, селезенка, тонкий и толстый кишечник, стенка брюшной полости) мышей после внутрибрюшинной инъекции суспензии микроразмерных частиц карбоната кальция, содержащих плазмиды, кодирующие люциферазу светлячков. Экспрессия трансгена в органах брюшной полости после введения данной суспензии была значительно выше по сравнению с введением свободной пДНК (рисунок 10) и сопоставима с использованием липидного комплекса. Однако изменение концентрации провоспалительного цитокина ФНО- α в крови и серозной внутрибрюшинной жидкости через несколько часов после внутрибрюшинных инъекций показали меньший воспалительный ответ организма при введении частиц карбоната кальция, чем липидного комплекса. Также малые изменения активности лактатдегидрогеназы в серозной жидкости брюшной полости и крови подтверждают безопасность использования микрочастиц карбоната кальция.

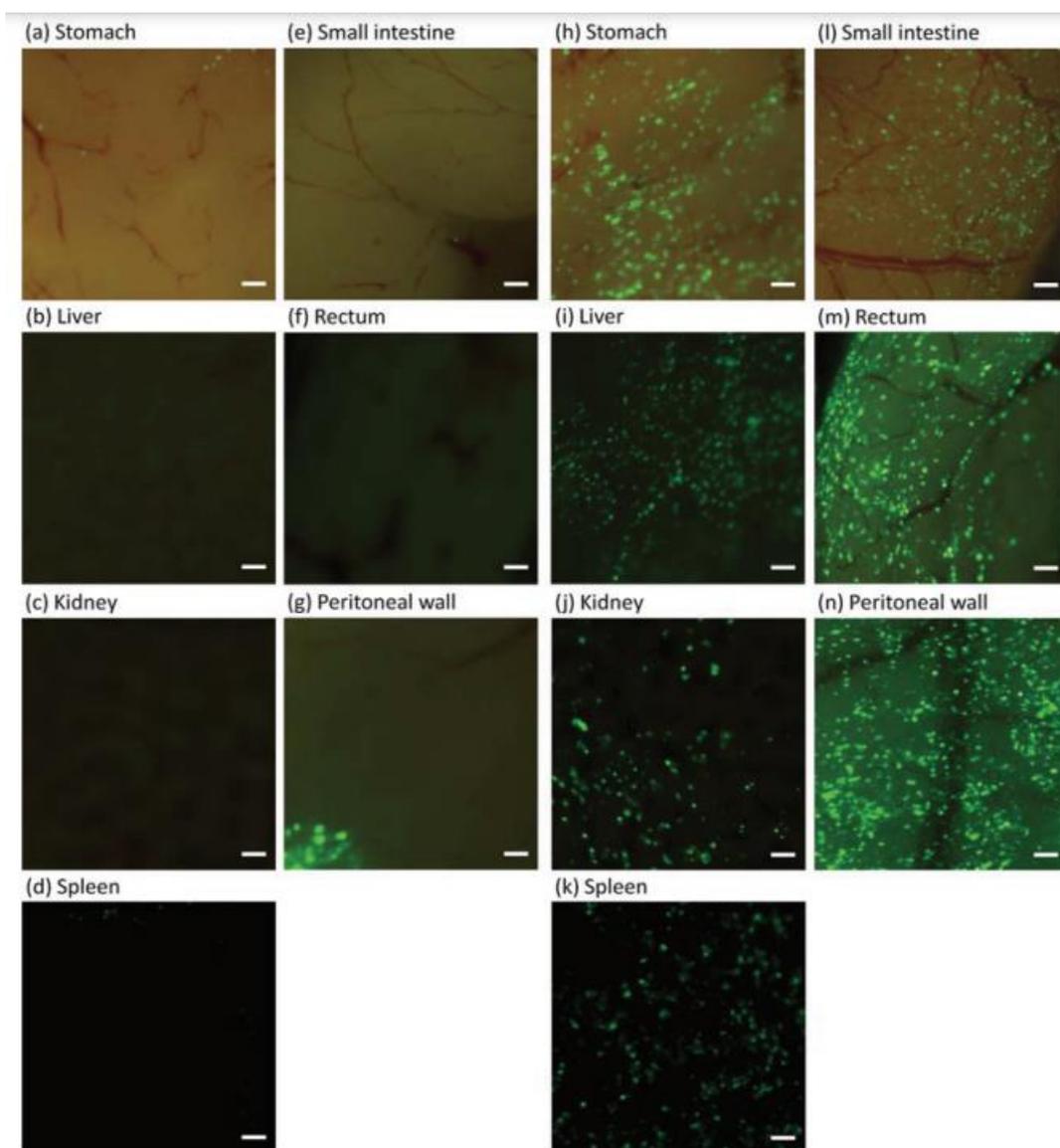


Рисунок 10 – Обнаружение трансген-положительных клеток в каждом органе через 24 часа после внутрибрюшинного введения мышам свободной пДНК (a-g) и суспензии микроцветков карбоната кальция (6.25 мкг/мкл), содержащих пДНК (h-n). Доза пДНК (pZsGreen1-N1) составляла 100 мкг/100 мкл.

Масштабная линейка: 200 мкм [123]

В литературе представлены также примеры успешного применения частиц карбоната кальция для радиотерапии онкологических заболеваний [124]. Инкапсуляция радия-224 в микрочастицы ватерита и последующее интраперитонеальная инъекция позволили добиться наибольшей выживаемости у мышей с привитой внутрибрюшинно опухолью рака яичников при дозах

микрочастиц $^{224}\text{Ra-CaCO}_3$ 3.5 и 5 мг с удельной активностью 1.8–4.6 кБк/мг [125].

Интраназальное введение

Острая или хроническая медикаментозная терапия различных нейродегенеративных и психических расстройств представляет собой сложную задачу по нескольким аспектам. Низкая биодоступность и ограниченное воздействие на мозг пероральных препаратов, быстрый метаболизм и выведение, нежелательные побочные эффекты, а также высокая доза, которую необходимо вводить в организм, означают как неудобства для пациентов, так и высокие затраты. Причина малого проникновения веществ в мозг заключается в существовании гематоэнцефалического барьера, защищающего мозг от ксенобиотиков. Интраназальное введение препаратов является одним из перспективных вариантов обхода гематоэнцефалического барьера, снижения вводимых доз препаратов и системных побочных эффектов [126].

Т. Бородина и коллеги [69] осуществили интраназальную доставку лоперамида с помощью микроразмерных частиц карбоната кальция покрытых гиалуроновой кислотой. Вывод об эффективности доставки препарата в центральную нервную систему был сделан на основании снижения болевых ощущений у крыс в модели неспецифического воспалительного процесса (формалиновый тест) после закапывания в нос суспензии микрочастиц ватерита с иммобилизованным лоперамидом без и с оболочкой из гиалуроновой кислоты (рисунок 11).

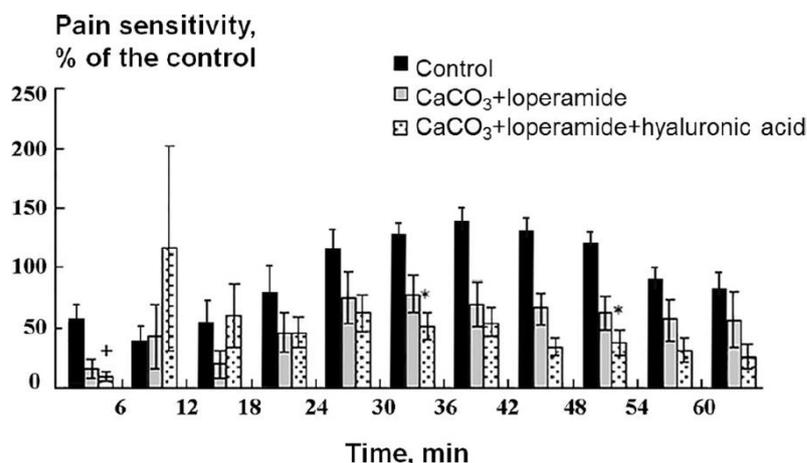


Рисунок 11 – Результаты испытания *in vivo* немодифицированных частиц карбоната кальция, содержащих лоперамид, и тех же частиц, покрытых гиалуроновой кислотой. Достоверные отличия от контрольной группы при (*) $p < 0.05$ и (+) $p < 0.1$; p — статистическая значимость результата по критерию Краскела–Уоллиса [69]

Внутриопухолевое введение

Уже более 100 лет главной целью химиотерапии является адресация или локализация доставки лекарств. Однако клиническое применение несистемной внутриопухолевой химиотерапии по-прежнему ограничено даже для видов рака с высокой смертностью, которые характеризуются четко выраженными первичными поражениями, то есть рака молочной железы, колоректального рака, легких, простаты и кожи [127]. Поскольку инъекция производится непосредственно в опухолевые ткани, можно избежать захвата систем доставки лекарственных средств РЭС и максимизировать их накопление в опухоли. Более того, в отличие от свободного введения лекарств, использование систем доставки для внутриопухолевого введения может предотвратить быстрое вымывание лекарств из опухолевых тканей в кровоток и окружающие нормальные ткани за счет контроля их диффузии. Таким образом, внутриопухолевое введение носителей с лекарственным веществом может обеспечить улучшение терапевтических результатов и снизить нецелевую токсичность по сравнению с их системным введением [128].

В ряде работ была показана возможность использования наночастиц CaCO_3 (58 нм) для генной терапии рака за счет формирования комплекса «частица/малые интерферирующие РНК» и высокой эффективности трансфекции раковых клеток-мишеней, обеспечивающей ингибирование синтеза фактора роста эндотелия сосудов С (VEGF-C). Эффективность использования такого комплекса была продемонстрирована для терапии рака желудка [25] и кишечника [129]. Сравнение выживаемости клеток при инкубировании с комплексами частицы/ДНК и липосомы/ДНК выявило малую цитотоксичность частиц карбоната кальция по сравнению с липосомальной формой.

1.4.3 Использование частиц карбоната кальция в диагностических целях

Помимо способствования увеличению эффективности терапии, системы доставки могут рассматриваться как носители диагностических агентов для МРТ, рентгена, УЗИ, улучшающие контрастные свойства последних. Способность CaCO_3 увеличивать контрастность при ультразвуке обусловлена процессом быстрого растворения частиц и, как следствие, образованием углекислого газа в слабокислых средах, таких как опухоль, например. В работе [64] были представлены наночастицы (220 нм), состоящие из карбоната кальция и PLGA, поверхность которых была дополнительно модифицирована пептидом RVG. Увеличение контрастности УЗИ в области опухоли отмечалось через 30 минут после внутривенного введения. В исследовании Min K.H и др. [130] представлены наночастицы, полученные минерализацией матрицы из сополимеров ПЭГ-ПАспК и нагруженные доксорубицином. Авторы отмечают, что сразу после внутриопухолевого введения УЗ-контрастного усиления не произошло, и только через 30 минут после инъекции контраст начал возрастать. Контрастное усиление продолжалось до 120 минут (рисунок 12).

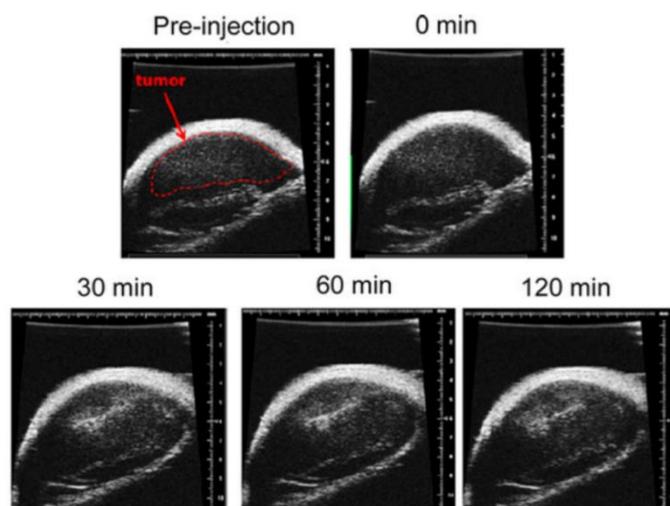


Рисунок 12 – Ультразвуковая визуализация опухоли SCC-7 *in vivo* путем внутриопухолевой инъекции DOX-CaCO₃-MNP [130]

Авторы статьи [131] разработали элегантную модель МРТ-контрастирования опухолевой ткани с использованием наноконъюгатов NaGdF₄-CaCO₃. Согласно гипотезе, хотя наночастицы NaGdF₄ встроены в структуру карбоната кальция, они отделены от протонов воды и имеют низкую контрастность T1 (состояние «ВЫКЛ»). Но когда под действием слабокислой опухолевой среды карбонат кальция начинает растворяться и высвобождать наночастицы NaGdF₄, позволяя передавать энергию от протонов воды ионам Gd³⁺, возникает яркий сигнал (состояние «ВКЛ»). Действительно, результаты экспериментов *in vivo* свидетельствуют о начале контрастирования подкожно выращенной опухоли у мыши через 30 минут, а через 195 минут соотношение контрастности опухоль/фон составляет ≈ 48 . Авторы статьи сравнили эффективность контрастирования опухоли ткани с использованием разработанных носителей и коммерчески доступного агента (Магневист) (рисунок 13). Соотношение опухоль/мышцы для наноконъюгата NaGdF₄-CaCO₃ в 61.6 раза выше, чем для Магневиста.

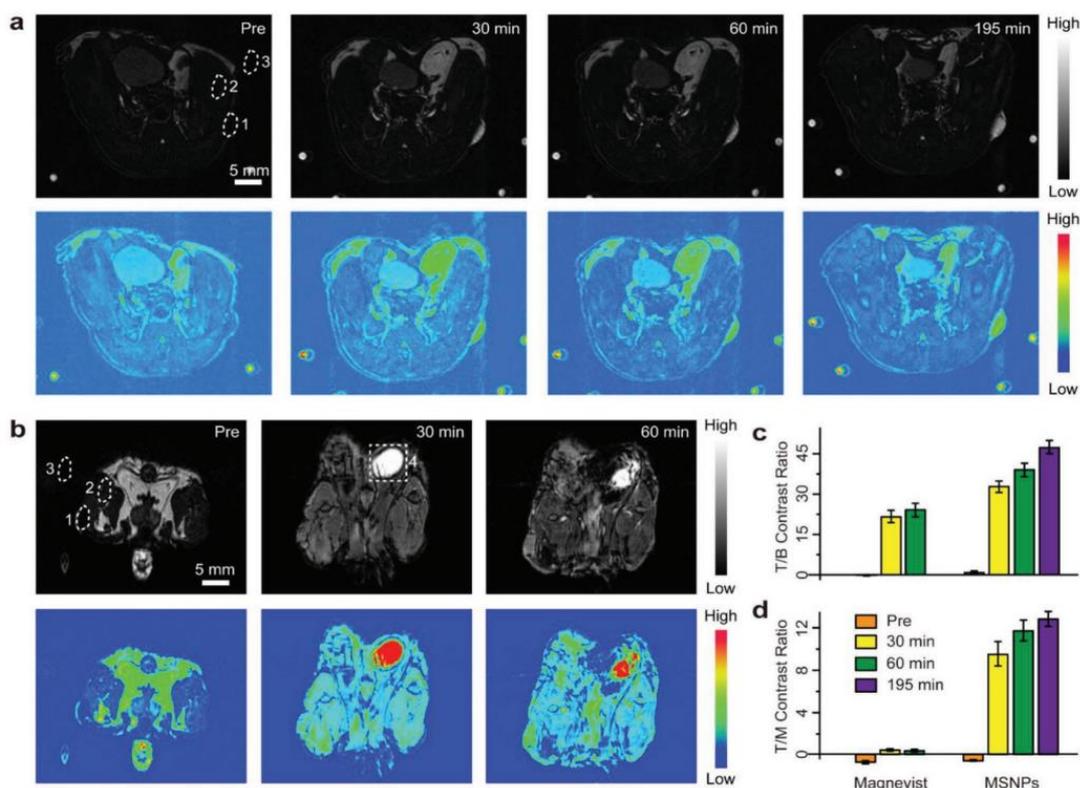


Рисунок 13 – Оценка контрастного усиления *in vivo*. а, б) T1-взвешенная МРТ и соответствующие псевдоцветные изображения мышей с опухолью после внутривенного введения MSNP (наноконъюгата) (а) и магневиста (б) в той же дозе (2.5 мкмоль Gd^{3+} для каждой мыши). Изображения были получены до и в разные моменты времени после введения контрастных веществ. Пунктирные кружки представляют интересующие области: 1) опухоль, 2) мышцы, 3) фон и 4) мочевого пузыря. Масштабные линейки для всех изображений составляют 5 мм. Небольшие пятна по углам — от аппарата кровообращения в МРТ-сканере. с,д) Коэффициенты контрастности опухоли к фону (Т/В) и опухоли к мышцам (Т/М) на основе соответствующих изображений МРТ. Значения, представленные как средние \pm стандартное отклонение. ($n = 3$) [131]

Похожий принцип получения T1-контраста представлен в [132]. Пэгилированные наночастицы $CaCO_3$ были загружены хлорином еб, хелатированным с Mn^{2+} и доксорубицином. Через 24 часа после внутривенного введения таких частиц сигнал в области опухоли увеличился в 8 раз. Авторы статьи также отметили корреляцию между интенсивностью контрастирования и

количеством высвобождаемого доксорубина, что потенциально позволяет контролировать ход терапии. В работе [133] продемонстрирована возможность использования носителей на основе карбоната кальция в качестве мультимодальной системы визуализации. В качестве дополнительных частиц выступали гибридные наночастицы CaCO₃-полидофамин, причем отмечается, что эффективность использования таких средств выше, чем у коммерческого Магневиста. Использование частиц Себ обеспечивает фотоакустический контраст, возможность отслеживать сигнал флуоресценции с помощью флуоресцентной томографии и ФДТ.

1.5 Выводы

Использование карбоната кальция с функциональной полимерной, белковой, ферментативной оболочкой является наиболее перспективным подходом к созданию адресной доставки большинства видов препаратов от противоопухолевых до противогрибковых. В представленном выше обзоре приведены данные по введению карбоната кальция различных кристаллографических форм. Рассмотрены подходы к созданию частиц и определены методы синтеза функциональных полимерных, ферментных и белковых оболочек. Носители на основе карбоната кальция могут использоваться как для обеспечения высокого терапевтического эффекта, так и для повышения контрастности в диагностике. Многие научные группы доказали эффективность и безопасность использования таких носителей при различных способах введения. Важно отметить, что частицы карбоната кальция, которые могут служить минеральным «ядром» для структур «ядро»-полимерная оболочка или полимерных капсул, сами по себе заслуживают внимания как носители лекарственных средств благодаря своей безопасности, биосовместимости, биоразлагаемости, простоте приготовления и пористой структуре. Благодаря специфической морфологии частицы ватерита могут эффективно инкапсулировать как высокомолекулярные, так и низкомолекулярные вещества, реализуя пролонгированное высвобождение и

биосенсорство. Следует подчеркнуть, что многие исследования продемонстрировали безопасность систем доставки, основанных на частицах карбоната кальция. Это доказано наблюдением за весом животных, гистологическим анализом, биохимическим анализом крови [98, 100, 102, 123, 133]. Конечно, для широкого использования минеральных частиц карбоната кальция с полимерной оболочкой необходимы дополнительные исследования, но имеющийся материал показывает перспективность используемого материала.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

Хлорид кальция (CaCl_2), карбонат натрия (Na_2CO_3), хлорид натрия (NaCl), этиленгликоль, фосфатно-солевой буфер (ФСБ), бычий сывороточный альбумин (БСА), антимикотический препарат «нафтифина гидрохлорид» (Нф), поли-L-аргинин с молекулярной массой 15-70 кДа (ПА), декстран сульфат с молекулярной массой 7-20 кДа (ДС), натриевая соль полиакриловой кислоты с молекулярной массой ~8000 Да (ПАК), Стрептавидин (10 ед/мг), рибонуклеиновая кислота дрожжей (РНК), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), диметилсульфоксид (ДМСО), этанол, соляная кислота, хлорная кислота (70%), набор для определения концентрации белка методом Брэдфорда были приобретены у Sigma-Aldrich (Сент-Луис, Миссури, США). NHS-эфир цианина 7 (Ци7) был приобретен в Lumiprobe (Москва, Россия). Тетраметилпродамин изотиционат (ТРИТЦ) был получен от ThermoFisher Scientific (Королевство Нидерландов). Гепарин натрия (Геп) был использован в форме раствора для инъекций 5000 Ед/мл (Белмедпрепараты, Беларусь). Порфиразин был предоставлен лабораторией Оптической Терапии Национального исследовательского Нижегородского государственного университета имени Н. И. Лобачевского. Биотинилированный и флуоресцентно меченный (активированный эфир Цианин 5 NHS) олигонуклеотид (молекулярной массой 25 848 Да) специфичный к молекуле клеточной адгезии эпителия (EPCAM) со следующей последовательностью (Biotin Pro)-
СТССТСТГАСТГТААССАСГАСАСГАСАААТГТСАГТГТАССГАСАСТСГ
САСАТТСТТАГСАТАГГТАГТССАГААГСС-(Ци5) был получен от ООО «НПФ Синтол». Золотые наностержни (ЗНС) были предоставлены Институтом Биохимии и Физиологии Растений и Микороорганизмов РАН. Все химические реагенты использовались без дополнительной очистки. На всех этапах экспериментов была использована деионизированная вода, полученная на установке очистки воды Milli-Q (Millipore, США).

В экспериментах с клеточными культурами были использованы культуральная среда F-12К (Gibco, Германия), DMEM («ПанЭко», Россия), MEM (ThermoFisher, Германия), инактивированная фетальная бычья сыворотка (ThermoFisher, Германия или «HyClone», США), смесь пенициллина и стрептомицина (ThermoFisher, Германия), L-глутамин («ПанЭко», Россия), раствор трипсина в этилендиаминтетрауксусной кислоте (1:1) («ПанЭко», Россия), фосфатно-солевой буфер без кальция и магния (ThermoFisher, Германия), Calcein AM (ThermoFisher), набор для определения пролиферации клеток CellTiter 96 Aqueous One Solution (Promega, Мэдисон, Висконсин, США) (реагент MTS), питательная среда Сабуро, содержащая 20 г/л пептона (ФБУН ГНЦ ПМБ Питательные среды, Россия), мальтоза (Лаверна, Россия).

2.2 Синтез частиц ватерита

В экспериментах по внутрилегочной доставке.

Для получения частиц ватерита (Вт) достаточно смешать две соли (хлорид кальция и карбонат натрия) в равных количествах. Изменяя условия синтеза (способ смешивания, наличие дополнительных агентов, температуру и т. д.), можно контролировать размер получаемых частиц в широком диапазоне от сотни нанометров [134] до нескольких микрометров [66]. Были использованы три метода для получения частиц трех размеров: 3.15, 1.35 и 0.65 мкм. Схематически синтезы представлены на рисунке 14.

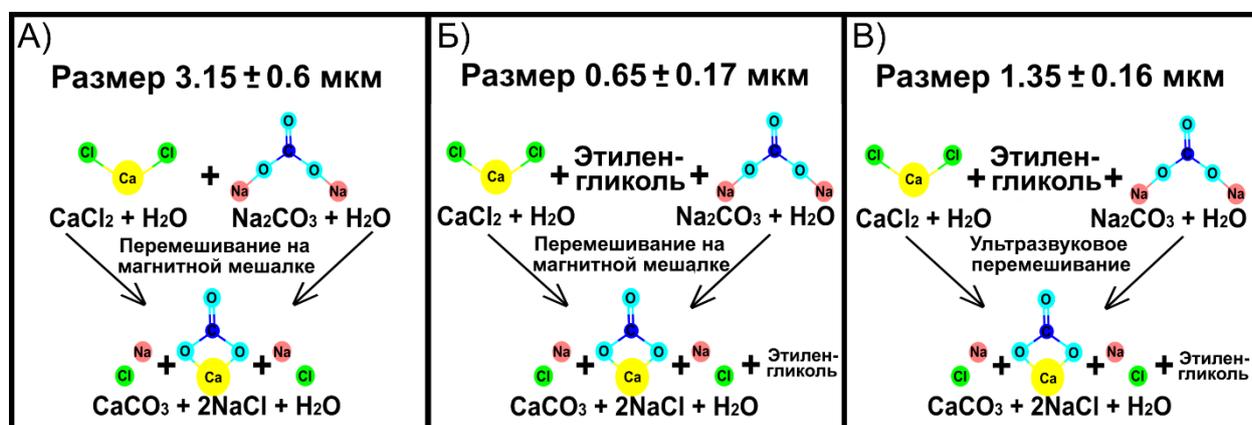


Рисунок 14 – Схематичное представление методики синтезов (а) при смешении эквимольных растворов солей, (б) при смешении эквимольных растворов солей в присутствии этиленгликоля, (в) при смешении с помощью ультразвука эквимольных растворов солей в присутствии этиленгликоля [23]

Сферические микрочастицы карбоната кальция диаметром 3.15 мкм были приготовлены, как описано в статье [66]. Вкратце, растворы карбоната натрия (0.33 М) и хлорида кальция (0.33 М) непрерывно перемешивали в равном объеме (2 мл) в течение 1 мин со скоростью 500 об./мин. на магнитной мешалке. Полученные частицы осаждали центрифугированием со скоростью 3000 rpm в течение 1 минуты.

Вт размером 0.65 мкм были получены в соответствии с протоколом, описанным в работе [135]. Вкратце, к каждому раствору соли (2 мл) был добавлен этиленгликоль (10 мл), затем полученные растворы солей перемешивали в течение 3 часов при 650 об./мин. на магнитной мешалке. Добавление этиленгликоля уменьшило молекулярную диффузию, уменьшив скорость роста кристаллов и вероятность зародышеобразования, что, в конечном итоге, стабилизировало кристаллы ватерита и привело к уменьшению размера частиц. Осаждение Вт было произведено при центрифугировании со скоростью 6000 об./мин. в течение 3 минут.

Вт размером 1.35 мкм были приготовлены в сочетании двух методов: увеличения вязкости реакционной смеси путем добавления этиленгликоля, как описано в предыдущем методе, и с использованием ультразвукового перемешивания, как описано в материалах статьи [136] для синтеза в воде. Смесь двух солей и этиленгликоля в качестве растворителя в соотношении 17 и 83% соответственно перемешивали в течение 15 мин при ультразвуковой обработке ультразвуковым гомогенизатором Sonopuls (Bandelin, Германия) с частотой 20 кГц и удельной мощностью 1 Вт/см². За счет непрерывной работы ультразвукового гомогенизатора температура реакционной смеси значительно

повысилась. Чтобы уменьшить этот эффект, стакан со смесью был помещен в холодную воду. Температура воды поддерживалась на уровне 10°C за счет добавления льда. Таким образом, был получен температурный градиент от 33°C вокруг стержня ультразвукового гомогенизатора до 10°C возле стеклянных стенок. В этом случае локальное повышение температуры приводило к увеличению размера Вт в 2 раза по сравнению с методами, в которых перемешивание реакционной смеси в присутствии этиленгликоля осуществлялось на магнитной мешалке. Осаждение Вт было произведено центрифугированием со скоростью 6000 об./мин. в течение 3 минут.

Использование глицерина вместо этиленгликоля позволяет получать Вт субмикронного размера [46]. Вкратце, равные объемы (0.4 мл) водных растворов хлорида кальция (0.5 М) и карбоната натрия (0.5 М) добавляли к 4 мл глицерина при постоянном перемешивании (500 об/мин) и оставляли реакционную смесь на 90 мин при комнатной температуре. Затем Вт осаждали путем центрифугирования при 7500 об/мин в течение 1 мин.

После осаждения полученных Вт при каждой синтезе были осуществлены три промывки деионизованной водой и одна промывка этанолом. Затем полученные осадки были высушены при 60° С в течение 1 часа.

В экспериментах с барназой

Чтобы синтезировать Вт для последующей иммобилизации барназы (Бн) был использован следующий протокол [46]. Равные объемы (0.4 мл) водных растворов CaCl_2 (0.5 М) и Na_2CO_3 (0.5 М) были введены при перемешивании в 4 мл глицерина. Итоговая смесь была оставлена на магнитной мешалке при 500 об/мин на 90 мин. Затем частицы были несколько раз промыты деионизованной водой путем центрифугирования при 7500 об/мин в течение 1 мин. После промывки частицы были высушены в печи при температуре 70°C в течение 3 часов. Во избежание ферментативной деградации и предотвращения контаминации образцов все этапы приготовления частиц «ядро»-оболочка и их

функционализация олигонуклеотидами были проведены в стерильных условиях. Иммунизация Бн на Вт была основана на электростатической адсорбции отрицательно заряженного сульфата декстрана (ДС) и положительно заряженной барназы (Бн). К 3.5 мг частиц было добавлено 2 мл водного раствора ДС (2 мг/мл, рН 6.5) с последующей инкубацией в течение 30 минут на шейкере при 1200 об/мин. Затем частицы трижды были промыты сверхчистой водой путем центрифугирования образца при 7500 об/мин в течение 1 мин. После промывки к частицам, покрытым ДС, был добавлен 1 мл Бн (0.5 мг/мл) в буфере ЭДТА (0.01 мМ, рН 8.0), и образец был инкубирован еще 30 мин на шейкере при 1200 об/мин. Затем частицы один раз были промыты сверхчистой водой путем центрифугирования при 7500 об/мин в течение 1 мин. Используя этот протокол, были подготовлены частицы ядро-оболочка с одним и двумя ферментными слоями: ДС/Бн/ДС и (ДС/Бн)₂/ДС. Чтобы использовать частицы с флуоресцентным маркером перед осаждением ДС и Бн, частицы были инкубированы либо в водных растворах ПА, меченного ТРИТЦ (рН 6.5), либо в водных растворах БСА, меченного Ци7 (рН 6.5), на шейкере при 1200 об/мин в течение 30 мин. Для удаления несвязавшихся молекул частицы трижды были промыты сверхчистой водой путем центрифугирования образцов при 7500 об/мин в течение 1 мин.

В экспериментах с порфиразином.

Синтез был проведен согласно протоколу, опубликованному в [135], и включал в себя повышение вязкости реакционной смеси за счет использования этиленгликоля. Пз был иммобилизован в Вт путем инкубации 55 мг Вт с 2 мл водного раствора Пз (10 мМ) при комнатной температуре в течение 1 часа. Загруженные частицы были промыты центрифугированием, затем осадок ресуспензировали в ФСБ (рН 7.4) для экспериментов *in vivo*.

В экспериментах с нафтифином

В основу синтеза Вт легла методика, описанная в [135] с небольшой модификацией для иммобилизации антимикотика методом соосаждения. Так, 0.33 М водные растворы солей CaCl_2 и Na_2CO_3 объемом по 2 мл были смешаны с 10 мл этиленгликоля. Предварительно к смеси этиленгликоля и водного раствора CaCl_2 было добавлено 5 мг Нф. Перемешивание полученной реакционной смеси было проведено с помощью магнитной мешалки со скоростью 700 об/мин в течение 3 часов. Полученные частицы были осаждены центрифугированием при скорости 3800g, а затем трижды промыты водой и один раз этанолом. Затем частицы были высушены при 37°C в течение ночи. Таким образом были получены Вт носители с инкапсулированным Нф. Небольшое количество высушенных частиц было суспензировано в воде и нанесено на проводящую подложку для визуализации с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) MIRA II LMU (Tescan, Чехия) при рабочем напряжении 30 кВ. Распределение частиц карбоната кальция по размерам с иммобилизованным Нф и без него рассчитывали с помощью бесплатного программного обеспечения ImageJ. (<https://imagej.net/Welcome>) путем измерения большого диаметра 300 частиц для каждого образца.

2.3 Протоколы конъюгации высокомолекулярных веществ и низкомолекулярных флуоресцентных красителей

Процедура конъюгации БСА и флуоресцентного красителя Ци7 была проведена в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем (Lumiprobe). Флуоресцентный краситель Ци7 (7 мг) растворяли в безводном ДМСО в объеме 5 мл, добавляли к 45 мл раствора БСА (100 мг) в солевой фосфатный буфер (ФБС) (рН 8.3) и перемешивали в течение ночи при 4° С. Полученный раствор БСА, конъюгированного с Ци7, отмывали от избытка реагентов диализом против деионизованной воды в течение 3 дней с ежедневной заменой воды. После диализа раствор БСА-Ци7 переливали в 50-миллилитровую пробирку и хранили в холодильнике.

ТРИТЦ химически конъюгировали с ПА по следующей методике: 5 мл ПА в борном буфере (20 мг/мл, рН 9) смешивали с 1 мл ТРИТЦ в ДМСО (5 мг/мл) при комнатной температуре в течение 1 часа. Для отделения несвязавшегося красителя от конъюгата ПА-ТРИТЦ использовали диализ против деионизованной воды (6 л).

2.4 Спектрофотометрия

В экспериментах с нафтифином

Количественная оценка эффективности загрузки контейнеров была проведена путем измерения спектров флуоресценции в диапазоне 312-500 нм при возбуждении излучением на длине волны 285 нм при помощи прибора (Synergy H1, BioTek). Количество загруженного Нф было оценено как по супернатантам, так и с помощью растворения 4 мг полученных частиц в 0.1 М растворе соляной кислоты. Для подсчетов были использованы калибровочные прямые, определяющие зависимость интенсивности флуоресценции раствора Нф от концентрации в исследуемой среде (рисунок 15).

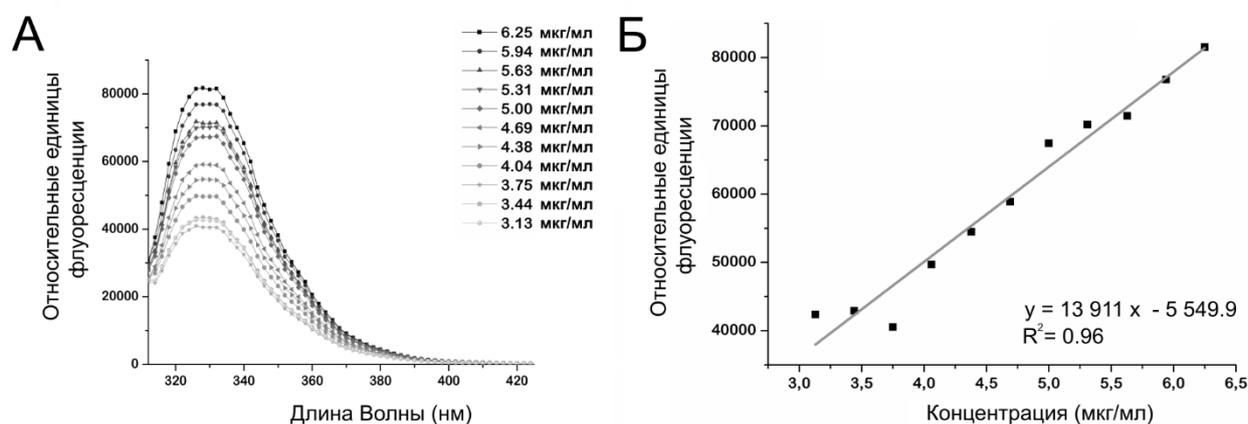


Рисунок 15 – Калибровка растворов нафтифина в этиленгликоле. а) спектры растворов нафтифина с различной концентрацией в этиленгликоле; б) калибровочная прямая, полученная для зависимости относительных флуоресцентных единиц от концентрации нафтифина в растворе этиленгликоля

В экспериментах с конъюгатом БСА-Ци7.

Была получена зависимость относительных флуоресцентных единиц (RFU) от концентрации конъюгата БСА-Ци7 (Рисунок 16) для дальнейшего использования при калькуляции его количества, адсорбированного на частицы. Измерения флуоресценции растворов были произведены с помощью микропланшетного ридера (Synergy H1, BioTek). Пара возбуждение / эмиссия были установлены 750 / 777 нм. В дальнейшем измерения всех супернатантов были произведены при аналогичных настройках, и концентрации конъюгата рассчитаны по представленной калибровочной прямой.

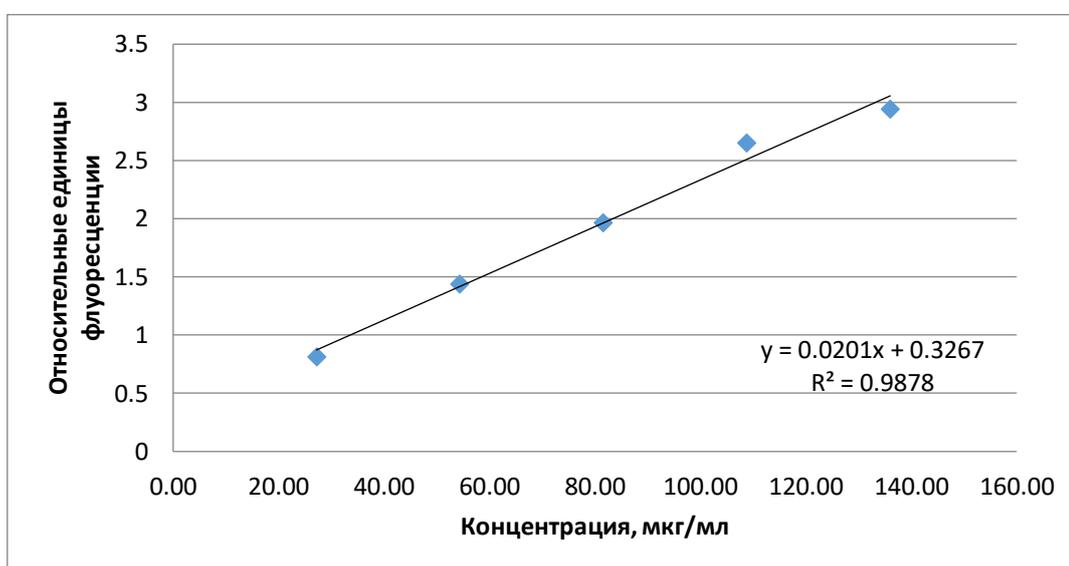


Рисунок 16 – Калибровочная прямая, определяющая зависимость относительных флуоресцентных единиц от концентрации конъюгата бычьего сывороточного альбумина и флуоресцентного красителя Ци 7

В экспериментах с порфиразином.

Спектры флуоресценции растворов Пз были измерены с помощью спектрофлуориметра FluoroMax-4 (HORIBA Jobin Yvon, США). Температуру образцов контролировали с помощью термостатического держателя кювет Peltier Sample Coller F3004 (HORIBA Jobin Yvon, США).

Для определения количества молекул Пз, иммобилизованных в Вт, и кинетики их высвобождения из Вт, концентрация Пз была определена в супернатантах спектрофотометрически с помощью микропланшетного ридера (Synergy MX BioTeck, США). Были установлены следующие длины волн возбуждения/эмиссии: 580 нм/640 нм. Флуоресценция раствора Пз была измерена перед адсорбцией на Вт и после. Разделение Пз-Вт и раствора с неадсорбированными молекулами Пз в Вт-матрицу были произведено с помощью центрифугирования при 600×g. Разность сигналов определяла количество Пз, загруженного в Вт. Эффективность инкапсуляции была рассчитана как массовое соотношение Пз и Вт.

Кинетика высвобождения Пз была изучена при суспензировании Пз-Вт в воде или ФСБ и инкубировании при 37°C в тщательно закрытых центрифужных пробирках. Для получения супернатантов образцы были центрифугированы при 600×g. Концентрация Пз в супернатантах была рассчитана согласно процедуре, описанной выше.

В экспериментах с золотыми наностержнями.

К сухой навеске Вт массой 3 мг был добавлен 1 мл коллоидного раствора наностержней золота (150 мкг/мл). Полученная смесь была инкубирована 1 час при постоянном встряхивании, а затем осадок трижды промывали деионизированной водой. Супернатанты были собраны при каждой промывке для определения остаточной концентрации ЗНС по калибровочной прямой (Рисунок 17), построенной по значениям оптической плотности растворов с известной концентрацией ЗНС на длине волны 820 нм [138]. Количество ЗНС, адсорбированных на Вт, было рассчитано как разница между концентрациями ЗНС в растворах до и после адсорбции.

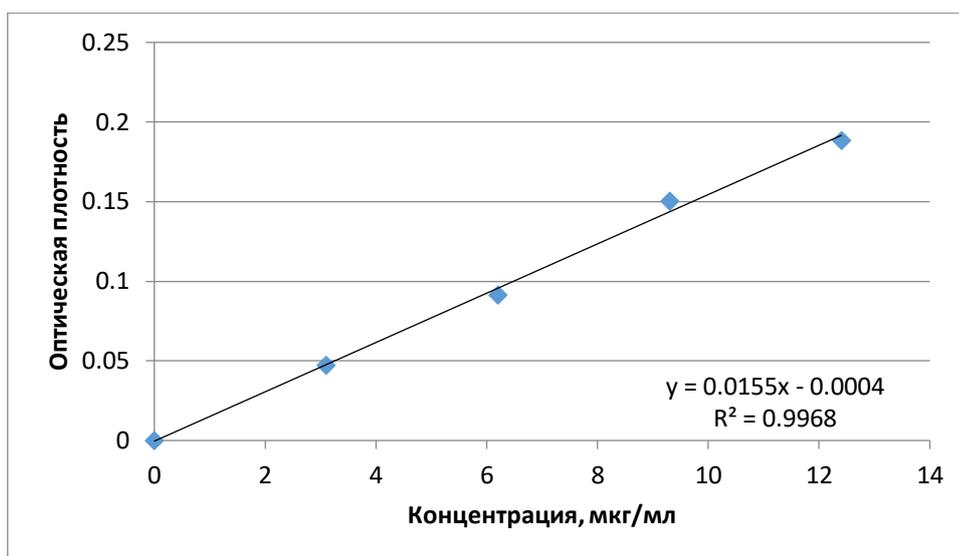


Рисунок 17 – Калибровочная прямая, определяющая зависимость оптической плотности растворов от концентрации ЗНС

2.5 Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния для детекции нафтифина в составе частиц ватерита

Для подтверждения включения молекул лекарственного препарата Нф в структуру субмикронных Вт были изучены спектры комбинационного рассеяния полученных образцов. Измерения спектров были проведены с помощью спектрометра Renishaw InVia (Renishaw) с объективом 50X/0.5 п.а., на длине волны лазера 532 нм, мощностью 0.15 мВт и CCD детектором в диапазоне колебательных частот от 800 до 2000 см⁻¹. Статистика набиралась минимум по 5 частицам из разных участков образца, и измерение проводилось в 3-х точках для каждой частицы.

2.6 Формирование полимерных оболочек на частицах ватерита с иммобилизованным нафтифином

Были приготовлены растворы полимеров (полиаргинин и декстран сульфат) в физиологическом растворе с концентрациями 1 мг/мл. Раствор гепарина был использован в исходной концентрации.

Цикл адсорбции одного слоя полимера представлял из себя следующее. К навеске Вт с иммобилизованным Нф добавляли 1 мл полимера, получившаяся смесь была суспензирована и оставлена на 15 минут при постоянном встряхивании (600 об./мин.). Затем частицы с нанесенным слоем осаждали с

помощью центрифугирования на скорости 3000 об./мин. в течении 1 минуты. После осуществляли однократный процесс промывки деионизованной водой. Для адсорбции следующего слоя все действия повторяли с новым полимером.

Таким образом, были созданы образцы с несколькими видами оболочек, а именно: гепариновая оболочка ([Вт+Нф]+Геп), один ([Вт+Нф]+ПА/ДС) и два ([Вт+Нф]+[ПА/ДС]₂) бислоя полиаргинина и декстран сульфата, а также комплексная оболочка из двух бислоев ПА/ДС, завершающаяся Геп ([Вт+Нф]+[ПА/ДС]₂+Геп).

2.7 Исследование стабильности ватеритных контейнеров с инкапсулированным нафтифином в различных средах

Было проведено исследование кинетики перекристаллизации Вт, содержащих антимикотик (Нф), как чистый, так и с адсорбированными полимерными оболочками, при инкубации в различных средах: деионизованная вода, физиологический раствор. Для этого образцы (масса Вт, загруженных антимикотиком в каждом образце 5 мг) были инкубированы в указанных средах в объеме 1 мл при постоянном встряхивании 700 об./мин. и температуре 25°C. Каждый день (в течение 10 дней) были отобраны капли объемом 1 мкл из каждого образца и нанесены на кремниевую подложку для изучения морфологической структуры Вт с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) MIRA II LMU (Tescan).

2.8 Исследование динамики высвобождения нафтифина из ватеритных матриц-носителей

Было проведено исследование динамики высвобождения Нф из Вт в модельных средах: деионизованная вода, физиологический раствор. Для этого образцы (масса Вт, загруженных антимикотиком, в каждом образце 5 мг) были инкубированы в указанных средах в объеме 1 мл при постоянном встряхивании 700 об./мин. и температуре 25°C. Число повторностей образцов каждого вида – 3. Каждый день (в течение 10 дней) для определения концентрации Нф, вышедшего из Вт, жидкая фаза образцов анализировалась спектрофотометрически при помощи прибора (Synergy H1, BioTek) после

центрифугирования. Для этого 20 мкл жидкой фазы было смешано с 600 мкл этиленгликоля и добавлено в 96-луночный планшет в объеме 200 мкл. Измерение уровня флуоресценции образца проводилось на длине волны 332 нм при возбуждении излучением на длине волны 285 нм. Ежедневное изменение объема каждого образца было учтено при подсчете высвободившегося Нф. Повторность измерений для каждого образца каждого вида – 3. Расчет вышедшего Нф из состава Вт было произведено в соответствии с полученной калибровочной прямой (рисунок 15).

Исследование стабильности полученных образцов и динамики высвобождения препарата было осуществлено на разных образцах.

2.9 Определение количества фермента барназа, иммобилизованного в частицы ватерита, методом Брэдфорда

Количество фермента, внедренного в Вт, определяли с помощью колориметрического анализа белка (метод Брэдфорда, в котором БСА был использован в качестве стандарта). После каждого осаждения фермента частицы центрифугировали и тщательно собирали надосадочную жидкость для дальнейшего анализа. Чтобы удалить любые частицы, содержащие ферменты, из супернатанта, была проведена дополнительная стадия центрифугирования образцов на высокой скорости (12000 об/мин в течение 5 мин). Для определения количества фермента в Вт рассчитывали эффективность загрузки (LE) и емкость загрузки (LC), используя следующие выражения:

$$LE = ((M_u - M_c)/M_u) \times 100\% \quad [1],$$

$$LC = ((M_u - M_c)/M_c) \times 100\% \quad [2],$$

где M_c соответствует количеству фермента, оставшемуся в супернатанте (не адсорбированному на частицы ватерита), M_u - исходное количество фермента, а M_c - масса частиц (в мг).

2.10 Дополнительная функционализация частиц ватерита с иммобилизованным ферментом барназа олигонуклеотидами, специфичными к ЕрСАМ

Для модификации структур «ядро-оболочка» ДС/Бн/ДС и (ДС/Бн)₂/ДС олигонуклеотидами, специфичными к ЕрСАМ, частицы дополнительно покрывали двумя слоями полиэлектролитов. Для этого 1 мл раствора ПА с концентрацией 1 мг/мл (в растворе 0.15М NaCl, pH 6.5) добавляли к частицам и инкубировали при постоянном встряхивании на шейкере при 1200 об/мин в течение 15 мин. После инкубации частицы трижды промывали деионизованной водой путем центрифугирования образцов при 7500 об/мин в течение 1 мин. Затем к частицам добавляли 1 мл водного раствора ПАК с концентрацией 1 мг/мл (pH 6.5) и инкубировали еще 15 мин на шейкере при 1200 об/мин. Затем частицы трижды промывали центрифугированием. Для активации карбоксильных групп ПАК частицы «ядро-оболочка» сначала инкубировали в 0.5 мл 1 мг/мл EDC в ФСБ (pH 7.2) на шейкере при 1200 об/мин в течение 15 мин, а затем в 0.5 мл 1 мг/мл сульфо-NHS в ФСБ (pH 7.2) еще 15 мин. Затем в смесь вводили 0.5 мл 0.1 мг/мл стрептавидина в ФСБ (pH 7.2) и образец инкубировали в течение ночи при 4 °С в ротаторе. После этого частицы тщательно промывали ФСБ (pH 7.2). Для присоединения олигонуклеотидов к частицам, конъюгированным со стрептавидином, к частицам добавляли 1×10^{-9} М биотинилированного олигонуклеотида, специфичного к ЕрСАМ в 1 мл ФСБ (pH 7.2), и полученную смесь перемешивали в ротаторе в течение 2 ч при 4°С. На заключительном этапе образец трижды промывали с помощью центрифугирования (в ФСБ) для удаления непрореагировавшего олигонуклеотида. Подтверждение связывания олигонуклеотида с ВТ было произведено с помощью проточного цитометра CytoFLEX (Beckman Coulter) при длинах волн лазера 488 нм и 638 нм. Данные были проанализированы с использованием программного обеспечения CytExpert.

2.11 Измерение активности барназы

Определение активности фермента барназа (Бн) было проведено согласно протоколу, описанному в [139]. Вкратце, 160 мкл дрожжевой РНК с концентрацией 2 мг/мл в Трис-НСl-буфере (0.125 М, рН 8.5) были смешаны с 40 мкл 0.015 мг/мл Бн в Трис-НСl-буфере (0.125 М, рН 8.5). Затем смесь была инкубирована в термошейкер при 37°C в течение 15 мин. Для остановки реакции к смеси были добавлены 200 мкл 6 % хлорной кислоты, и инкубация была продолжена при 0°C в течение 15 мин. Для удаления нерасцепленной РНК образцы были центрифугированы при 16 000 g в течение 10 мин при 0°C. Поглощение надосадочной жидкости на 260 нм было определено относительно контрольного образца (буфер Трис-НСl, 0.125 М, рН 8.5). За единицу активности было принято количество Бн, которое увеличивало поглощение на одну оптическую единицу на длине волны 260 нм. Рибонуклеазная активность одного и двух слоев Бн, иммобилизованных в Вт, была измерена через разные промежутки времени в водном растворе согласно протоколу, приведенному выше. Также была измерена активность одного и двух слоев Бн, вошедших в состав функционализированных ЕрСАМ частиц. В качестве эталонных образцов были использованы Вт, покрытые слоем ДС, и Вт, функционализированные ЕрСАМ, не содержащие фермента.

2.12 Взаимодействие частиц ватерита с компонентами легочного сурфактанта *in vitro*

Полученные Вт размером 0.65 мкм инкубировали при концентрации 10 мг/мл с деионизированной водой, физиологическим раствором, гидрофильной или гидрофобной фракциями легочного сурфактанта при постоянном встряхивании при 37°C, в определенные моменты времени (1, 3, 5, 7, 9, 24, 32, 56, 96 и 144 ч) 1 мкл каждого образца отбирали и наносили на кремниевую подложку для анализа морфологии частиц с помощью сканирующего электронного микроскопа MIRA II LMU (Tescan).

2.13 Клеточные линии

В экспериментах с ферментом Барназа

Линия клеток A549 была культивирована в среде F-12K (Gibco, Германия), дополненной фетальной бычьей сывороткой до конечной концентрации 10% и 1% смесью пенициллина и стрептомицина в соответствии с протоколом, предоставленным АТСС.

В экспериментах с порфиразином.

Клетки аденокарциномы толстой кишки мыши (СТ-26.WT, АТСС) были культивированы в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки («HyClone», США), 4 мМ L-глутамин («ПанЭко», Россия) в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С. На каждом этапе пассирования клетки обрабатывали раствором трипсина в этилендиаминтетрауксусной кислоте (1:1) («ПанЭко», Россия).

В экспериментах с нафтифином

В экспериментах с линией клеток NHDF (нормальные человеческие дифференцированные фибробласты) была использована среда Minimum Essential Medium (MEM) (ThermoFisher, Германия) с добавлением 10 % инактивированной эмбриональной бычьей сыворотки (ThermoFisher, Германия) и 1% смеси стрептомицина и пенициллина (ThermoFisher, Германия). Для визуализации клеток с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа был использован флуоресцентный краситель Calcein AM (ThermoFisher).

Для культивирования штамма *Candida albicans* АТСС 885-653 была использована питательная среда Сабуро, содержащая 20 г/л пептона (ФБУН ГНЦ ПМБ Питательные среды, Россия) и 80 г/л мальтозы (Лаверна, Россия).

2.14 Оценка цитотоксического эффекта частиц ватерита с иммобилизованной барназой и различным типом оболочки

Оценка токсичности Вт с иммобилизованной Бн была произведена с помощью набора для анализа пролиферации клеток CellTiter 96 Aqueous One Solution (Promega, Мэдисон, Висконсин, США). Клетки A549 были высеваны в 96-луночный культуральный планшет из расчета 2×10^3 клеток на лунку и

культивированы в течение ночи. После этого к клеткам были добавлены частицы с различными оболочками (ДС, (ДС/Бн)/ДС, (ДС/Бн)₂/ДС) без и с олигонуклеотидом, специфичным к ЕрСАМ, в количестве 100, 500, 1000, 2500, 5000 частиц на клетку, и инкубация была продолжена в течение следующих 72 часов. Затем клетки были промыты ФСБ для удаления неинтернализированных частиц. Далее, в каждую лунку была добавлена питательная среда (100 мкл) с 20% от объема (20 мкл) реагента MTS, инкубирование с клетками длилось 3 часа. Наконец, было измерено поглощение при 490 нм с использованием многомодового планшет-ридера The Infinite 200 PRO (TECAN).

2.15 Интернализация носителей на основе частиц ватерита эукариотическими клетками

В экспериментах с барназой

Клетки A549 в чашках Петри (35 мм) инкубировали в течение 1 и 4 часов с частицами Вт, нагруженными барназой, немодифицированными и модифицированными ЕрСАМ: (ДС/Бн)₂/ДС и (ДС/Бн)₂/ДС/ЕрСАМ в концентрации 100 частиц на клетку. Клетки, инкубированные в течение 1 часа без добавления каких-либо частиц, использовали в качестве контроля. Культуру клеток промывали 2 раза ФСБ для удаления свободных частиц после расчетного времени инкубации. Затем клетки фиксировали ледяным этанолом (70%) и окрашивали реагентом ActinGreen™ 488 ReadyProbes™ и Hoechst 33258 в течение 15 минут и промывали 2 раза ФСБ. После промывки к клеткам снова добавляли ФСБ и проводили конфокальную флуоресцентную микроскопию.

Поглощение частиц Вт, содержащих барназу, клеточной линией A549 было визуализировано с помощью системы Zeiss LSM 800 AiryScan с объективом LD Plan-Neofluar 20x/0,4 Corr M27. Hoechst 33258, окрашивающий ядра, возбуждали на длине волны 405 нм и детектировали при длине волны от 420 до 475 нм, ActinGreen, окрашивающий F-актин в цитоскелете клетки, возбуждали при длине волны 488 нм и детектировали при длине волны от 500 до 526 нм, ТРИТЦ

(маркеры частиц) возбуждали при длине волны 561 нм и детектировали на длине волны от 579 до 700 нм.

Оценка доли клеток, захвативших частицы, была произведена с помощью анализа флуоресцентных изображений. Число захваченных частиц не учитывалось. Общее число клеток было подсчитано по числу ядер, окрашенных Hoechst 33258 в поле зрения. Затем было подсчитано число клеток, для которых частицы, окрашенные ТРИТЦ, были обнаружены во внутреннем пространстве клетки, окрашенной ActinGreen. Доля клеток с интернализированными частицами была определена как соотношение числа клеток, связанных с исследуемыми частицами, к общему числу клеток, выраженное в процентах. Для каждого типа частиц и момента времени было проанализировано не менее 5 изображений.

В экспериментах с нафтифином

Захват Вт, нагруженных антимикотиком Нф, окрашенных тетраметилпроламином (ТРИТЦ), с различными оболочками изучали на культуре клеток дермальных фибробластов человека (Normal Human Differential Fibroblastic, NHDF).

Адсорбция ТРИТЦ на поверхность Вт была проведена после иммобилизации противогрибкового препарата путем инкубирования суспензии частиц в растворе ТРИТЦ в течение 15 минут. Затем были нанесены следующие оболочки: гепариновая ([Геп]), двойной бислой полиэлектролитов ([ПА/ДС]₂) и комплексная ([ПА/ДС]₂+Геп).

Было проведено культивирование клеток с частицами в течении 24-х часов с концентрацией 10 частиц/клетку. Затем было осуществлено окрашивание флуоресцентным красителем Calcein AM. После 24-х часов инкубации с исследуемыми образцами, клеточные культуры промывали 2 раза раствором фосфатного буфера для удаления свободных частиц и непрореагировавшего Calcein AM. После промывки к клеточной культуре вновь добавляли питательную среду MEM.

Микроскопическое исследование культуры клеток было проведено в боксе при 37°C и 5% CO₂. Для оценки эффективности захвата клетками исследуемых

частиц были получены конфокальные флуоресцентные изображения клеток с интернализированным NfC. Размер анализируемых изображений составлял 500 × 500 мкм. Последующий анализ изображений проводили с использованием программного обеспечения ImageJ, на основе которого были построены круговые диаграммы для каждого типа образца.

2.16 Исследование антимикотических свойств частиц ватерита с иммобилизованным нафтифином

Были изучены антимикотические свойства Вт с иммобилизованным Нф по сравнению со свободным раствором Нф в ДМСО. Также оценивали цитотоксическое действие ДМСО на клетки грибов. Было обнаружено, что выбранная концентрация ДМСО для растворения Нф (2.5% по весу) не подавляла рост грибов. В качестве экспериментальной модели использовали стандартный штамм *C. albicans* ATCC 885-653. Антимикотическую активность исследуемых препаратов определяли методом серийных микроразбавлений с определением МПК [140]. Микроорганизмы культивировали на мальтозном бульоне Saburo в течение 36 часов в 96-луночной планшете, содержащем 200 мкл среды (100 мкл 2-х кратного мальтозного бульона Saburo; 45 мкл физиологического раствора; 50 мкл клеточной суспензии; 5 мкл образца; pH - 7) при 28 ° С. Антимикотический эффект препаратов оценивали по изменению оптической плотности (ОП) культуральной жидкости при длине волны 600 нм с использованием микропланшетного ридера Synergy H1 каждые 12 часов. Эффективность подавления роста дрожжеподобных грибов *C. albicans* (Э_П) определяли следующим образом:

$$\text{Э}_\text{П} = \frac{A_{600}^{\text{Контр}} - A_{600}^{\text{Эксп}}}{A_{600}^{\text{Контр}}} * 100\% \quad [3],$$

где $A_{600}^{\text{Эксп}}$ – это оптическая плотность экспериментального образца (суспензия клеток инкубированная со свободным Нф или иммобилизованным в Вт), измеренная на длине волны 600 нм; $A_{600}^{\text{Контр}}$ – оптическая плотность контрольного образца (суспензия клеток без добавления каких-либо субстанций), измеренная на длине волны 600 нм.

2.17 Эксперименты с животными

В экспериментах по внутрилегочной доставке

Все животные для данного исследования содержались в виварии Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарева в стандартных условиях со свободным доступом к пище и воде. Все процедуры на животных были проведены в соответствии с протоколом, утвержденным комитетом по уходу и использованию животных Медицинского института Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарева (протокол комитета по этике №50 от 20.05.2017). Мышей Balb/c, смешанной популяции в возрасте 6–8 недель, умерщвляли смесью Золетила (40 мг/кг, 50 мл, Virbac SA, Каррос, Франция) и 2% Рометар (10 мл и 10 мг/кг, Spofa, Чехия) с помощью внутрибрюшинной инъекции данной смеси в высокой дозе.

В экспериментах с барназой.

Все эксперименты *in vivo* были проведены на мышах линии Balb/c в возрасте 6-8 недель в соответствии с разрешением Этического комитета Института биологии развития (Москва, Россия), а экспериментальные протоколы соответствовали соответствующим институциональным и национальным руководствам. Для внутритрахеальной инстиляции (в.т.) мышам вводили наркоз (Золетил 50 мг/кг, ксилазин 5 мг/кг). Умерщвление животных было осуществлено методом сервикальной дислокации.

В экспериментах с нафтифином.

Мыши линии Balb/c смешанной популяция в возрасте 6–8 недель были размещены в помещении для ухода за животными ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского Минздрава России в стандартных условиях со свободным доступом к пище и воде. Все процедуры на животных были выполнены в соответствии с протоколом, утвержденным этическим комитетом ФГБОУ ВО Саратовский ГМУ им. В. И. Разумовского Минздрава России (протокол Этической комиссии №8 от 10.04.2018).

В экспериментах с порфиразином.

Все эксперименты на животных были одобрены комитетом по биоэтике Нижегородского государственного университета. Эксперименты были проведены в строгом соответствии с Законом 708н (23.08.2010) Национального Минздрава РФ, утверждающим Правила лабораторной практики по уходу и использованию лабораторных животных, и Директивой 2010/63 ЕС Европейского Парламента (от 22 сентября 2010 г.) о защите животных, используемых в научных целях.

2.18 Получение бронхоальвеолярного лаважа

Бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ) был отобран аликвотами по 0.5 мл с помощью стерильного физиологического раствора до общего объема 10 мл, как описано [141]. Извлеченные образцы БАЛ были центрифугированы при 400 g и 4°C в течение 10 минут для удаления клеток. Бесклеточные супернатанты БАЛ были разделены на гидрофильную и гидрофобную фракции легочного сурфактанта центрифугированием (20000 g в течение 60 минут при 4°C), как описано ранее [142]. Осадок биофизически активной гидрофобной фракции был ресуспендирован в стерильном физиологическом растворе и заморожен при -20°C до последующего использования. Супернатант от высокоскоростного центрифугирования, гидрофильная фракция, содержащий растворимые белки и биофизически неактивные формы легочного сурфактанта, был перенесен в свежую пробирку и также заморожен при -20°C для будущих манипуляций.

2.19 Аллографтная модель рака кишечника мыши, индуцированная подкожной инъекцией

Эксперименты с порфиразином in vivo

Эксперименты на животных проведены на мышах-самках Balb/c (возраст 7-8 недель, масса 16-20 г, количество животных 37). Волосы на задних лапах были удалены триммером и кремом для депиляции. В дорсальную сторону левой задней конечности внутримышечно была введена суспензия 0.5×10^6 клеток аденокарциномы CT26.WT (ATCC® CRL-2638™) в 50 мкл ФСБ.

2.20 Биораспределение частиц ватерита *in vivo*

В экспериментах по внутрилегочному введению.

Вт (0.65, 1.35 и 3.15 мкм), содержащие флуоресцентный конъюгат БСА-Ци7, вводили интратрахеально мышам линии Balb/c в возрасте 6-8 недель, как описано в работе [143]. В качестве контроля был использован конъюгат БСА-Ци7, доза флуоресцентного красителя Ци7 составляла 300 нг для каждого введения. Все мыши (n = 3-4 в каждой группе) были визуализированы перед и через 5, 20 минут и 24, 48 и 72 часа после введения. Поведение и самочувствие мышей оставались нормальными после интратрахеальной инстилляцией, а дыхание под анестезией было стабильным. После всех манипуляций физическая активность и аппетит мышей оставались в норме в течение всего времени наблюдения (3 дня).

В указанное время после введения частиц (24, 48 и 72 часа) биораспределение флуоресцентного сигнала в легких, печени, почках, желудке и кишечнике живых анестезированных мышей анализировали с помощью системы визуализации IVIS® Lumina (Xenogen Corp.) с набором фильтров ICG (возбуждение, 710–760 нм; испускание, 810–875 нм). Все флуоресцентные изображения были получены с 5-секундной экспозицией и нормализованы на интенсивность флуоресцентных изображений, полученных при эталонном освещении. Интенсивность флуоресценции определяли количественно с использованием программного обеспечения Living Image (Xenogen Corp). Для получения числовых данных об уровне интенсивности в интересующей области было использовано программное обеспечение Fiji (<https://fiji.sc>). Результирующий уровень флуоресценции интересующей области был рассчитан как разница между эффективностью излучения в определенный момент времени и начальным уровнем (до интратрахеальной инстилляцией) для каждой мыши.

В экспериментах с барназой

Анализ биораспределения проводили после внутривенного или интратрахеального введения флуоресцентно меченных частиц Вт (ДС/Бн/ДС и

ДС/Бн/ДС/ЕрСАМ) или физиологического раствора (контрольная группа) мышам FvB (самцам в возрасте 6-8 недель). Были использованы частицы, меченные цианином 7 (Ци7), для анализа с помощью IVIS Spectrum CT и частицы Вт, меченные ТРИТЦ, для анализа тканей легких с помощью конфокальной микроскопии. Для внутритрахеальной инстилляций мышей анестезировали (золетил 50 мг/кг, ксилазин 5 мг/кг), интубировали катетером 22 калибра и закапывали полученные частицы. Внутривенная инъекция была осуществлена в хвостовую вену с использованием иглы 29G. Животных умерщвляли через 1 час и 24 часа после введения, а органы (легкие, сердце, почки, печень, селезенку) удаляли и анализировали либо с помощью IVIS Spectrum CT, используя возбуждение/эмиссию при 710/780 нм (для визуализации Ци7), либо с помощью конфокальной микроскопии (частицы, меченные ТРИТЦ). Количественную оценку изображений, полученных с помощью IVIS Spectrum CT, осуществляли с использованием программного обеспечения LivingImage Software (Perkin Elmer, США).

В экспериментах с порфиразином.

Эксперименты проводили на 7-е сутки после инокуляции раковых клеток (СТ26), когда объем опухоли достигал $\sim 0.25 \text{ см}^3$. Раствор свободного Пз и суспензию Пз-Вт вводили в хвостовую вену в дозе 15 мг/кг (15 мкг порфиразина на 1 г массы мыши). Концентрацию и объем раствора Пз рассчитывали согласно ранее сделанной оценке емкости загрузки Вт. Мышам в контрольной группе вводили чистый ФСБ. Через 3 часа животных наркотизировали смесью растворов Золетила (50 мг/кг) («Вирбак Санте Анимале», Франция) и Ксиланита (30 мг/кг) («НИТА-ФАРМ», Россия) в соотношении 1:6, вводимом внутрибрюшинно с контролем pedalного рефлекса. Животных умерщвляли методом цервикальной дислокации. Накопление и клиренс Пз-Вт и свободного Пз в опухолях и органах были изучены с помощью прижизненной визуализации животных, предоставленной Институтом прикладной физики РАН, Россия [144]. Животное тщательно брили триммером с последующим нанесением крема для депиляции для удаления остатков шерсти и уменьшения оптического рассеяния

на шерсти животного. Мышь лежала на специально разработанном плоском лотке, при этом лапы фиксировали на лотке с помощью клейкой ленты и помещались в темную камеру на время визуализации. Флуоресценцию возбуждали при 585 нм и регистрировали в спектральной полосе 645-725 нм. Изображения получали до и через 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 24, 48 ч после введения Пз-Вт или свободного Пз, или ФСБ. Количественный анализ полученных флуоресцентных изображений был проведен с использованием бесплатного программного обеспечения ImageJ. Сигнал флуоресценции $I_{\text{Фл}}$ усредняли по областям изображения опухоли на левой задней конечности $I_{\text{Фл}}^{\text{Опухоль}}$ и области нормальной ткани (на правой задней конечности) $I_{\text{Фл}}^{\text{Здоров}}$. Контраст изображения опухоли определялся как:

$$\text{Контраст} = \frac{I_{\text{Фл}}^{\text{Опухоль}}}{I_{\text{Фл}}^{\text{Здоров}}} \quad [4],$$

2.21 Исследование динамики деградации частиц ватерита с иммобилизованным нафтифином в волосяных фолликулах мыши

Доставка Вт с иммобилизованным Нф была проведена согласно методики ранее представленной в работе [113]. Вкратце, за день до введения частиц в волосяные фолликулы нижняя часть спины мышей была выбрита, так чтобы остались короткие волосы в 1-2 мм. На следующий день навеска Вт, загруженных антимикотиком массой 5 мг, была суспензирована в 70% растворе этанола в объеме 50 мкл и нанесена на выбритую часть спины с последующим втиранием звуковой головкой ультразвукового терапевтического аппарата (Dynatronics, USA). Был использован ультразвук с частотой 1 МГц и мощностью 0.5 Вт/см² в течении 3 минут. Сонофорез был использован для увеличения глубины проникновения частиц.

Изучение морфологии Вт, доставленных в глубь волосяных фолликулов мыши, и их деградации было проведено с помощью сканирующего электронного микроскопа MIRA II LMU instrument (Tescan) при рабочем напряжении 30 кВ. Для этого было проведено выдергивание нескольких волос с волосяными

луковицами из зоны внедрения частиц с помощью щипцов с последующим разрушением волосяных фолликулов с помощью лезвия на проводящей ленте, покрывающей держатель для образцов. Образцы волосяных фолликулов были получены до внедрения частиц, сразу после и через 24, 48, 72, 96, 120 часов.

2.22 Прижизненная мультифотонная микроскопия

Мультифотонная микроскопия (возбуждение, Ti:Sapphire, фемтосекундный перестраиваемый лазер с синхронизацией мод, настроенный на 800 нм; излучение 600-750 нм) была использована в сочетании с флуоресцентной микроскопией с визуализацией времени жизни (FLIM, Becker & Hickl, Германия). Записанные кривые затухания флуоресценции были аппроксимированы биэкспоненциальной функцией и проанализированы для определения взвешенного по интенсивности времени жизни τ_{pz} возбужденного состояния с использованием следующей формулы:

$$\tau_{pz} = \frac{a_1\tau_1^2 + a_2\tau_2^2}{a_1\tau_1 + a_2\tau_2} \quad [5],$$

где a_i и τ_i – процентный вклад и время жизни возбужденного состояния i -й компоненты затухания флуоресценции, $i = 1, 2$.

Введение Пз-Вт, свободного Пз и ФСБ было произведено как описано ранее (пункт 2.19) за исключением того, что исследования проводили на 14-е сутки (объем опухолевого узла $\sim 1 \text{ см}^3$). У анестезированного животного был удален кожный лоскут хирургическими ножницами, чтобы полностью обнажить капсулу опухоли. Затем животное иммобилизовали скотчем на столике микроскопа, капсулу опухоли помещали в кювету с физиологическим раствором (рН 7,0-7,5, «ПанЭко», Россия). Объектив (с-Apochroma 40x/1,20 W Corr) инвертированного микроскопа (Axio Observer Z1 LSM-710 DUO NLO, Carl Zeiss, Германия) был подведен близко ко дну кюветы и оптически герметизирован маслом, с соответствующим индексом. Наблюдения прижизненной микроскопией были проведены как минимум в 5 полях зрения с разрешением, оцененным в 0.21 мкм. Для получения изображений FLIM свободный порт системы мультифотонного микроскопа был подключен к системе подсчета

одиноким фотонов с корреляцией по времени (TCSPC) (Simple-Tau 152, Becker & Hickl GmbH, Германия). Псевдоцветовая палитра была использована для построения цифровой карты $\tau_{Пз}$ поля зрения.

2.23 Время циркуляции порфиразина в кровотоке

У животных из ретроорбитального синуса с помощью гематокритных капилляров были отобраны аликвоты крови (~15 мкл) до и через 5 мин после введения испытуемого препарата, а затем каждый час в течение 5 часов для измерения периода полувыведения Пз-Вт и свободного Пз из кровотока. Образцы крови были смешаны с гепарином в соотношении 5:3 (кровь:гепарин), центрифугированы при 600 g в течение 5 мин для осаждения клеток крови. Затем плазму (надосадочную жидкость) собирали для флуоресцентного анализа с помощью планшетного ридера (Synergy Mx, BioTek, США). Периферическую кровь брали у интактных здоровых мышей Balb/c, смешивали с гепарином в соотношении 5:3, получали плазму крови и добавляли Пз в различных концентрациях. Был построен график зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации Пз для получения калибровочной прямой (рисунок 18). Калибровочную прямую использовали для определения абсолютной концентрации Пз и Пз-Вт в системном кровообращении по зарегистрированной флуоресценции.

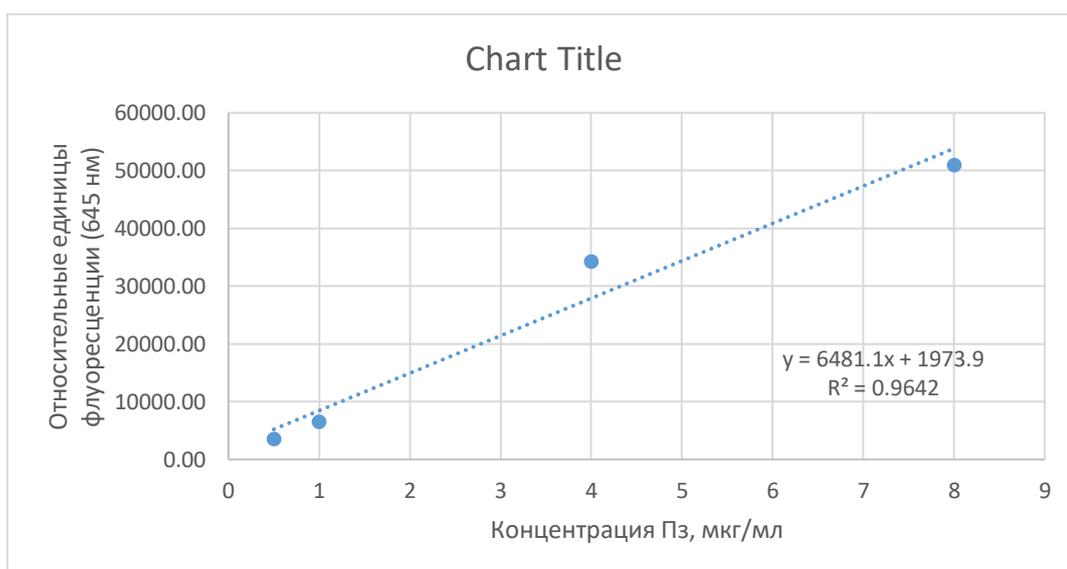


Рисунок 18 – Зависимость флуоресценции растворов Пз известных концентраций в сыворотке крови

2.24 Фармакокинетика низкомолекулярного и высокомолекулярного модельных веществ после интратрахеальной инстиляции в составе субмикронных частиц ватерита

Мышам интратрахеально вводили частицы размером 0.65 мкм с адсорбированным из спиртового раствора чистым флуорофором Ци7 или конъюгатом БСА-Ци7. В качестве контроля использовали флуоресцентный краситель Ци7 в 0.01% спиртовом растворе. Доза красителя Ци7 в каждом случае составляла 300 нг. Через 5, 15 и 45 минут, 1, 5, 3, 6, 9, 24 и 48 часов после введения были взяты образцы крови в объеме 50 мкл через ретроорбитальный синус с помощью стеклянных гематокритных капилляров. Образцы крови были смешаны с гепарином в соотношении 5:3. Интенсивность флуоресценции образцов крови измеряли спектрофотометром Synergy H1 (BioTek Instruments, Inc.) при длине волны возбуждения 720 нм. Спектры испускания были измерены в диапазоне 750-800 нм с шагом 1 нм. Также была построена калибровочная прямая (рисунок 19) определяющая закон изменения относительных единиц флуоресценции образца крови в зависимости от количества, содержащегося в нем флуорофора Ци7. Для каждой концентрации было рассчитано, насколько увеличилось значение относительных единиц флуоресценции (RFU) по сравнению с нулевой концентрацией в указанном диапазоне, то есть было рассчитано следующее соотношение:

$$I = \frac{\sum_{\lambda=765}^{785} RFU_{\lambda}^{dyed}}{\sum_{\lambda=765}^{785} RFU_{\lambda}^{blank}} \quad [6],$$

где “I” – это коэффициент увеличения интенсивности флуоресценции, “λ” – длина волны. Суммарный сигнал RFU был подсчитан в диапазоне от 765 нм до 785 нм с шагом в 1 нм.

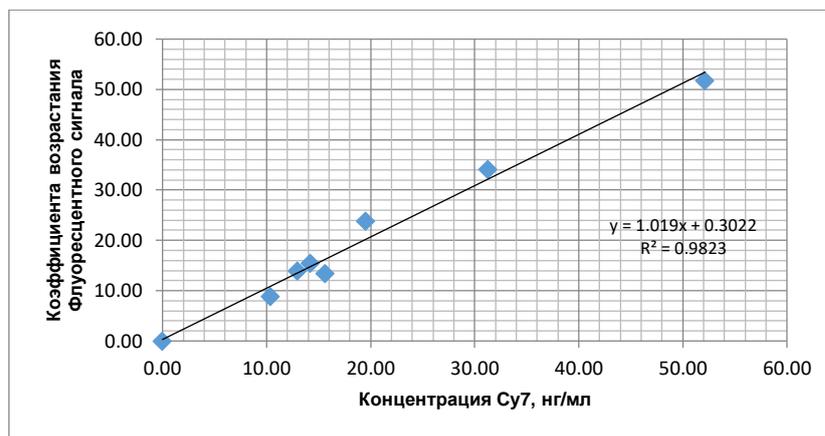


Рисунок 19 – Калибровочная прямая для расчета концентрации флуорофора Ци7 в крови животных

Количество флуоресцентного агента Ци7 в крови животных после интратрахеального введения трех различных формуляций (Вт, содержащие чистый флуорофор, Вт, содержащие флуоресцентный конъюгат, спиртовой раствор чистого флуорофора) было рассчитано согласно данной калибровочной прямой.

2.25 Фотодинамическая терапия

Животные с опухолями случайным образом были разделены на 6 групп, из которых 4 группы были использованы в качестве контроля. Опухоли подвергали облучению через 3 ч после внутривенной инъекции, чтобы обеспечить максимальное накопление тестируемых препаратов Пз-Вт или свободного Пз. Облучение было проведено с помощью светодиодного источника света с длиной волны 640 нм в дозе 150 Дж/см² (интенсивность 100 мВт/см²). Световой обработке подвергался только участок опухоли, а окружающая его область была покрыта черной бумагой. Для предотвращения термического повреждения тканей опухоль облучение проводили тремя этапами по 500 секунд, разделенными темновыми периодами по 180 секунд, когда опухоль охлаждалась аэрацией. Температуру опухоли после процедуры ФДТ измеряли термометром.

Группа	Инъекция	Облучение	Количество животных
1	10 мМ ФСБ	-	8

2	15 мг/кг Пз; 130 мг/кг Вт	-	5
3	15 мг/кг Пз	-	5
4	10 мМ ФСБ	150 Дж/см ²	5
5	15 мг/кг Пз	150 Дж/см ²	7
6	15 мг/кг Пз; 130 мг/кг Вт	150 Дж/см ²	7

Результат ФДТ контролировали каждый 2-й день (в течение 12 дней) после лечения путем визуального осмотра и измерения размера опухоли. Объем оценивали путем измерения линейных размеров опухоли в ортогональных осях (x, y, z) с помощью штангенциркуля. Для расчета объема опухоли было использовано следующее уравнение:

$$V = \frac{x \times y \times z}{2} \quad [7],$$

где x – ширина опухоли, y – длина опухоли, z – высота опухоли.

Коэффициент ингибирования роста опухоли (КИРО) рассчитывали по следующему уравнению:

$$\text{КИРО}(\%) = \frac{V_{\text{контр}} - V_{\text{терап}}}{V_{\text{контр}}} \times 100\%, \quad [8]$$

где $V_{\text{терап}}$, $V_{\text{контр}}$ обозначают объемы опухоли, получившей терапию, и контрольной (без каких-либо инъекций и воздействий), соответственно.

2.26 Подготовка срезов тканей органов для микроскопии

Мышей анестезировали золетилом (50 мг/кг) и ксилазином (5 мг/кг), умерщвляли, легкие отделяли от прилежащих тканей и извлекали из организма, промывали физиологическим раствором, препарировали и помещали в 10% забуференный раствор формальдегида (на ночь, при 4°C). На следующий день образцы тканей переносили в ФСБ с 0.01% азидом натрия для хранения при 4°C до гистологического исследования. Криопротекция была осуществлена путем последовательного вымачивания исследуемых органов в растворе сахарозы с возрастающей концентрацией (10%, 20%, 30%) в течение 2 часов. Затем органы подвергали быстрой заморозке на сухом льду. Срезы толщиной 25 мкм готовили

с помощью криомикротомы Leica CM1950 и монтировали на предметные стекла, покрытые поли-L-лизинном.

2.27 Сканирующая электронная микроскопия

Для изучения морфологии и микроструктуры на высушенные частицы было осаждено нанометровое золотое покрытие, визуализация была проведена с помощью растрового сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) (MIRA II LMU, Tescan) при рабочем напряжении 30 кВ.

В экспериментах с нафтифином

Небольшое количество сухих полученных частиц было суспензировано в воде и нанесено на проводящую подложку для визуализации с помощью сканирующего электронного микроскопа MIRA II LMU instrument (Tescan) при рабочем напряжении 30 кВ. Распределение частиц карбоната кальция без и с иммобилизованным антимикотиком было рассчитано с помощью свободного программного обеспечения ImageJ путем измерения большого диаметра 300 частиц для каждого образца.

В ходе изучения процесса перекристаллизации Вт с иммобилизованным Нф без и с полимерными оболочками ежедневно в течение 10 дней из каждого образца были отбраны капли по 1 мкл и нанесены на кремниевую подложку для изучения морфологической структуры с помощью СЭМ при рабочем напряжении 30 кВ.

Морфологию Вт с иммобилизованным Нф через 24, 48, 72, 96, 120 часов после внедрения в волосяные фолликулы мышей, изучали с помощью СЭМ при рабочем напряжении 30 кВ.

В экспериментах с порфиразином

Собранные опухолевые ткани через 3 часа после введения Вт, Вт-ЗНЧ подвергали криозащите, сначала фиксируя их в 10% формалине в течение 3 дней при 4°C. Затем ткани переносили в ФСБ на одну неделю при 4 °С, а затем инкубировали в растворах сахарозы с возрастающей концентрацией (10%, 20%,

30%) в ФСБ в течение 2 часов. Ткани опухоли замораживали с помощью криостата Leica на специальном держателе для дисков с использованием замораживающей среды (Tissue Freezing Medium, Leica Biosystems). Затем ткань нарезали на кусочки толщиной 30 мкм, помещали на кремниевые подложки и напыляли углерод для изучения с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДРС). Рабочее напряжение было установлено 15 кВ.

2.28 Конфокальная микроскопия

В экспериментах по внутрилегочной доставке частиц ватерита

Конфокальный микроскоп Leica TCS SP8 X (Leica Microsystems) использовали для визуализации полученных меченых Вт (БСА-Ци7). Длина волны возбуждения флуоресцентного красителя Ци7 равняется 750 нм, длина волны эмиссии (флуоресценции) – 773 нм.

Подготовленные срезы (легкие – Ци7) толщиной 25 мкм были визуализированы на лазерном конфокальном сканирующем микроскопе (Leica TCS SP8 X). Использовали лазерное излучение с длиной волны 670 нм. Изображения регистрировали с использованием двух флуоресцентных каналов: диапазон 680–726 нм, соответствующий автофлуоресценции легочной ткани, и диапазон 747–794 нм, соответствующий флуоресцентному красителю Ци7. Также были записаны оптические изображения образца. Технология z-stack была использована для локальной трехмерной визуализации тканей, где Вт были обнаружены в альвеолярном пространстве. После выбора интересующей области на криосрезе образца легкого с введенными частицами, покрытыми флуоресцентным красителем, был выполнен диапазон сканирования по оси z, перпендикулярный плоскости криосреза. Шаг формирования конфокальных плоскостей не превышал 0.2 мкм. После завершения процедуры сканирования образца в указанном диапазоне была выполнена трехмерная реконструкция интересующей области с помощью программы LasX (Leica).

В экспериментах с барназой

Для флуоресцентной визуализации ткани легких после интратрахеальной инстилляцией монтировали с помощью водной среды для заливки FluoroMount (Sigma) на тонкие покровные стекла, а распределение наночастиц визуализировали в красном канале с помощью системы Zeiss LSM 800 AiryScan с объективом Plan-Apochromate 10x/0,45 WD2.1. Автофлуоресценцию возбуждали на длине волны 488 нм и детектировали в диапазоне от 505 до 650 нм, Ци5 (маркер частиц) возбуждали на длине волны 640 нм и детектировали в диапазоне от 650 до 700 нм. Расчет поверхностной концентрации исследуемых носителей был произведен с использованием свободно распространяемого ПО Gwyddion. Изображения, представляющие собой поля 320×320 мкм, анализировали с помощью функции «Обработка данных» – «Зерна» – «Пометить по порогу». Итоговое число присутствующих на изображении зерен получали в «Сводке». Было проанализировано 20 изображений для каждого типа носителей. Данные представлены в виде диаграммы размаха с помощью ПО Origin 9.1.

В экспериментах с нафтифином

Для визуализации жизнеспособных клеток и оценки поглощения контейнеров был использован флуоресцентный микроскоп Nikon TI (Nikon, Япония) с объективом 10X (Nikon, Япония) и флуоресцентными фильтрами Nikon Filter Cube Set – GFP и Nikon Filter Cube Set – TRITC (Nikon, Япония) с длинами волн 502/538 и 570/613, соответственно. Микроскопия клеточных культур была произведена в боксе с температурой 37°C и 5% CO₂. Были получены конфокальные флуоресцентные изображения клеток с интернализированными частицами, что позволило оценить их количество. Размер анализируемых изображений 500×500 мкм. Последующий анализ изображений был проведен с помощью программного обеспечения ImageJ, на основе которого были построены круговые диаграммы эффективности интернализации частиц для каждого вида образца.

В экспериментах с порфиразином

Биораспределение Пз-Вт и Пз *ex vivo* в следующих органах и тканях животных с опухолями было оценено с помощью ЛКСМ через 3 часа после инъекции: опухоль, печень, легкие, селезенка, почки, кожа, кишечник, желудок, костный мозг, сердце, тимус и мышцы. Срезы ткани предварительно увлажняли в ФСБ и помещали между двумя покровными стеклами с помощью зажима-держателя. ЛКСМ работал при настройке возбуждения/излучения на: 594 нм/625–758 нм (режим флуоресценции) и 594 нм/579–610 нм (режим отражения). Количественный анализ биораспределения Пз-Вт и Пз в собранных органах и тканях проводили с использованием фирменного программного обеспечения ZEN BLUE (Carl Zeiss, Германия). Необработанные изображения были преобразованы в формат .tiff с использованием черно-белого кодирования. Далее с помощью бесплатного программного обеспечения ImageJ был определен усредненный сигнал флуоресценции для каждой области изображения. Каждый орган или ткань каждого животного были проанализированы по меньшей мере в трех случайно выбранных полях зрения.

2.29 Атомно-абсорбционная спектроскопия

Атомно-абсорбционная спектроскопия (ААС) была использована для определения массового содержания золота в опухоли через 3 часа после внутривенной инъекции Вт-ЗНЧ и свободных ЗНЧ. Собранные опухоли расщепляли в микроволновой системе высокого давления MARS Xpress (США) в тефлоновой посуде HNO_3 (и 30% растворе H_2O_2 , только для тканей) при постоянной комнатной температуре и анализировали с помощью прибора ААС (спектрофотометр Dual Atomizer Zeeman AA iCE 3500, Thermo Scientific, США). Для калибровки спектрометра был использован стандарт ААС (Fluke) со стандартным отклонением <4% для всех измерений.

2.30 Статистика

В экспериментах по внутрилегочной доставке

Для проведения теста ANOVA был использован сайт <http://vassarstats.net> (Односторонний дисперсионный анализ для независимых или коррелированных выборок), который выполняет попарные сравнения средних значений выборки с

помощью теста Тьюки и использует распределение Стьюдента. Для определения статистической значимости полученных результатов при изучении динамики перекристаллизации Вт в четырех различных растворах сравнивали две пары (вода/физиологический раствор и гидрофильная/гидрофобная фракции). В исследовании биораспределения все значения эффективности излучения для отдельных органов в каждой группе сравнивали в каждый момент времени (24, 48 и 72 часа). Было проведено сравнение фармакокинетики для введения трех различных формуляций. Установлено два уровня значимости ($p < 0.05$ и < 0.01).

В экспериментах с барназой

Статистическую значимость цитотоксического действия носителей с иммобилизованной барназой на клеточную линию A549 и биораспределение, выполненное с помощью флуоресцентной томографии IVIS, определяли с помощью теста множественного сравнения Тьюки (Prism8 GraphPad).

В экспериментах с нафтифином

Статистические данные по массе лекарственного средства Нф, как иммобилизованного в Вт, так и высвобождаемого из них в модельных средах, по клеточной жизнеспособности и противогрибковой активности носителей были рассчитаны с использованием Microsoft Excel. Средние значения, стандартные отклонения и стандартные ошибки были получены на основе 3-5 независимых экспериментов.

Данные о кинетике высвобождения Нф из Вт, в отсутствие и при наличии различных полимерных оболочек при инкубации в деионизированной воде и физиологическом растворе, были нанесены на график как «среднее значение \pm стандартная ошибка» ($n = 3$). Жизнеспособность клеток NHDF после их инкубации в течение 24 часов с различными формуляциями были представлены как «среднее значение \pm стандартное отклонение» ($n = 5$). Данные по противогрибковой активности нагруженных Нф носителей и раствора свободного антимикотика против *C. albicans* были представлены как «среднее \pm стандартное отклонение» ($n = 3$). ANOVA-тест использовали для определения

статистической значимости полученных результатов. Расчеты проводились с использованием программы Prism6 GraphPad.

В экспериментах с порфиразином

Статистический анализ в экспериментах по фотодинамической терапии подкожно привитой опухоли с помощью Пз и Пз-Вт проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа и критерия Даннетта (программное обеспечение GraphPad Prism 6).

ГЛАВА 3. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЧАСТИЦ ВАТЕРИТА В КАЧЕСТВЕ СИСТЕМ ДОСТАВКИ ПРИ ИНТРАТРАХЕАЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ

3.1 Характеризация частиц ватерита, используемых в экспериментах по их биораспределению после интратрахеального введения

На первой стадии экспериментов по внутрилегочной доставке были использованы Вт со следующими средними размерами 3.15 ± 0.60 мкм (рисунок 20 а, г), 1.35 ± 0.16 мкм (рисунок 20 б, д) и 0.65 ± 0.17 мкм (рисунок 20 в, е).

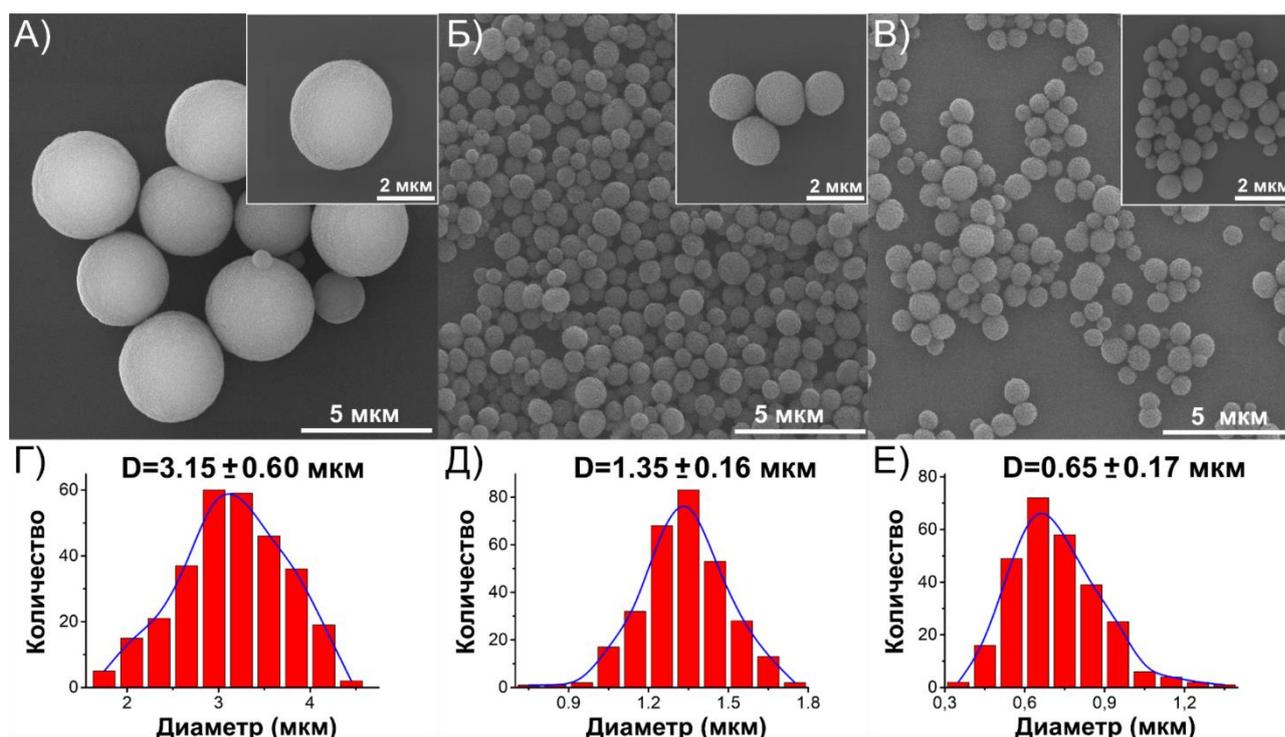


Рисунок 20 – Характеризация частиц ватерита, используемых в *in vitro* и *in vivo* экспериментах. Визуальное представление и распределение по размерам частиц ватерита, полученных (а, г) при смешении эквимольных растворов солей, (б, д) при смешении с помощью ультразвука эквимольных растворов солей в присутствии этиленгликоля, (в, е) при смешении эквимольных растворов солей в присутствии этиленгликоля [23]

Как видно из СЭМ-изображений все частицы обладают сферической формой и пористой поверхностью, детальное изображение поверхности одной ватеритной частицы диаметром 700 нм представлено на рисунке 21 а. Вт имеют

поликристаллическую структуру [145], где нанокристаллиты вытянутой формы располагаются от центра к периферии, как показано на рисунке 21 б. Такое осевое расположение нанокристаллитов формирует поры, уходящие с поверхности глубоко внутрь Вт. В работе [66] была показана пористая поликристаллическая структура Вт диаметром 4.5 мкм. По литературным данным размер пор для Вт варьируется в диапазоне от 10 до 40 нм [145–147].

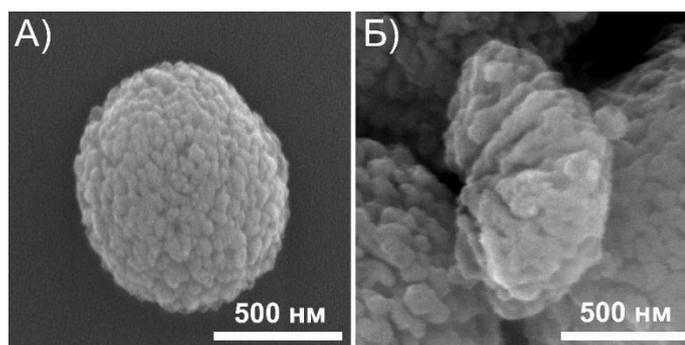


Рисунок 21 – СЭМ-изображения частиц ватерита при увеличении 250000X: (а) целая частицы ватерита, (б) механически разрушенная частица ватерита

Благодаря пористой структуре Вт способны адсорбировать как внутрь, так и на поверхность, молекулы различных модельных и терапевтических агентов. Для наблюдения за биораспределением Вт после интратрахеального введения с помощью флуоресцентной томографии, необходимо иммобилизовать на их поверхность и внутрь пор флуоресцентный агент. В данной работе был использован конъюгат альбумина (БСА) и Цианина 7 (Ци7).

3.2 Создание формуляции, включающей в себя частицы ватерита и флуоресцентный конъюгат альбумина и Цианина 7, для визуализации с помощью флуоресцентной томографии

Конъюгированный БСА-Ци7 (2 мл) смешивали с 5 мг полученных высушенных Вт и инкубировали в течение 1 часа при постоянном встряхивании при комнатной температуре. Для осаждения, частицы микронного размера центрифугировали при 3000 об./мин. в течение 1 мин, субмикронные частицы

центрифугировали при 6000 об./мин. в течение 1 мин. Все супернатанты были собраны для оценки количества конъюгата не адсорбированного на частицах. Концентрацию флуоресцентного красителя определяли фотометрически с использованием спектрофотометра (Synergy H1) в соответствии с калибровочной прямой (рисунок 16) и рассчитывали количество БСА-Ци7, иммобилизованного на Вт.

На рисунке 22 представлена флуоресцентная микроскопия Вт после иммобилизации БСА-Ци7. Из анализа изображений можно сделать вывод о формировании слоя флуоресцентного конъюгата на поверхности Вт, так как контур частиц имеет флуоресцентный сигнал, в отличие от внутреннего пространства частиц, окрашенного на рисунке 22 Б, В в черный цвет. Определение эффективности инкапсуляции данного модельного вещества в состав Вт показало, что частицы наименьшего размера (0.65 мкм) обладают наибольшей загрузкой, составляющей 10.3% от веса самих частиц, в то время как для частиц 1.35 мкм и 3.15 мкм данный параметр составляет 1.5 и 0.88%, соответственно. Стоит отметить, что адсорбция была произведена однократно и эффективность инкапсуляции может быть увеличена при осуществлении нескольких циклов адсорбции с применением метода индуцированной кристаллизацией адсорбции [81].

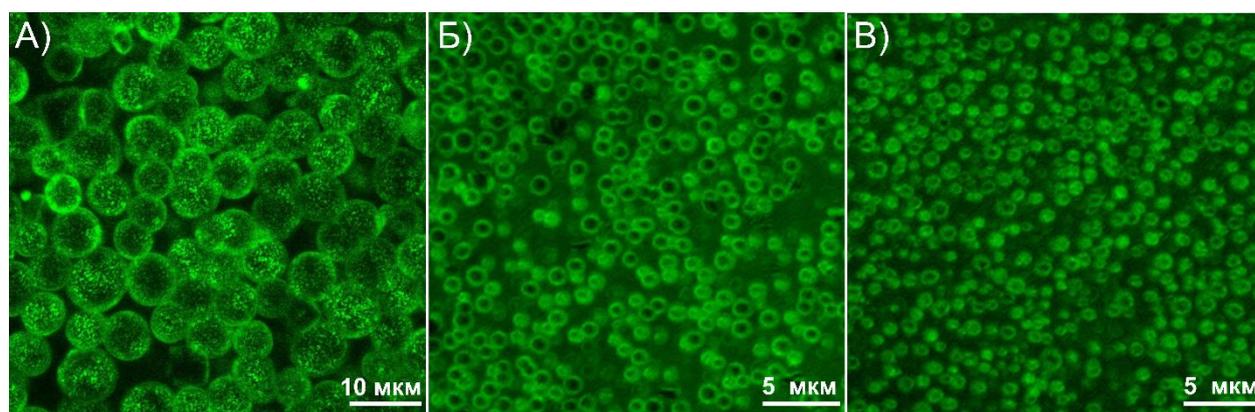
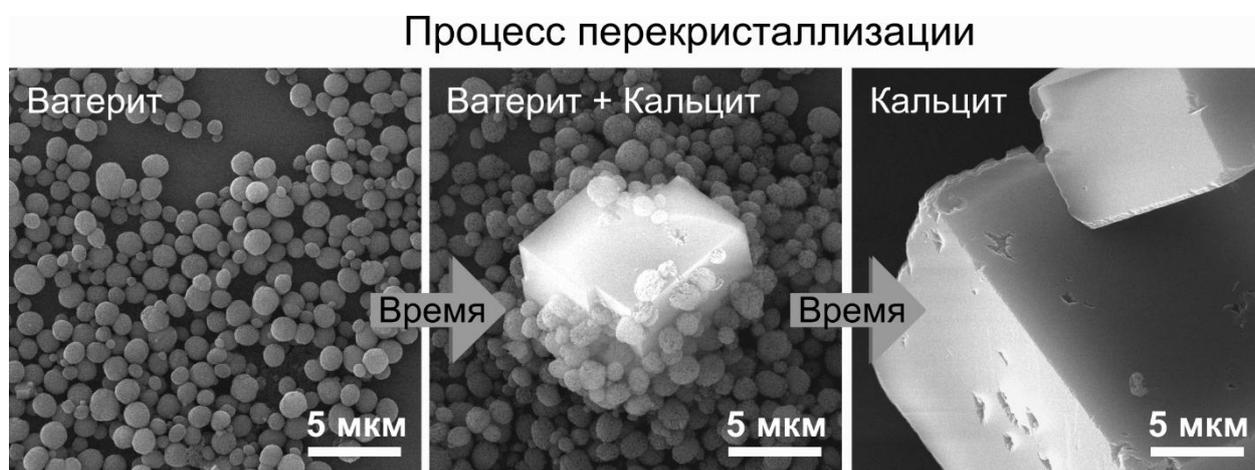


Рисунок 22 – Флуоресцентные изображения частиц ватерита размером (а) 3.15 мкм, (б) 1.35 мкм, (в) 0.65 мкм с адсорбированным флуоресцентным

конъюгатом БСА-Ци7 полученные с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа [23]

3.3 Стабилизация частиц ватерита в компонентах легочного сурфактанта *in vitro*

Вт представляют собой метастабильную полиморфную форму карбоната кальция и имеют тенденцию превращаться в термодинамически более стабильный кальцит [148]. Такое превращение возможно благодаря одновременным процессам растворения и новой кристаллизации, которые происходят с частицами в растворе, и может быть описано в некотором приближении с точки зрения гомогенной теории нуклеации [68, 149]. Схематично данный процесс представлен на рисунке 23. Скорости этих процессов в разных веществах отличаются. В данном разделе показано, что трансформация ватерита в кальцит происходит быстрее в физиологическом растворе, чем в воде, что согласуется с предыдущими исследованиями [135].



Вт как и другие экзогенные частицы способны взаимодействовать с биологическими молекулами, формируя «корону» [150]. «Корона» в свою очередь способна замедлять процессы растворения или перестройки

кристаллической решетки неорганических частиц. В связи с этим было изучено как инкубирование с компонентами легочного сурфактанта - первого вещества, с которым вступает в контакт любая формуляция при легочной доставке, - меняет морфологию Вт. Для этого, частицы были инкубированы с водой, физиологическим раствором, гидрофобной и гидрофильной фракциями сурфактанта, а скорость перекристаллизации была оценена с помощью СЭМ-изображений экспериментальных образцов через 1, 3, 5, 7, 9, 24, 32, 56, 96 и 144 часа взаимодействия.

Понимание того, как компоненты флюида, выстилающего легкие, влияют на скорость перекристаллизации частиц является важным в части возможности пролонгации высвобождения биологически активных веществ. Как можно видеть на рисунке 24 морфологические изменения поверхности частиц при инкубировании в деионизованной воде и физиологическом растворе происходят значительно быстрее, чем в случае инкубирования с растворами сурфактантов. Через 9 часов инкубирования частиц в физиологическом растворе и 24 часа в воде карбонат кальция присутствует только в форме кальцита.

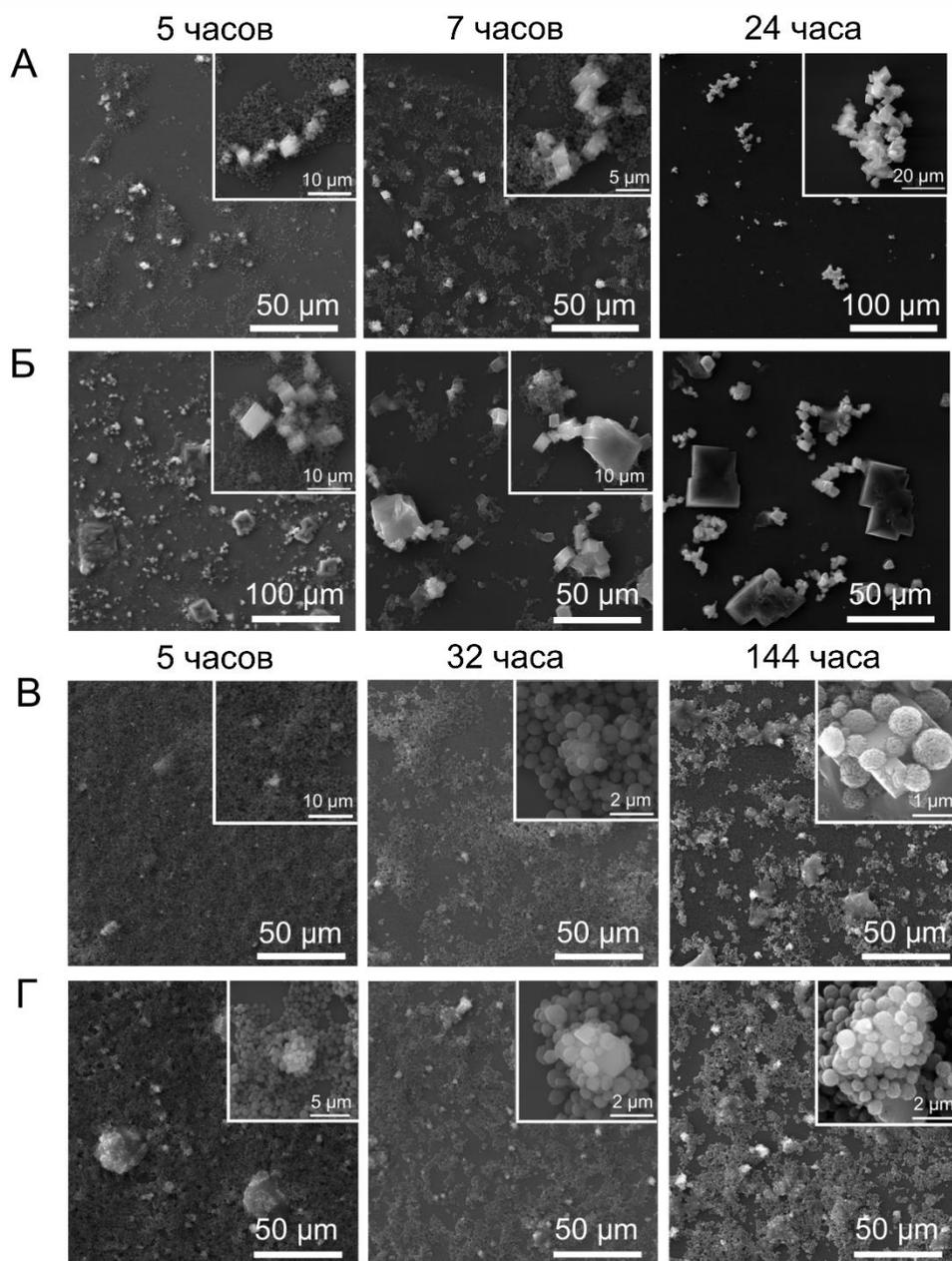


Рисунок 24 – Взаимодействие частиц ватерита с частями легочного сурфактанта *in vitro*. СЭМ-изображения частиц, инкубированных в (а) деионизированной водой, (б) физиологическом раствора, фракции (в) гидрофильной и (г) гидрофобной сурфактанта в указанное время [23]

При визуализации поверхности исследуемого с помощью СЭМ объекта, количество вторичных электронов, попадающих на детектор (результат взаимодействия электронного пучка и исследуемой поверхности), преобразуется в изображение в серых тонах. Разное количество вторичных электронов будет обнаруживаться с поверхностями с различным химическим составом, хотя эта

зависимость не является столь значительной, как для рассеянных электронов. Однако химический элемент с большим атомным номером на изображениях будет иметь более светлый оттенок серого [151]. Таким образом, все кубические объекты на рисунке 24 Б, имеющие темно-серый цвет, следует идентифицировать как кристаллы соли. Кристаллы кальцита, в свою очередь, отличаются ярким светло-серым цветом. При взаимодействии с компонентами флюида, выстилающего легкие, процесс превращения ватерита в кальцит значительно замедляется. Видно, что даже после 144 часов инкубации практически все частицы все еще присутствуют в кристаллографической фазе ватерита.

На некоторых изображениях, полученных с помощью СЭМ, можно увидеть, что на поверхности частиц, по-видимому, образовалась «корона» при инкубации с компонентами легочного сурфактанта (рисунок 25).

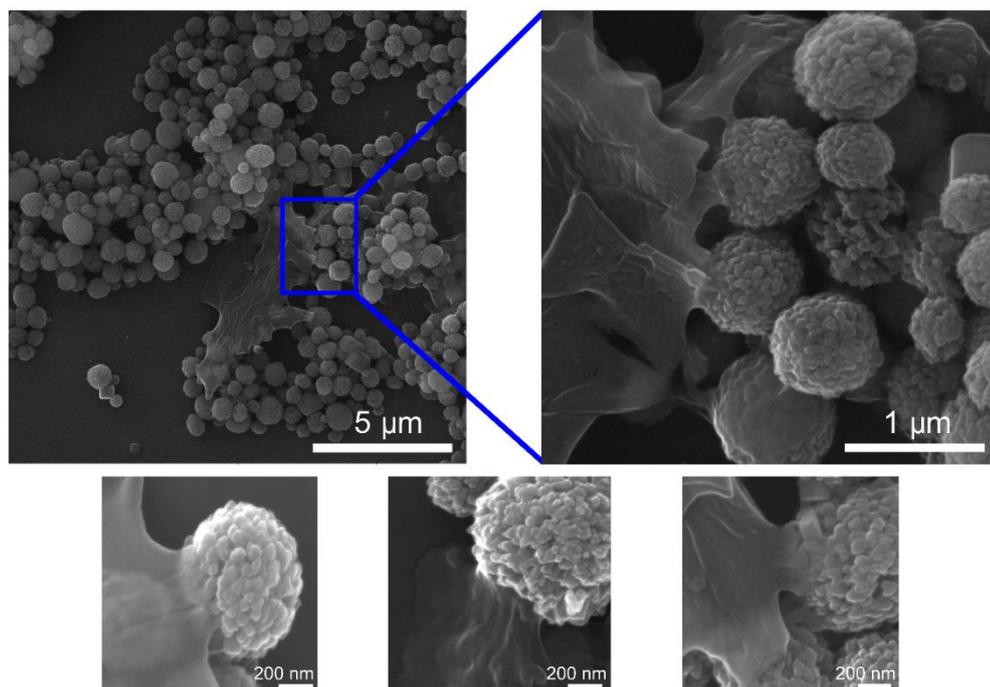


Рисунок 25 – СЭМ-изображения частиц ватерита, покрытых компонентами легочного сурфактанта через 56 часов инкубации [23]

Чтобы получить некоторую количественную оценку процесса перекристаллизации, были построены графики на рисунке 26. В каждый момент

времени для каждого образца были измерены геометрические размеры агрегатов частиц кальцита с использованием бесплатного программного обеспечения Fiji, поскольку со временем уже невозможно визуально определить начало и конец одиночного кристалла кальцита из-за их большой скученности. В первый час инкубации в деионизированной воде и физиологическом растворе все еще остаются отдельные кристаллы кальцита размером 3 мкм, а через 24 часа размер их агрегатов превышает 20 мкм. В то время как для инкубации во фракциях легочного сурфактанта рост размеров как отдельных частиц кальцита, так и их агрегатов происходит очень медленно, от 1.5 мкм через 5 часов до 2.7 мкм через 144 часа при взаимодействии частиц с гидрофильной фракцией сурфактанта. В случае инкубации Вт с гидрофобной фракцией сурфактанта размер кальцита изменяется от 2 мкм до 4.1 мкм за тот же период времени. Размер частиц кальцита в случае инкубации с гидрофобной фракцией сурфактанта легких в два раза больше, чем при инкубации с гидрофильной. Мы предполагаем, что гидрофильные компоненты легочного флюида легче покрывают Вт.

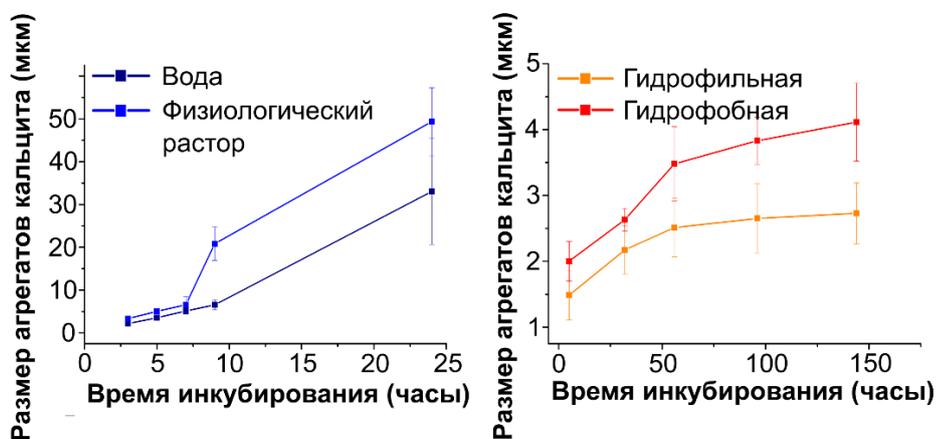


Рисунок 26 – Изменения размера агрегатов кальцита во времени при инкубации частиц ватерита 0.65 мкм с различными биологическими жидкостями, статистическая значимость результатов ($p < 0.01$) появляется после 7-часовой инкубации в воде и физиологическом растворе, но для пары гидрофильная и гидрофобная фракции легочного сурфактанта значительная разница ($p < 0.05$) наблюдается после 56 часов инкубации. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение [23]

Важнейшим выводом из полученных результатов может являться следующее заключение: инкубация Вт в жидкостях, выстилающих легкие, которые имеют ионную силу, аналогичную физиологическому раствору, значительно замедляет растворение частиц (рисунок 24, 26). Ряд исследований показал, что белок адсорбируется на поверхности посторонних частиц, контактирующих с биологическими жидкостями [152–154]. Как и ожидалось, Вт не стали исключением в этом вопросе, поскольку они имеют отрицательно заряженную поверхность [155] и давно известны своей способностью адсорбировать различные белки [156]. Хотя детального изучения этого вопроса пока не проводилось.

Изображения, полученные с помощью сканирующего электронного микроскопа на рисунке 24, посвященные морфологическим изменениям Вт, взаимодействующих с фракциями легочного сурфактанта, ясно показывают замедление процесса превращения в кальцит. Чтобы объяснить такое поведение частиц, следует отметить, что гидрофобная фракция содержит малые белки легочного сурфактанта, SP-B и SP-C; в то время как гидрофильная фракция содержит большие белки из семейства коллектинов SP-A и SP-D [157]. Белки SP-B и SP-C работают с основными липидами слизистой оболочки легких, фосфатидилхолином, чтобы контролировать поверхностное натяжение. В растворе они существуют преимущественно в виде сформированных мицелл, что может ограничивать их способность взаимодействовать с другими поверхностями при концентрации выше критической концентрации мицеллообразования. Благодаря своей гидрофильности, SP-A и SP-D могут хорошо взаимодействовать с поверхностью частиц, и действительно, одна из их основных функций как коллектинов - связываться с посторонними объектами [158]. Разумно предположить, что эти белки образуют «корону» на поверхности Вт, которая предотвращает морфологические изменения, и, следовательно, растворение в гидрофильной фракции сурфактанта будет самым медленным. Адсорбция белка на поверхности частиц препятствует процессу растворения, что приводит к уменьшению количества ионов кальция и, в связи с этим, замедляется

рост новых кристаллов. Нечто подобное было показано в работе [159], где Вт были покрыты слоями полиэлектролитов, что привело к сильному увеличению времени полной рекристаллизации Вт по сравнению с частицами без покрытия. Также было показано, что время рекристаллизации зависит от количества слоев полиэлектролита. Увеличение количества слоев полиэлектролита приводит к увеличению времени трансформации частиц ватерита в кальцит. Из графика на рисунке 26 видно, что размер кристаллов кальцита в случае инкубации Вт в гидрофобной фракции в два раза больше, чем при инкубации в гидрофильной фракции легочного сурфактанта. Это, по-видимому, указывает на то, что гидрофильная фракция покрывает частицы более эффективно и, таким образом, в большей степени замедляет рекристаллизацию. Эти исследования ясно демонстрируют, что Вт будут иметь пониженную скорость рекристаллизации при доставке в легкие из-за их взаимодействия с жидкостью, выстилающей альвеолярные мешочки.

3.4 Биораспределение частиц ватерита различного диаметра при внутрилегочном введении

Существует пять различных механизмов, влияющих на распределение частиц в легких: инерционное столкновение (уравнение (9)), седиментация (уравнение (10)), диффузия (уравнение (11)), перехват и электростатическое осаждение. Два последних механизма связаны с формой частиц и электростатическим зарядом [160], и не были рассмотрены в настоящей работе. Механизмы осаждения, прямо (или обратно) связанные с размером частиц, представлены на рисунке 27 и описываются формулами (9) – (12).

$$Stk = \frac{\rho_p \times d_{ae}^2 \times V}{18 \times \eta \times R}, \quad (9)$$

$$V_{ts} = \frac{(\rho_p - \rho_a) \times d_{ae}^2 \times g}{18 \times \eta}, \quad (10)$$

$$Dif = \frac{k \times T}{3\pi \times \eta \times d_{ae}}, \quad (11)$$

$$d_{ae} = d \times \sqrt{\frac{\rho_p}{\rho_0}}, \quad (12)$$

где Stk – это число Стокса; ρ_p – плотность частиц; d_{ae} – аэродинамический диаметр частицы; V – скорость воздуха; η – вязкость воздуха; R – радиус дыхательных путей; V_{ts} – конечная скорость осаждения; ρ_a – плотность воздуха; g – гравитационное ускорение; Dif – коэффициент диффузии; k – постоянная Больцмана; T – температура; d – это геометрический диаметр частиц; ρ_0 – единичная плотность. В уравнение (12) значениями плотности воздуха пренебрегли.

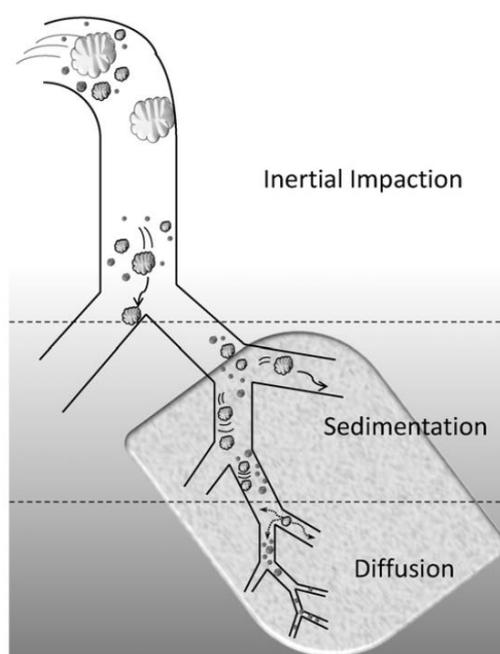


Рисунок 27 – Схематическая диаграмма, показывающая распределение частиц в легких в соответствии с различными механизмами, связанными с их размером: инерционное столкновение, седиментация и диффузия. На этой диаграмме желудочно-кишечный тракт опущен [160]

В связи с сильным влиянием размера носителей на распределение в легких были изучены частицы трех размеров. Из анализа литературы можно было ожидать, что частицы с геометрическим диаметром 0.65 мкм (аэродинамическим диаметром 1.1 мкм) будут распространяться в легких за счет броуновского движения. Осаждение должно оказывать значительное влияние на частицы размером 1.35 мкм (2.2 мкм). На расположение крупных частиц с диаметром 3.15

мкм (5.13 мкм) больше всего должна повлиять сила инерции [116]. Увеличение аэродинамического диаметра в 2 и 4.7 раза ведет к увеличению чисел Стокса в 4 и 22 раза соответственно, тем самым подтверждая, что большие частицы распределяются в верхних воздухоносных путях под действием инерционных сил. Кроме того, была учтена анатомия легкого. Целью данного этапа экспериментов было доставить частицы в дистальную часть легких мыши, таким образом, нужно было учитывать, что размер шейки альвеол у данного вида животных составляет приблизительно 1 мкм. Не были использованы частицы значительно меньше 0.5 мкм, так как такие частицы будут более подвержены выдыханию и быстрому растворению.

Предполагалось, что распределение в легких Вт различного размера будет различно. Поэтому было исследовано распределение Ци7-меченых частиц с использованием флуоресцентной томографии *in vivo* после интратрахеального введения. Через двадцать минут после инстилляций все три размера частиц демонстрировали значительное распределение в легких и большую интенсивность излучения фотонов, чем свободный раствор конъюгата БСА-Ци7 (Рисунок 28). Эти результаты демонстрируют, что все частицы обладают способностью доставлять меченые биомолекулы в легкие. Однако способность эффективно аккумулировать иммобилизованные в частицы вещества, по-видимому, зависит от размера, поскольку частицы размером 0.65 мкм демонстрируют наибольший флуоресцентный сигнал через 20 минут после введения, что коррелирует с результатами полученными при введении частиц на основе частиц силики [161]. Этот же эффект был выявлен и впоследствии при наблюдении в течение 72 часов.

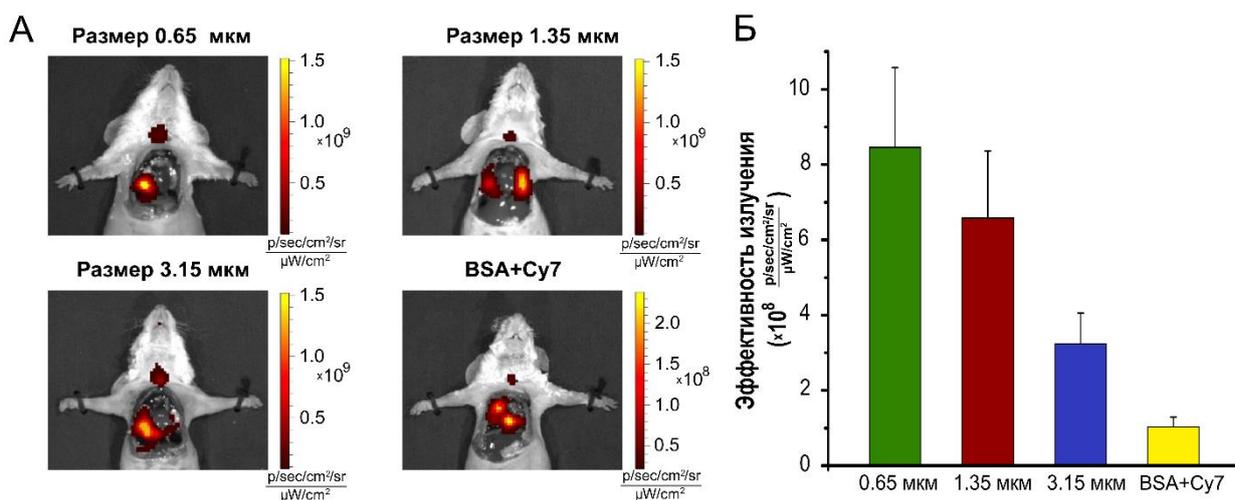


Рисунок 28 – Биораспределение частиц ватерита в легких. а) Легкие животных были визуализированы с помощью флуоресцентной томографии через 20 минут после введения частиц ватерита различного размера и свободного конъюгата через трахеостому. Различные размеры частиц. б) Гистограмма эффективности излучения в органе-мишени. Доза флуоресцентного красителя Ци7 составила 300 нг для каждой инъекции [23]

Кинетика переаспределения флуоресцентного сигнала в живом организме в течение 72 часов была прослежена, чтобы показать возможность удержания частиц в легких и медленное высвобождение их содержимого. Сигналы флуоресценции от всего тела мыши регистрировали через 24, 48 и 72 ч после интратрахеальной инстилляцией Вт размером 0.65 мкм, 1.35 мкм и 3.15 мкм с адсорбированным конъюгатом БСА-Ци7 (рисунок 29). Значения даны в процентах от общей флуоресценции в каждый момент времени, чтобы можно было определить относительное распределение по органам. Как видно, даже через 72 часа после введения половина введенного Ци7 остается в легких. Кроме того, перераспределение флуоресцентного сигнала в ткани других органов следует классическому пути (абсорбция, распределение, метаболизм и экскреция), сначала обнаруживаясь в печени, а затем в почках. Напротив, свободный конъюгат БСА-Ци7 очень быстро (уже к 24 часам) выводится из легких. Частицы диаметром 1.35 мкм и 3.15 мкм обеспечивают высокий уровень

флуоресцентного сигнала через 24 часа, но к 72 часам в целевом органе остается небольшое количество флуоресцентного агента.

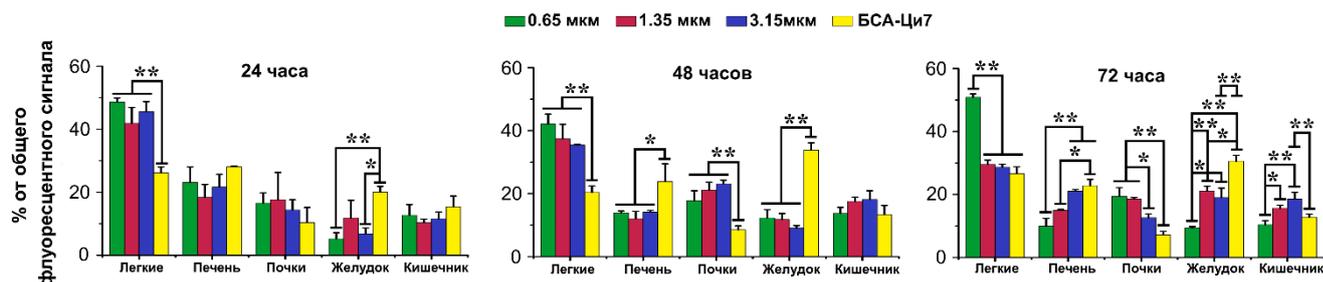


Рисунок 29 – Биораспределение частиц ватерита *in vivo*. Биораспределение в органах частиц размером 0.65 мкм, 1.35 мкм и 3.15 мкм, содержащих конъюгат БСА-Ци7, и свободного БСА-Ци7, через 24 часа, 48 часов и 72 часа после интратрахеального введения. Данные выражены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение, n = 3 мыши на группу [23]

3.5 Локализация частиц ватерита с размером 0.65 мкм в легких после интратрахеального введения

Чтобы определить, достигли ли частицы респираторной части легкого, были исследованы кройрезы данной ткани на наличие флуоресцентного сигнала от Ци7 с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии (рисунки 30, 31). Легкие были извлечены из тел животных для визуализации через 20 мин после интратрахеальной инстилляцией Вт 0.65 мкм с иммобилизованным конъюгатом БСА-Ци7. Наложение сигнала, полученного в канале Ци7 (рисунок 30 Б), на автофлуоресценцию ткани (рисунок 30 А), позволяет выделить область расположения именно частиц (зеленые пятна на рисунке 30 В). Совмещение флуоресценции и изображения светлого поля легкого (рисунок 30 Г), наглядно показывает, что сигнал, исходящий от частиц, расположен в воздушном пространстве альвеол. На рисунке 30 Г изогнутые линии черного цвета можно идентифицировать как капиллярные сосуды, поскольку они образуют полое пространство при подготовке криосреза. Остальное пространство серого цвета, окруженное капиллярами, - это стенки альвеол.

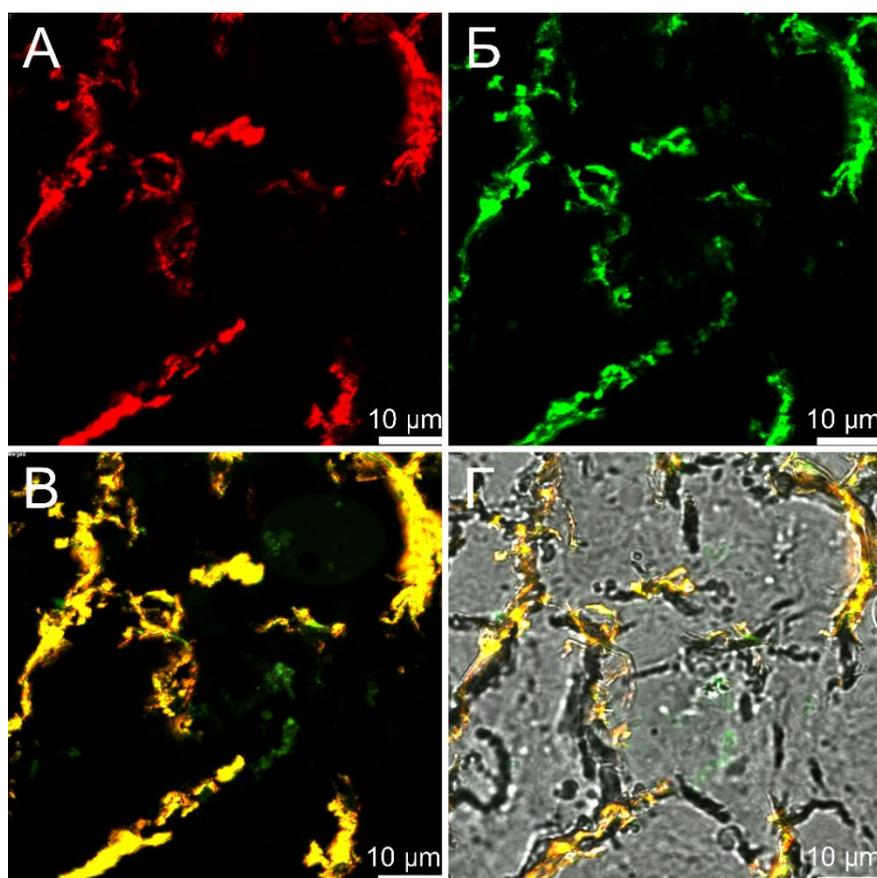


Рисунок 30 – Конфокальные флуоресцентные изображения криосреза легких.

Срезы легких анализировали на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе через 20 минут после интратрахеального введения 0.65 мкм частиц, с адсорбированным конъюгатом БСА-Ци7. а) Флуоресцентный сигнал в диапазоне 680-726 нм соответствовал автофлуоресценции легочной ткани; б) Флуоресцентный сигнал в диапазоне 747-794 нм соответствовал флуорофору Ци7; в) Совмещение изображений канала автофлуоресценции и экзогенного флуорофора Ци7; г) Совмещение флуоресцентных изображений с изображением светлого поля [23]

Трехмерная реконструкция конфокальных изображений в другой части легкого подтвердила расположения Вт в альвеолярной области (рисунок 31). На этом изображении ткани целевого органа четко видны как в автофлуоресцентном канале (красный цвет), так и в канале Ци7 (зеленый цвет), но для канала Ци7 есть также области, где присутствуют зернистые структуры, отсутствующие в канале автофлуоресценции. Детекторы флуоресцентного сигнала были настроены

таким образом, что вся флуоресценция ткани и крови на картинке была красной, а все остальные объекты - зеленым. Области, в которых нет флуоресцентного сигнала, соответствуют альвеолярному пространству, когда выбрана правильная фокальная плоскость, исключая автофлуоресценцию предметного стекла. Таким образом, хорошо видно, что зернистые структуры – окрашенные Вт – сосредоточены в альвеолярном пространстве.

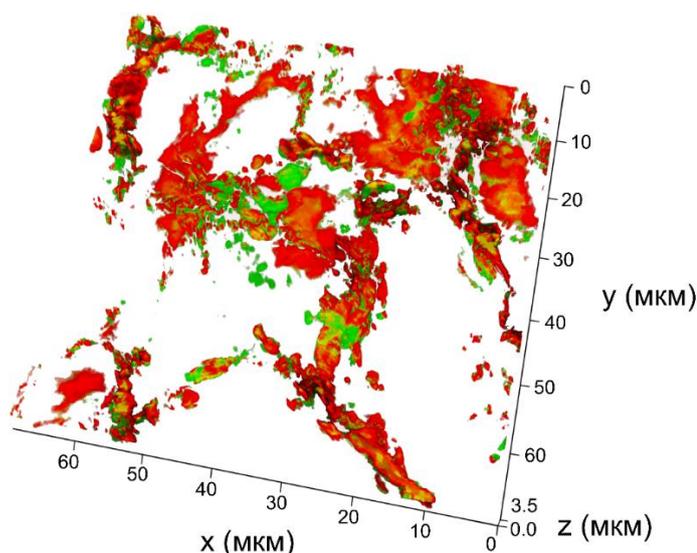


Рисунок 31 – Трехмерная реконструкция флуоресцентного изображения криосреза легких. Частицы 0.65 мкм с БСА-Ци7-конъюгатом были интратрахеально введены мышам. Легкие были извлечены из организма животного через 20 минут после инстиляции. Толщина 3D реконструкции составила 3.5 мкм. Шаг построения конфокальных плоскостей составлял 0.2 мкм [23]

3.6 Фармакокинетика модельных веществ после интратрахеальной инстиляции

В рамках исследования фармакокинетики модельных веществ, доставляемых в легкие с помощью субмикронных Вт, были получены данные о концентрации флуорофора Ци7 в крови (рисунок 32). Данный краситель вводили в легкие мышей через трахеостому либо в свободном виде, либо в составе Вт. На частицы размером 0.65 мкм были адсорбированы чистый краситель Ци7 в

качестве модели низкомолекулярного вещества ($M_w=733.64$ Да) или в виде конъюгата БСА-Ци7 в качестве модели высокомолекулярного вещества ($M_w\sim 69$ кДа), а также свободный Ци7 в качестве контроля. Как видно, в каждом случае концентрация красителя в крови достигала максимума в определенный период времени. Как для одиночного красителя, адсорбированного на частицах, так и для свободного Ци7 максимальная концентрация наблюдается через 1.5–3 часа после введения. Однако меньшее количество красителя наблюдается в крови в случае введения частиц с иммобилизованным чистым флуорофором Ци7 в течение 48 часов, по-видимому, значительная часть остается в легких. В случае введения конъюгата БСА-Ци7, адсорбированного на Вт, наблюдается временной сдвиг максимальной концентрации красителя в крови. Наибольшая концентрация Ци7 в крови в данном случае обнаруживается через 6–9 часов после введения. И снова общее количество красителя, попадающего в кровоток в течение 48 часов значительно ниже по сравнению с введением свободного красителя (13% против 60%). Полученные данные демонстрируют, что Вт способны обеспечивать механизм медленного высвобождения как высокомолекулярных, так и низкомолекулярных веществ в легких с последующим их проникновением в системный кровоток.

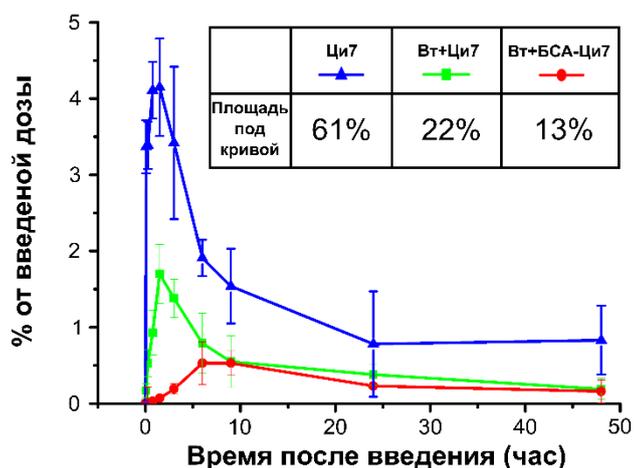


Рисунок 32 – Фармакокинетика флуоресцентного агента Ци7 после внутривнегочного введения в составе частиц ватерита 0.65 мкм и в свободной форме *in vivo*. Пробы крови анализировали в % от введенной дозы в указанные промежутки времени (5, 15 и 45 мин, 1,5, 3, 6, 9, 24 и 48 ч) после интратрахеального введения 0.65 мкм частиц, содержащих флуорофор Ци7 (как модельное низкомолекулярное вещество) или его конъюгат с белком БСА-Ци7 (как модельное высокомолекулярное вещество), а также свободного флуоресцентного красителя Ци7. Доза Ци7 составляла 300 нг для каждого введения. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение (n=3). Вставка – таблица, представляющая данные о суммарном количестве флуорофора, вышедшего в кровь за 48 часов наблюдения (AUC)

[23]

3.7 Иммобилизация бактериальной рибонуклеазы в структуру частиц ватерита

Представленные выше результаты основаны на адсорбции флуоресцентного агента на Вт для обеспечения визуализации распределения изучаемых частиц после интратрахеальной инстилляции. В описанных исследованиях акцент был сделан именно на изучении свойств Вт как системы доставки в нижние отделы легких. Данные о преимуществах Вт субмикронного размера позволяют перейти к рассмотрению формуляции уже не с модельным веществом, а с конкретным

биологически активным веществом, например, вызывающим апоптотическую гибель клетки.

В последнее время микробные рибонуклеазы вызывают значительный интерес в качестве потенциальных лекарственных средств. Среди бактериальных T1 рибонуклеаз следует отметить рибонуклеазу барназа, выделяемую из *Bacillus amyloliquefaciens* [162]. Барназа в составе рекомбинантных белков обладает высокой стабильностью и способностью вновь принимать нативную биологически активную конформацию после удаления хаотропных агентов [163]. Бактериальные рибонуклеазы обладают цитотоксическим действием на многие виды опухолевых клеток и, в связи с этим, представляют интерес в качестве основы для создания лекарственных средств, направленных на терапию некоторых видов рака. Показано, что бактериальные рибонуклеазы способны ингибировать клеточную пролиферацию для ряда лейкозов и солидных опухолей человека [164, 165]. Была показана селективная цитотоксичность и противоопухолевый эффект иммунотоксинов на основе барназы [166]. Бактериальные рибонуклеазы не имеют дисульфидных связей и не нуждаются ни в посттрансляционных модификациях, ни в кофакторах для каталитического гидролиза РНК. В силу высокой стабильности и отсутствия восприимчивости к ингибиторам рибонуклеаз, оба фермента проявляют высокую каталитическую активность к молекулам РНК в любых клетках эукариот. Разрезание молекулы РНК происходит преимущественно рядом с остатками гуанозина с образованием гуанозин-3'-фосфатного фрагмента и свободной 5'-гидроксильной группы [167]

Возможность индуцировать апоптоз у конкретной популяции клеток является на сегодняшний день очень желанной целью. В рамках представленной работы была реализована стратегия, подразумевающая иммобилизацию бактериальной рибонуклеазы барназы в Вт (частицы размером 0.55 ± 0.12 мкм) с последующей функционализацией поверхности носителей с помощью аптамера к ЕрСАМ. Для загрузки барназой использовали Вт, синтезированные

как описано в главе 2. Загрузка была основана на электростатической адсорбции отрицательно заряженного декстрана сульфата (ДС) и положительно заряженной барназы (Бн). Схема загрузки Бн в Вт показана на рисунке 33. К частицам добавляли водный раствор ДС с последующей инкубацией в течение 30 мин при постоянном перемешивании. Затем частицы трижды промывали ультрачистой водой путем центрифугирования образца. После промывки к частицам, покрытым ДС, добавляли раствор барназы в ЭДТА-буфере и инкубировали еще 30 мин при постоянном перемешивании. Затем следовала промывка ультрачистой водой путем центрифугирования. Были подготовлены частицы «ядро-оболочка» с одним и двумя ферментными слоями: ДС/Бн/ДС и (ДС/Бн)₂/ДС. Для включения в состав носителей флуоресцентного маркера, Вт инкубировали в водных растворах пАрг, меченного ТРИТЦ, или БСА, меченного Ци7, до нанесения ДС и Бн. Для удаления несвязавшихся молекул частицы трижды промывали сверхчистой водой путем центрифугирования образцов.

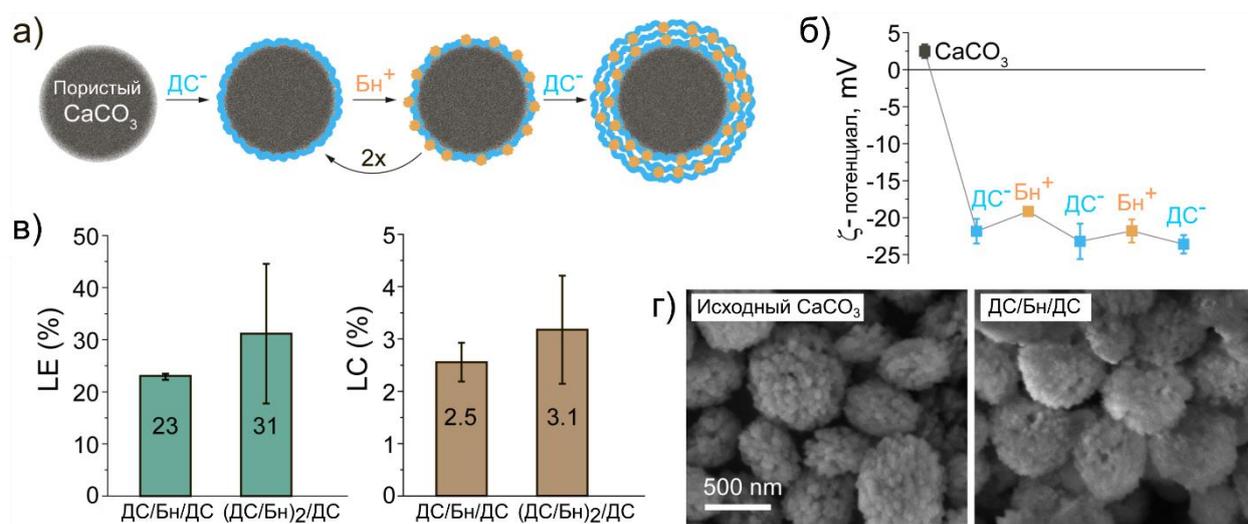


Рисунок 33 –а) Схема, показывающая адсорбцию положительно заряженной барназы (Бн) на субмикронных частицах ватерита, покрытых отрицательно заряженным декстрана сульфатом (ДС). б) Изменение поверхностного заряда (ζ-потенциала) частиц ватерита при осаждении ДС и Бн, измеренное методом динамического рассеяния света (ДРС). в) Эффективность инкапсуляции частиц ватерита после нанесения одного и двух слоев Бн (LE - эффективность загрузки; LC - емкость загрузки). Столбцы представляют собой среднее

значение \pm стандартное отклонение результатов трех независимых экспериментов. г) СЭМ-изображения исходных частиц ватерита и после нанесения одного слоя Бн [168]

Дзета-потенциал Вт после адсорбции каждого слоя измеряли методом динамического светорассеяния (ДСР), чтобы контролировать осаждение молекул (рисунок 33б). При нанесении первого слоя ДС дзета-потенциал Вт изменился с +2.8 мВ до -21.4 мВ. Адсорбция Бн на частицах, покрытых ДС изменила дзета-потенциал незначительно до -18.8 мВ, тогда как последующее покрытие ДС вновь понизило дзета-потенциал до -22.8 мВ. Дзета-потенциал после адсорбции второго слоя Бн составил -21.4 мВ и значение в -23.2 мВ было достигнуто после финального покрытия ДС. Хотя полной сверхкомпенсации поверхностного заряда после осаждения фермента на частицы, покрытые ДС, не произошло, снижение дзета-потенциала может свидетельствовать о связывании Бн с ДС. Барназа имеет 16 из 110 аминокислотных остатков (аргинин, гистидин и лизин), которые несут катионные группы [162]. Бн обладает положительным зарядом (+11.7 мВ) при рН 8 (изоэлектрическая точка \sim 9.6). С другой стороны, ДС имеет отрицательный заряд -31 мВ из-за большого количества сульфатных групп на глюкозильный остаток. Таким образом, можно ожидать электростатического комплексообразования между Бн и ДС. Это комплексообразование можно считать аналогичным взаимодействию других слабых и сильных полиэлектролитов, учитывая, что ДС имеет больший суммарный отрицательный заряд по сравнению с суммарным положительным зарядом Бн [169]. Это, в свою очередь, может приводить к уменьшению компенсации отрицательного заряда ДС молекулами Бн.

На рисунке 33в представлены рассчитанные значения LE и LC фермента в Вт. Для Вт с двумя слоями Бн LE и LC несколько выше, чем для частиц с одним слоем Бн. Полученные данные согласуются с предыдущими результатами, в которых была исследована загрузка Бн с помощью ДС в качестве адьюванта. СЭМ-изображения Вт, загруженных одним слоем Бн, выявили разницу в

морфологии по сравнению с исходными Вт (рисунок 33г). Установлено, что поверхность Вт с одним слоем Бн имеет большое количество пор, заполненных внедряющимися молекулами. Хотя СЭМ-изображения не демонстрируют локализации молекул внутри пор, они качественно показывают изменения морфологии частиц при осаждении Бн и ДС. В работе [24] было определено распределение молекул Бн и ДС по размерам методом динамического светорассеяния. Бн и ДС имеют следующие гидродинамические диаметры: 2.7 ± 0.7 нм и 0.8 ± 0.2 нм, соответственно [24]. Эти значения чрезвычайно малы по сравнению с размером пор Вт (30-80 нм). Таким образом, можно ожидать их преимущественной локализации внутри пор частиц. В указанной работе также было исследовано распределение Бн, конъюгированной с флуоресцеина малеимидом, с помощью конфокального микроскопа и выявлена его локализация как внутри пор, так и на поверхности частиц. Таким образом, локализация адсорбируемых молекул происходит внутри пор Вт, особенно в ходе первых циклов осажденных слоев. Антонов и др. показали, что отношение зарядов определяет степень комплексообразования лизоцима с сульфатом декстрана и что преобладающую роль во взаимодействии играют электростатические силы [170]. Следует отметить, что лизоцим имеет природу, сходную с барназой [162], поэтому можно ожидать аналогичного взаимодействия между Бн и ДС. Полученные данные свидетельствуют об успешной иммобилизации Бн в Вт.

Далее была оценена активность Бн, иммобилизованной в Вт, в отношении дрожжевой РНК. За единицу активности принимали количество Бн, увеличивающее оптическую плотность на одну оптическую единицу при 260 нм гидролиза РНК при инкубации при 37°C. РНКазная активность очищенной Бн и Вт, содержащих один и два слоя Бн, показана на рисунке 34а. Было установлено, что РНКазная активность зависит от ЛС Вт, в частности, активность для частиц с одним слоем Бн составила 9.8 нМ/мин, а для частиц с двумя слоями Бн активность составила 13 нМ/мин. В течение первых 24 часов активность

снизилась до 8.6 нМ/мин для двух слоев Бн, а для одного слоя Бн увеличилась до 11.3 нМ/мин (рисунок 34б). В последующие интервалы инкубации активность двух слоев Бн увеличивалась до 44.9 нМ/мин, затем снизилась до 18.6 нМ/мин после инкубации в течение 168 часов и до 10.9 нМ/мин через 336 часов. Напротив, активность одного слоя Бн продолжала постепенно увеличиваться до 22 нМ/мин в течение 336 часов. Активность Бн увеличивается за счет высвобождения фермента из частиц в результате растворения карбоната кальция в водном растворе и превращения его в термодинамически стабильную полиморфную модификацию кальцита [24].

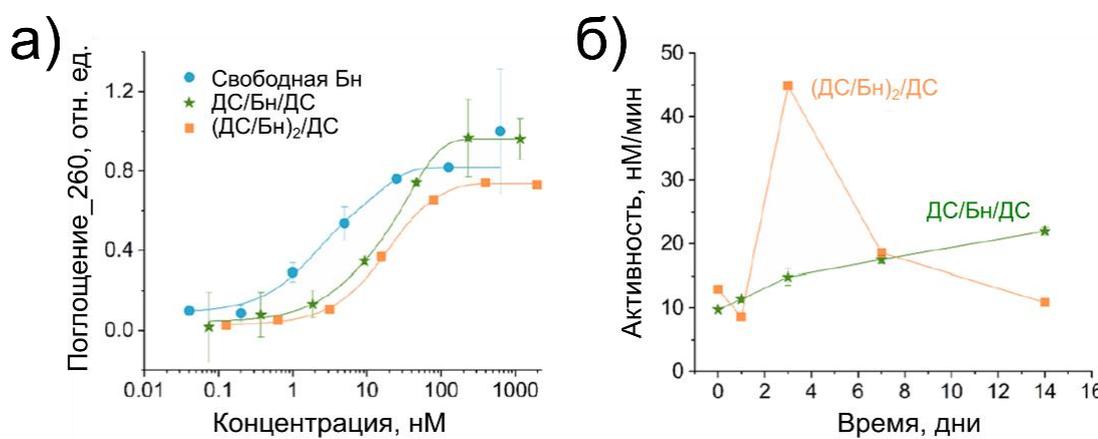


Рисунок 34 – а) Зависимость нормированной оптической плотности свободного Вп, а также одного и двух слоев Вп в частицах ватерита, измеренная при $\lambda = 260$ нм, от концентрации. б) РНКазная активность одного и двух слоев Вп в частицах ватерита в разные интервалы времени в водном растворе [168]

В настоящей работе изменение активности во времени также может быть связано с высвобождением Бн, ДС или комплекса Бн/ДС из частиц, способствующим РНКазной активности, хотя каких-либо значительных изменений в кристаллической фазе Вт не было обнаружено через 336 ч (рисунок 35). Кроме того, некоторые ферментные молекулы, которые не ограничены внутренней поверхностью Вт, также могут вносить свой вклад в активность.

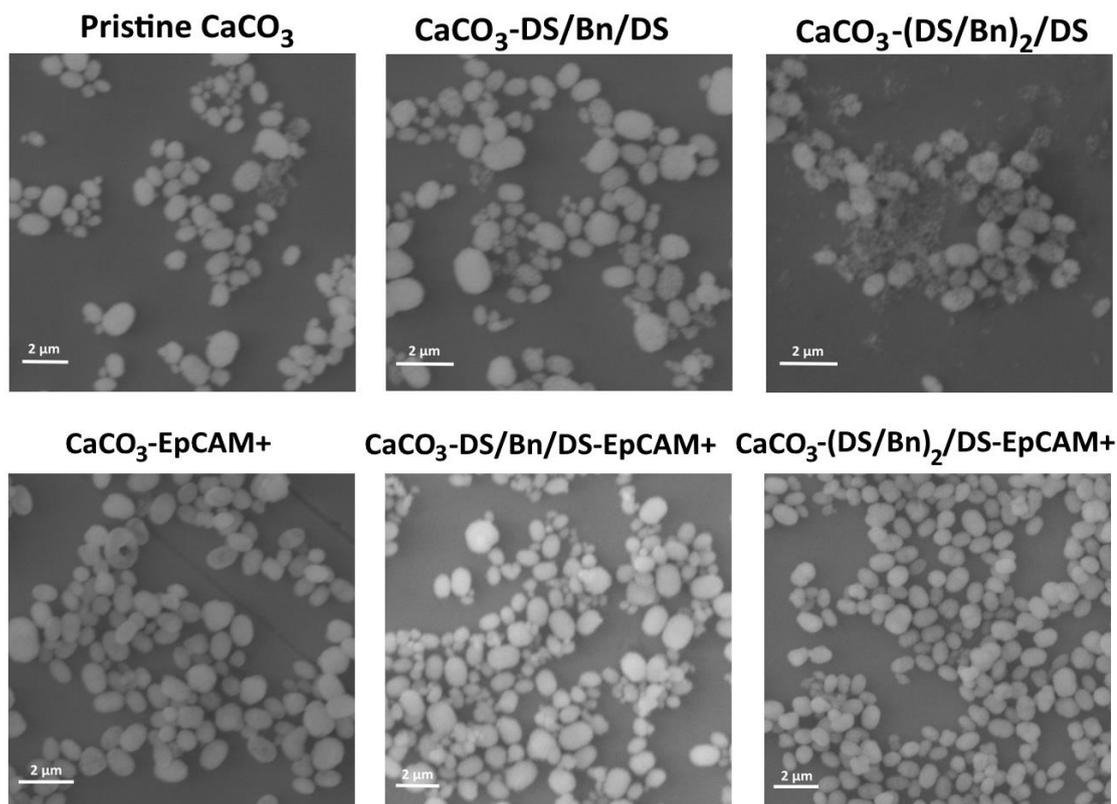


Рисунок 35 – СЭМ-изображения исходных частиц ватерита, покрытых слоями ДС/Бн/ДС и (ДС/Бн)₂/ДС без и с дополнительной функционализацией олигонуклеотидом, специфичным к EpCAM, инкубированных в деионизованной воде в течение 336 часов [168]

Следует отметить, что ДС не влияет на активность Бн, как показано на рисунке 36. Установлено, что более 90% Бн было активным при инкубации с 1 мг/мл ДС. Метод оценки активности Бн предполагает деградацию субстрата, в данном случае РНК дрожжей [139]. Одна активная молекула Бн способна расщеплять РНК более одного раза. Таким образом, даже небольшое увеличение количества адсорбированной Бн приводит к резкому изменению количества расщепленного субстрата.

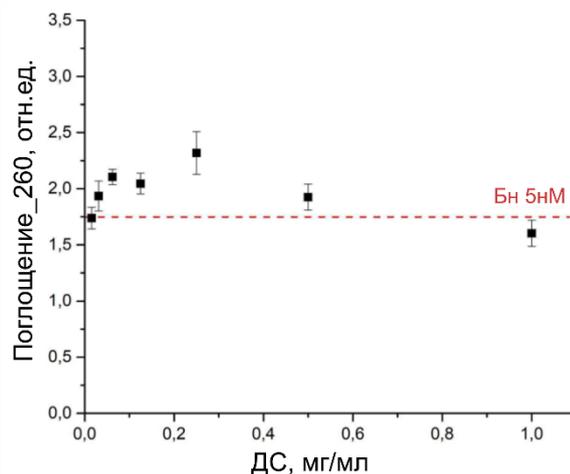


Рисунок 36 – Значения активности Бн после инкубации с ДС с различными концентрациями в течение 15 минут [168]

Рибонуклеазная активность одного и двух слоев Бн, иммобилизованных в Вт, функционализированных ЕрСАМ, в разные промежутки времени показана на рисунке 37а. Проточная цитометрия связывания Цианин 5-меченого олигонуклеотида с Вт, конъюгированными со стрептавидином, продемонстрировала значительное увеличение флуоресценции по сравнению с фоном, что подтверждает успешное присоединение олигонуклеотида к частицам (рисунок 37б, в).

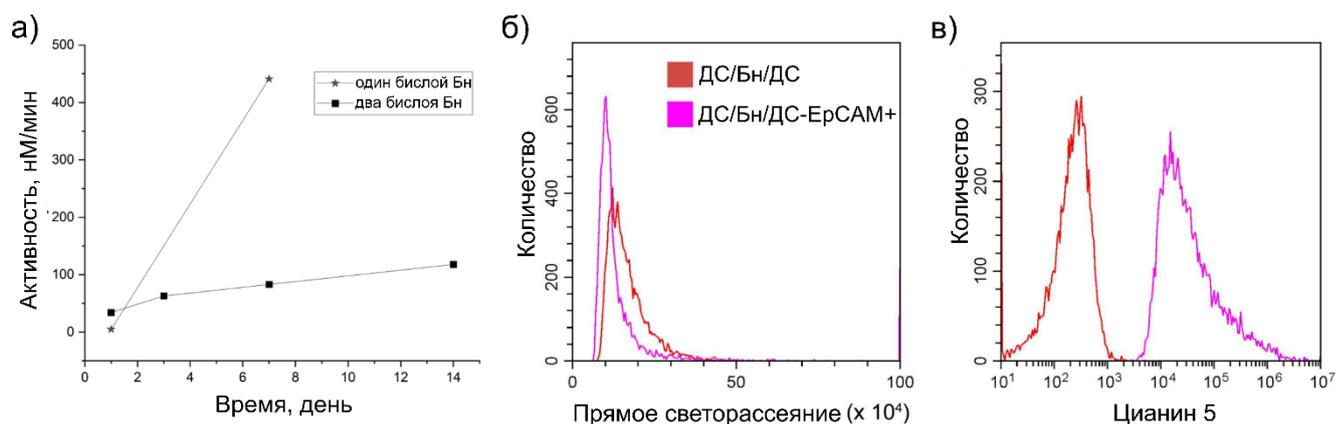


Рисунок 37 – а) Рибонуклеазная активность одного и двух бислоев Бн, иммобилизованных в частицах ватерита, функционализированных ЕрСАМ, в разные промежутки времени. Данные проточной цитометрии связывания биотинилированного Цианин 5-меченого олигонуклеотида со стрептавидином, адсорбированным на частицах ватерита ДС/Бн/ДС. б) сигнал прямого рассеяния и в) флуоресценция Цианина 5 от частиц ватерита ДС/Бн/ДС до и после конъюгации олигонуклеотидов [168]

3.8 Интернализация частиц ватерита с иммобилизованным ферментом барназа, функционализированных олигонуклеотидом

Чтобы проверить успешность использования разработанных структур «ядро-оболочка» с иммобилизованным ферментом Барназа (Бн), а также учесть вклад векторного олигонуклеотида (ЕрСАМ) в обеспечение цитостатического эффекта был проведен MTS тест на клеточной линии легочной карциномы человека. Были исследованы образцы (i) без барназы в качестве контроля влияния, оказываемого непосредственно пустым носителем в отсутствии и при наличии на поверхности частиц ЕрСАМ, (ii) с одним и (iii) двумя циклами адсорбции фермента для немодифицированных и модифицированных ЕрСАМ частицах. На рисунке 38а представлены результаты расчета выживаемости клеток линии А549 через 48 часов после добавления указанных образцов в широком диапазоне концентраций. Наибольший цитостатический эффект был

продемонстрирован частицами с двойной загрузкой Бн и при наличии ЕрСАМ. Данный результат является статистически значимым, в то время как средние значения выживаемости клеток в остальных группах образцов хоть и отличаются друг от друга с тенденцией к снижению выживаемости при увеличении количества загруженной бараназы и применении векторного олигонуклеотида, но данные различия не являются статистически значимыми.

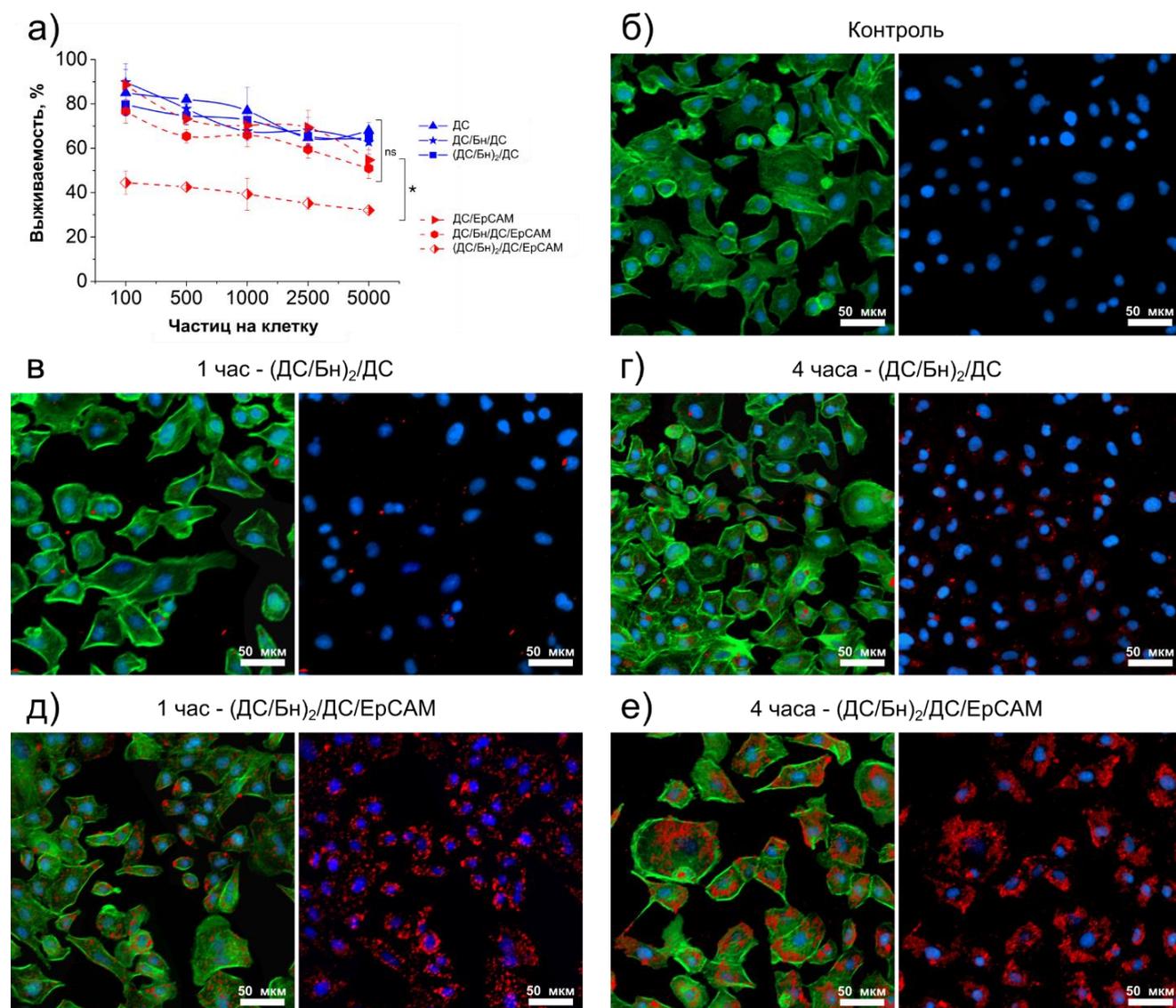


Рисунок 38 – а) Цитотоксичность субмикронных частиц ватерита с одним и двумя слоями фермента Бн с вектором ЕрСАМ и без него на поверхности частиц на клетках аденокарциномы легкого человека А549. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (* - p-уровень значимости < 0,01; ns - недостоверно). Флуоресцентные изображения клеток

A549, культивируемых без частиц (б) и с частицами, содержащими два слоя Бн без (в-г) и с векторным олигонуклеотидом ЕрСАМ (д-е), через 1 час (в, д) и 4 часа (г, е) с добавлением 100 частиц на клетку. Частицы ватерита были легированы ТРИТЦ-меченым пАрг (красный цвет), ActinGreen и Hoechst были использованы для окрашивания F-актина (зеленый цвет) и ядер (синий цвет)

[168]

Во многих работах было показано слабое цитостатическое действие как самих субмикронных Вт [27], так и структур «ядро-оболочка» различного состава на их основе [171, 172]. Полученные результаты свидетельствуют о цитотоксичности не более 18% при использовании пустых частиц «ядро-оболочка» в наименьших концентрациях (100-500 частиц на клетку). Использование модификации поверхности с помощью ЕрСАМ увеличивает цитотоксичность пустого носителя на 10%. Загрузка барназы в частицы, модифицированные ЕрСАМ, увеличивает цитотоксический эффект еще на 15% и 30% для одного и двух циклов адсорбции фермента. Цитотоксический эффект, оказываемый барназой, является дозозависимым явлением [164].

В данном исследовании был оценен цитотоксический эффект после 48 часов инкубации A549 с разработанными носителями без и с иммобилизованной Бн, а также свободным ферментом (рисунок 38а, 39а,б). Ранее было показано [166], что жизнеспособность клеток со временем снижается при воздействии барназы. Полученные результаты коррелируют с представленными в [166] и показывают, что рациональная конструкция носителей, включающая высокий уровень эффективности загрузки и функционализацию специфическими векторами, может обеспечить цитотоксичность более 65%. Этот критерий можно улучшить за счет увеличения времени инкубации. Следует также учитывать, что интернализация добавленных к клеткам частиц может идти по пути макропиноцитоза с увеличением их числа из-за слишком близкого расположения

друг к другу. Такой путь поглощения приводит к лизосомальному расщеплению активного фермента и потере его активности. Доставка отдельных частиц делает возможным выход Бн из эндосомы, что приводит к эффективному биологическому ответу (например, к гибели клеток) [173].

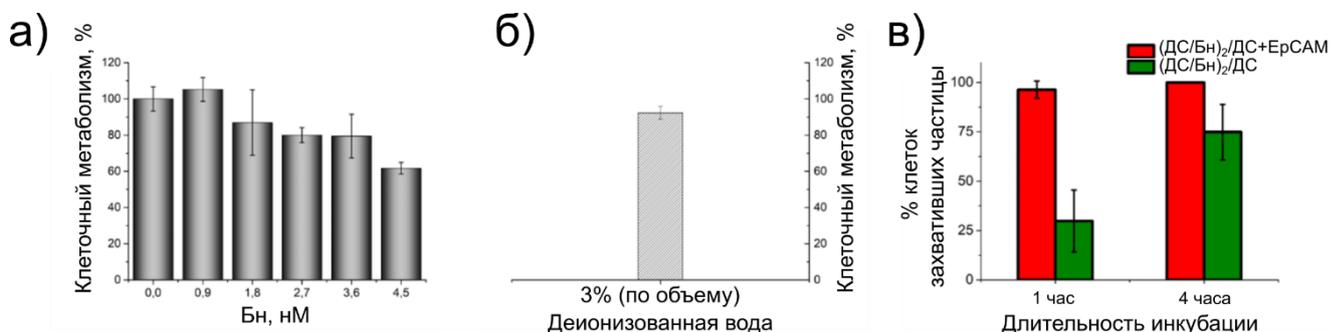


Рисунок 39 – а) Относительная жизнеспособность клеток после 48 часов инкубации со свободной барназой. б) Относительная жизнеспособность клеток после 48 часов инкубации с деионизированной водой. в) Процент клеток с интернализированными частицами. Расчет основан на учете количества ядер на микроскопических изображениях и анализе колокализации (наличие частицы внутри клетки). Анализировали 5 полей зрения для каждого образца и момента времени [168]

Для визуализации эффективности интернализации образцов, обладающих наибольшей цитотоксичностью, а также контрольных образцов, была проведена флуоресцентная микроскопия клеток A549 через 1 и 4 часа инкубации (рисунок 38 б-е). Исследуемая концентрация составляла 100 частиц на клетку. F-актин в клетках окрашен в зеленый цвет, ядро окрашено голубым, добавленные частицы имеют красный цвет. Микроскопия контрольных образцов демонстрирует в основном распластанные клетки и несколько округлых, которые недавно поделились (рисунок 38б). Артефактов, имеющих красную окраску, не было обнаружено.

За час инкубации A549 с частицами без ЕрСАМ лишь единичные клетки успевают захватить хотя бы одну частицу (рисунок 38в). В то время как векторный олигонуклеотид обеспечивает адгезию множества частиц (рисунок 38г). Процент клеток, захвативших частицы без олигонуклеотидного вектора, был более чем в 3 раза меньше, чем процент клеток, интернализовавших частицы с ЕрСАМ (рисунок 38в-е, 39в). Модификация поверхности частиц «ядро-оболочка» с помощью аптамера ЕрСАМ позволила улучшить скорость интернализации [172], так что уже через 1 час инкубации почти все клетки в популяции захватили частицы. Кроме того, количество частиц, ассоциированных с единичной клеткой, также было достаточно велико. В случае инкубации с частицами, свободными от ЕрСАМ, клетки были способны захватывать только одну частицу или агрегированные частицы, в то время как наличие вектора ЕрСАМ на частицах обеспечивает интернализацию клетками десятков частиц (точное количество частиц, интернализируемых клетками, подсчитать сложно из-за их небольшого размера). Таким образом, эти данные ясно показали, что направляющий вектор ЕрСАМ ускоряет интернализацию частиц и приводит к большому количеству частиц на клетку.

Более длительное время инкубации (4 часа) приводит к распространению маркера флуоресцентных частиц (ТРИТЦ-меченный пАрг) в цитоплазме клеток, что наблюдается по окрашиванию больших участков внутри клеток (рисунок 38е). ТРИТЦ- меченный пАрг был адсорбирован на Вт в качестве первого слоя, и его диффузия через остальные 5 слоев весьма сомнительна. Высвобождение и распределение в цитозоле ТРИТЦ-меченого пАрг, скорее всего, связано с разрушением связей между молекулами, образующими оболочку частицы, под действием внутриклеточных ферментов при рецептор-опосредованном эндоцитозе [174]. Об аналогичном процессе изменения характера распределения флуоресцентного сигнала, а именно переходе от пятнистой картины флуоресценции к довольно диффузному флуоресцентному фону, сообщали Силу

Чжан и др. [175], и он был связан с деградацией носителя, загруженного флуоресцентным веществом, внутри клетки.

Таким образом, нами был разработан подход к увеличению эффективности использования фермента, вызывающего гибель раковых клеток [164, 176] за счет возможности многократной загрузки предлагаемого носителя и модификации его поверхности вектором для адресации [177].

3.9 Исследование влияния функционализации частиц олигонуклеотидом на их биораспределение

Легочное аэрозольное введение, в частности интратрахеальная инстилляционная как модель ингаляции, является одной из наиболее эффективных стратегий локализации систем доставки лекарств в легких [23, 115], хотя могут возникать некоторые воспалительные изменения [178]. Прежде всего, были проверены безопасность и эффективность разработанных носителей в трех дозах: 6×10^6 , 18×10^6 , 30×10^6 частиц. Был проведен гистологический анализ легочной ткани через 24 часа после однократной интратрахеальной инстилляционной 6×10^6 и 30×10^6 частиц на мышь (рисунок 40а-в). Патологических изменений в альвеолярной структуре не было выявлено (окраска гематоксилином и эозином). Кроме того, более высокая доза была связана с лучшим сигналом флуоресценции (рисунок 40г) и использовалась в следующих экспериментах.

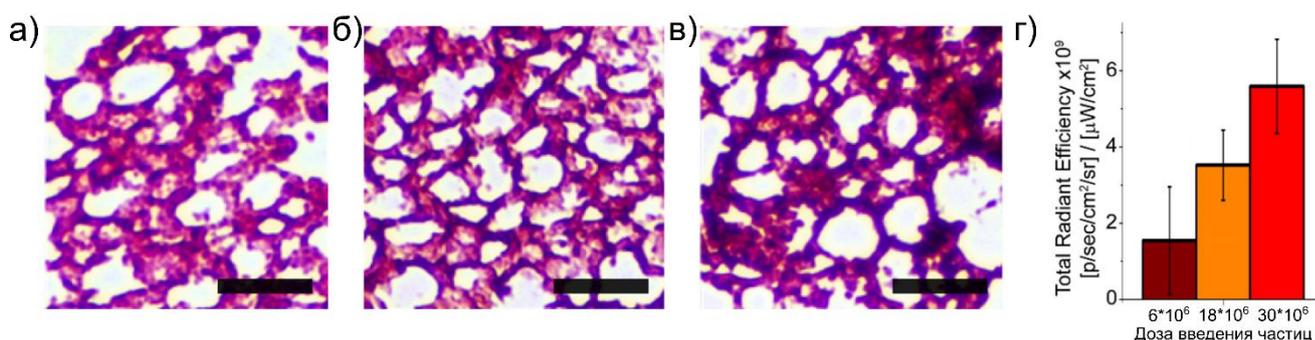


Рисунок 40 – Гистологический анализ тканей легких через 24 часа после интратрахеальной инстилляционной частиц ватерита в различных дозах: а) ФСБ, б) 6×10^6 частиц, в) 30×10^6 частиц. Масштабная линейка составляет 20 мкм. г)

Анализ биораспределения частиц ватерита (ДС/Бн/ДС) при различных дозах введения [168]

Затем было изучено биораспределение 30×10^6 частиц «ядро-оболочка» у мышей после их внутривенной инъекции или интратрахеальной инстилляцией. Хотя экспрессия ЕрСАМ немного увеличивается в нормальном эпителии легких [179, 180], это не приводит к заметному увеличению целевых частиц в легких после внутривенной инъекции (рисунок 41а). Немодифицированные Вт и частицы, модифицированные ЕрСАМ, предпочтительно накапливались в печени через 1 час после внутривенной инъекции (рисунок 41а, б). Полученный результат не коррелирует с данными, представленными в работе Марины Новоселовой и др. [181], где введение субмикронных капсул, модифицированных DARPin, привело к их аккумуляции в легких через 48 часов. Такое расхождение может быть связано с различиями в используемых носителях и дозе введения. Помимо того, что биораспределение в органах зависит от формы и размера носителя [182], их элиминация из органа является дозозависимой [183]. Носители в первую очередь проходят через сосуды, опутывающие легкие после внутривенного введения. Первоначально за счет механического застревания в мелких капиллярах введенные объекты удерживаются некоторое время в легких. Если не происходит полного блокирования капилляра, то кровотоком постепенно смывает часть застрявших носителей, оставляя те объекты, которые уже достаточно сильно адгезировали к эндотелию. В работе О. Майоровой [184] была показана динамика миграции введенных микрокапсул из легких в печень в течение 2 часов. Модификация носителей с помощью векторов, специфичных к ЕрСАМ, способна увеличить долю задерживаемых в легких систем доставки лекарственных средств [185]. Однако, стоит отметить, что при малых дозах введения наиболее вероятно, что носители, особенно нанометрового размера, способны пройти малый круг кровообращения без задерживания в легких. В данном исследовании использовано введение 30×10^6

частиц, что является крайне малой дозой. Обычно внутривенно вводят от 1×10^8 до 1×10^9 носителей [181, 185]. По-видимому, на удержание носителя, который адгезировал к эндотелию, влияет его жесткость. Мягкие объекты, такие как капсулы, могут изменять свою форму, но оставаться связанными с эндотелием, при столкновении с другими носителями или клетками, которые несутся в кровотоке. В то время как жесткие частицы скорее всего будут оторваны в случае соударения. Данные вопросы являются крайне важными и требуют дальнейшего изучения.

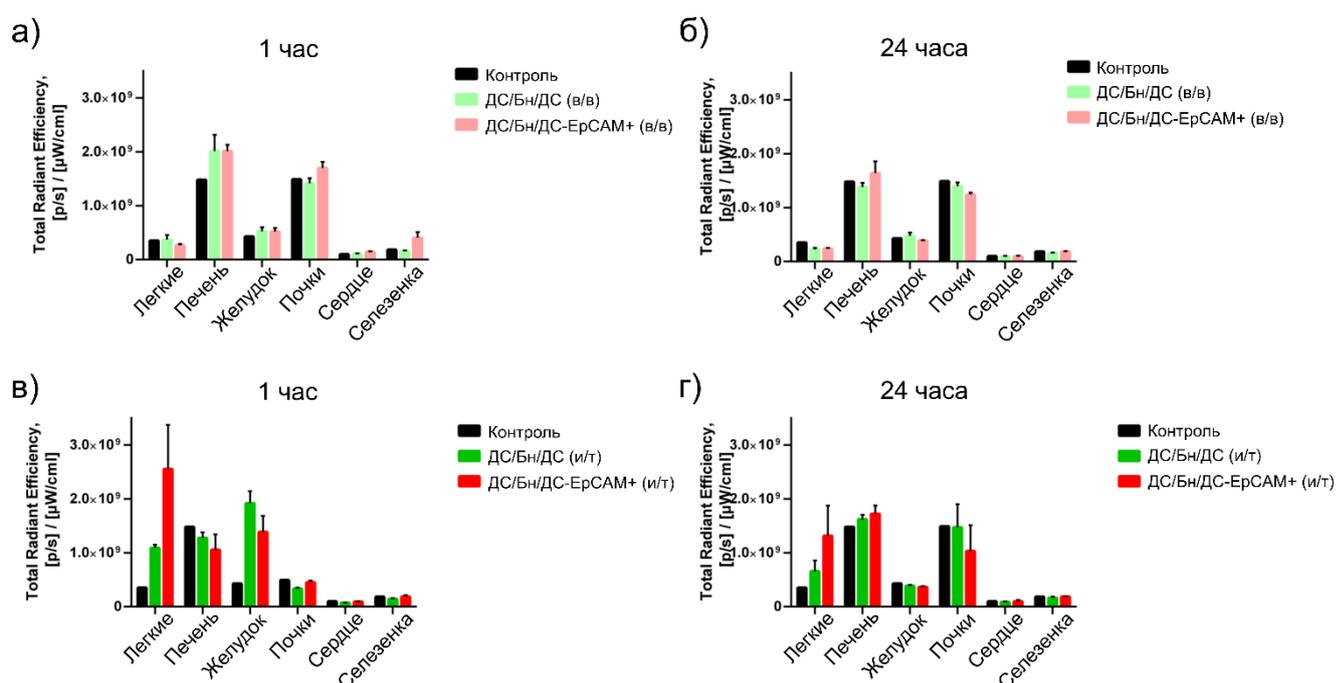


Рисунок 41 – Анализ биораспределения частиц ватерита (ДС/Бн/ДС и ДС/Бн/ДС-ЕрСАМ+) в органах (легкие, печень, желудок, почки, сердце и селезенка) через 1 ч (а, в) и 24 ч (б, г) после внутривенной инъекции (в/в.) или интратрахеальной инстилляцией (и/т.). Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение [168]

Основным преимуществом местного введения является достижение желаемого эффекта при низких дозах введения. В данном случае это увеличение интенсивности флуоресцентного сигнала в легких, что напрямую связано с

накоплением вводимых частиц «ядро-оболочка». Было проанализировано биораспределение 30×10^6 частиц с одним слоем Бн с вектором ЕрСАМ и без него через 1 ч и 24 ч после их интратрахеальной инстилляции. Флуоресцентная визуализация органов *ex vivo* и анализ сигналов флуоресценции представлены на рисунке 42. Более высокая флуоресценция в легких через 1 ч была обнаружена для Вт, модифицированных ЕрСАМ, по сравнению с частицами без ЕрСАМ и контрольным образцом (ФСБ). Криосрезы легких, сделанные через 1 ч после интратрахеального введения частиц с аптамером специфичным к ЕрСАМ и без него, также продемонстрировали большее количество частиц, конъюгированных с ЕрСАМ, в легочной ткани (рисунок 42д). На микроскопических изображениях криосрезом легких представлено именно альвеолярное пространство, которое являлось целью для распределения вводимых частиц. В случае с контрольным образцом сигнал от флуоресцентного красителя Ци5 не обнаруживается, только автофлуоресценция биологической ткани. На остальных изображениях (рисунок 42д) видны яркие пятна с типичной эмиссией Ци5, которые связаны с частицами «ядро-оболочка», вводимыми посредством интратрахеальной инстилляции. Таким образом, внутрилегочное введение разработанных носителей, независимо от функционализации вектором ЕрСАМ, приводит к их распространению в альвеолах. Частицы размером 0.5-1 мкм распределяются и глубоко проникают в легкие за счет диффузии (броуновское движение) [23, 115, 116]. Таким образом, модификация олигонуклеотидом, специфичным для ЕрСАМ, не оказала значимого влияния на место депонирования, однако наличие векторных молекул на поверхности введенных частиц повлияло на количество частиц, оставшихся в легких (рисунок 42б, г), что позволяет рассматривать данную формуляцию как систему с пролонгированным действием.

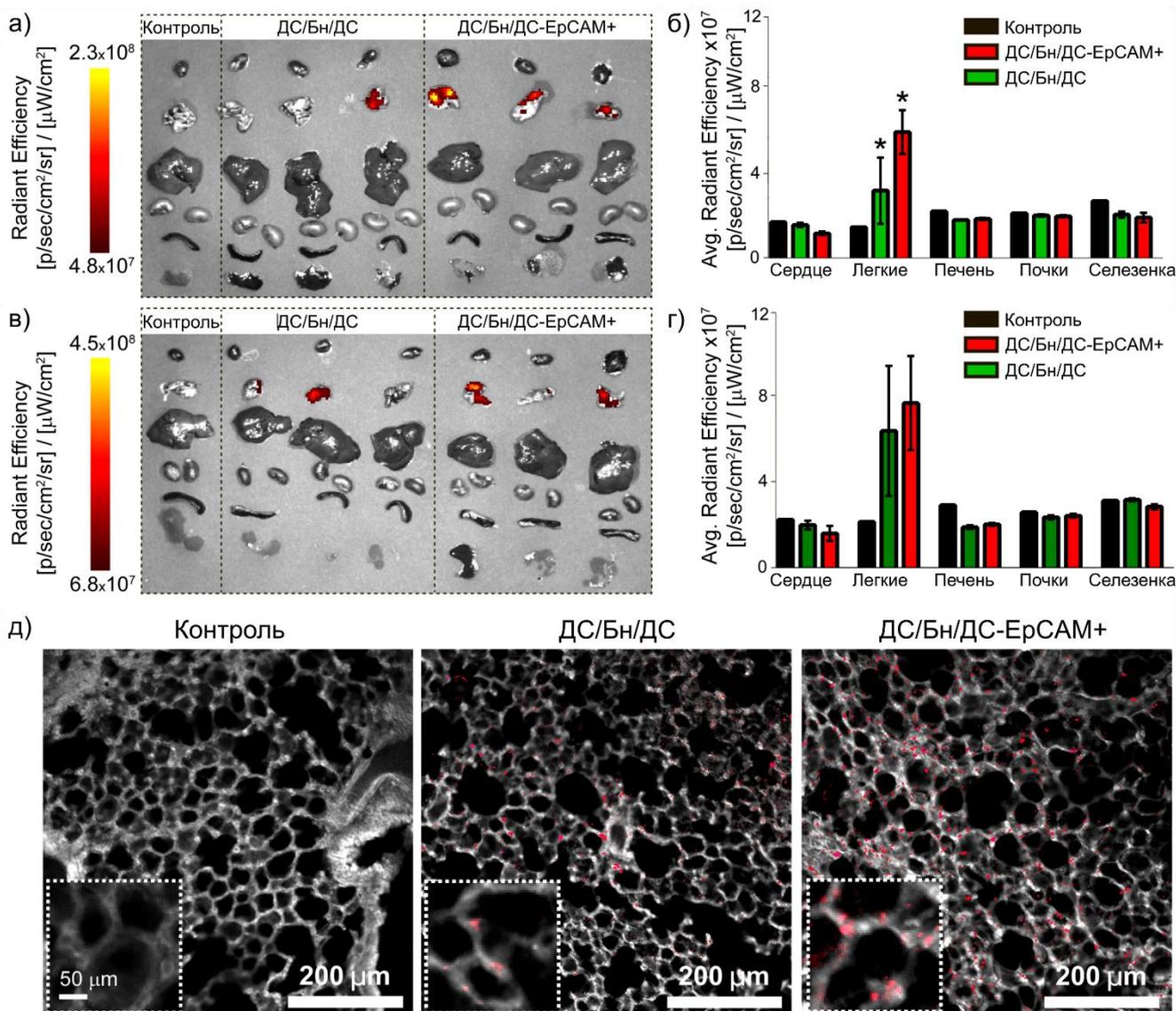


Рисунок 42 – а) - г) Анализ биораспределения меченных Цианином 7 частиц ватерита без и с дополнительной модификацией аптамером ЕрСАМ (ДС/Бн/ДС и ДС/Бн/ДС-ЕрСАМ+), после интратрахеальной инстилляцией через 1 ч (а, б) и 24 ч (в, г). В качестве контроля было осуществлено введение физиологического раствора (контроль). Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение (* - р-уровень значимости <0.05). Органы (сверху вниз): сердце, легкие, печень, почки, селезенка. Флуоресцентную визуализацию выполняли на системе визуализации IVIS SpectrumCT In Vivo в режиме эпи-освещения (возбуждение/испускание при 710/780 нм). д) Наложение автофлуоресценции и канала Ци5 (маркер частиц) криосрезов легких через 1 ч после

интратрахеального введения частиц с рецептором ЕрСАМ и без него и контроля. На вставке показано увеличенное изображение структуры легкого

В то время как в первые минуты или даже час интенсивность флуоресценции в органе напрямую связана с количеством частиц (рисунок 43), аккумулярованных в нем, связь флуоресценции и количества частиц с течением времени становится сложно предсказуемой из-за большого количества факторов, действующих на частицы, распределившиеся в легких. С одной стороны, макрофаги, патрулирующие альвеолярное пространство, способны фагоцитировать и метаболизировать введенные частицы [186], что должно приводить к уменьшению числа распределенных в органе частиц и, как следствие, к снижению интенсивности флуоресценции. С другой стороны, деградация частиц в альвеолах может приводить к разрушению связей между Ци7 и аптомером к ЕрСАМ с последующим высвобождением Ци7 в легочный флюид, что, в свою очередь, внесет изменения в интенсивность флуоресценции. Так, в ряде работ было показано разгорание флуоресценции при деградации носителей *in vivo* [183, 187]. Цианиновые красители имеют тенденцию к увеличению квантового выхода при увеличении концентрации белков в растворе [188]. Поэтому с течением времени соотносить интенсивность флуоресценции и количество объектов, обладающих этой флуоресценцией, напрямую не представляется правильным. Однако флуоресцентная томография органов через 24 часа после интратрахеальной инстиляции показывает, что функционализация частиц олигонуклеотидом к ЕрСАМ позволяет сохранить уровень флуоресценции в целевом органе. Можно ожидать, что связывание ЕрСАМ-модифицированных частиц с эпителиальными клетками (бронхиальными или альвеолярными) препятствует клиренсу частиц из дыхательной системы в первые часы после инстиляции и может в дальнейшем способствовать их интернализации. Эти данные согласуются с результатами интернализации частиц в клетках аденокарциномы легкого человека А549, описанными выше.

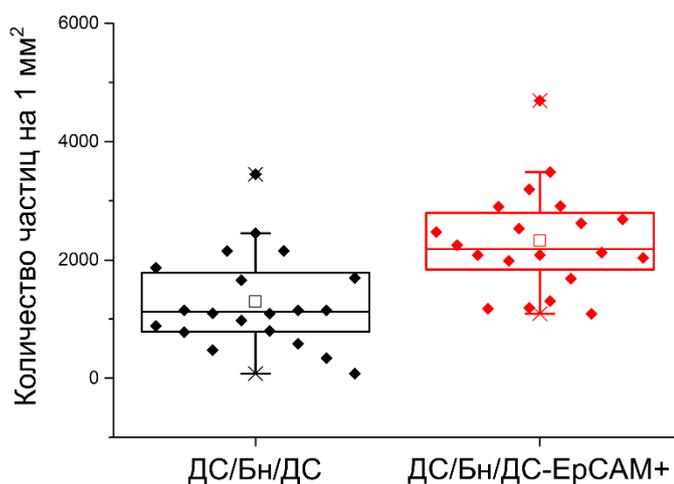


Рисунок 43 – Плотность распределения частиц без и с модификацией поверхности векторным олигонуклеотидом специфичным к ЕрСАМ через 1 ч после интратрахеальной инстилляции (р-критерий составляет 0.0456).

Данный этап исследований продемонстрировал возможность новой системы доставки на основе Вт обеспечить эффективное накопление рибонуклеазы Бн в тканях легких. С этой целью были разработаны наноразмерные Вт и покрыты оболочкой из биомолекул, в том числе ферментом Бн с высокой рибонуклеазной активностью и длительной стабильностью. Конъюгация с аптамером ЕрСАМ способствовала проникновению частиц через клеточную мембрану, что привело к значительному цитотоксическому эффекту *in vitro*. Улучшение накопления разработанных ЕрСАМ-нацеленных частиц в легких было подтверждено с помощью флуоресцентной томографии (IVIS Spectrum СТ) и конфокальной микроскопии после однократной интратрахеальной инстилляцией. Рассчитанная на основе анализа гистологических срезов тканей легких средняя поверхностная концентрация частиц после введения показывает, что наличие на поверхности векторных молекул позволяет сохранить в целевом органе больше носителей ($2.3 \times 10^3 \text{ мм}^{-2}$) по сравнению с немодифицированными носителями ($1.3 \times 10^3 \text{ мм}^{-2}$). Таким образом, двухслойные наноразмерные Вт, содержащие Бн, могут быть

перспективным средством для эффективной доставки рибонуклеазы и других белков для лечения заболеваний легких, включая рак и вирусные заболевания.

3.10 Выводы к главе 3

Были исследованы три размера Вт от 0.65 до 3.15 мкм (рисунок 20). Частицы трех размеров достигали легких после интратрахеальной инстилляцией и, как следствие, доставляли иммобилизованное вещество (конъюгат БСА-Ци7), в тело животных (рисунок 28). Однако частицы размером 0.65 мкм обеспечили самую эффективную аккумуляцию флуоресцентного сигнала в органе-мишени в течение 72 часов. Эти частицы проникли в легкие и достигли альвеолярной области (рисунок 30, 31). Кроме того, они обеспечили самое продолжительное время удержания флуоресценции в легких (рисунок 29) и благоприятную фармакокинетику для системы доставки лекарственных средств с медленным высвобождением в сосудистую сеть (рисунок 32).

Одним из наиболее значимых результатов этого исследования является подтверждение того факта, что, используя Вт размером 0.65 мкм, можно добиться доставки в респираторную часть легких. Ряд заболеваний легких, включая ХОБЛ и острое поражение легких, имеют значительную долю воспаления в этих областях как компонент их патофизиологии. Технически сложно доставлять противовоспалительные препараты в эту часть легких через дыхательные пути, так как основная часть активного компонента задерживается в проводящих дыхательных путях, где эти соединения могут иметь побочные эффекты. Представленные результаты демонстрируют возможность эффективной доставки частиц в респираторную часть. В разработке стратегии терапии различных заболеваний легких можно опираться на иммобилизацию лекарственного вещества в Вт, как матрицу-носитель, и высвобождение лекарства только после достижения дыхательной части. Кроме того, взаимодействие с компонентами легочного сурфактанта будет вызывать медленное высвобождение лекарства, что может быть полезно при лечении хронических заболеваний легких, таких как эмфизема. Также предоставлены

доказательства возможности использования Вт для доставки лекарств в системный кровоток после внутрилегочного введения.

Был продемонстрирован подход к повышению эффективности использования фермента, вызывающего гибель раковых клеток [164, 176] за счет возможности многократной загрузки предлагаемых частиц и модификации их поверхности вектором для адресации [177]. В частности, предполагается, что изготовленные Бн-нагруженные Вт с направляющим вектором могут быть эффективны при лечении раковых заболеваний и вирусных инфекций, включая коронавирусные заболевания человека при интратрахеальной инстилляцией.

Выносимые на защиту положения

- 1. Частицы ватерита диаметром 0.65 ± 0.17 мкм, содержащие комплекс бычьего сывороточного альбумина и флуоресцентного красителя (Цианин 7), обеспечивают флуоресцентный сигнал в легких с интенсивностью $51.3 \pm 1.4\%$ от общей интенсивности флуоресценции по органам (легкие, печень, почки, желудок и кишечник), благодаря способности достигать альвеолярного пространства в следствии преимущественного влияния процесса диффузии на движение частиц малого размера в респираторной части легких, по сравнению с частицами ватерита диаметром 1.35 ± 0.16 мкм и 3.15 ± 0.60 мкм, движение которых управляется суперпозицией сил гравитации и инерции прямо пропорциональными квадрату аэродинамического диаметра частиц, обеспечивающими $30.2 \pm 1.4\%$ и $29.1 \pm 1.1\%$ интенсивностей флуоресцентных сигналов, соответственно, через 72 часа после интратрахеальной инстилляцией.**
- 2. Интратрахеальная инстилляцией суспензии носителей (30×10^6) на основе ватеритных частиц диаметром 0.55 ± 0.12 мкм, содержащих на поверхности олигонуклеотид специфичный к ЕрСАМ, обеспечивает распределение и удержание в течение одного часа в альвеолярном пространстве в 1.8 раз больше носителей (поверхностная концентрация частиц 2.3×10^3 мм⁻²) по сравнению с введением носителей, не**

обладающих векторными молекулами на поверхности (поверхностная концентрация частиц $1.3 \times 10^3 \text{ мм}^{-2}$) в следствие улучшения адгезии за счет образования лиганд-рецепторной связи между вводимыми частицами и клетками эндотелия легких.

Глава 4. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СУБМИКРОННЫХ ЧАСТИЦ ВАТЕРИТА С ИММОБИЛИЗОВАННЫМ АГЕНТОМ ДЛЯ ФДТ В РАМКАХ ОНКОТЕРАПИИ

4.1 Иммунизация порфиразина в субмикронные частицы ватерита

В экспериментах с порфиразином были использованы Вт, полученные методом химического соосаждения с повышенной вязкостью реакционной смеси за счет добавления этиленгликоля к раствору солей [135]. Морфологический анализ свежесинтезированных частиц проводили с помощью сканирующей электронной микроскопии (рисунок 44 а-в). Распределение по размерам было получено путем анализа полученных изображений ансамбля из 100 частиц с использованием бесплатного программного обеспечения Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

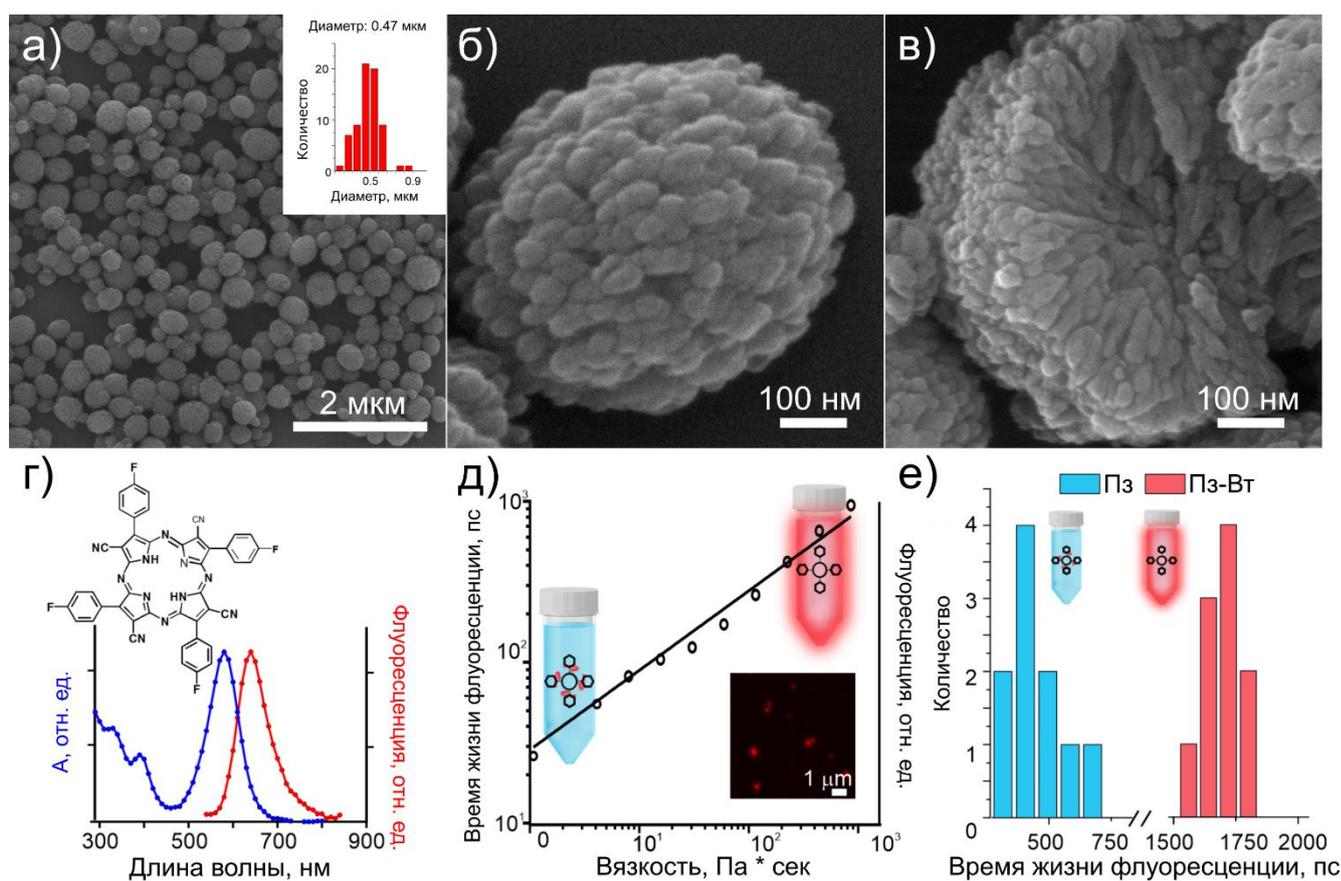


Рисунок 44 – а) Изображение частиц ватерита (Вт), полученное с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). На вставке (вверху справа) показана гистограмма распределения Вт по размерам, полученная в результате

анализа изображений СЭМ, средний диаметр 0.47 ± 0.14 мкм. б) Увеличенное изображение поверхности частицы ватерита, демонстрирующее ее пористую структуру. в) Разрез Вт, демонстрирующий внутреннюю структуру поликристалла. г) Спектры поглощения (синий) и флуоресценции (красный) Пз. На вставке (вверху слева) представлена химическая структура порфиразина, показывающая 4 периферических арильных кольца, вероятно, способных вращаться вокруг соответствующих плоскостных осей. д) График времени жизни флуоресценции Пз (левая ось Y) и интенсивности (правая ось Y) в зависимости от вязкости раствора. На вставках слева и справа показан раствор Пз в пробирке, проявляющий слабую (синий) и яркую (красный) флуоресценцию при возбуждении в микросредах с низкой и высокой вязкостью, соответственно. Вставка: изображение Пз-Вт на стекле, наблюдаемое в виде дискретных пятен, полученное с помощью флуоресцентной лазерной сканирующей конфокальной микроскопии; возбуждение/испускание, 635 нм/661 \pm 8 нм, соответственно. е) Гистограммы распределения времени жизни флуоресценции свободного Пз (синий) и Пз, загруженного в Вт (Пз-Вт, красный), инкубированных в DMEM + 10% ФБС [28]

Порфиразин является низкомолекулярным лекарственным средством (молекулярная масса 890 Да) и фотосенсибилизатором, образующим синглетный кислород или активные формы кислорода при возбуждении светом с длиной волны 550 нм [189] (рисунок 44г). Это свойство используется в фотодинамической терапии (ФДТ) [190]. Кроме того, порфиразин может перераспределять энергию возбуждения во вращение без эмиссии фотонов [191]. Интенсивность флуоресценции ($I_{\text{Фл}}$) и время жизни ($\tau_{\text{Пз}}$) Пз меняются в зависимости от степени внутримолекулярного вращения, которая зависит от локальной вязкости [192] – чем выше вязкость, тем выше как $I_{\text{Фл}}$, так и $\tau_{\text{Пз}}$ (рисунок 44д).

Вт загружали Пз путем инкубации 55 мг Вт с 2 мл 10 мМ водного раствора Пз при комнатной температуре в течение 1 часа. Нагруженные Вт промывали центрифугированием, затем осадок ресуспензировали в среде для роста клеток или в фосфатно-солевом буфере для экспериментов *in vitro* и *in vivo*, соответственно.

Эффективность загрузки Пз-Вт составила 2.3×10^{-2} моль Пз на 1 мг Вт (3×10^{11} молекул на Вт, или около $\sim 10\%$ масс./масс.), что сопоставимо с указанными в литературе данными для Вт и малых молекул (<1 кДа), таких как доксорубин [26], фотосенсибилизатор фталоцианин алюминия [136] и родамин [135]. Загрузка Пз в Вт происходила преимущественно за счет иммобилизации Пз в порах Вт.

Были проведены эксперименты, направленные на оценку морфологических и фазовых изменений и кинетики высвобождения. Был проведен фазовый анализ полученных спектров рентгеновской дифракции методом Ритвельда, результаты которого представлены на рисунке 45 а-б. Было замечено, что иммобилизация Пз сместила путь деградации Вт в сторону растворения, а не перекристаллизации, которая оставалась доминирующей в случае исходного Вт. В случае загруженных частиц во время инкубации при более низком рН 6.8 скорость перекристаллизации была самой высокой и составила $\sim 32\%$ частиц, представленных в фазе кальцита. Кроме того, твердая фракция коллоидного раствора уменьшилась на 10–50% в зависимости от времени инкубации и рН раствора (рисунок 45 в).

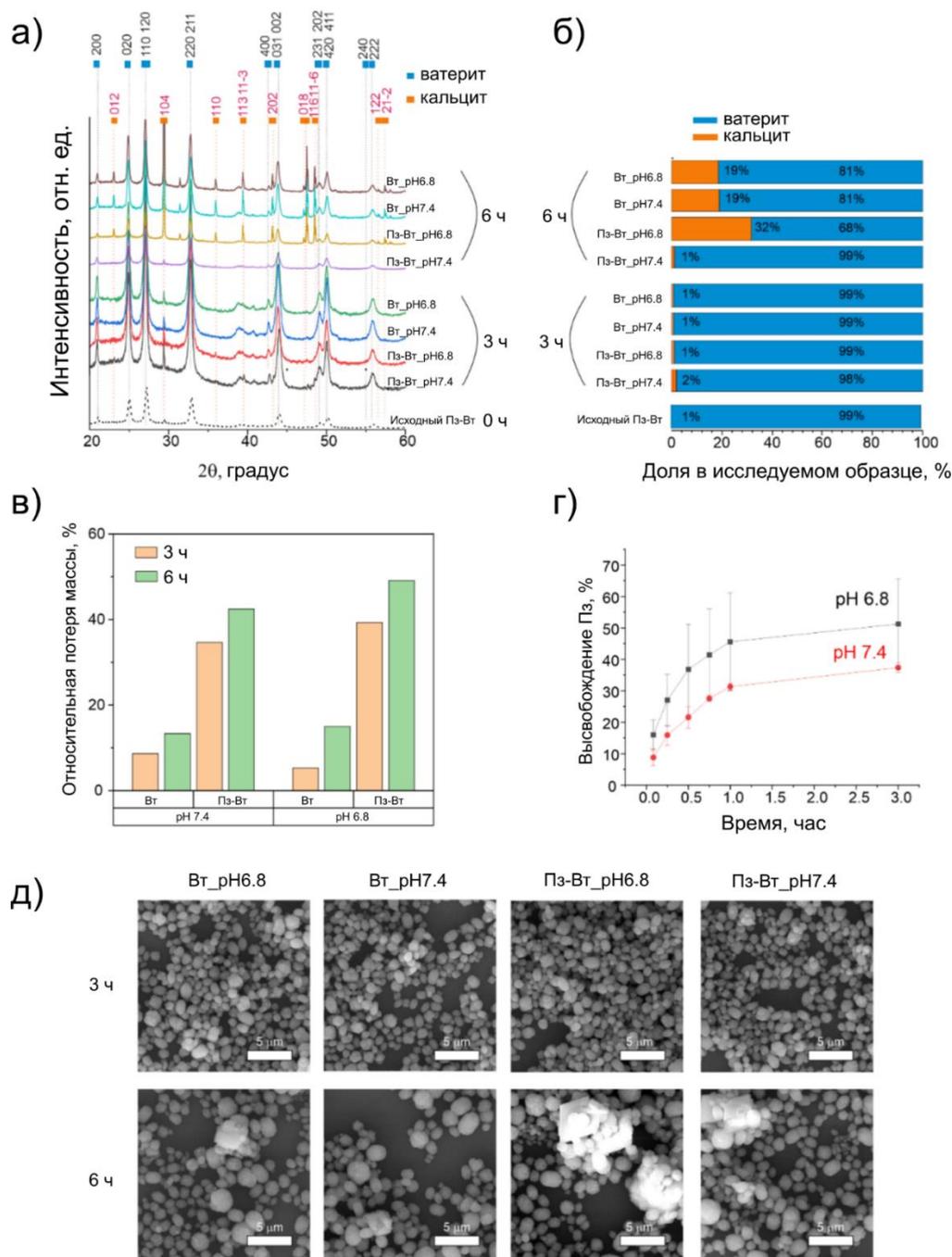


Рисунок 45 – а) Характеристика частиц ватерита, загруженных Пз, после инкубации в растворе с рН 6.8 и 7.4. Спектры дифракции рентгеновских лучей. б) Гистограмма фазового состава по данным анализа спектров РФА по методу Ритвельда. в) Относительная потеря веса исследуемых образцов. г) Динамика высвобождения Пз из ватеритной матрицы. д) Изображения сканирующей электронной микроскопии нагруженных (Пз-Вт) и ненагруженных (Вт) частиц, инкубированных 3 и 6 часов в растворах с рН 6.8 и рН 7.4 [28]

Высвобождение Пз из Вт измеряли в воде при физиологических условиях, имитирующих условия опухоли, рН 7.4 и 6.8 в течение 3 часов (рисунок 45г). При рН 7.4 высвобождение Пз через 3 часа составило <37%, что согласуется с сообщением о высвобождении фотосенсибилизатора Фотосенс® из Вт [136]. Наблюдаемое высвобождение было связано с десорбцией, поскольку частицы Вт оставались стабильными в коллоидах в течение 6 дней до появления кристаллов кальцита. При рН 6.8 высвобождение примерно 50% загруженного лекарственного средства произошло намного быстрее, в течение 3 часов (рисунок 45г), частично из-за растворения Вт после превращения Вт в аморфный CaCO₃ [193]. Следует отдельно подчеркнуть, что заметное увеличение уровня высвобождения и растворения Вт наблюдалось при несколько более низком значении рН, а именно рН 6.8, по сравнению с нейтральным уровнем кислотности (рН 7.4). Это важно для объяснения усиленного высвобождения лекарственного средства в ядре опухоли, для которого характерна более кислая среда внутри кровеносных сосудов. Резкая чувствительность высвобождения инкапсулированного в частицы Вт вещества к кислому рН (рН 6.8), типичному для микроокружения опухоли [194], является рациональным обоснованием выбора Вт в качестве средства доставки противоопухолевого лекарства.

Частицы Вт в жидкостях подвергаются растворению/перекристаллизации со скоростью, зависящей от значения рН. Например, при рН 6.8 Вт высвобождают около 50% иммобилизованного вещества в течение 3 часов (рисунок 45г, что также подтверждается наблюдением и анализом СЭМ-изображений, представленных на рисунке 45 д). Эта скорость намного выше, чем у широко распространенных полимерных наночастиц, биоразлагаемых в течение нескольких дней [195]. Хотя рН 6.8 является обычным для ракового микроокружения (рН 6.5 – 6.9) [194], значения рН плазмы крови в опухолевых капиллярах варьируются от нейтральных до кислых значений. Например, при скорости перфузии <0.2 мл/г/мин рН венозной крови опухоли составил 7.1 [196].

Иммобилизация Пз в Вт была подтверждена с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (КЛСМ). КЛСМ Пз-Вт показала дискретные яркие пятна, соответствующие одиночным Пз-Вт (рисунок 44 д). Для исследования распределения $\tau_{\text{Пз}}$ была проведена микроскопия времени жизни флуоресценции Пз-Вт и свободного Пз, инкубированных в культуральной среде DMEM с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ФСБ). На рисунке 44е показано, что распределение $\tau_{\text{Пз}}$ для Пз-Вт было значительно выше, чем у свободного Пз. Пз, связанный с белками сыворотки, вносил основной вклад в формирование микроскопического изображения времени жизни флуоресценции в случае рассмотрения свободного Пз. Среднее значение распределения времени жизни флуоресценции Пз-Вт составило 1.7 ± 0.1 нс, что было почти в 4 раза больше, чем у Пз, связанного с ФСБ (0.4 ± 0.1 нс) и на порядок больше, чем Пз в воде, о которых сообщалось в [191]. Иммобилизация Пз в порах Вт снижала степень свободы вращения Пз более эффективно, чем в случае связывания Пз с белками сыворотки. Совершенно разные значения интенсивностей флуоресценции Пз, инкапсулированного в Вт и свободного, предоставили возможность для отслеживания Пз, введенного в составе Вт в биологические системы. Важно отметить, что флуоресценция не зависела от pH в широком диапазоне [28].

4.2 Сравнительное исследование биораспределения порфиразина при внутривенном введении в свободной форме и в составе субмикронных частиц ватерита

Чтобы продемонстрировать концепцию доставки лекарств к опухолям *in vivo*, была использована модель животных с привитыми опухолями. Суспензию клеток CT26.WT (клетки рака толстой кишки мыши) инокулировали подкожно в дорсальную сторону левой задней конечности взрослых мышей Balb/c дикого типа и выращивали в течение 7 дней до достижения опухолью объема ~ 0.25 см³. Композиции Пз-Вт или свободного Пз (доза по Пз 15 мг/кг, объем 150 мкл) вводили внутривенно (в/в) в хвостовую вену мыши. Были получены

прижизненные флуоресцентные изображения животных с опухолью до и после инъекции (через 5, 30 минут, 1, 3, 6 и 24 часа) (рисунок 46а). На рисунке 46б,в показаны зависимости интенсивности флуоресценции областей на двух лапах мышей (с опухолью $I_{Фл}^{Опухоль}$ и без $I_{Фл}^{Здоров}$) от времени при в/в введении Пз-Вт и свободного Пз, соответственно. Значения представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Флуоресцентный контраст опухоли был определен как соотношение интенсивностей флуоресценции областей с опухолью и без. Контраст, оцененный в момент времени после инъекции $t = 3$ ч, показан в виде гистограммы на рисунке 46г, где введение Пз-Вт представлено в красном цвете и свободного Пз – в черном.

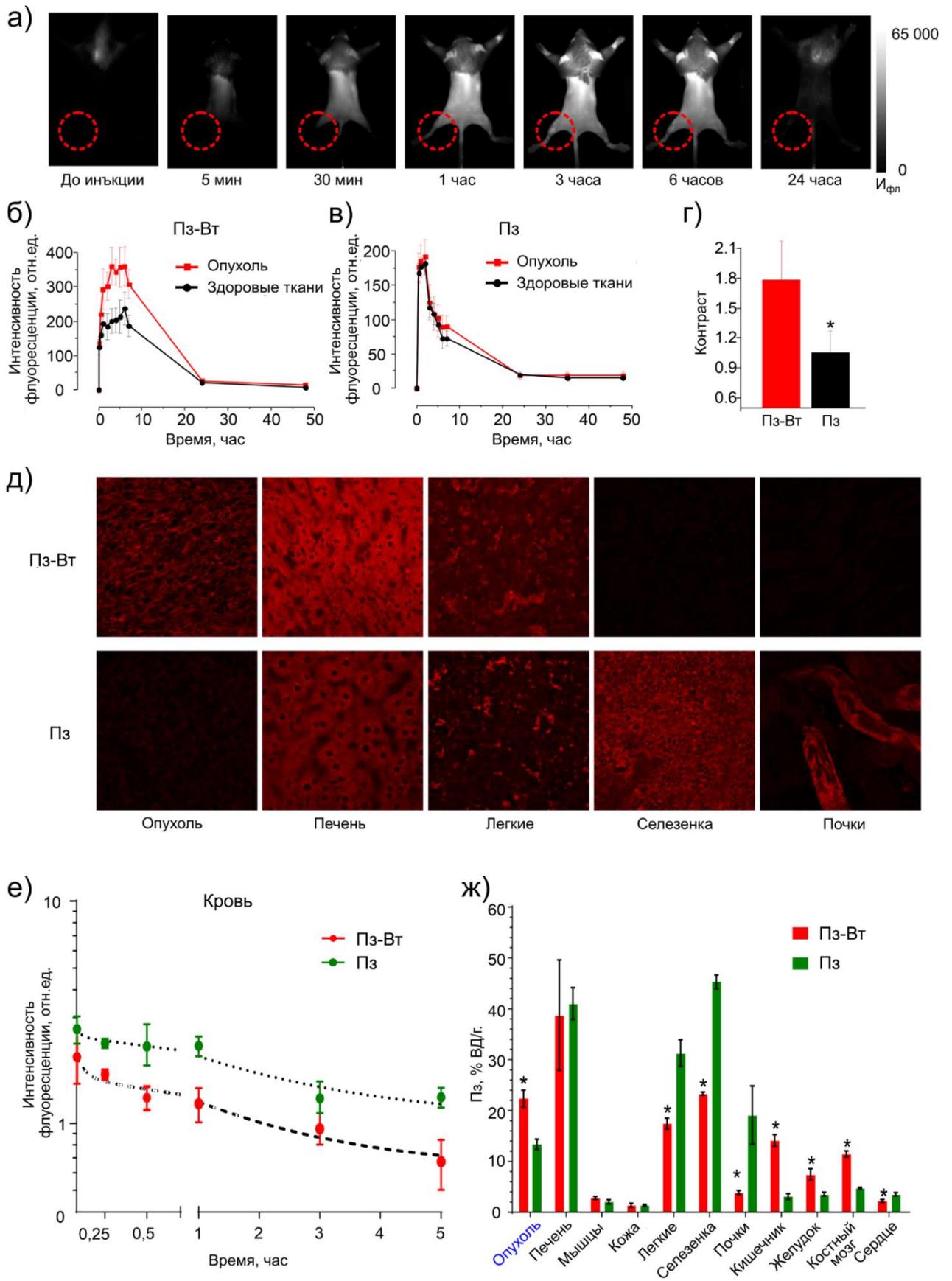


Рисунок 46 – а) Флуоресцентные прижизненные изображения мыши Balb/c с инокулированной опухолью СТ26.WT (дорсальная сторона левой задней

конечности) до и после внутривенной инъекции Пз-Вт, полученные в моменты времени 5 минут, 30 минут, 1 час, 3 часа, 6 часов и 24 часа.

Возбуждение/эмиссия 585 нм/645-725 нм, соответственно. Красные кружки обозначают область опухоли. Серая полоса (правая панель) отображает интенсивность флуоресценции на полученных кадрах в оттенках серого ($I_{фл}$).

Размер изображений, 3 см × 5 см. б-в) Графики интенсивностей сигналов флуоресценции, усредненных по площади, в области опухоли на левой задней конечности («опухоль», красные квадраты) и такой же области на противоположной конечности («здоровые ткани», черные кружки), полученные после внутривенной инъекции в случае введения Пз-Вт (б) и свободного Пз (в). г) Гистограмма соотношения интенсивностей флуоресценции опухоль/здоровые ткани через 3 часа после внутривенной инъекции Пз-Вт (красный столбец) и свободного Пз (черный столбец). Данные представлены как среднее арифметическое ± стандартное отклонение. *

Обозначает статистически значимую разницу, оцененную как $p < 0.05$. д) Флуоресцентные изображения КЛСМ тканей органов, полученных от мыши с опухолью через 3 часа после внутривенной инъекции Пз-Вт (изображения верхнего ряда) и Пз (изображения нижнего ряда). Возбуждение/эмиссия – 594 нм/625–758 нм, соответственно. Размер изображений 213×213 мкм. е) График кинетики выведения Пз (зеленый) и Пз-Вт (красный) из кровотока мышей с опухолями после внутривенной инъекции. ж) Гистограмма концентрации Пз в опухоли и других органах мыши через 3 часа после внутривенной инъекции Пз (зеленый) и Пз-Вт (красный). * $p < 0.05$. Внутривенно вводимая доза по Пз - 15 мг/кг [28].

Накопление Пз *in vivo* у мышей было заметно через 5 минут после инъекции Пз-Вт и свободного Пз (рисунок 46а). Начало накопления Пз в опухоли было обнаружено на временной точке в 30 мин, и в течение последующих 3 ч постепенно увеличивалось вместе с общим уровнем $I_{фл}$ (рисунок 46а-в).

Максимум был достигнут в 3 часа (соотношение между $I_{\text{Фл}}^{\text{Опухоль}}$ и $I_{\text{Фл}}^{\text{Здоров}}$ составляло 1.8 ± 0.3 (рисунок 46г)), после чего интенсивность флуоресценции начала спадать сигнализируя о клиренсе Пз. Полный клиренс был отмечен на 48 часах. Концентрация Пз в крови была в ~ 1.84 раза и ~ 2.7 раза выше в моменты времени $t = 1$ мин и 5 часов, соответственно, в случае введения свободного Пз по сравнению с инъекциями Пз-Вт (рисунок 46е). Учитывая, что в случае свободного Пз специфического накопления в опухоли не обнаружено (рисунок 46в), была выдвинута гипотеза о способствовании Вт увеличению аккумуляции Пз в опухоли.

Биораспределение Пз-Вт и свободного Пз дополнительно исследовали с помощью микроскопии *ex vivo* собранных органов и тканей мышей с опухолями (рисунок 46д, 46ж). Для оценки поглощения Пз органами и тканями использовали усредненное по рассматриваемой области значение $I_{\text{Фл}}$ (рисунок 46ж). В обоих случаях введения Пз-Вт и свободного Пз наиболее выраженным было накопление Пз в опухоли, печени и легких. Небольшие количества Пз были обнаружены в кишечнике, желудке и сердце и совсем немного – в тканях с непрерывными капиллярами, таких как кожа и скелетные мышцы. Низкий уровень поглощения Пз кожей является преимуществом, поскольку он может смягчить побочные эффекты фототоксичности у пациентов, подвергающихся воздействию окружающего света. Больше поглощение свободного Пз по сравнению с Пз-Вт было обнаружено в легких, почках и селезенке. Важно отметить, что режим лечения Пз-Вт приводил к накоплению в опухоли $23.1 \pm 2.4\%$ ВД/г, что почти в 2 раза больше, чем при использовании свободного Пз. Тогда как в печени накапливалось примерно равное количество Пз в обоих случаях введения.

В печени Пз преимущественно локализовался в цитоплазме гепатоцитов, не накапливаясь в ядрах и интерстиции. Низкое поглощение Пз было замечено в альвеолярных клетках легких. В селезенке Пз был равномерно распределен по

клеткам и интерстицию. В опухолевой ткани Пз распределялся в цитоплазме раковых клеток как при введении Пз-Вт, так и при инъекции свободного Пз.

4.3 Исследование характера внутриопухолевого распределения частиц ватерита

На следующем этапе исследований было определено внутриопухолевое распределение Пз при введении в составе частиц Вт и в свободной форме с помощью прижизненной мультифотонной лазерной сканирующей микроскопии и микроскопии времени жизни флуоресценции, как показано на рисунке 47а. Лабораторную мышь устанавливали на держатель образца инвертированного микроскопа стороной опухоли вниз (окрашенной в коричневый цвет). Кожный лоскут предварительно удаляли, чтобы обнажить капсулу опухоли, и осторожно прижимали к покровному стеклу, чтобы обеспечить оптический контакт с масляно-иммерсионным объективом 40X, установленным под покровным стеклом. На рисунке 47б-ж представлены прижизненные флуоресцентные изображения микроокружения опухоли через 3 часа после инъекции Пз-Вт и свободного Пз, полученные в пределах тонкого периферического слоя опухоли толщиной примерно 200 мкм, который в дальнейшем будет называться «периферией».

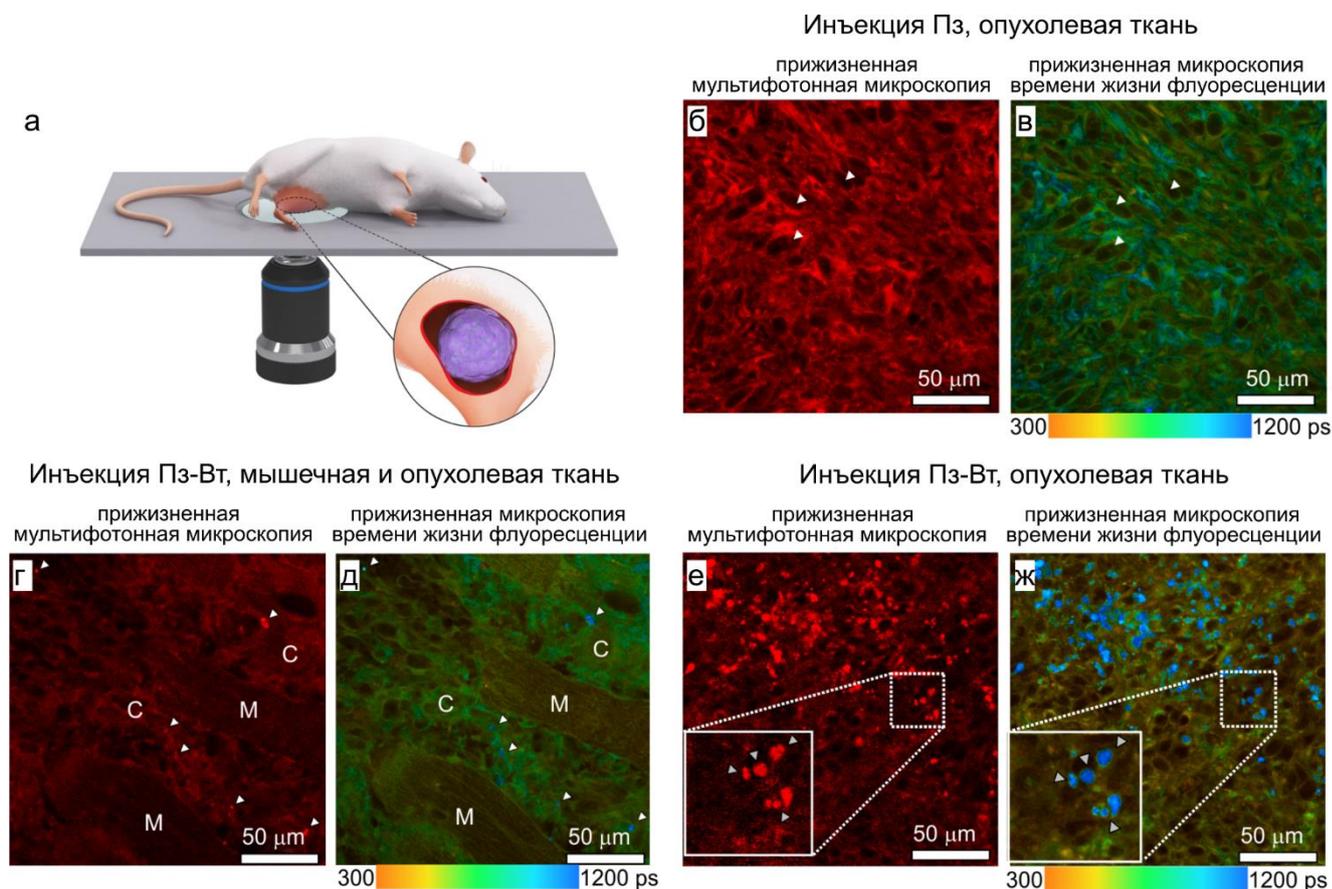


Рисунок 47 – а) Графическая иллюстрация прижизненной мультифотонной микроскопии и микроскопии времени жизни флуоресценции опухолевого узла через 3 часа после внутривенной инъекции Пз-Vт или Пз. б-ж) Пары изображений мультифотонной микроскопии и микроскопии времени жизни флуоресценции опухолевой ткани через 3 часа после внутривенной инъекции свободного Пз (б, в) и Пз-Vт (г, д, е, ж). Изображения, полученные с помощью микроскопии времени жизни флуоресценции, представлены в псевдоцвете с цветной полосой внизу. Стрелки на изображениях (б, в) указывают на ядра клеток, демонстрирующие отрицательный контраст флуоресценции. Стрелки на изображениях (г, д, е, ж) указывают на участки, идентифицированные как агрегаты Пз-Vт. Область на изображениях (е, ж), выделенная пунктирным квадратом, увеличена и показана на вставках. Возбуждение фемтосекундного лазера производилось на длине волны 800 нм, с шириной импульса 60 фс, частотой следования 80 МГц. Полоса детекции составляла 600–750 нм [28].

Прежде всего следует отметить, что отдельные клетки с яркой флуоресценцией были четко различимы при прижизненной мультифотонной микроскопии после введения Пз-Вт и Пз, тогда как в опухолевой ткани контрольных животных, которым был введен раствор ФСБ, обнаруживалась только слабая автофлуоресценция, что было подтверждено методом ЛКСМ *ex vivo* (рисунок 48). Изображения, полученные с помощью микроскопии времени жизни флуоресценции, соответствовали морфологии микросреды, полученной с помощью мультифотонной микроскопии.

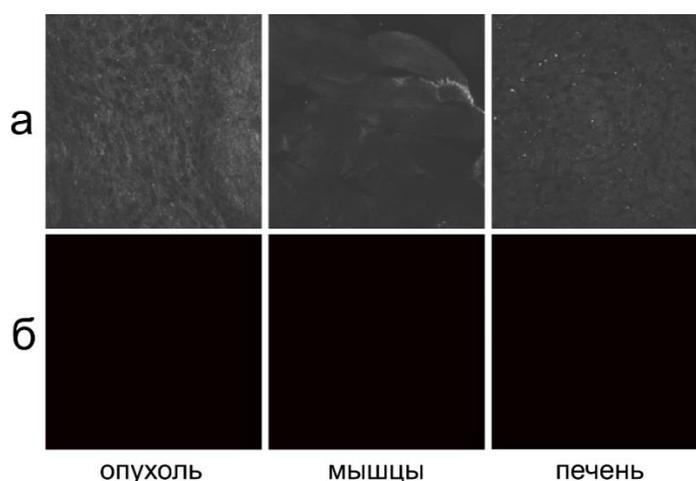


Рисунок 48 – ЛКСМ-изображения тканей лабораторных мышей с опухолями через 3 часа после инъекции ФСБ. а) Канал отражения (шкала серого), полоса возбуждения/детекции: 594 нм/579–610 нм; б) канал флуоресценции (красный), полоса возбуждения/детекции: 594 нм/625–758 нм. Размер изображения 213 × 213 мкм [28]

Флуоресценция опухолевой ткани была значительно ярче флуоресценции прилегающей мышечной ткани, как показано на рисунке 47г, д. Распределение флуоресценции в паренхиме опухоли при введении свободного Пз было равномерным (за исключением темных ядер клеток, отмеченных стрелками, рисунок 47б,в). Однако, в случае инъекции Пз-Вт на однородном фоне наблюдалось множество ярких дискретных включений (рисунок 47е, ж). Среднее значение времени жизни флуоресценции по этим включениям составило $\tau_{Пз} =$

1.2 ± 0.1 нс, которое попадает в диапазон $\tau_{\text{Пз}}$ характерный для Пз иммобилизованного в Вт (рисунок 44е). Яркие включения были интерпретированы как Пз-Вт, локализованные преимущественно в ядре опухоли.

В работе [28] была оценена интенсивность флуоресценции Пз в ядре и на периферии опухоли. Не было обнаружено существенной разницы между поглощением Пз на периферии и в ядре в случае введения свободного Пз. В то же время при доставке Пз-Вт интенсивность флуоресценции Пз резко снижалось от ядра опухоли к периферии (>21 раз). При сравнении двух способов доставки лекарственного средства доставка Пз-Вт в виде частиц приводила к накоплению Пз в ядре опухоли в 1.8 раза больше, чем в случае доставки свободного Пз. Это повышенное накопление Пз в ядре опухоли объясняет усиление флуоресценции участков опухоли при прижизненной визуализации животных (рисунок 46а), поскольку ядро составляет основную массу опухоли. В то же время при доставке Пз-Вт на периферии опухоли содержалось значительно меньшее количество Пз, чем при доставке свободного Пз.

Для исследования морфологии микроокружения Вт в опухолевой ткани была проведена сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) и энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия (ЭДРС) криосрезов иссеченной опухолевой ткани через 3 часа после внутривенного введения Вт. Золотые наностержни (ЗНС), покрытые полиэтиленгликолем [138], загруженные в Вт (рисунок 49), использовались для усиления электронного контраста для оценки поглощения Вт опухолью. На рисунках 48б и 48в показаны просветы, интерпретируемые как кровеносные сосуды, содержащие агрегаты с размерами в несколько микрометров (белые стрелки).

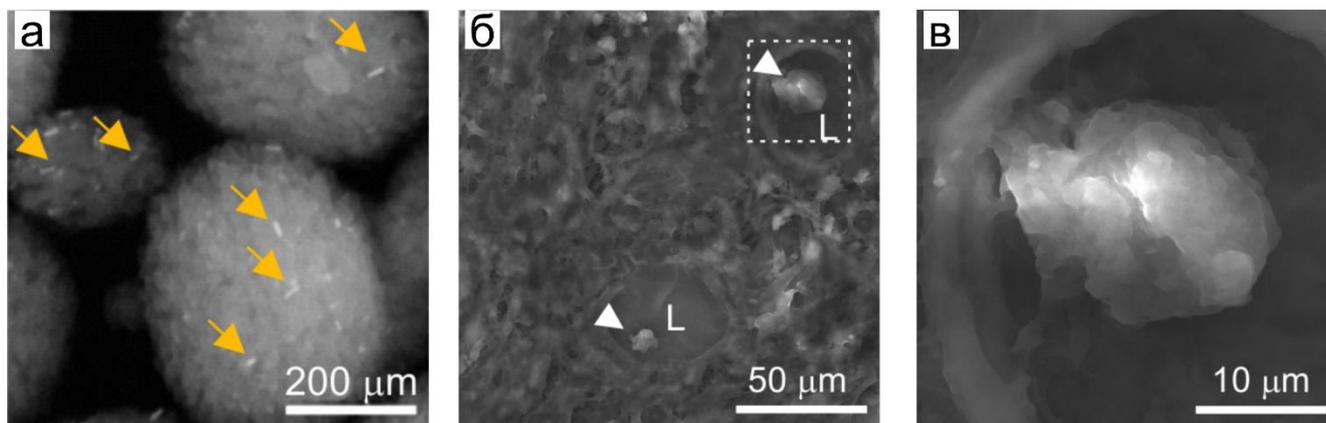


Рисунок 49 - а) СЭМ-изображение Вт с адсорбированными золотыми наностержнями (ЗНС), указанными желтыми стрелками, полученное в режиме обратнорассеянных электронов (BSE); б) Репрезентативное СЭМ-изображение опухолиевой ткани через 3 часа после внутривенной инъекции, полученное в режиме вторичных электронов (SE). Два просвета (обозначены буквой «L»), предположительно, являются кровеносными сосудами и содержат единичные агрегаты карбоната кальция (белые стрелки — CaCO_3); в) увеличенное СЭМ-изображение области, выделенной квадратом на рисунке (б) [28]

В данных агрегатах был обнаружен кальций с помощью энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДРС) (рисунок 50), что указывало на скопление Вт в сосудах опухоли. В некоторых случаях в богатых кальцием агрегатах присутствовала как ватеритная, так и аморфная кристаллическая фаза (рисунок 50 в-д), косвенно указывая на растворение. В остальных случаях было очевидно образование кристаллитов кальцита (рисунок 50е-ж), что свидетельствовало о процессе перекристаллизации. Поскольку плотность Вт (2.6 г/см^3) несколько меньше плотности кальцита (2.7 г/см^3), растворение Вт должно предшествовать процессу перекристаллизации, чтобы отдать ионы Ca^{2+} для завершения образования кальцита. Такая трансформация косвенно указывает на высвобождение инкапсулированного вещества, в данном случае Пз, как сообщается в литературе [197]. В нормальной ткани следов Вт обнаружено не было (рисунок 49б).

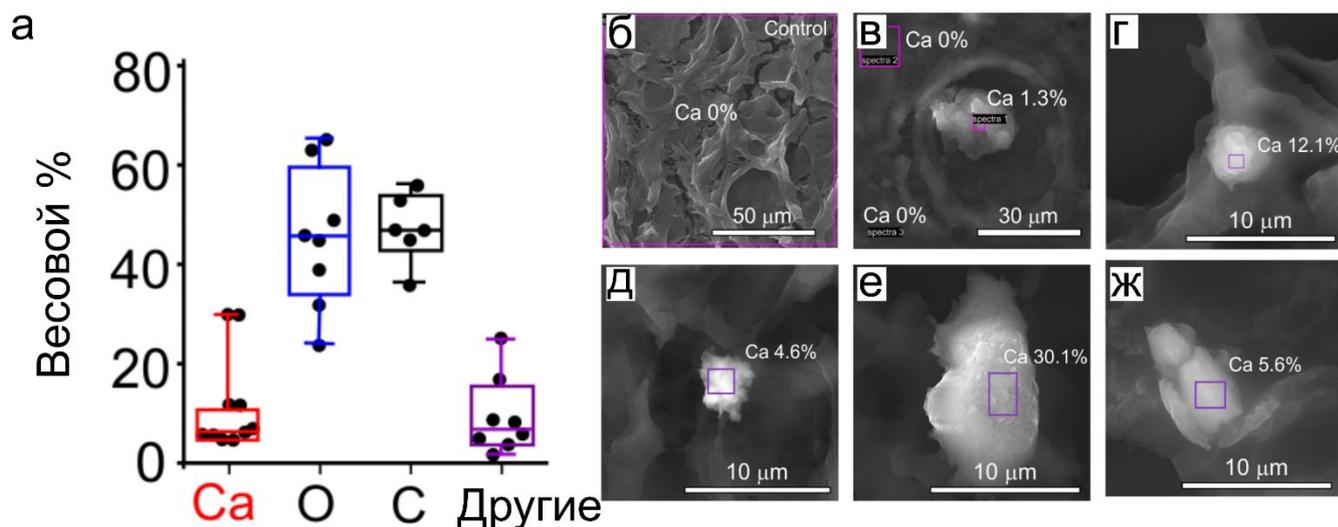


Рисунок 50 – а) Диаграмма размаха для усредненного по ансамблю процентного содержания кальция (Ca), кислорода (O), углерода (C) и других элементов, измеренного методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДРС) в агрегатах, обнаруженных в опухолевой ткани через 3 ч после внутривенного введения Пз-Вт; б) опухолевая ткань животного, не получившего внутривенную инъекцию Пз-Вт; в) – ж) СЭМ-изображения кристаллических структур, относящихся к CaCO_3 , обнаруженных в просветах опухолевой ткани, идентифицированных как кровеносные сосуды. На вставках показано процентное содержание кальция определенное с помощью ЭДРС в выделенных фиолетовыми прямоугольниками областях [28]

Чтобы сравнить накопление в опухоли свободных и иммобилизованных на поверхности Вт золотых наностержней, было проведено внутривенное введение равных доз коллоидных растворов ЗНС и Вт-ЗНС (содержание ЗНС на 1 мг Вт составляло 2.3 ± 0.1 мкг) животным (Balb/c) с аллогraftными опухолями СТ-26. Опухоли собирали через 3 часа после инъекции и анализировали на содержание золота методами сканирующей электронной микроскопии (рисунок 51а) и атомно-абсорбционной спектроскопии (рисунок 51б). Заключение, сделанное ранее о высвобождении иммобилизованного в Вт вещества при перекристаллизации и растворении Вт-матриц внутри сосудов опухоли, было

дополнительно подтверждено отсутствием золота в агрегатах карбоната кальция, обнаруженных в сосудах через 3 часа после внутривенного введения ЗНС-Вт, что указывает на почти полное высвобождение ЗНС. В то же время в опухолевой ткани были обнаружены кластеры золота, которые были интерпретированы как ЗНС, высвободившиеся из ЗНС-Вт (рисунок 51а). Накопление ЗНС в опухоли (58 нг или 0.8 % ВД) было в 3.4 раза выше при доставке ЗНС-Вт. Эти результаты позволяют сделать вывод о том, что частицы Вт накапливаются в сосудах опухоли и высвобождают полезную нагрузку.

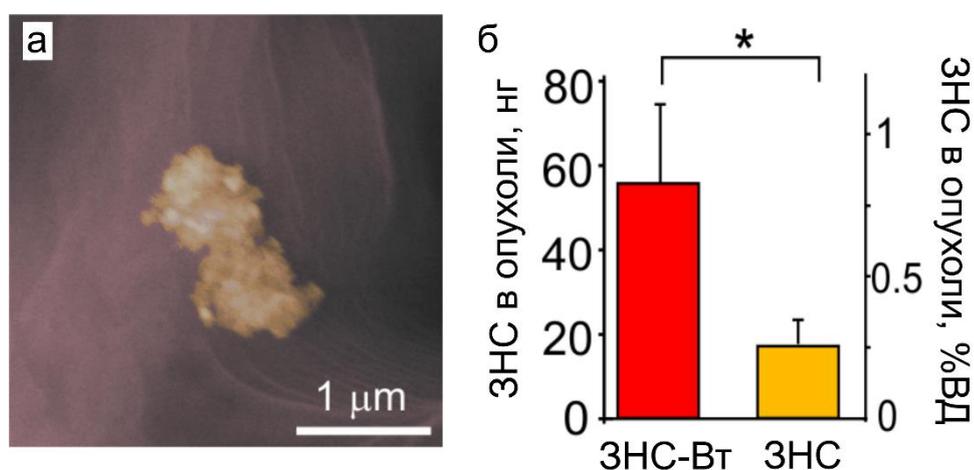


Рисунок 51 – а) СЭМ-изображение опухолевой ткани (окрашено бледно-фиолетовым при постобработке) через 3 часа после внутривенной инъекции ЗНС-Вт показывает два кластера ЗНС (окрашено желтым при постобработке); б) гистограмма содержания ЗНС в опухоли через 3 часа после внутривенной инъекции ЗНС-Вт и ЗНС, определенного методом атомно-абсорбционной спектроскопии (ААС). * - указывает на статистически значимую разницу между двумя значениями ($p < 0,05$) [28]

Скорость кровотока, по-видимому, играет решающую роль в накоплении и биодegradации Пз-Вт опухолевой тканью. Сообщалось, что в ядре опухоли скорость кровотока на порядок ниже, чем в нормальных микрокапиллярах [198] и на периферии [199]. Это объясняет полное растворение/перекристаллизацию Пз-Вт и последующее проникновение Пз в паренхиму ядра опухоли.

В работе S. Wilhelm и др. [200] эффективность доставки лекарственного средства с помощью наночастиц золота размером 50 нм достигает 18.9% ВД/г, что сопоставимо с результатами, полученными A.L. van de Ven и др. [201] по накоплению системно вводимых субмикронных частиц, составившей 5–10% ВД/г. Упомянутые работы установили высокий стандарт в этой области. Тем не менее, представленный в настоящей главе подход обещает пассивную целевую доставку лекарств к опухоли с эффективностью 0.8% ВД (что эквивалентно 28% ВД/г (рисунок 46ж)). Описанный подход к доставке лекарств представляет собой жизнеспособную альтернативу стратегиям, основанным на эффекте повышенной проницаемости и удержании (EPR эффект), обладающем серьезными ограничениями при трансляции применения систем доставки лекарственных средств на людях [202].

4.4 Моделирование процессов переноса порфиразина из капилляра в интерстиций опухоли

В предыдущем разделе было наглядно продемонстрировано накопление агрегатов Вт в капиллярах опухоли. Были отмечены морфологические изменения свидетельствующие о процессах растворения / рекристаллизации. Данные процессы ведут к высвобождению иммобилизованного вещества, в настоящем исследовании Пз. Как обсуждалось ранее, слабокислые значения рН, характерные для микроокружения опухоли, ускоряют процессы растворения / рекристаллизации. Таким образом, застревая в капиллярах и подвергаясь быстрому растворению, Вт становится локальным источником высокой концентрации Пз. Параметры, характеризующие распространение Пз в интерстиций опухоли (глубина диффузии, зависимость концентрации Пз от времени и расстояния), представляют большой интерес и могут быть оценены методами численного моделирования.

Был рассмотрен капилляр, моделируемый как бесконечная тонкая линия, погруженная в однородную среду, моделирующую среду интерстиция. Было сделано предположение, что капилляр заполнен Вт, нагруженными

низкомолекулярным Пз с молекулярной массой $M_{\text{Пз}} \approx 890$ Да. Растворение Вт и диффузия из капилляра в интерстиций высвободившегося Пз начинается в момент $t = 0$. В каждый момент времени t существуют два противоположно направленных процесса: диффузия Пз в прилежащие к капилляру ткани и удаление Пз из области рассмотрения. Последние процессы в настоящем рассмотрении не учитывались:

1. Удаление высвободившегося Пз потоком крови в капилляре. При низкой средней скорости крови в опухолевом капилляре (0.1 мм/с) за пределы области опухоли выносятся лишь незначительная часть молекул Пз. В нулевом приближении этим можно пренебречь.
2. Пз из интерстиция удаляется посредством нескольких процессов экскреции. В наших экспериментах на мышах период выведения оценивался как $\tau_{\text{выведения}} \approx 24$ ч (где флуоресценция Пз затухала ниже предела обнаружения). Поскольку $\tau_{\text{выведения}} \gg \tau_{1/2}$, то им можно пренебречь, по крайней мере, для оценки процесса диффузии Пз, высвободившегося из Вт.

Константу диффузии $D_{\text{Пз}}$ можно оценить с помощью эмпирической формулы, полученной в работе [203], а ранее она была оценена для Пз как 1.0×10^{-6} см²/с. Модель Вейбулла, которая учитывает первичное резкое высвобождение, лучше всего соответствует экспериментальным данным, полученным при оценке высвобождения в слабокислом рН 6.8, и описывается формулой $\Phi_{\text{Вт}_k}(t) = a_{\text{Вт}_k} + b_{\text{Вт}_k}(1 - \exp(-\kappa_{\text{Вт}_k}t))$, где $a_{\text{Вт}_k}, b_{\text{Вт}_k}, \kappa_{\text{Вт}_k}$ соответствуют 20, 57, 24.5 (рисунок 52а – красная сплошная линия). Совокупное высвобождение при рН 7.4 было аппроксимировано моделью Корсемейера-Пеппаса ($R^2 = 0.9652$), используя $\Phi_{\text{Вт}_h}(t) = 18t^{0.07}$ [204] (рисунок 52б).

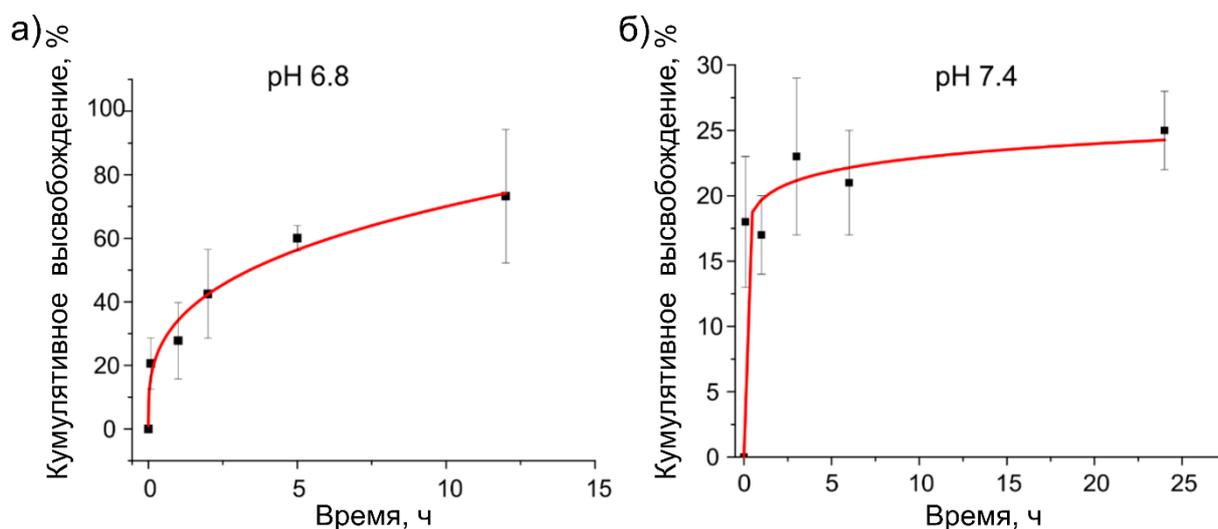


Рисунок 52 – Профиль высвобождения препаратов из Вт (а) Фотосенса в ФСБ при рН 6.8 (б) Пз в воде при рН 7.4. Черными квадратами представлены экспериментальные данные (среднее \pm стандартное отклонение), красной сплошной линией – аппроксимация с использованием модели Вейбулла (а) и Корсемейера-Пеппаса (б) [28].

Случай высвобождения Пз при рН 6.8 является наиболее актуальным для данного исследования. Высвобождение происходит в две фазы: фаза 1, мгновенное высвобождение, при которой высвобождается примерно 20% загруженного Пз, и Фаза 2, которую можно смоделировать как десорбцию Пз со скоростью

$$\Phi'_{ВТ_К} = b_{ВТ_К} \kappa_{ВТ_К} \exp(-\kappa_{ВТ_К} t), \quad (13)$$

Фаза 2, начинающаяся при $t = 0$, моделируется с использованием аналитического выражения, приведенного в [205], со скоростью десорбции

$$\phi(t) = \frac{\Phi'}{l_{\text{капилляра}}} :$$

$$C = \frac{1}{4\pi D} \int_0^t \phi(t') \exp\left[-\frac{r^2}{4D_{Пз}(t-t')}\right] \frac{dt'}{t-t'}, \quad (14)$$

где $D_{Пз}$ – константа диффузии Пз, $C(r, t)$ – концентрация Пз в интерстиции опухоли на расстоянии r в момент времени t .

После подстановки в уравнение (14), замены переменных $t - t' = \xi$ и перестановки:

$$C(r, t) \sim b_{VPa} \kappa_{VPa} e^{-\kappa_{VPa} t} \int_0^t \exp \left[\kappa_{VPa} \xi - \frac{r^2}{4D_{pz}\xi} \right] \frac{d\xi}{\xi} \quad (15)$$

Результаты численного интегрирования представлены на рисунке 53. Концентрация $C(r, t)$ возрастает с увеличением времени.

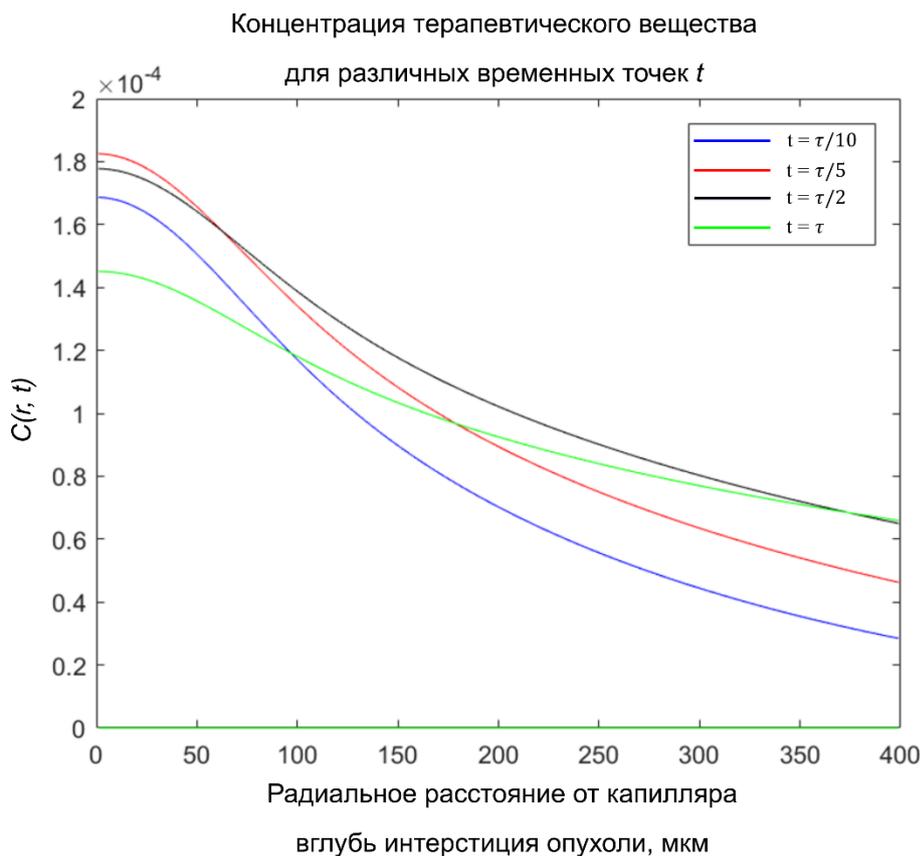


Рисунок 53 – Концентрация терапевтического вещества в интерстиции опухоли в зависимости от радиального расстояния от капилляра. Синяя, красная, черная и зеленая кривые представляют $C(r, t)$ при $t = \tau/10$, $t = \tau/5$, $t = \tau/2$ и $t = \tau$ соответственно, где τ – экспериментально определенное максимальное обнаружение Пз в опухоли [28].

Целесообразно сравнить представленные результаты с результатами, полученными при моделировании кинетики более медленного высвобождения

из полимерных наночастиц (сополимер молочной и гликолиевой кислот, PLGA), описанной в [206] (рисунок 54). Эта кинетика моделируется как

$$\Phi_{PLGA}(t) = b_{PLGA}(1 - \exp(-\kappa_{PLGA}t)), \quad (16)$$

где b_{PLGA}, κ_{PLGA} равняются $0.95, 1.63 \times 10^{-6} \text{ с}^{-1}$, соответственно.

$$\Phi'_{PLGA}(t) = b_{PLGA}\kappa_{PLGA}\exp(-\kappa_{PLGA}t) \quad (17)$$

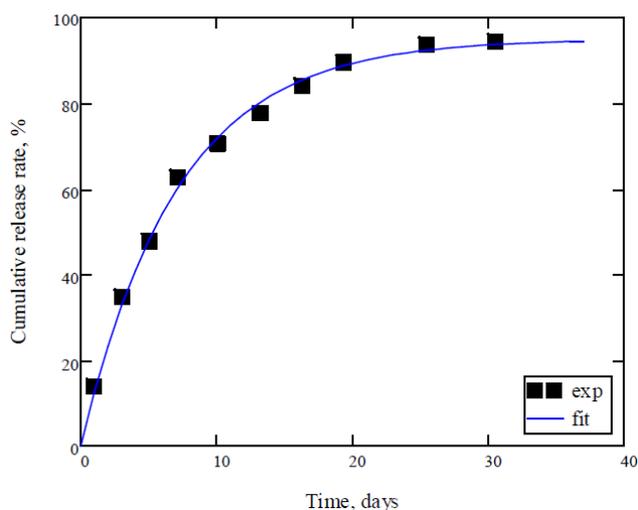


Рисунок 54 – Кинетика высвобождения терапевтического вещества (доксорубин) из наночастиц кремния, покрытых PLGA. Адаптировано из ссылки [206].

Исходя из предположения, что Пз-Вт мгновенно высвобождает свою нагрузку при рекристаллизации/растворении частицы, можно оценить потенциальное диффузионное распространение ($L_{диф}$) Пз ($M_{Пз} = 890 \text{ Да}$) в опухолевую ткань как: $L_d = \sqrt{t_c D_{Пз}}$, где t_c — среднее время прохождения Пз по капилляру. Учитывая, что капилляры в среднем имеют диаметр 2 мм и средняя скорость крови в капиллярах опухоли около 0.1 мм/с, получаем $t_c = 20 \text{ с}$. Коэффициент диффузии ($D_{Пз}$) в опухолевой ткани можно оценить как [203]: $D_{Пз} = 0.3 \times 10^{-4} M_{Пз}^{-0.6} = 1.0 \times 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$. Использование этих значений дает $L_{диф} = 45 \text{ мкм}$. Предполагая однородную концентрацию Пз в области вокруг центра капилляра $R = r_{кан} + L_{диф}$, где $r_{кан} = 4 \text{ мкм}$ (радиус капилляра), получаем следующее отношение Пз в ткани ($A_{опухоль}$) к концентрации все еще находящейся

в крови ($A_{\text{кровь}}$) как $A_{\text{опухоль}} / A_{\text{кровь}} = [(r_{\text{кан}} + L_{\text{диф}})^2 - r_{\text{кан}}^2] / r_{\text{кан}}^2 = 148$. Таким образом, можно заключить, что почти весь Пз имеет шанс диффундировать из капилляра за 20 с транзита через капилляр. Сравнивая численное моделирование кинетики высвобождения из Вт и наночастиц кремния покрытых PLGA (рисунок 55) можно сделать вывод о способности Вт обеспечить локально высокую концентрацию терапевтического вещества благодаря быстрой динамике растворения / рекристаллизации под действием слабокислого pH, в отличие от носителей, демонстрирующих медленное высвобождение иммобилизованного вещества.

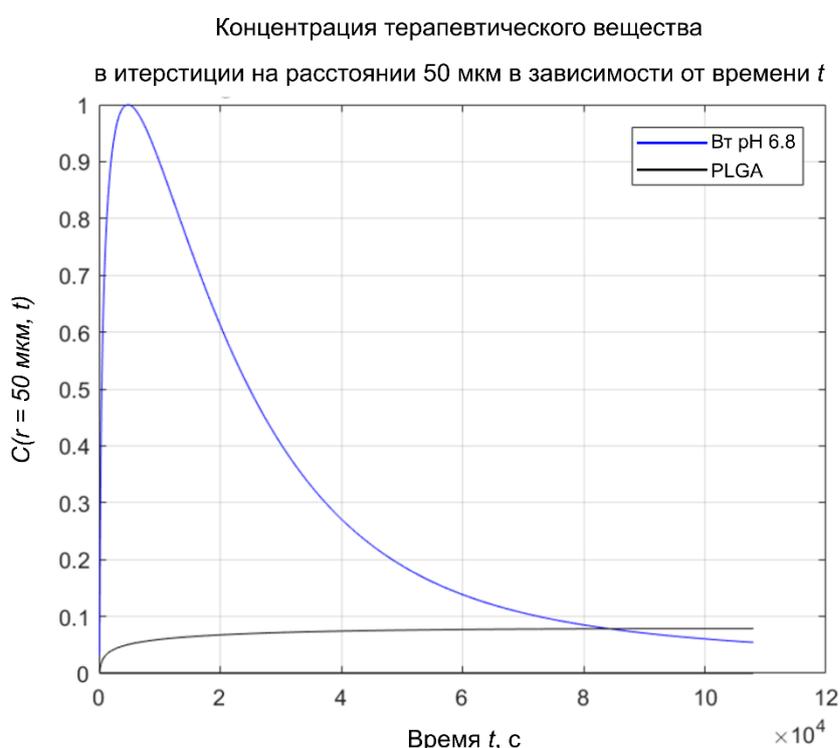


Рисунок 55 – Нормализованный график зависимости концентрации Пз в интерстиции от времени на радиальном расстоянии $r = 50$ мкм от капилляра в случае средств доставки Вт (синяя линия) и PLGA (черная линия) [28].

4.5 Фотодинамическая терапия *in vivo*

Чтобы установить, что доставка Пз с помощью Вт в опухоль сохраняет фотосенсибилизирующие свойства свободного Пз [191], была проведена фотодинамическая терапия (ФДТ) на лабораторных животных с привитыми

подкожными опухолями. Животные были случайным образом разделены на шесть групп: без инъекций и без воздействия света (группа 1 - контроль); инъекция Пз и отсутствие света (группа 2 - Пз); инъекция Пз-Вт и отсутствие света (группа 3 – Пз-Вт); инъекция ФСБ и световое воздействие (группа 4 – контрольное освещение); инъекция Пз и световое воздействие (группа 5 – Пз-ФДТ) и инъекции Пз-Вт и световое воздействие (группа 6 – Пз-Вт-ФДТ). Фотодинамическая терапия была проведена через 3 часа после инъекций, так как данная временная точка была определена, как обеспечивающая максимальное накопление Пз в опухоли.

Опухолевые участки облучали светодиодным источником света с длиной волны 640 нм в дозе 150 Дж/см², а результат лечения был оценен по коэффициенту ингибирования роста опухоли (КИРО).

На рисунке 56 представлены результаты анализа динамики роста объема опухоли после проведения ФДТ во всех группах. ФДТ в опытных группах привела к достоверному снижению скорости роста опухоли по сравнению с контрольными группами, включающими только лечение воздействием светом и только внутривенные инъекции Пз и Пз-Вт. На вставке показано, что биологически значимый КИРО, оцененный как КИРО > 50%, был обнаружен только у подопытных, которым вводили раствор Пз-Вт и свободный Пз в сочетании со световой обработкой. Экспериментальная группа Пз-ФДТ демонстрировала более высокий КИРО, начиная с 7-го дня после проведения ФДТ.

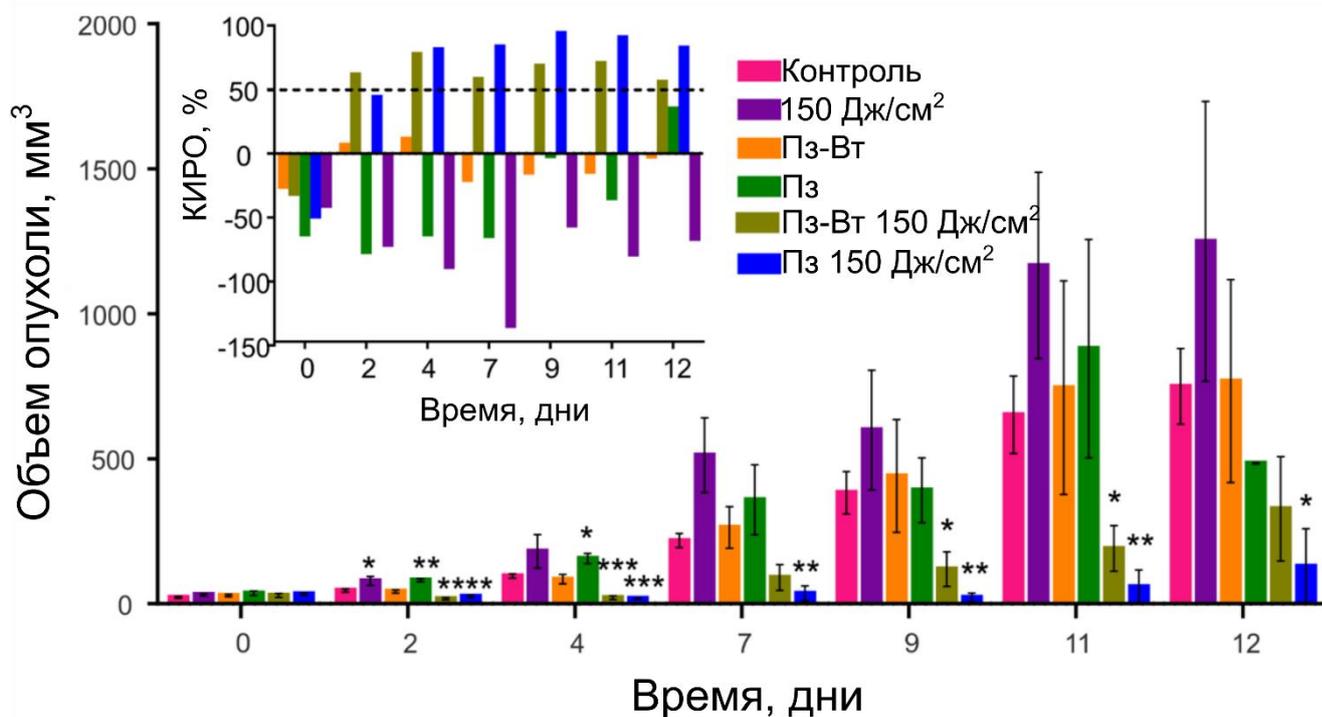


Рисунок 56 – Динамика роста объема опухоли *in vivo* у мышей Balb/c после проведения ФДТ. Столбики ошибок означают стандартную ошибку; (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$ и (***) $p < 0,001$ (критерий Даннета, $n = 5-7$). Вставка: динамика КИРО во всех группах кроме контрольной (без инъекции и освещения). Пунктирная линия показывает биологически значимое подавление роста опухоли ($>50\%$) [28]

4.6 Выводы к главе 4

Контейнеры с лекарством пассивно накапливаются в аномальной сосудистой сети опухоли, характеризующейся медленной скоростью кровотока. Эти контейнеры прикрепляются к эндотелию капилляров и высвобождают лекарственные средства, которые частично уносятся с током крови, а частично распространяются из капилляра в интерстиций опухоли. Быстрое высвобождение лекарства из контейнера представляет собой ключевое преимущество в рамках представленной концепции.

Была успешно продемонстрирована альтернативная стратегия доставки лекарств в паренхиму опухоли, не основанная на EPR эффекте. Прямому

прохождению нанопрепаратов из системного кровообращения в интерстиций опухоли препятствует медленная диффузия наночастиц. Чтобы преодолеть этот барьер, был рассмотрен трехэтапный подход к доставке лекарственного средства: (1) контейнеры с лекарственным средством, вводимые системно, прикреплялись к эндотелию опухоли, затем (2) высвобождали лекарственное средство во внутрикапиллярное пространство и (3) лекарственное средство проникало через стенки эндотелия в интерстиций опухоли за счет градиента концентраций. Каждый этап этой стратегии был реализован путем рационального подбора контейнера с лекарственным средством. Во-первых, снижение скорости кровотока способствует прилипанию частиц к стенкам сосудов [201] и помогает накапливать частицы в сосудистой сети опухоли, характеризующейся пониженной скоростью кровотока (< 0.1 мм/с [199]). Во-вторых, контейнеры, адгезированные к эндотелиальному слою капилляров в опухолях, высвобождают лекарственные средства в объем сосуда, подвергаясь растворению и/или перекристаллизации, чему способствует пониженное значение pH, свойственное микроокружению опухоли. В-третьих, небольшие липофильные молекулы лекарственного средства (в проведенных экспериментах это молекулы порфиразина), высвобождаемые из контейнеров, оптимальны для проникновения через слой эндотелиальных клеток в паренхиму опухоли. Чтобы осуществить этот перенос, необходимо создать высокий градиент концентрации лекарства от внутрикапиллярного пространства к интерстицию. Быстрое высвобождение лекарства из контейнера приводит к созданию локально высокой концентрации лекарства в сосуде.

Выносимые на защиту положения.

- 1. Частицы ватерита (0.47 ± 0.14 мкм) с иммобилизованным агентом фотодинамической терапии (порфиразином) при внутривенном введении способны накапливаться в сосудах опухоли, индуцированной подкожной инъекцией клеток колоректальной карциномы (CT26.WT) в области бедра мыши, и обеспечивать**

доставку $23.1 \pm 2.4\%$ от введенной дозы порфиразина на массу животного за счет изменения биофизических параметров кровотока в опухолевой кровеносной сети, а именно снижения скорости кровотока и аномального извилистого строения сосудистой сети.

ГЛАВА 5. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЧАСТИЦ ВАТЕРИТА В КАЧЕСТВЕ ТРАНСДЕРМАЛЬНОЙ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ПРИМЕРЕ НАФТИФИНА

5.1 Получение субмикронных частиц ватерита с иммобилизованным противогрибковым препаратом нафтифином

За основу при синтезе частиц карбоната кальция была взята методика с повышением вязкости реакционной смеси в этиленгликоле, описанная в статье [135], с небольшой модификацией для иммобилизации антимикотика, путем его соосаждения с частицами. Таким образом, 0.33 М водные растворы солей хлорида кальция и карбоната натрия, объемами по 2 мл каждый, были смешаны с 10 мл этиленгликоля. Предварительно к смеси этиленгликоля и водного раствора соли карбоната натрия был добавлен Нф массой 5 мг. Перемешивание полученной реакционной смеси осуществляли с помощью магнитной мешалки при скорости 700 об./мин. в течение 3 часов. Образовавшиеся частицы были осаждены путем центрифугирования при скорости 6000 об./мин., а затем трижды промыты водой и однократно этанолом. Готовые частицы были высушены при температуре 37°C в течение ночи.

Препарат Нф, который является синтетическим лекарственным средством и относится к классу производных аллиламина [207], показал успешную терапию нескольких типов микозов при наружном применении: дерматофития конечностей [208], дерматофития туловища [209], паховый дерматомикоз [210], онихомикоз [211], отрубевидный лишай [212] и кожный кандидоз [213]. Нф демонстрирует два вида действия: фунгистатическое по отношению к дрожжевым грибам и фунгицидное по отношению к дерматофитам и плесневым грибам [214]. Основное действие Нф заключается в ингибировании скваленэпоксидазы, что приводит к прекращению биосинтеза эргостерина, важного элемента различных внутриклеточных мембран грибков [215]. В результате: (i) возникает дефицит эргостерина, необходимого для роста клетки,

и (ii) накопление скваленэпоксидазы ведет к некоторым внутриклеточным дегенеративным процессам таким, как отложение жировых капель во всех липидных мембранах, что ведет к изменению их свойств и нарушению всех внутриклеточных процессов, связанных с ними, а в конечном итоге к повреждению клеточной стенки [214, 216]. Боковая цепь молекулы Нф связывается с липофильной частью эпоксидазы, а кольцо Нф располагается на месте, где должна происходить связь эпоксидазы и сквалена [217], азот в молекуле обеспечивает проникновение через клеточную стенку [218]. Помимо противогрибкового действия Нф обладает антибактериальным и противовоспалительным действием [207, 214]. В Таблице 2 приведен перечень патогенных микроорганизмов, против которых Нф доказал свою эффективность *in vitro* и *in vivo*.

Таблица 2 – Список видов грибов и бактерий, против которых эффективно применение нафтифина.

Противогрибковая активность				Антибактериальная активность			
#	Род грибов	Диапазон минимальной подавляющей концентрации, [мкг/мл]	Ссылки	#	Вид бактерий	Минимальная бактерицидная концентрация, [% от фармацевтической субстанции]	Ссылки
1.	<i>Trichophyton spp.</i>	0.1 – 0.2 ≤ 0.06 – 0.13	[219] [177]	1.	<i>Staphylococcus aureus</i>	1.25	[214]
2.	<i>Epidermophyton floccosum</i>	0.1 – 0.2 ≤ 0.06	[219] [220]				
3.	<i>Microsporum spp.</i>	0.1 – 0.2 ≤ 0.06 – 0.13	[219] [220]	2.	<i>Streptococcus pyogenes</i>	0.04	
4.	<i>Aspergillus spp.</i>	0.8 – 12.5	[219]				
5.	<i>Aspergillus flavus</i>	0.25	[220]	3.	<i>Corynebacterium xerosis</i>	0.16	
6.	<i>Aspergillus fumigatus</i>	2 – 8	[220]				
7.	<i>Sporothrix schenckii</i>	0.8 – 1.5 ≤ 0.06 – 8	[219] [220]	4.	<i>Rhodococcus equi</i> (<i>Corynebacterium equi</i> ³)	0.31	
8.	<i>Pseudallescheria boydii</i>	16 – 64	[220]				
9.	<i>Zygomycetes</i>	64 - >128	[220]	5.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0.63	
10.	<i>Dematiaceae</i>	0.25 – 4	[220]				
11.	<i>Candida spp</i>	1.5 - >100	[219]	6.	<i>Escherichia coli</i>	0.31	
12.	<i>Candida albicans</i>	> 100 > 128	[219] [220]				

13.	<i>Candida parapsilosis</i>	1.56 – 100 1 – 8	[219] [220]	7.	<i>Proteus mirabilis</i>	0.63	
14.	<i>Candida tropicalis</i>	100 64 – 128	[219] [177]				
15.	<i>Cryptococcus neoformans</i>	4 -64	[220]	8.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.16	
16.	<i>Candida glabrata</i> (<i>Torulopsis glabrata</i>)	> 128	[220]				

Вт, полученные методом осаждения [135] в отсутствии и присутствии антимикотика, были визуализированы с помощью сканирующего электронного микроскопа (MIRA II LMU, Tescan) для определения морфологии поверхности частиц и распределения по размерам. На рисунке 57 а,б представлены характерные изображения Вт без и с иммобилизованным препаратом Нф, соответственно. Как видно из представленных изображений, в обоих случаях Вт имеют пористую структуру, но частицы, загруженные антимикотиком, визуальнo имеют более гладкую поверхность, что связано с заполнением пор препаратом. Распределения по размерам частиц является логарифмически нормальными. В Таблице 3 приведены значения рассчитанных геометрических параметров, а именно среднее арифметическое значение диаметра частиц, стандартное отклонение и индекс полидисперсности. Полученные результаты свидетельствуют об увеличении размера частиц и их возрастающей полидисперсности при загрузке антимикотиком.

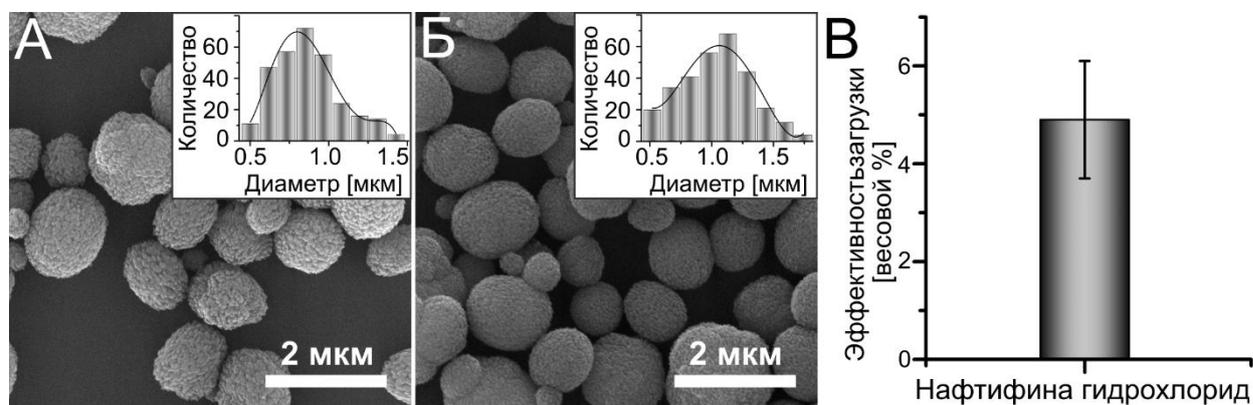


Рисунок 57 – а) - б) характерные СЭМ-изображения частиц ватерита, исходных и содержащих в своей структуре антимикотик. Во вставках представлены

распределения по размерам. в) эффективность загрузки частиц ватерита нафтифином (среднее значение \pm стандартное отклонение) [27]

Таблица 3 – Геометрические параметры чистых частиц ватерита (Вт) и нагруженных нафтифином (Вт+Нф).

Параметры	Вт	Вт + Нф
Средний диаметр, мкм	0.866	1.038
Стандартное отклонение, мкм	0.318	0.419
Индекс полидисперсности	0.117	0.169

Количественная оценка эффективности загрузки Вт препаратом Нф была проведена по спектрам флуоресценции супернатантов, результаты представлены на рисунке 57в. Под эффективностью загрузки понимается отношение массы иммобилизованного препарата к массе Вт, выраженное в процентах. Среднее значение эффективности загрузки составило $4.9 \pm 1.2\%$, что показывает высокую эффективность включения антимикотика в предлагаемый носитель по сравнению с разрешенными к применению средствами, такими как 1% раствор (Экзодерил®), 1% крем (Naftifine hydrochloride 1% cream, Renaissance Pharma, Inc.) и 1% гель (Naftifin, Merz Pharmaceuticals).

В настоящее время нафтифина гидрохлорид коммерчески доступен в трех формах: крем, гель, раствор (содержание активного вещества во всех формах - 1%) [214, 221]. Доказано, что Нф проникает сквозь роговой слой и эпидермис [207, 214]. Как правило данные лекарственные формы назначаются для нанесения на кожу один или два раза в день в течении 4 или 6 недель. Не было отмечено существенных различий между однократным и двукратным применением 1% крема Нф в день в отношении эффективности лечения [208]. Нежелательные побочные эффекты во время применения наружных форм лечения дерматомикозов, содержащих 1% Нф, проявляются крайне редко (менее

5% случаев) на ранних стадиях лечения и не требуют прекращения терапии [207]. Известны лишь несколько случаев аллергической реакции на Нф [222, 223]. Исследования острой токсичности, толерантности кожи к воздействию Нф, репродуктивной токсикологии, мутагенности подтвердили, что данный препарат можно считать очень хорошо переносимым как кожно, так и системно [214, 224].

Тенденции на современном рынке лекарственных препаратов для лечения грибковых заболеваний показывают заинтересованность производителей и потребителей в увеличении содержания действующего вещества в композиции лекарственной формы. Были опубликованы клинические испытания крема [225, 226] и геля [227], содержащих 2% Нф по весу. Результаты испытаний показали, что эффективность лечения с помощью композиции, содержащей 2% Нф в течение 2 недель сопоставима с эффектом, достигаемым при лечении с помощью композиции, содержащей 1% Нф, в течение 4 недель. Также в данных статьях подтверждается хорошая переносимость новых композиций. Таким образом, исследуемые в данной статье носители на основе пористых Вт способны обеспечить большую эффективность включения Нф в лекарственную форму даже по сравнению с водно-спиртовыми пенными композициями, обеспечивающими 2-4% по весу Нф [228].

Для подтверждения факта включения Нф в состав Вт, были исследованы спектры комбинационного рассеяния полученных образцов. Эффективность данного метода была показана во многих работах, где в спектре многокомпонентной системы идентифицировались волновые числа присущие именно составным частям исследуемой системы [229]. На рисунке 58 представлены спектры комбинационного рассеяния чистых Вт, свободного антимикотика и Вт, содержащих Нф.

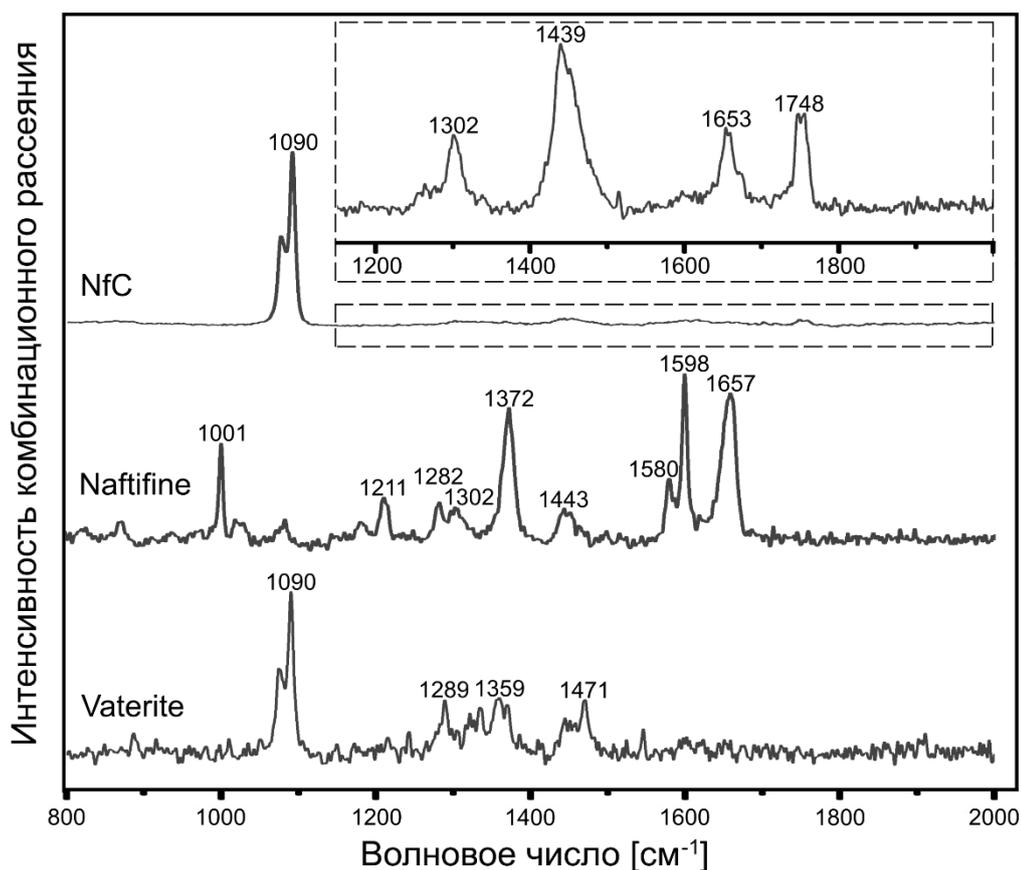


Рисунок 58 – Спектры комбинационного рассеяния для чистых частиц ватерита, чистого препарата нафтифин и частиц ватерита, содержащих в своей структуре данный антимикотик. Во вставке представлен увеличенный фрагмент спектра комбинационного рассеяния для частиц ватерита с иммобилизованным препаратом в диапазоне [1150; 2000] [27]

Обычно неорганические структуры, содержащие карбонат, имеют пики в диапазонах [1080; 1090] и [1410; 1495] см^{-1} и т.д. [230]. Спектр комбинационного рассеяния чистых частиц содержит сильно выраженный пик с волновым числом 1090 см^{-1} , что является ярким показателем кристаллографической структуры, присущей ватериту, в сравнении с двумя другими полиморфами карбоната кальция (кальцита, арагонита) [231, 232]. Спектр свободного антимикотика имеет более сложную структуру, представленную в Таблице 4 [230]. Спектр комбинационного рассеяния Вт с иммобилизованным препаратом Нф, помимо ярко выраженного пика, присущего ватериту (1090 см^{-1}), содержит набор компонентов (алкены – 1302 см^{-1} ; амина гидрохлорид – 1439 см^{-1} ; алкены,

конъюгированные с арильными группами – 1653 см^{-1}), позволяющих точно утверждать, что молекулы Нф присутствуют в Вт.

Таблица 4 – Диапазоны спектральных компонентов свободного препарата нафтифин [230]. trans – транс-изомер; sat – насыщенная связь.

Диапазон, см^{-1}	Функциональная группа	Примечания
990 – 1010	Монозамещенные бензолы	Ароматические деформационные вибрации в плоскости $=\text{C}-\text{H}$
1260 – 1305	<i>trans</i> –(sat) – $\text{CH}=\text{CH}$ –(sat)	Деформационные вибрации $\text{C}-\text{H}$
1370 – 1400	Нафталин	Вибрации растяжения, сильный пик проявляется в случае монозамещенного нафталина
1390 – 1475	Амин гидрохлорид	Симметричные деформационные вибрации $\text{C}-\text{H}$
1580 – 1620	Нафталин	Вибрация растяжения $\text{C}=\text{C}$, часто присутствует двойной пик
1610 – 1640	Алкен (двойная связь $\text{C}=\text{C}$ конъюгированная с арильной группой)	Вибрация растяжения $\text{C}=\text{C}$, в случае орто-замещения диапазон частот возрастает

5.2 Оценка скорости высвобождения антимикотика из ватеритной матрицы в отсутствии и при наличии полимерных оболочек

Как отмечалось ранее ватерит является наименее стабильным полиморфом карбоната кальция. В зависимости от иммерсионной среды, ватерит либо полностью растворяется, либо трансформируется в кальцит [148]. Высвобождение иммобилизованного вещества из Вт сопровождается процессом перекристаллизации. Переход всей массы Вт в кальцит означает полное высвобождение загруженного ранее вещества, так как происходит полное перестроение кристаллической решетки карбоната кальция [233]. На скорость трансформации Вт влияет не только среда, в которой располагаются частицы, но

и наличие стабилизирующих веществ, как, например, полимеры, белки и т.д., формирующие оболочку, препятствующую покиданию ионами поверхности частиц [159, 234, 235].

Контролируя фазу частиц, можно судить о скорости высвобождения иммобилизованного вещества. В связи с этим, было проведено исследование кинетики перекристаллизации Вт, содержащих антимикотик Нф и дополнительные оболочки полимеров, при инкубации в различных средах (деионизованная вода, физиологический раствор и культуральная среда). Были созданы образцы без полимерных слоев, с одним слоем гепарина (Геп), с одним бислоем полиаргинина и декстран сульфата (ПА/ДС), с двумя бислоями полиаргинина и декстран сульфата ($[\text{ПА/ДС}]_2$) и с двумя бислоями полиаргинина и декстран сульфата, дополненными одним слоем гепарина ($[\text{ПА/ДС}]_2 + \text{Геп}$).

Результаты исследования кинетики трансформации Вт с иммобилизованным Нф в отсутствие и при наличии полимерных оболочек представлены на графиках (рисунок 59 а,б), где показано увеличение площади частиц в модификации кальцита по отношению к площади занимаемой всеми частицами карбоната кальция. Во-первых, для все типов образцов было установлено, что при инкубации контейнеров в физиологическом растворе процесс перекристаллизации ускорялся, что приводило к появлению большего количества кубических кристаллов кальцита уже в первые сутки инкубации. Такое ускорение процесса обусловлено большей концентрацией ионов в растворе, по сравнению с деионизованной водой, играющих роль дополнительных центров перекристаллизации [233]. Во-вторых, наличие даже одного слоя полимера значительно увеличивает длительность трансформации Вт в кальцит как в воде, так и в физиологическом растворе. Так, например, полная трансформация образцов, обладающих стабилизирующими оболочками, не произошла спустя 10 дней в случае водной иммерсионной среды, хотя Вт без оболочки полностью перекристаллизовались через 4 дня. В-третьих, при инкубировании в физиологическом растворе наибольшую степень защиты Вт

обеспечивают оболочки с максимальным числом слоев, а именно $[\text{ПА/ДС}]_2$ и $[\text{ПА/ДС}]_2 + \text{Геп}$.

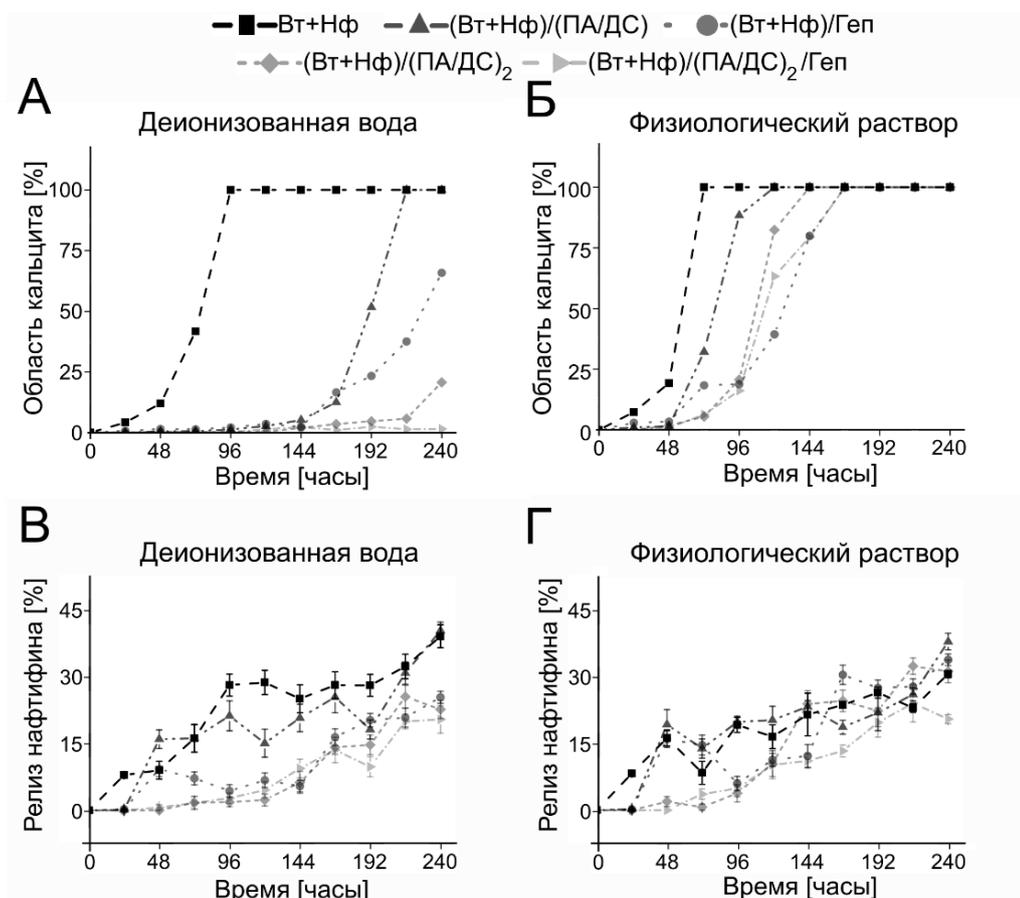


Рисунок 59 – а) - б) Кинетика трансформации частиц ватерита с иммобилизованным нафтифином в отсутствие и при наличии полимерных оболочек при инкубировании в (а) деионизованной воде и (б) физиологическом растворе. в) - г) Кинетика высвобождения нафтифина из ватеритной матрицы в отсутствие и при наличии полимерных оболочек при инкубировании в (в) деионизованной воде и (г) физиологическом растворе. На графиках отображены средние значения \pm стандартная ошибка [27]

На рисунке 59 в,г представлены кривые высвобождения Нф из Вт в отсутствие и при наличии полимерных оболочек при инкубировании в деионизованной воде и физиологическом растворе, соответственно. Как видно из обоих графиков, наименьший выход лекарственного препарата достигается при адсорбции на поверхность Вт максимального количества полимерных слоев,

то есть наличие $[\text{ПА/ДС}]_2$ и $[\text{ПА/ДС}]_2+\text{Геп}$ позволяет дольше сохранять Нф в структуре Вт. Статистический анализ результатов показал, что кинетика высвобождения Нф из частиц, покрытых $[\text{ПА/ДС}]_2$ и $[\text{ПА/ДС}]_2+\text{Геп}$ значительно отличается от динамики чистых образцов и покрытых $[\text{ПА/ДС}]$ на всех временных интервалах при инкубировании в деионизованной воде ($p<0.01$). Для случая инкубирования в физиологическом растворе статистически значимая разница существует только между кинетикой высвобождения из непокрытых Вт и с максимальным числом слоев $[\text{ПА/ДС}]_2+\text{Геп}$ ($p<0.05$).

5.3 Влияние композиции носителей на захват частиц клетками линии NHDF

Огромный интерес представляет взаимодействие Вт с иммобилизованным Нф в отсутствие и при наличии полимерных оболочек с клеточными культурами. Для определения скорости захвата и выживаемости эукариотических клеток были проведены *in vitro* исследования, в которых клетки линии NHDF были инкубированы с суспензией частиц разной концентрации.

Поглощение Вт с иммобилизованным антимикотиком в отсутствие и при наличии полимерных оболочек изучали на культуре клеток дермальных фибробластов человека (NHDF). На рисунке 60 представлены характерные изображения клеток NHDF через 24 часа после добавления суспензии частиц без и с различными полимерными оболочками (Геп; $[\text{ПА/ДС}]_2$; $[\text{ПА/ДС}]_2+\text{Геп}$) в концентрации 10 частиц на клетку, полученные методом сканирующей конфокальной микроскопии. Данные изображения демонстрируют способность частиц любого типа к интернализации.

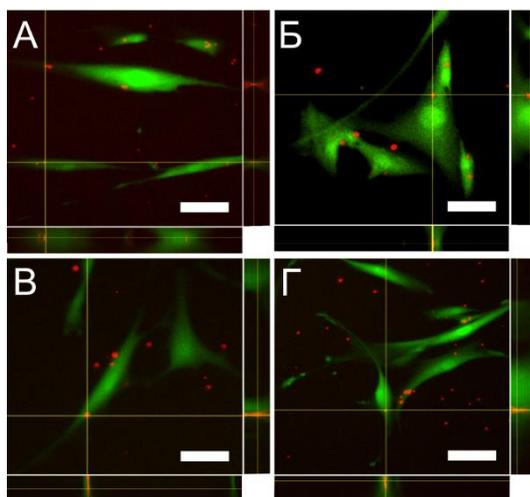


Рисунок 60 – Взаимодействие эукариотических клеток с частицами ватерита, содержащими нафтифин, без и с полимерными оболочками различной конфигурации. Характерные флуоресцентные конфокальные изображения клеток линии NHDF после инкубирования в течении 24 часов с суспензией частиц (а) без оболочки, (б) с оболочкой из гепарина, (в) с двойным бислоем полиаргинина и декстран сульфата, (г) с двойным бислоем полиаргинина и декстран сульфата и дополнительным верхним слоем гепарина [27]

Важным этапом исследований было определение композиции, обеспечивающей наилучший захват частиц клетками линии NHDF. Ранее в работе [36] было показано, что интернализация Вт зависит от размера и формы. Также существует множество работ, отмечающих изменение эндоцитоза при модификации поверхности частиц различными полимерами и лигандами [236], что заставляет ожидать разную эффективность интернализации для образцов с различными оболочками. С использованием трехмерной флуоресцентной микроскопии были подсчитаны частицы, захваченные клетками (рисунок 61). Наименьшая разница в захвате наблюдалась для (Вт+Нф) и (Вт+Нф)/Геп; процент клеток без частиц и клеток с разным числом частиц (1-3, 4-6 и 7-10) не показал статистической разницы. Наибольшее количество «пустых» клеток – 24.3% и наименьшее количество клеток, содержащих от 7 до 10 частиц – 1.4% наблюдалось для (Вт+Нф)/(ПА/ДС)₂. Образец (Вт+Нф)/(ПА/ДС)₂/Геп имел наименьший процент для группы 1-3 частицы на клетку (48.6%) и наибольший

для группы 4-6 частиц на клетку (27.1%) среди всех изученных носителей. Среднее количество интернализированных частиц для групп (Вт+Нф), (Вт+Нф)/Геп, (Вт+Нф)/(ПА/ДС)₂ и (Вт+Нф)/(ПА/ДС)₂/Геп составляет 2, 3, 2 и 3, соответственно. Таким образом, модификация поверхности Вт с иммобилизованным Нф повлияла на поглощение носителей, но не так сильно, как ожидалось. Таким образом, выбирать подходящий состав оболочки следует, исходя из нужд поставленной задачи. Эффективное клеточное поглощение продемонстрировано для непокрытых Вт, нагруженных Нф, и функционализированных гепарином. Однако, как указывалось выше, перекристаллизация (Вт+Нф) и (Вт+Нф)/Геп идет быстрее, чем для частиц, модифицированных как минимум двумя бислоями ПА/ДС. Хотя такая модификация продлевает время перекристаллизации, она отрицательно влияет на поглощение клетками. Этот эффект связан с отрицательным зарядом, образованным анионным полисахаридом на поверхности Вт. Многие исследования показали сильную зависимость эффективности интернализации от знака поверхностного заряда, и только положительно заряженная поверхность значительно увеличивает захват частиц клетками [237, 238]. Дополнительный верхний слой гепарина на поверхности таких носителей ((Вт+Нф)/(ПА/ДС)₂/Геп) улучшал клеточное поглощение при сохранении длительного времени перекристаллизации. Несмотря на то, что гепарин является анионным полисахаридом, в нескольких статьях сообщалось, что функционализация поверхности неорганических и полимерных частиц гепарином приводит к увеличению их эффективности поглощения [239–241], поскольку он способен связываться с рядом клеточных структур, включая белки, расположенные на поверхности мембраны [242, 243].

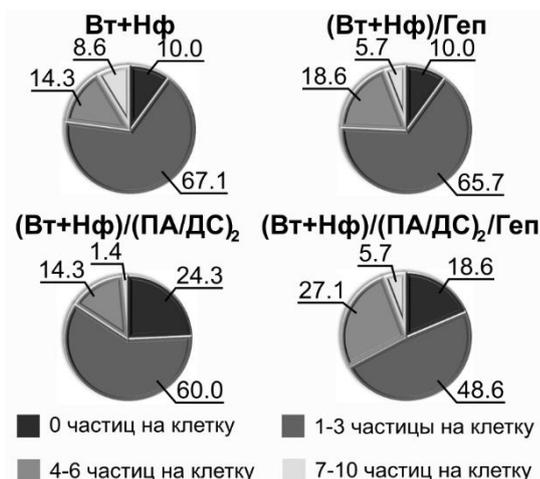


Рисунок 61 – Диаграммы процентного соотношения клеток линии NHDF, которые захватили или не захватили частицы без и с различными оболочками. Сектора демонстрируют количество клеток без интернализированных частиц, с 1-3 интернализированными частицами в клетке, с 4-6 частицами и 7-10 частицами [27]

В работе [27] исследование выживаемости клеток линии NHDF не выявило выраженной токсичности Вт с иммобилизованным Нф с различными оболочками и без вплоть до концентрации 300 частиц на клетку, что несомненно говорит о прекрасной биосовместимости исследуемых носителей лекарственных веществ.

5.4 Исследование противогрибковой активности частиц ватерита с иммобилизованным нафтифином

Для изучения противогрибковой активности Вт с иммобилизованным Нф были проведены тесты на культуре грибов *Candida albicans* ATCC 885-653, а также было проведено сравнение эффективности данной композиции и свободного лекарственного препарата.

Целью исследования было определение чувствительности дрожжей линии *Candida albicans* к новой предлагаемой форме противогрибкового препарата и выявление отличий в динамике роста культуры дрожжей при инкубировании со свободным Нф и иммобилизованным в пористые Вт. Как известно, дрожжи значительно менее чувствительны к действию лекарственных средств такого

класса, как Нф, по сравнению с дерматофитами [244]. Малые концентрации препарата способны обеспечить лишь фунгистатическое действие [216, 245, 246]. В работе [247] сообщается, что для полного подавления роста (и уничтожения) клеток грибов рода *Trichophyton* и *Aspergillus* достаточно лишь частичного ингибирования биосинтеза эргостерина, в то время как для дрожжеподобных грибов рода *Candida* необходимо более 80%. Эргостерин является одним из основных стероидов отвечающих за рост грибов [248, 249], их дыхание [215], состав и соотношение между насыщенными и ненасыщенными жирами на плазматической мембране [250, 251], которое является критическим для проницаемости клеточной стенки. Различия в чувствительности отдельных видов грибов может быть объяснено различием в физиологии [252] и способности замещать дефицитный эргостерол другими стероидами или перемещать его из областей менее значимых в критические [215].

Рисунок 62 наглядно демонстрирует, что, начиная с концентрации 31.25 мкг/мл, Вт с загруженным антимикотиком намного успешнее подавляют рост клеток *C. albicans* по сравнению со свободным препаратом после 36 часов инкубирования. В литературе значения минимальной подавляющей концентрации варьируются в очень широких пределах от 25 до 400 мкг/мл [219, 246, 253, 254]. Такой разброс значений во многом связан с условиями, в которых проходит рост клеток: состав среды, рН, размер инокулума [244].

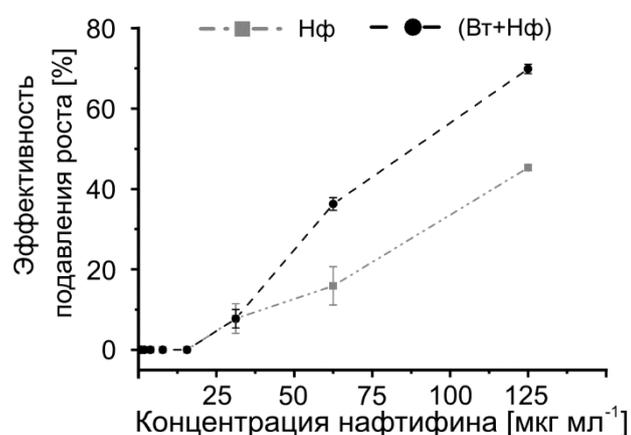


Рисунок 62 – Сравнительное исследование противогрибковой активности носителей, нагруженных лекарственным средством (Вт+Нф), и раствора лекарственного средства (Нф) против *C. albicans*. Влияние концентрации лекарственного средства на ингибирующую активность через 36 часов после нанесения обеих формуляций [27]

Полученные оценки позволяют рассматривать Вт как перспективную систему доставки препарата Нф для обеспечения эффекта длительного и непрерывного воздействия лекарственного средства на возбудителей дерматомикозов.

5.5 *In vivo* исследование деградации ватеритных частиц, содержащих нафтифин

Создание эффективных методов лечения дерматомикозов является общемировой проблемой. По статистике 20-25% населения Земли имеют кожные грибковые заболевания, что делает их наиболее распространённым видом инфекционных заболеваний. В результате развития массового туризма, международных культурных и спортивных мероприятий, возросшего уровня миграции населения из стран с низкими социально-экономическими показателями, теплым и влажным климатом, благоприятным для жизнедеятельности различных микозов, грибковые заболевания распространяются по всему миру [255]. На сегодняшний день на рынке существует огромный выбор противогрибковых лекарственных форм для наружного и перорального применения с различными классами активных веществ (полиеновые антибиотики, производные имидазола и триазола, аллиламины, эхинокандины, сордарины и др.) [256, 257].

Возбудители большинства дерматомикозов паразитируют в толще рогового слоя или в более глубоких слоях кожи и подкожной клетчатке, именно поэтому важно обеспечить глубокое проникновение действующего вещества, применяемого наружно. Для повышения эффективности лечения грибковых заболеваний могут быть использованы современные достижения в области

создания систем доставки лекарственных средств. Sedef Edral M. и коллеги [258] продемонстрировали повышение эффективности доставки препарата Нф в толщу рогового слоя и даже в более глубокие слои кожи за счет применения микроэмульсии по сравнению с рыночно доступным препаратом (Экзодерил). Но рН такой формы лекарственного препарата примерно равен 4, что не является оптимальным условием для противогрибковой активности Нф (оптимум составляет 7) [220]. Еще одним примером использования новых объектов для иммобилизации антимикотика является гель, содержащий ниосомы [259]. Достоинством данной лекарственной формы является отсутствие спиртовых компонентов, которые могут наносить вред коже при многократном применении. Но, исходя из анализа кривых высвобождения Нф из ниосом, можно отметить, что использование таких носителей не позволяет добиться пролонгированного высвобождения, так как основная масса препарата выходит из носителя менее, чем за 5 часов. Таким образом, сейчас активно ведется поиск новых носителей с высокой эффективностью загрузки, способных обеспечить глубокое проникновение и длительное высвобождение для противогрибковых препаратов таких, как Нф.

За последние годы резко возросло число исследований в области трансфолликулярной доставки лекарственных веществ как для локального воздействия при лечении заболеваний волосяных фолликулов и кожи, так и обеспечения системной адсорбции препаратов [260]. Структура и физиологические особенности волосяных фолликулов позволяют рассматривать их как перспективный путь для проникновения и резервуар для длительного размещения систем доставки лекарственных средств на основе частиц [261]. Обеспечение длительного высвобождения лекарственного препарата в глубокие слои кожи приведет к уменьшению числа терапевтических процедур, а также снизит вероятность рецидива заболевания, в случае если пациент досрочно завершил прием лекарственного препарата из-за прекращения проявления симптомов грибкового заболевания кожи [262]. Множество исследований глубины проникновения неорганических, полимерных частиц и липосом в

волосяной фолликул выявили зависимость от физико-химических свойств носителей [263, 264].

В данном исследовании частицы с иммобилизованным Нф были доставлены в волосяные фолликулы мышей, используя методику, разработанную ранее группой Ю. Свенской [111] на крысах, в которой для улучшения проникновения в глубокие слои кожи были использованы спирт для очищения и обезжиривания, а также воздействие терапевтическим ультразвуком. На рисунке 63 представлены СЭМ изображения волосяных фолликулов мыши, выдернутых из кожи до, сразу после, и через 24, 48, 72, 96 и 120 часов после введения частиц. Как видно из представленных изображений, Вт с иммобилизованным Нф проникают на всю глубину волосяного фолликула и полностью растворяются через 120 часов. Основная масса частиц растворяется в течение 72 часов тем самым обеспечивая высвобождение лекарственного препарата во внутренних тканях волосяного фолликула. Как было показано ранее [111] адресация в волосяной фолликул флуоресцентного красителя Ци7 с помощью Вт увеличивает системную адсорбцию краски в 5 раз по сравнению с обычной кожной аппликацией.

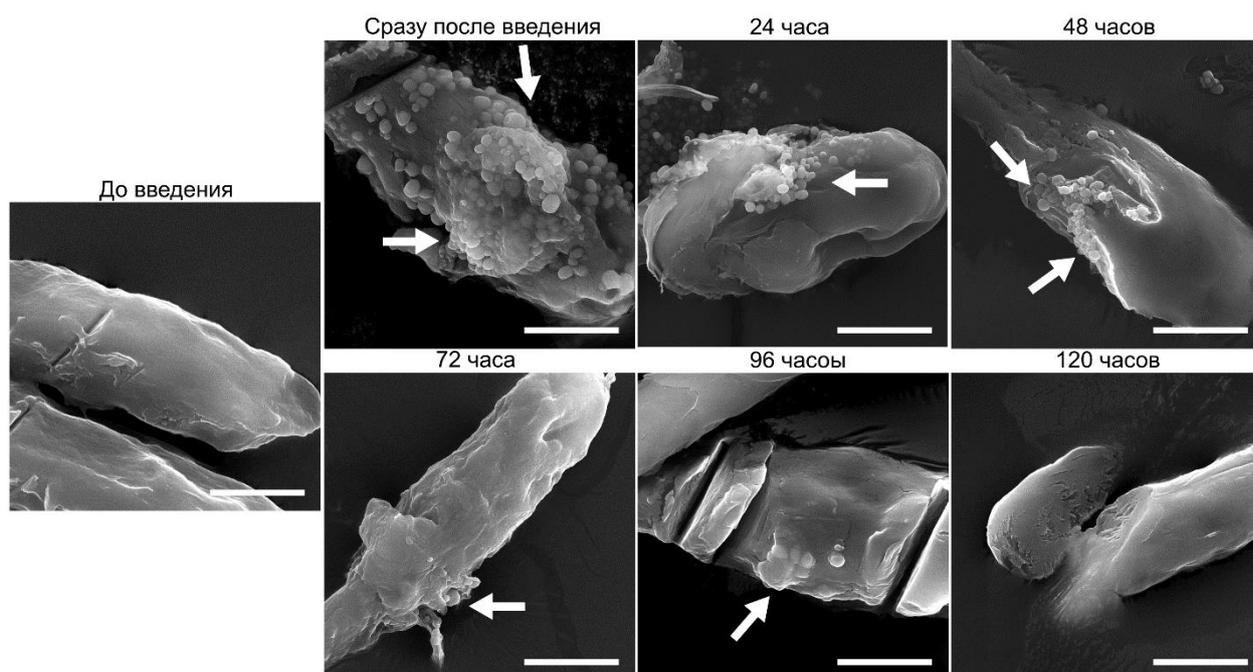


Рисунок 63 – СЭМ изображения волосяных фолликулов мыши, выдернутых из кожи до, сразу после, и через 24, 48, 72, 96 и 120 часов после введения частиц.

Белыми стрелками отмечено расположение частиц ватерита в волосяном фолликуле [27]

Таким образом, использование пористых Вт для терапии грибковых заболеваний кожи позволяет доставить лекарственный препарат в самые глубокие слои кожи и обеспечить длительное и непрерывное высвобождение лекарства. В работе М. Sedef Erdal [258] была показана возможность значительного увеличения концентрации Нф в глубоких слоях рогового слоя при использовании микроэмульсий по сравнению с коммерчески доступным препаратом Экзодерил, но предлагаемая в настоящем исследовании формула способная обеспечить адресацию лекарственного препарата не только в глубокие слои рогового слоя, но и в слои дермы. Наблюдаемая кинетика растворения частиц в волосяном фолликуле совместно с результатами противогрибковой активности предлагаемой лекарственной формы (рисунок 62) позволяет рассматривать пористые Вт с иммобилизованным Нф как новую перспективную формулу для терапии грибковых заболеваний кожи, способную сократить число терапевтических процедур и обеспечить защиту от рецидива заболевания.

5.6 Выводы к главе 5

Данное исследование показало ряд преимуществ использования пористых Вт в качестве носителей противогрибкового препарата Нф для адресации в глубокие слои кожи через волосяные фолликулы. Во-первых, Вт способны обеспечить высокую эффективность загрузки антимикотиком (4.9% по весу). Во-вторых, применение пористых частиц карбоната кальция гарантирует длительное высвобождение загруженного препарата и время его высвобождения может быть увеличено за счет адсорбции полимеров на поверхность частиц. Так, максимальное увеличение времени высвобождения было достигнуто при нанесении наибольшего числаслоев, то есть использование оболочки $[PA/DC]_2 + Геп$. В-третьих, за счет варьирования наносимых полимеров

возможно увеличивать эффективность захвата частиц клетками при крайне низкой цитотоксичности. В-четвертых, предлагаемая лекарственная форма на основе пористых Вт способна проникать на всю глубину волосяного фолликула и, как следствие, обеспечить доставку лекарственного препарата в глубокие слои дермы. И, наконец, применение данной формулы способно обеспечить непрерывное фунгицидное и фунгистатическое действие в месте поражения за счет высокой степени загрузки и длительного высвобождения препарата из своей структуры.

Выносимые на защиту положения:

- 1. Частицы ватерита (1.0 ± 0.4 мкм) с иммобилизованным противогрибковым препаратом нафтифина гидрохлоридом, суспензированные в 70% водном растворе этилового спирта и наносимые *in vivo* на поверхность кожи мышей в области спины с использованием несфокусированного терапевтического ультразвука (с частотой 1 МГц, мощностью 0.5 Вт/см², длительностью воздействия 3 минуты), во-первых, проникают и распределяются по всей глубине волосяного фолликула, во-вторых, подвергаются биodeградации в течении, как минимум, четырех дней.**

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Исследованы частицы ватерита размером 0.65 ± 0.17 , 1.35 ± 0.12 3.15 ± 0.60 мкм с позиции распределения в легких после интратрахеальной инстилляций. Частицы трех размеров достигали легких и, как следствие, доставляли иммобилизованное вещество (конъюгат бычьего сывороточного альбумина и Цианина 7), в тело животных. При этом частицы размером 0.65 ± 0.17 мкм обеспечили самую эффективную аккумуляцию флуоресцентного сигнала в органе-мишени в течение 72 часов. Достижение такими частицами альвеолярного пространства было подтверждено с помощью флуоресцентной микроскопии криосрезов целевого органа. Кроме того, частицы размером 0.65 ± 0.17 мкм обеспечили самое продолжительное время удержания флуоресценции в легких и характерную фармакокинетику для систем доставки лекарственных средств с пролонгированным высвобождением в сосудистую сеть.
2. Полного растворения и перекристаллизации частиц ватерита диаметром 0.65 ± 0.17 мкм при взаимодействии с компонентами бронхоальвеолярного лаважа не происходит после 6 суток со-инкубации *in vitro*, в то время как полный переход частиц карбоната кальция из ватеритной в кальцитную полиморфную модификацию при инкубации в воде и физиологическом растворе составляет менее суток, что может быть объяснено адсорбцией и формированием «короны» на поверхности частиц ватерита компонентами легочного флюида (белками, фосфолипидами).
3. Продемонстрирован подход к повышению эффективности использования барназы, вызывающего гибель раковых клеток за счет возможности многократной загрузки частиц ватерита (0.55 ± 0.12 мкм) и модификации их поверхности вектором специфичным к ЕрСАМ для адресации.

4. Рассчитанная на основе анализа гистологических срезов тканей легких средняя поверхностная концентрация частиц после введения показывает, что наличие на поверхности векторных молекул позволяет сохранить в целевом органе больше носителей ($2.3 \times 10^3 \text{ мм}^{-2}$) по сравнению с немодифицированными носителями ($1.3 \times 10^3 \text{ мм}^{-2}$).
5. Контейнеры на основе частиц ватерита размером $0.47 \pm 0.14 \text{ мкм}$ с лекарством (порфиразин) пассивно накапливаются в аномальной сосудистой сети опухоли, характеризующейся медленной скоростью кровотока, после внутривенной инъекции. Эти контейнеры прикрепляются к эндотелию капилляров и высвобождают лекарственное средство, которое частично уносится с током крови, а частично распространяется из капилляра в интерстиций опухоли. Быстрое высвобождение лекарства из контейнера представляет собой ключевое преимущество в рамках представленной концепции.
6. С помощью численного моделирования изменения концентрации вещества $C(r,t)$ от времени при фиксированном расстоянии от капилляра ($r = 50 \text{ мкм}$) продемонстрировано и объяснено быстрое высвобождение порфиразина из частиц ватерита, что обеспечивает концентрацию вещества в 20 раз большую в интерстиции опухоли через 3 часа по сравнению с медленно высвобождающимися частицами на основе PLGA.
7. Фотодинамическая терапия через 3 часа после внутривенного введения суспензии частиц ватерита, содержащих порфиразин, привела к достоверному снижению скорости роста опухоли более чем на 50% по сравнению с терапией, включающей только воздействие светом или только внутривенные инъекции свободного порфиразина и в составе частиц ватерита.
8. Применение пористых частиц карбоната кальция гарантирует длительное высвобождение загруженного препарата и время его высвобождения может быть увеличено за счет адсорбции полимеров на поверхность частиц. Так, максимальное увеличение времени

высвобождения было достигнуто при нанесении наибольшего числа слоев, то есть использование оболочки, содержащей два бислоя полиаргенина и декстрана сульфата и терминальный слой гепарина.

9. Иммобилизация нафтифина в частицы ватерита способно обеспечить непрерывное фунгицидное и фунгистатическое действие в месте поражения за счет высокой емкости загрузки частиц ($4.9 \pm 1.2\%$ мас.) и длительного высвобождения препарата из своей структуры.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

СЭМ	сканирующая электронная микроскопия
БСА	бычий сывороточный альбумин
Ци7	цианин 7, флуоресцентный краситель, 750/773 нм (возбуждение/эмиссия)
ICG	индоцианин зеленый, 789/814 нм (возбуждение/эмиссия)
ФДТ	фотодинамическая терапия
ЕрСАМ	молекула адгезии клеток эндотелия
EPR	повышенная проницаемость и удержание
ПЭГ	поли(этиленгликоль)
ПАспК	поли(L-аспарагиновая кислота)
PLA	поли(молочная кислота)
КТ	компьютерная томография
PLGA	поли(молочная-гликолиевая кислота)
PCL	поли(капролактон)
ТА	таниновая кислота
пДНК	плазмидная ДНК
ФНО- α	фактор некроза опухоли – α
РЭС	ретикуло-эндотелиальная система
УЗ	ультразвук
МРТ	магнитно-резонансная томография
ДС	декстран сульфат
Бн	барназа
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота
ТРИТЦ	тетраметилродамин изотиоцианат, 544/570 нм (возбуждение/эмиссия)
Пз	порфиразин
ФСБ	фосфатно-солевой буфер

Нф	нафтифин гидрохлорид
ПА	поли(L-аргинин)
ДМСО	диметилсульфоксид
Вт	ватерит / ватеритные частицы
ЗНС	золотые наностержни
Геп	гепарин
ПАК	поли(акриловая кислота)
EDC	1-этил-3-(3диметиламинопропил)карбодиимид
NHS	N-гидроксисукцинимид
РНК	рибонуклеиновая кислота
F-12	культуральная среда (питательная смесь Хама F-12)
DMEM	культуральная среда (модифицированная Дубелько среда BME (базальная среда Игла))
MEM	культуральная среда (Минимальная необходимая среда (Minimum Essential Medium))
NHDF	нормальные человеческие дермальные фибробласты
MTS	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолий
МПК	минимальная подавляющая концентрация
БАЛ	бронхоальвеолярный лаваж
FLIM	микроскопия времени жизни флуоресценции
RFU	относительные единицы флуоресценции
КИРО	коэффициент ингибирования роста опухоли
ЭДРС	энергодисперсионная рентгеновская спектрометрия
ЛКСМ	лазерная конфокальная сканирующая микроскопия
ААС	атомно-адсорбционная спектрометрия

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю, профессору центра фотоники и фотонных технологий Сколковского института науки и технологий, д.х.н., Горину Дмитрию Александровичу.

Автор выражает глубокую признательность старшему научному сотруднику лаборатории «Дистанционно управляемые системы для тераностики», к.ф.-м.н., Свенской Юлии Игоревне, профессору центра фотоники и фотонных технологий Сколковского института науки и технологий, д.ф.-м.н., Яценку Алексею Михайловичу, заместителю директора института молекулярной тераностики, д.ф.-м.н., Звягину Андрею Васильевичу и коллективу лаборатории оптической тераностики Национального исследовательского Нижегородского государственного университета имени Н. И. Лобачевского за проведение совместных исследований. Автор благодарит коллектив лаборатории молекулярной иммунологии Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН за предоставление фермента барназа. Автор выражает благодарность ООО «НПФ Синтол» за предоставление биотинилированного и флуоресцентно меченного (активированный эфир Цианин 5 NHS) олигонуклеотида (молекулярной массой 25 848 Да) специфичного к молекуле клеточной адгезии эпителия (ЕрСАМ). Автор выражает глубокую признательность директору ФИЦ СНЦ РАН, д.ф.-м.н., Хлебцову Борису Николаевичу за предоставление золотых наночастиц.

Автор благодарит ЦКП научного оборудования в области физико-химической биологии и нанобиотехнологий «Симбиоз» ФГНУ «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов» РАН за проведение атомно-абсорбционная спектрометрия.

Автор выражает глубокую признательность и благодарность заместителю руководителя НМЦ СГУ, к.х.н. Иноземцевой Ольге Александровне за ценные замечания и конструктивную критику работы. Автор выражает глубокую признательность и благодарность коллективу лабораторий «Дистанционно

управляемые системы для тераностики» и «Биомедицинская фотоакустика» научного медицинского центра СГУ за бесценную помощь, поддержку и понимание.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yoo J.-W. Bio-inspired, bioengineered and biomimetic drug delivery carriers / Yoo J.-W., Irvine D.J., Discher D.E., Mitragotri S. // *Nature Reviews Drug Discovery* – 2011. – Т. 10 – № 7 – С.521–535.
2. Lavan D.A. Small-scale systems for in vivo drug delivery / Lavan D.A., McGuire T., Langer R. // *Nature biotechnology* – 2003. – Т. 21 – № 10 – С.1184–1191.
3. Wu J. The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application / Wu J. // *Journal of personalized medicine* – 2021. – Т. 11 – № 8 – С.771.
4. Ku S.H. Tumor-Targeting Multifunctional Nanoparticles for siRNA Delivery: Recent Advances in Cancer Therapy / Ku S.H., Kim K., Choi K., Kim S.H., Kwon I.C. // *Advanced Healthcare Materials* – 2014. – Т. 3 – № 8 – С.1182–1193.
5. Hillaireau H. Nanocarriers' entry into the cell: Relevance to drug delivery / Hillaireau H., Couvreur P. // *Cellular and Molecular Life Sciences* – 2009. – Т. 66 – № 17 – С.2873–2896.
6. Jain R.K. Delivering nanomedicine to solid tumors / Jain R.K., Stylianopoulos T. // *Nature reviews Clinical oncology* – 2010. – Т. 7 – № 11 – С.653–664.
7. Otto D.P. Differences in physicochemical properties to consider in the design, evaluation and choice between microparticles and nanoparticles for drug delivery / Otto D.P., Otto A., Villiers M.M. De // *Expert opinion on drug delivery* – 2015. – Т. 12 – № 5 – С.763–777.
8. De R. Structure-Based Varieties of Polymeric Nanocarriers and Influences of Their Physicochemical Properties on Drug Delivery Profiles / De R., Mahata M.K., Kim K. // *Advanced Science* – 2022. – Т. 9 – № 10 – С.2105373.
9. Kirpotin D.B. Antibody Targeting of Long-Circulating Lipidic Nanoparticles Does Not Increase Tumor Localization but Does Increase Internalization in Animal Models / Kirpotin D.B., Drummond D.C., Shao Y., Shalaby M.R., Hong K., Nielsen U.B., Marks J.D., Benz C.C., Park J.W. // *Cancer research* – 2006. – Т. 66 – № 13 – С.6732–6740.
10. Fay F. Antibody-targeted nanoparticles for cancer therapy / Fay F., Scott C.J. // *Immunotherapy* – 2011. – Т. 3 – № 3 – С.381–394.
11. Vaupel P. Blood Flow, Oxygen and Nutrient Supply, and Metabolic Microenvironment of Human Tumors: A Review / Vaupel P., Kallinowski F., Okunieff P. // *Cancer research* – 1989. – Т. 49 – № 23 – С.6449–6465.
12. Raghunand N. Microenvironmental and cellular consequences of altered blood flow in tumours / Raghunand N., Gatenby R.A., Gillies R.J. // *The British journal of radiology* – 2003. – Т. 76 – С.11–22.
13. Bertrand N. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology / Bertrand N., Wu J., Xu X., Kamaly N., Farokhzad O.C. // *Advanced drug delivery reviews* – 2014. – Т. 66 – С.2–25.
14. Filipczak N. Recent advancements in liposome technology / Filipczak N., Pan J., Yalamarty S.S.K., Torchilin V.P. // *Advanced Drug Delivery Reviews* – 2020. – Т. 156 – С.4–22.
15. Duncan R. Dendrimer biocompatibility and toxicity / Duncan R., Izzo L. // *Advanced drug delivery reviews* – 2005. – Т. 57 – № 15 – С.2215–2237.
16. Gokmen M.T. Porous Polymer Particles – A Comprehensive Guide to Synthesis,

- Characterization, Functionalization and Applications / Gokmen M.T., Prez F.E. Du // Progress in polymer science – 2012. – T. 37 – № 3 – C.365–405.
17. Cock L.J. De Polymeric Multilayer Capsules in Drug Delivery / Cock L.J. De, Koker S. De, Geest B.G. De, Grooten J., Vervaet C., Remon J.P., Sukhorukov G.B., Antipina M.N. // Angewandte Chemie International Edition – 2010. – T. 49 – № 39 – C.6954–6973.
18. Letchford K. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes / Letchford K., Burt H. // European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics – 2007. – T. 65 – № 3 – C.259–269.
19. Lingayat V.J. Solid Lipid Nanoparticles: A Review / Lingayat V.J., Zarekar N.S., Shendge R.S. // Nanoscience and Nanotechnology Research – 2017. – T. 4 – № 2 – C.67–72.
20. Pandey P. A brief review on inorganic nanoparticles / Pandey P., Dahiya M. // J Crit Rev – 2016. – T. 3 – № 3 – C.18–26.
21. Yu T. Impact of silica nanoparticle design on cellular toxicity and hemolytic activity / Yu T., Malugin A., Ghandehari H. // ACS Nano – 2011. – T. 5 – № 7 – C.5717–5728.
22. Gupta R. Polymeric micelles and nanoemulsions as drug carriers: Therapeutic efficacy, toxicity, and drug resistance / Gupta R., Shea J., Scaife C., Shurlygina A., Rapoport N. // Journal of Controlled Release – 2015. – T. 212 – C.70–77.
23. Gusliakova O. Use of submicron vaterite particles serves as an effective delivery vehicle to the respiratory portion of the lung / Gusliakova O., Atochina-Vasserman E.N., Sindeeva O., Sindeev S., Pinyaev S., Pyataev N., Revin V., Sukhorukov G.B., Gorin D., Gow A.J. // Frontiers in Pharmacology – 2018. – T. 9 – № JUN – C.1–13.
24. Yashchenok A.M. Barnase encapsulation into submicron porous CaCO₃ particles: studies of loading and enzyme activity / Yashchenok A.M., Gusliakova O.I., Konovalova E. V., Novoselova M. V., Shipunova V.O., Abakumova T.O., Efimova O.I., Kholodenko R., Schulga A.A., Zatsepin T.S., Gorin D.A., Deyev S.M. // Journal of Materials Chemistry B – 2021. – T. 9 – № 42 – C.8823–8831.
25. He X. Calcium carbonate nanoparticle delivering vascular endothelial growth factor-C siRNA effectively inhibits lymphangiogenesis and growth of gastric cancer in vivo / He X., Liu T., Chen Y., Cheng D., Li X., Xiao Y., Feng Y. // Cancer gene therapy – 2008. – T. 15 – № 3 – C.193–202.
26. Peng C. Sustained delivery of doxorubicin by porous CaCO₃ and chitosan/alginate multilayers-coated CaCO₃ microparticles / Peng C., Zhao Q., Gao C. // Colloids and surfaces A: physicochemical and engineering aspects – 2010. – T. 353 – № 2–3 – C.132–139.
27. Gusliakova O. Transdermal platform for the delivery of the antifungal drug naftifine hydrochloride based on porous vaterite particles / Gusliakova O., Verkhovskii R., Abalymov A., Lengert E., Kozlova A., Atkin V., Nechaeva O., Morrison A., Tuchin V., Svenskaya Y. // Materials Science & Engineering C – 2021. – T. 119 – C.111428.
28. Parakhonskiy B. V A method of drug delivery to tumors based on rapidly biodegradable drug-loaded containers / Parakhonskiy B. V, Shilyagina N.Y., Gusliakova O.I., Volovetskiy A.B., Kostyuk A.B., Balalaeva I. V, Klapshina L.G., Lermontova S.A., Tolmachev V., Orlova A., Gorin D.A., Sukhorukov G.B., Zvyagin A. V // Applied Materials Today – 2021. – T. 25 – C.101199.
29. Nicolas J. Design, functionalization strategies and biomedical applications of targeted biodegradable/biocompatible polymer-based nanocarriers for drug delivery / Nicolas J., Mura S., Brambilla D., Mackiewicz N., Nicolas J., Haddleton D.M. // Chemical Society Reviews – 2013. –

T. 42 – № 3 – C.1147–1235.

30. Peer D. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy / Peer D., Karp J.M., Hong S., Farokhzad O.C., Margalit R., Langer R. // *Nature nanotechnology* – 2007. – T. 2 – № 12 – C.751–60.

31. Torchilin V.P. RECENT ADVANCES WITH LIPOSOMES AS PHARMACEUTICAL CARRIERS / Torchilin V.P. // *Nature reviews Drug discovery* – 2005. – T. 4 – № 2 – C.145–160.

32. Trushina D.B. CaCO₃ vaterite microparticles for biomedical and personal care applications / Trushina D.B., Bukreeva T. V., Kovalchuk M. V., Antipina M.N. // *Materials Science and Engineering: C* – 2014. – T. 45 – C.644–658.

33. Dizaj S.M. Calcium carbonate nanoparticles as cancer drug delivery system / Dizaj S.M., Barzegar-jalali M., Zarrintan M.H., Adibkia K., Lotfipour F., Barzegar-jalali M., Zarrintan M.H., Adibkia K., Lotfipour F. // *Expert Opinion on Drug Delivery* – 2015. – T. 12 – № 10 – C.1649–1660.

34. Som A. Monodispersed calcium carbonate nanoparticles modulate local pH and inhibit tumor growth in vivo / Som A., Raliya R., Tian L., Akers W., Ippolito J., Singamaneni S., Biswas P., Achilefu S. // *Nanoscale* – 2015.

35. Svenskaya Y.I. Ultrasonically assisted fabrication of vaterite submicron-sized carriers / Svenskaya Y.I., Fattah H., Zakharevich A.M., Gorin D.A., Sukhorukov G.B., Parakhonskiy B. V. // *Advanced Powder Technology* – 2016. – T. 27 – № 2 – C.618–624.

36. Parakhonskiy B. The influence of the size and aspect ratio of anisotropic, porous CaCO₃ particles on their uptake by cells / Parakhonskiy B., Zyuzin M. V., Yashchenok A., Carregal-Romero S., Rejman J., Möhwald H., Parak W.J., Skirtach A.G. // *Journal of Nanobiotechnology* – 2015. – T. 13 – № 1 – C.53.

37. Costa L.M.M. Precipitated calcium carbonate nano-microparticles: applications in drug delivery / Costa L.M.M., Olyveira G.M. De, Salomão R. // *Advances in Tissue Engineering & Regenerative Medicine: Open Access* – 2017. – T. 3 – № 2 – C.336–340.

38. Barhom H. Biological Kerker effect boosts light collection efficiency in plants / Barhom H., Machnev A.A., Noskov R.E., Goncharenko A., Gurvitz E.A., Timin A.S., Shkoldin V.A., Koniakhin S. V., Koval O.Y., Zyuzin M. V., Shalin A.S., Shishkin I.I., Ginzburg P. // *Nano letters* – 2019. – T. 19 – № 10 – C.7062–7071.

39. Michavila S. Histological description of *Saxifraga paniculata* leaves with special focus on structures that release CaCO₃ / Michavila S., Encina A., Frey C., Álvarez R. // *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology* – 2022. – T. 156 – № 2 – C.497–505.

40. Achal V. Influence of Calcium Sources on Microbially Induced Calcium Carbonate Precipitation by *Bacillus* sp. CR2 / Achal V., Pan X. // *Applied biochemistry and biotechnology* – 2014. – T. 173 – C.307–317.

41. Chekroun K. Ben Precipitation and Growth Morphology of Calcium Carbonate Induced by *Myxococcus Xanthus*: Implications for Recognition of Bacterial Carbonates / Chekroun K. Ben, Rodríguez-Navarro C., González-Muñoz M.T., Arias J.M., Cultrone G., Rodríguez-Gallego M. // *Journal of Sedimentary Research* – 2004. – T. 74 – № 6 – C.868–876.

42. Rodríguez-Navarro C. Bacterially mediated mineralization of vaterite / Rodríguez-Navarro C., Jimenez-Lopez C., Rodríguez-Navarro A., Gonzalez-Mun M.T., Rodríguez-Gallego M. // *Geochimica et Cosmochimica Acta* – 2007. – T. 71 – № 5 – C.1197–1213.

43. Fujiwara M. Encapsulation of Proteins into CaCO₃ by Phase Transition from Vaterite to Calcite / Fujiwara M., Shiokawa K., Araki M., Ashitaka N., Morigaki K., Kubota T., Nakahara Y. // *Crystal growth & design* – 2010. – T. 10 – № 9 – C.4030–4037.
44. Svenskaya Y.I. Key Parameters for Size and Shape Controlled Synthesis of Vaterite Particles / Svenskaya Y.I., Fattah H., Inozemtseva O.A., Ivanova A.G., Shtykov S.N., Gorin D.A., Parakhonskiy B. V // *Crystal Growth & Design* – 2017. – T. 18 – № 1 – C.331–337.
45. Shirsath S.R. A novel approach for continuous synthesis of calcium carbonate using sequential operation of two sonochemical reactors / Shirsath S.R., Bhanvase B.A., Sonawane S.H., Gogate P.R., Pandit A.B. // *Ultrasonics - Sonochemistry* – 2017. – T. 35 – C.124–133.
46. Trushina D.B. Size-Controlled Synthesis of Vaterite Calcium Carbonate by the Mixing Method: Aiming for Nanosized Particles / Trushina D.B., Bukreeva T. V, Antipina M.N. // *Crystal growth & design* – 2016. – T. 16 – № 3 – C.1311–1319.
47. Boyjoo Y. Synthesis of micro and nano-sized calcium carbonate particles and their applications / Boyjoo Y., Pareek V.K., Liu J. // *Journal of Materials Chemistry A* – 2014. – T. 2 – № 35 – C.14270–14288.
48. Volodkin D. V One-Step Formulation of Protein Microparticles with Tailored Properties: Hard Templating at Soft Conditions / Volodkin D. V, Schmidt S., Fernandes P., Larionova N.I., Sukhorukov G.B., Duschl C., Möhwald H., Klitzing R. von // *Advanced Functional Materials* – 2012. – T. 22 – № 9 – C.1914–1922.
49. Hu Q. Growth process and crystallographic properties of ammonia-induced vaterite / Hu Q., Zhang J., Teng H., Becker U. // *American Mineralogist* – 2012. – T. 97 – № 8–9 – C.1437–1445.
50. Liu Y. Calcium Carbonate Crystallization in the Presence of Casein / Liu Y., Cui Y., Mao H., Guo R. // *Crystal growth & design* – 2012. – T. 12 – № 10 – C.4720–4726.
51. Manoli F. The effect of aminoacids on the crystal growth of calcium carbonate / Manoli F., Kanakis J., Malkaj P., Dalas E. // *Journal of crystal growth* – 2002. – T. 236 – № 1–3 – C.363–370.
52. Trushina D.B. Size Control and Structure Features of Spherical Calcium Carbonate Particles / Trushina D.B., Sulyanov S.N., Bukreeva T. V, Kovalchuk M. V // *Crystallography reports* – 2015. – T. 60 – C.570–577.
53. Begum G. In Situ Strategy to Encapsulate Antibiotics in a Bioinspired CaCO₃ Structure Enabling pH-Sensitive Drug Release Apt for Therapeutic and Imaging Applications / Begum G., Reddy T.N., Kumar K.P., Dhevendar K., Singh S., Amarnath M., Misra S., Rangari V.K., Rana R.K. // *ACS Applied Materials & Interfaces* – 2016. – T. 8 – № 34 – C.22056–22063.
54. Guo S. Bioinspired synthesis of fluorescent calcium carbonate/carbon dot hybrid composites / Guo S., Yang M., Chen M., Zhang J., Liu K., Ye L., Gu W. // *Dalton Transactions* – 2015. – T. 44 – № 17 – C.8232–8237.
55. Boyjoo Y. Synthesis of CaCO₃@C yolk–shell particles for CO₂ adsorption / Boyjoo Y., Merigot K., Lamonier J., Pareek V.K., Tade M.O., Liu J. // *RSC Advances* – 2015. – T. 5 – № 32 – C.24872–24876.
56. Sharma S. An insight into functionalized calcium based inorganic nanomaterials in biomedicine: Trends and transitions / Sharma S., Teja B.V., Pandey G., Mittapelly N., Trivedi R., Mishra P.R. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* – 2015. – T. 133 – C.120–139.
57. Wu Z. Shape control of inorganic nanoparticles from solution / Wu Z., Yang S., Wu W. // *Nanoscale* – 2016. – T. 8 – № 3 – C.1237–1259.

58. Walczyk D. What the Cell “Sees” in Bionanoscience / Walczyk D., Bombelli F.B., Monopoli M.P., Lynch I., Dawson K.A. // *Journal of the American Chemical Society* – 2010. – T. 132 – № 16 – C.5761–5768.
59. Kango S. Surface modification of inorganic nanoparticles for development of organic – inorganic nanocomposites — A review / Kango S., Kalia S., Celli A., Njuguna J., Habibi Y., Kumar R. // *Progress in Polymer Science* – 2013. – T. 38 – № 8 – C.1232–1261.
60. Husain Q. Nanomaterials as novel supports for the immobilization of amyolytic enzymes and their applications: A review / Husain Q. // *Biocatalysis* – 2017. – T. 3 – № 1 – C.37–53.
61. Volodkin D. CaCO₃ templated micro-beads and -capsules for bioapplications / Volodkin D. // *Advances in Colloid and Interface Science* – 2014. – T. 207 – C.306–324.
62. Park D.J. Photosensitizer-loaded bubble-generating mineralized nanoparticles for ultrasound imaging and photodynamic therapy / Park D.J., Min K.H., Lee H.J., Kim K., Kwon I.C., Jeong S.Y., Lee S.C. // *Journal of Materials Chemistry B* – 2016. – T. 4 – № 7 – C.1219–1227.
63. Tang Z. Characteristics evaluation of calcium carbonate particles modified by surface functionalization / Tang Z., Cheng G., Chen Y., Yu X. // *Advanced Powder Technology* – 2014. – T. 25 – № 5 – C.1618–1623.
64. Lee J. Theranostic gas-generating nanoparticles for targeted ultrasound imaging and treatment of neuroblastoma / Lee J., Min H., You D.G., Kim K., Kwon I.C., Rhim T., Lee K.Y. // *Journal of Controlled Release* – 2016. – T. 223 – C.197–206.
65. Xu P. Short Protecting Group-free Syntheses of Camptothecin and 10-Hydroxycamptothecin Using Cascade Methodologies / Xu P., Chen D., Xi J., Yao Z. // *Chemistry—An Asian Journal* – 2015. – T. 10 – № 4 – C.976–981.
66. Volodkin D. V Matrix Polyelectrolyte Microcapsules: New System for Macromolecule Encapsulation / Volodkin D. V., Petrov A.I., Prevot M., Sukhorukov G.B. // *Langmuir* – 2004. – T. 20 – № 8 – C.3398–3406.
67. Volodkin D. V. Pure protein microspheres by calcium carbonate templating. / Volodkin D. V., Klitzing R. von, Möhwald H. // *Angewandte Chemie (International ed. in English)* – 2010. – T. 49 – № 48 – C.9258–9261.
68. Parakhonskiy B. V Colloidal micro- and nano-particles as templates for polyelectrolyte multilayer capsules / Parakhonskiy B. V., Yashchenok A.M., Konrad M., Skirtach A.G. // *Advances in Colloid and Interface Science* – 2014. – T. 207 – C.253–264.
69. Borodina T.N. Calcium Carbonate-Based Mucoadhesive Microcontainers for Intranasal Delivery of Drugs Bypassing the Blood – Brain Barrier / Borodina T.N., Trushina D.B., Marchenko I. V., Bukreeva T. V – 2016. – C.261–268.
70. Challa R. Cyclodextrins in Drug Delivery: An Updated Review / Challa R., Ahuja A., Ali J., Khar R.K. // *Aaps Pharmscitech* – 2005. – T. 6 – C.E329-E357.
71. Blanco E. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery / Blanco E., Shen H., Ferrari M. // *Nature biotechnology* – 2015. – T. 33 – № 9 – C.941–951.
72. Maver U. A fast and simple method for preparation of calcium carbonate – drug composites for fast drug release / Maver U., Bele M., Jamnik J., Gaberšček M., Planinšek O. // *Materials Research Bulletin* – 2013. – T. 48 – № 1 – C.137–145.
73. Ueno Y. Drug-incorporating calcium carbonate nanoparticles for a new delivery system / Ueno Y., Futagawa H., Takagi Y., Ueno A., Mizushima Y. // *Journal of Controlled Release* – 2005. – T.

74. Petrov A.I. Protein - Calcium Carbonate Coprecipitation: A Tool for Protein Encapsulation / Petrov A.I., Volodkin D. V, Sukhorukov G.B. // *Biotechnology progress* – 2005. – T. 21 – № 3 – C.918–925.
75. Wang C. Molecular BioSystems Protamine sulfate – calcium carbonate – plasmid DNA ternary nanoparticles for efficient gene / Wang C., Wu J., Zhuo R., Cheng S. // *Molecular BioSystems* – 2014. – T. 10 – № 3 – C.672–678.
76. Chen S. Co-delivery of genes and drugs with nanostructured calcium carbonate for cancer therapy / Chen S., Zhao D., Li F., Zhuo R., Cheng S. // *RSC Advances* – 2012. – T. 2 – № 5 – C.1820–1826.
77. Microcapsules S. Controlled Release of DNA from Self-Degrading Microcapsules / Microcapsules S., Borodina T., Markvicheva E., Kunizhev S., Sukhorukov G.B., Kreft O. // *Macromolecular rapid communications* – 2007. – T. 28 – № 18–19 – C.1894–1899.
78. Koker S. De Polyelectrolyte Microcapsules as Antigen Delivery Vehicles To Dendritic Cells: Uptake , Processing , and Cross-Presentation of Encapsulated Antigens / Koker S. De, Geest B.G. De, Singh S.K., Rycke R. De, Naessens T., Kooyk Y. Van, Demeester J., Smedt S.C. De, Grooten J. // *Angewandte Chemie International Edition* – 2009. – T. 48 – № 45 – C.8485–8489.
79. Qiu N. Calcium carbonate microspheres as carriers for the anticancer drug camptothecin / Qiu N., Yin H., Ji B., Klauke N., Glidle A., Zhang Y., Song H., Cai L., Ma L., Wang G., Chen L., Wang W. // *Materials Science & Engineering C* – 2012. – T. 32 – № 8 – C.2634–2640.
80. Sukhorukov G.B. Porous calcium carbonate microparticles as templates for encapsulation of bioactive compounds / Sukhorukov G.B., Volodkin D. V, Gu A.M. // *Journal of Materials Chemistry* – 2004. – T. 14 – № 14 – C.2073–2081.
81. German S. V High-efficiency freezing-induced loading of inorganic nanoparticles and proteins into micron-and submicron-sized porous particles / German S. V, Novoselo M. V, Bratashov D.N., Demina P.A., Atkin V.S., Voronin D. V, Khlebtsov B.N., Parakhonskiy B. V, Sukhorukov G.B., Gorin D.A. // *Scientific reports* – 2018. – T. 8 – № 1 – C.17763.
82. Wegst U.G. Biomaterials by freeze casting / Wegst U.G., Schecter M., Donius A.E., Hunger P.M. // *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* – 2010. – T. 368 – № 1917 – C.2099–2121.
83. Neto A.S. Synthetic and Marine-Derived Porous Scaffolds for Bone Tissue Engineering / Neto A.S., Ferreira J.M. // *Materials*, 11(9), 1702. – 2018. – T. 11 – № 9 – C.1702.
84. Julia V. The use of coral scaffold in oral and maxillofacial surgery: A review / Julia V., Maharani D.A., Latief B.S. // *Journal of International Dental and Medical Research* – 2016. – T. 9 – C.427–435.
85. Mangano C. Clinical and histologic evaluation of calcium carbonate in sinus augmentation: a case series / Mangano C., Iaculli F., Piattelli A., Mangano F., Awad Shibli J., Perrotti V., Iezzi G. // *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 34(2). – 2014. – T. 34 – № 2.
86. Dogan E. Cuttlebone used as a bone xenograft in bone healing / Dogan E., Okumus Z. // *Veterinarni Medicina* – 2014. – T. 59 – № 5 – C.254–260.
87. Gunn J.M. Comparison of the osteoconductive properties of three particulate bone fillers in a rabbit model: Allograft , calcium carbonate (Biocoral ®) and S53P4 bioactive glass / Gunn J.M., Rekola J., Hirvonen J., Aho A.J., Gunn J.M., Rekola J., Hirvonen J., Aho A.J. // *Acta Odontologica Scandinavica* – 2013. – T. 71 – № 5 – C.1238–1242.

88. Yuan J. Repair of Canine Mandibular Bone Defects / Yuan J., Zhang W.J., Liu G., Wei M., Qi Z.L., Liu W., Cui L., Cao Y.L. // *Tissue Engineering Part A* – 2010. – T. 16 – № 4 – C.1385–1394.
89. Liu G. Bone regeneration in a canine cranial model using allogeneic adipose derived stem cells and coral scaffold / Liu G., Zhang Y., Liu B., Sun J., Li W., Cui L. // *Biomaterials* – 2013. – T. 34 – № 11 – C.2655–2664.
90. Boehrnsen F. Cotransplantation of mesenchymal stromal cells and endothelial cells on calcium carbonate and hydroxylapatite scaffolds in vivo / Boehrnsen F., Petra M., Mareike N., Hans R., Boris S. // *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery* – 2020.
91. Rose F.R.A.J. Delivery systems for bone growth factors — the new players in skeletal regeneration / Rose F.R.A.J., Hou Q., Oreffo R.O.C. // *Journal of pharmacy and pharmacology* – 2004. – T. 56 – № 4 – C.415–427.
92. Vuola J. Transforming growth factor β released from natural coral implant enhances bone growth at calvarium of mature rat / Vuola J., Bo T., Go H., Puolakkainen P. // *Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials and The Japanese Society for Biomaterials* – 2001. – T. 51 – № 9 – C.152–159.
93. Xiao C. Repair of orbital wall defects using biocoral scaffolds combined with bone marrow stem cells enhanced by human bone morphogenetic protein-2 in a canine model / Xiao C., Zhou H., Ge S., Tang T., Hou H., Luo M.I.N., Fan X. // *International journal of molecular medicine* – 2010. – T. 26 – № 4 – C.517–525.
94. Huang Q. Comparing the regeneration potential between PLLA/Aragonite and PLLA/Vaterite pearl composite scaffolds in rabbit radius segmental bone defects / Huang Q., Liu Y., Ouyang Z., Feng Q. // *Bioactive Materials* – 2020. – T. 5 – № 4 – C.980–989.
95. Green D.W. Augmentation of skeletal tissue formation in impaction bone grafting using vaterite microsphere biocomposites / Green D.W., Bolland B.J.R.F., Kanczler J.M., Lanham S.A., Walsh D., Mann S., Oreffo R.O.C. // *Biomaterials* – 2009. – T. 30 – № 10 – C.1918–1927.
96. Saveleva M.S. Hybrid PCL/CaCO₃ scaffolds with capabilities of carrying biologically active molecules: Synthesis, loading and in vivo applications / Saveleva M.S., Ivanov A.N., Kurtukova M.O., Atkin V.S., Ivanova A.G., Lyubun G.P., Martyukova A. V, Cherevko E.I., Sargsyan A.K., Fedonnikov A.S., Norkin I.A., Skirtach A.G. // *Materials Science and Engineering: C* – 2018. – T. 85 – C.57–67.
97. Tolba E. High biocompatibility and improved osteogenic potential of amorphous calcium carbonate/ vaterite / Tolba E., Muller W.E.G., Abd El-Hady B.M., Neufurth M., Wurm F., Wang S., Schrodera H.C., Wang X. // *Journal of Materials Chemistry B* – 2016. – T. 4 – № 3 – C.376–386.
98. Kim S.K. Targeted delivery of EV peptide to tumor cell cytoplasm using lipid coated calcium carbonate nanoparticles / Kim S.K., Foote M.B., Huang L. // *Cancer letters* – 2013. – T. 334 – № 2 – C.311–318.
99. Peng J.Q. Targeted co-delivery of protein and drug to a tumor in vivo by sophisticated RGD-modified lipid-calcium carbonate nanoparticles / Peng J.Q., Fumoto S., Suga T., Miyamoto H., Kuroda N., Kawakami S., Nishida K. // *Journal of Controlled Release* – 2019. – T. 302 – C.42–53.
100. Shi H. Designed preparation of polyacrylic acid/calcium carbonate nanoparticles with high doxorubicin payload for liver cancer chemotherapy / Shi H., Li L., Zhang L., Wang T., Wang C., Zhu D., Su Z. // *CrystEngComm* – 2015. – T. 17 – № 26 – C.4768–4773.
101. Yazdian-robati R. Smart aptamer-modified calcium carbonate nanoparticles for controlled release and targeted delivery of epirubicin and melittin into cancer cells in vitro and in vivo /

- Yazdian-robati R., Arab A., Ramezani M., Rafatpanah H., Bahreyni A., Nabavinia M.S., Abnous K., Taghdisi S.M. // *Drug development and industrial pharmacy* – 2019. – Т. 45 – № 4 – С.603–610.
102. Xue P. Calcium-carbonate packaging magnetic polydopamine nanoparticles loaded with indocyanine green for near-infrared induced photothermal/photodynamic therapy / Xue P., Hou M., Sun L., Li Q., Zhang L., Xu Z., Kang Y. // *Acta Biomaterialia* – 2018. – Т. 81 – С.242–255.
103. Som A. Monodispersed calcium carbonate nanoparticles modulate local pH and inhibit tumor growth in vivo / Som A., Raliya R., Tian L., Akers W., Ippolito J.E., Singamaneni S., Biswas P., Achilefu S. // *Nanoscale* – 2016. – Т. 8 – № 25 – С.12639–12647.
104. Ших Е.В. Биодоступность пероральных препаратов / Ших Е.В. // *Российский медицинский журнал* – 2007. – Т. 2 – С.95.
105. Lee J.A. The fate of calcium carbonate nanoparticles administered by oral route: absorption and their interaction with biological matrices / Lee J.A., Kim M.K., Kim H.M., Lee J.K., Jeong J., Kim Y.R., Oh J.M., Choi S.J. // *International journal of nanomedicine* – 2015. – Т. 10 – С.2273–2293.
106. Chen H.S. Calcium Bioavailability of Nanonized Pearl Powder for Adults / Chen H.S., Chang J.H., Wu J.S.B. // *Journal of food science* – 2008. – Т. 73 – № 9 – С.246–251.
107. Park H.S. Effects of Nanocalcium Supplemented Milk on Bone Calcium Metabolism in Ovariectomized Rats / Park H.S., Jeon B.J., Ahn J., Kwak H.S. // *Asian-australasian journal of animal sciences* – 2007. – Т. 20 – № 8 – С.1266–1271.
108. Liu D. Oral delivery of insulin using CaCO₃ - based composite nanocarriers with hyaluronic acid coatings / Liu D., Jiang G., Yu W., Li L., Tong Z., Kong X. // *Materials Letters* – 2017. – Т. 188 – С.263–266.
109. Prausnitz M.R. Transdermal drug delivery / Prausnitz M.R., Langer R. // *Nature biotechnology* – 2008. – Т. 26 – № 11 – С.1261–1268.
110. Prausnitz M.R. Current status and future potential of transdermal drug delivery / Prausnitz M.R., Mitragotri S., Langer R. // *Nature reviews Drug discovery* – 2004. – Т. 3 – № 2 – С.115–124.
111. Svenskaya Y.I. A simple non-invasive approach toward efficient transdermal drug delivery based on biodegradable particulate system / Svenskaya Y.I., Genina E.A., Parakhonskiy B. V., Lengert E. V., Talnikova E.E., Terentyuk G.S., Utz S.R., Gorin D.A., Tuchin V. V., Sukhorukov G.B. // *ACS applied materials & interfaces* – 2019. – Т. 11 – № 9 – С.17270–17282.
112. Genina E.A. In vivo optical monitoring of transcutaneous delivery of calcium carbonate microcontainers / Genina E.A., Svenskaya Y.I., Yanina I.Y., Dolotov L.E., Navolokin N.A., Bashkatov A.N., Terentyuk G.S., Bucharskaya A.B., Maslyakova G.N., Gorin D.A., Tuchin V. V., Sukhorukov G.B. // *Biomedical Optics Express* – 2016. – Т. 7 – № 6 – С.2082–2087.
113. Lengert E. Mesoporous carriers for transdermal delivery of antifungal drug / Lengert E., Verkhovskii R.A., Genina E.A., Svenskaya Y. // *Materials Letters* – 2019. – Т. 248 – С.211–213.
114. Higaki M. Transdermal Delivery of CaCO₃-Nanoparticles Containing Insulin / Higaki M., Kameyama M., Udagawa M., Ueno Y., Yamaguchi Y., Igarashi R., Ishihara T., Mizushima Y. // *Diabetes Technology & Therapeutics* – 2006. – Т. 8 – № 3 – С.369–374.
115. Groneberg D.A. Fundamentals of pulmonary drug delivery / Groneberg D.A., Witt C., Wagner U., Chung K.F., Fischer A. // *Respiratory medicine* – 2003. – Т. 97 – № 4 – С.382–387.
116. El-Sherbiny I.M. Inhaled nano- and microparticles for drug delivery / El-Sherbiny I.M., El-Baz

- N.M., Yacoub M.H. // *Global Cardiology Science and Practice* – 2015. – T. 1 – № 2.
117. Patton J.S. Inhaling medicines : delivering drugs to the body through the lungs / Patton J.S., Byron P.R. // *Nature Reviews Drug Discovery* – 2007. – T. 6 – № January – C.67–74.
118. Nahar K. In vitro, in vivo and ex vivo models for studying particle deposition and drug absorption of inhaled pharmaceuticals / Nahar K., Gupta N., Gauvin R., Absar S., Patel B., Gupta V., Khademhosseini A., Ahsan F. // *European Journal of Pharmaceutical Sciences* – 2013. – T. 49 – № 5 – C.805–818.
119. Tewes F. Amorphous Calcium Carbonate Based-Microparticles for Peptide Pulmonary Delivery / Tewes F., Gobbo O.L., Ehrhardt C., Healy A.M. // *ACS Applied Materials & Interfaces* – 2016. – T. 8 – № 2 – C.1164–1175.
120. Shoyaib A. Al Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies? / Shoyaib A. Al, Archie S.R., Karamyan V.T. // *Pharmaceutical research* – 2020. – T. 37 – C.1–17.
121. Esperanca M.J. Peritoneal dialysis efficiency in relation to body weight / Esperanca M.J., Collins D.L. // *Journal of Pediatric Surgery* – 1966. – T. 1 – № 2 – C.162–169.
122. Zink J. Control of ascites absorption in anesthetized cats: effects of intraperitoneal pressure, protein, and furosemide diuresis / Zink J., Greenway C. V // *Gastroenterology* – 1977. – T. 73 – № 5 – C.1119–1124.
123. Fumoto S. Efficient in vivo gene transfer by intraperitoneal injection of plasmid DNA and calcium carbonate microflowers in mice / Fumoto S., Nakajima S., Mine T., Yoshikawa N., Kitahara T., Sasaki H., Miyamoto H., Nishida K. // *Molecular Pharmaceutics* – 2012. – T. 9 – № 7 – C.1962–1970.
124. Westrøm S. Therapeutic Effect of α -Emitting ^{224}Ra -Labeled Calcium Carbonate Microparticles in Mice with Intraperitoneal Ovarian / Westrøm S., Bønsdorff T.B., Bruland Ø.S., Larsen R.H. // *Translational Oncology* – 2018. – T. 11 – № 2 – C.259–267.
125. Li R.G. Calcium Carbonate Microparticles as Carriers of ^{224}Ra : Impact of Specific Activity in Mice with Intraperitoneal Ovarian Cancer / Li R.G., Napoli E., Jorstad I.S., Juzeniene A., Larsen R.H. // *Radiopharmaceuticals*, 14(2), 145-153 – 2021. – T. 14 – № 2 – C.145–153.
126. Erd F. Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting / Erd F., Anna L., Farkas D., Bajza Á., Gizurarson S. // *Brain research bulletin* – 2018. – T. 143 – C.155–170.
127. Goldberg E.P. Intratumoral cancer chemotherapy and immunotherapy: opportunities for nonsystemic preoperative drug delivery / Goldberg E.P., Hadba A.R., Almond B.A., Marotta J.S. // *Journal of Pharmacy and Pharmacology* – 2002. – T. 54 – № 2 – C.159–180.
128. Yun W.S. Recent Studies and Progress in the Intratumoral Administration of Nano-Sized Drug Delivery Systems / Yun W.S., Kim J., Lim D., Kim D., Jeon S.I., Kim K. // *Nanomaterials* – 2023. – T. 13 – № 15 – C.2225.
129. He X.W. Vascular endothelial growth factor-C siRNA delivered via calcium carbonate nanoparticle effectively inhibits lymphangiogenesis and growth of colorectal cancer in vivo / He X.W., Liu T., Xiao Y., Feng Y.L., Cheng D.J., Tingting G. // *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals* – 2009. – T. 24 – № 2 – C.249–259.
130. Min K.H. pH-controlled gas-generating mineralized nanoparticles: a theranostic agent for ultrasound imaging and therapy of cancers / Min K.H., Min H.S., Lee H.J., Park D.J., Yhee J.Y., Kim K., Kwon I.C., Jeong S.Y., Silvestre O.F., Chen X., Hwang Y., Kim E., Al M.I.N.E.T. // *ACS*

nano – 2015. – T. 9 – № 1 – C.134–145.

131. Yi Z. In Vivo Tumor Visualization through MRI Off-On Switching of NaGdF₄–CaCO₃ Nanoconjugates / Yi Z., Luo Z., Barth N.D., Meng X., Liu H., Bu W., All A., Vendrell M., Liu X. // *Advanced Materials* – 2019. – T. 31 – № 37 – C.1901851.

132. Dong Z. CaCO₃ nanoparticles as an ultra-sensitive tumor-pH-responsive nanoplatform enabling real-time drug release monitoring and cancer combination therapy / Dong Z., Feng L., Zhu W., Sun X., Gao M., Zhao H., Chao Y., Liu Z. // *Biomaterials* – 2016. – T. 110 – C.60–70.

133. Dong Z. Synthesis of hollow biomineralized CaCO₃–Polydopamine nanoparticles for multimodal imaging-guided cancer photodynamic therapy with reduced skin photosensitivity / Dong Z., Feng L., Hao Y., Chen M., Gao M., Chao Y. // *Journal of the American Chemical Society* – 2018. – T. 140 – № 6 – C.2165–2178.

134. Tarakanchikova Y. A highly efficient and safe gene delivery platform based on polyelectrolyte core–shell nanoparticles for hard-to-transfect clinically relevant cell types / Tarakanchikova Y., Muslimov A., Sergeev I., Lepik K., Yolshin N., Goncharenko A., Vasilyev K., Eliseev I., Bukatin A., Sergeev V., Pavlov S., Popov A., Meglinski I. // *Journal of Materials Chemistry B* – 2020. – T. 8 – № 41 – C.9576–9588.

135. Parakhonskiy B. V Sub-Micrometer Vaterite Containers: Synthesis, Substance Loading, and Release / Parakhonskiy B. V., Haase A., Antolini R. // *Angewandte Chemie International Edition* – 2012. – T. 51 – № 5 – C.1195–1197.

136. Svenskaya Y.I. Photodynamic therapy platform based on localized delivery of photosensitizer by vaterite submicron particles / Svenskaya Y.I., Pavlov A.M., Gorin D.A., Gould D.J., Parakhonskiy B. V., Sukhorukov G.B. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* – 2016. – T. 146 – C.171–179.

137. Gusliakova O.I. Spectral Monitoring of Naftifine Immobilization into Submicron Vaterite Particles / Gusliakova O.I., Lengert E. V., Atkin V.S., Tuchin V. V., Svenskaya Y.I. // *Optics and Spectroscopy* – 2019. – T. 126 – № 5 – C.539–544.

138. Terentyuk G. Gold nanorods with a hematoporphyrin-loaded silica shell for dual-modality photodynamic and photothermal treatment of tumors in vivo / Terentyuk G., Panfilova E., Khanadeev V., Chumakov D., Genina E., Bashkatov A., Tuchin V., Bucharskaya A., Maslyakova G., Khlebtsov N., Khlebtsov B. // *Nano Research* – 2014. – T. 7 – C.325–337.

139. Rushizky G.W. Studies on *B. subtilis* Ribonuclease. I. Characterization of Enzymatic Specificity / Rushizky G.W., Greco A.E., Hartley Jr R.W., Sober H.A. // *Biochemistry* – 1963. – T. 2 – № 4 – C.787–793.

140. Arendrup M.C. EUCAST definitive document E. DEF 7.3. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts. / M. C. Arendrup, J. Guinea, M. Cuenca-Estrella, J. Meletiadis, J. W. Mouton, K. Lagrou, S. on A. S. T. (AFST) of the E. E. C. for A. S. T. (EUCAST) – , 2015.– 1–21c.

141. Guo C. S -Nitrosylation of Surfactant Protein-D Controls Inflammatory Function / Guo C., Atochina-Vasserman E.N., Abramova E., Foley J.P., Zaman A., Crouch E., Beers M.F., Savani R.C., Gow A.J. // *PLoS Biol* – 2008. – T. 6 – № 11 – C.e266.

142. Atochina E.N. Surfactant Protein-D , a Mediator of Innate Lung Immunity , Alters the Products of Nitric Oxide Metabolism / Atochina E.N., Beers M.F., Hawgood S., Poulain F., Davis C., Fusaro T., Gow A.J. // *American journal of respiratory cell and molecular biology* – 2004. – T. 30 – № 3 – C.271–279.

143. Atochina-Vasserman E.N. Immune Reconstitution during Pneumocystis Lung Infection: Disruption of Surfactant Component Expression and Function by S-Nitrosylation / Atochina-Vasserman E.N., Gow A.J., Abramova H., Guo C.-J., Tomer Y., Preston A.M., Beck J.M., Beers M.F. // *The Journal of Immunology* – 2009. – T. 182 – № 4 – C.2277–2287.
144. Zdobnova T. A novel far-red fluorescent xenograft model of ovarian carcinoma for preclinical evaluation of HER2-targeted immunotoxins / Zdobnova T., Sokolova E., Stremovskiy O., Karpenko D., Telford W., Turchin I., Balalaeva I., Deyev S. // *Oncotarget* – 2015. – T. 6 – № 31 – C.30919.
145. Feoktistova N. Controlling the Vaterite CaCO₃ Crystal Pores. Design of Tailor-Made Polymer Based Microcapsules by Hard Templating / Feoktistova N., Rose J., Prokopovic V.Z., Vikulina A.S., Skirtach A., Volodkin D. // *Langmuir* – 2016. – T. 32 – № 17 – C.4229–4238.
146. Sun R. Mesoscale transformation of amorphous calcium carbonate to porous vaterite microparticles with morphology control / Sun R., Willhammar T., Grape E.S., Cheung O. // *Crystal growth & design* – 2019. – T. 19 – № 9 – C.5075–5087.
147. Souza E.F. Vaterite submicron particles designed for photodynamic therapy in cells / Souza E.F., Ambrósio J.A.R., Pinto B.C.S., Beltrame M., Sakane K.K., Pinto J.G., Ferreira-strixino J., Gonçalves E.P., Simioni A.R. // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* – 2020. – T. 31 – C.101913.
148. Ogino T. The formation and transformation mechanism of calcium carbonate in water / Ogino T., Suzuki T., Sawada K. // *Geochimica et Cosmochimica Acta* – 1987. – T. 51 – № 10 – C.2757–2767.
149. Gomez-Morales J. Nucleation of calcium carbonate at different initial pH conditions / Gomez-Morales J., Torrent-Burgues J., Rodriguez-Clemente R. // *Journal of crystal growth* – 1996. – T. 169 – № 2 – C.331–338.
150. Nokhodchi A. Pulmonary drug delivery: advances and challenges / A. Nokhodchi, G. P. Martin, Eds. – John Wiley & Sons, 2015.
151. Goldstein J.I. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis / J. I. Goldstein, D. E. Newbury, J. R. Michael, N. W. Ritchie, J. H. J. Scott, D. C. Joy – Springer, 2017.
152. Aggarwal P. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy / Aggarwal P., Hall J.B., Mcleland C.B., Dobrovolskaia M.A., Mcneil S.E. // *Advanced Drug Delivery Reviews* – 2009. – T. 61 – № 6 – C.428–437.
153. Pino P. Del Protein corona formation around nanoparticles—from the past to the future / Pino P. Del, Pelaz B., Zhang Q., Maffre P., Nienhaus G.U., Parak W.J. // *Materials Horizons* – 2014. – T. 1 – № 3 – C.301–313.
154. Ke P.C. A Decade of the Protein Corona / Ke P.C., Lin S., Parak W.J., Davis T.P., Caruso F. // *ACS nano* – 2017. – T. 11 – № 12 – C.11773–11776.
155. Leeuw N.H. De Surface Structure and Morphology of Calcium Carbonate Polymorphs Calcite, Aragonite, and Vaterite: An Atomistic Approach / Leeuw N.H. De, Parker S.C. // *The Journal of Physical Chemistry B* – 1998. – T. 102 – № 16 – C.2914–2922.
156. Volodkin D. V Protein Encapsulation via Porous CaCO₃ Microparticles Templating / Volodkin D. V, Larionova N.I., Sukhorukov G.B. // *Biomacromolecules* – 2004. – T. 5 – № 5 – C.1962–1972.
157. Griese M. Pulmonary surfactant in health and human lung diseases: state of the art / Griese M. // *European Respiratory Journal* – 1999. – T. 13 – № 6 – C.1455–1476.

158. Wright J.R. Immunoregulatory functions of surfactant proteins / Wright J.R. // *Nature Reviews Immunology* – 2005. – T. 5 – № 1 – C.58–68.
159. Sergeeva A. Composite Magnetite and Protein Containing CaCO₃ Crystals. External Manipulation and Vaterite → Calcite Recrystallization- Mediated Release Performance / Sergeeva A., Sergeev R., Lengert E., Zakharevich A., Parakhonskiy B., Gorin D., Sergeev S., Volodkin D. // *ACS Applied Materials & Interfaces* – 2015. – T. 7 – № 38 – C.21315–21325.
160. Carvalho T.C. Influence of particle size on regional lung deposition – What evidence is there? / Carvalho T.C., Peters J.I., Williams R.O. // *International Journal of Pharmaceutics* – 2011. – T. 406 – № 1–2 – C.1–10.
161. García-fernández A. Mesoporous silica nanoparticles for pulmonary drug delivery / García-fernández A., Sancenón F., Martínez-mañez R. // *Advanced Drug Delivery Reviews* – 2021. – T. 177 – C.113953.
162. Hartley R.W. Amino-acid sequence of extracellular ribonuclease (barnase) of *Bacillus amyloliquefaciens* / Hartley R.W., Barker E.A. // *Nature New Biology* – 1972. – T. 235 – № 53 – C.15–16.
163. Martsev S.P. Fusion of the antiferritin antibody VL domain to barnase results in enhanced solubility and altered pH stability / Martsev S.P., Tsybovsky Y.I., Stremovskiy O.A., Odintsov S.G., Balandin T.G., Arosio P., Kravchuk Z.I., Deyev S.M. // *Protein Engineering Design and Selection* – 2004. – T. 17 – № 1 – C.85–93.
164. Edelweiss E. Barnase as a New Therapeutic Agent Triggering Apoptosis in Human Cancer Cells / Edelweiss E., Balandin T.G., Ivanova J.L., Lutsenko G. V, Leonova O.G., Popenko V.I., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. // *PloS one* – 2008. – T. 3 – № 6 – C.e2434.
165. Chao T. Cellular Uptake of Ribonuclease A Relies on Anionic Glycans / Chao T., Lavis L.D., Raines R.T. // *Biochemistry* – 2010. – T. 49 – № 50 – C.10666–10673.
166. Balandin T.G. Antitumor activity and toxicity of anti-HER2 immunoRNase scFv 4D5-dibarnase in mice bearing human breast cancer xenografts / Balandin T.G., Edelweiss E., Andronova N. V., Treshalina E.M., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. // *Investigational new drugs* – 2011. – T. 29 – № 1 – C.22–32.
167. Ulyanova V. Barnase and binase: twins with distinct fates / Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O. // *The FEBS Journal* – 2011. – T. 278 – № 19 – C.3633–3643.
168. Abakumova T.O. Barnase-Loaded Vaterite Nanoparticles Functionalized by EpCAM Targeting Vectors for the Treatment of Lung Diseases / Abakumova T.O., Gusliakova O.I., Cvjetinovic J., Efimova O.I., Konovalova E. V, Schulga A.A., Zatsepin T.S., Gorin D.A., Yashchenok A.M., Deyev S.M. // *ACS Applied Nano Materials* – 2022. – T. 5 – № 8 – C.10744–10754.
169. Sato H. Mechanochemistry and Permeability of Polyelectrolyte Complex Membranes Composed of Poly (vinyl alcohol) Derivatives / Sato H., Maeda M., Nakajima A. // *Journal of Applied Polymer Science* – 1979. – T. 23 – № 6 – C.1759–1767.
170. Antonov Y.A. Structural studies on the interaction of lysozyme with dextran sulfate / Antonov Y.A., Zhuravleva I.L., Cardinaels R., Moldenaers P. // *Food Hydrocolloids* – 2015. – T. 44 – C.71–80.
171. Demina P.A. Highly-magnetic mineral protein – tannin vehicles with anti-breast cancer activity / Demina P.A., Abalymov A.A., Voronin D. V, Sadovnikov A. V, Lomova M. V // *Materials Chemistry Frontiers* – 2021. – T. 5 – № 5 – C.2007–2018.

172. Novoselova M. V Multifunctional nanostructured drug delivery carriers for cancer therapy: Multimodal imaging and ultrasound-induced drug release / Novoselova M. V, German S. V, Abakumova T.O., Perevoschikov S. V, Sergeeva O. V, Nesterchuk M. V, Efimova O.I., Petrov K.S., Chernyshev V.S., Zatsepin T.S., Gorin D.A. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* – 2021. – T. 200 – C.111576.
173. Smith S.A. The Endosomal Escape of Nanoparticles: Toward More Efficient Cellular Delivery / Smith S.A., Selby L.I., Johnston A.P.R., Such G.K. // *Bioconjugate chemistry* – 2018. – T. 30 – № 2 – C.263–272.
174. Tashima T. Effective cancer therapy based on selective drug delivery into cells across their membrane using receptor-mediated endocytosis / Tashima T. // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* – 2018. – T. 28 – № 18 – C.3015–3024.
175. Zhang S. Controllable Drug Release and Simultaneously Carrier Decomposition of SiO₂ - Drug Composite Nanoparticles / Zhang S., Chu Z., Yin C., Zhang C., Lin G., Li Q. // *Journal of the American Chemical Society* – 2013. – T. 135 – № 15 – C.5709–5716.
176. Makarov A.A. Cytotoxic ribonucleases: molecular weapons and their targets / Makarov A.A., Ilinskaya O.N. // *FEBS letters* – 2003. – T. 540 – № 1–3 – C.15–20.
177. Shipunova V.O. Delivery of Barnase to Cells in Liposomes Functionalized by Her2-Specific DARPIn Module / Shipunova V.O., Shramova E.I., Schulga A.A., Shilova M. V, Deyev S.M., Proshkina G.M. // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* – 2020. – T. 46 – № 6 – C.1156–1161.
178. Park E. Inflammatory responses may be induced by a single intratracheal instillation of iron nanoparticles in mice / Park E., Kim H., Kim Y., Yi J., Choi K., Park K. // *Toxicology* – 2010. – T. 275 – № 1–3 – C.65–71.
179. Dollé L. EpCAM and the biology of hepatic stem/progenitor cells / Dollé L., Theise N.D., Schmelzer E., Boulter L., Gires O., Van L.A. // *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* – 2015.
180. Kasper M. Distribution of E-cadherin and Ep-CAM in the human lung during development and after injury / Kasper M., Behrens J., Schuh D., Mtiler M. // *Histochemistry and cell biology* – 1995. – T. 103 – № 4 – C.281–286.
181. Novoselova M. V Submicron-Sized Nanocomposite Magnetic-Sensitive Carriers: Controllable Organ Distribution and Biological Effects / Novoselova M. V, German S. V, Sineeva O.A., Kulikov O.A., Minaeva O. V, Brodovskaya E.P., Ageev V.P., Zharkov M.N., Pyataev N.A., Sukhorukov G.B., Gorin D.A. // *Polymers* – 2019. – T. 11 – № 1082 – C.1082.
182. Decuzzi P. Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles / Decuzzi P., Godin B., Tanaka T., Lee S., Chiappini C., Liu X., Ferrari M. // *Journal of Controlled Release* – 2010. – T. 141 – № 3 – C.320–327.
183. Gusliakova O.I. Renal Artery Catheterization for Microcapsules' Targeted Delivery to the Mouse Kidney / Gusliakova O.I., Prikhozhenko E.S., Plastun V.O., Mayorova O.A., Shushunova N.A., Abdurashitov A.S., Kulikov O.A., Abakumov M.A., Gorin D.A., Sukhorukov G.B., Sineeva O.A. // *Pharmaceutics* – 2022. – T. 14 – № 5 – C.1056.
184. Mayorova O.A. Endovascular addressing improves the effectiveness of magnetic targeting of drug carrier. Comparison with the conventional administration method / Mayorova O.A., Sineeva O.A., Lomova M. V, Gusliakova O.I., Tarakanchikova Y. V, Tyutyayev E. V, Pinyaev S.I., Kulikov O.A., German S. V, Pyataev N.A., Gorin D.A., Sukhorukov G.B. // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* – 2020. – T. 28 – C.102184.

185. Novoselova M. Effect of Surface Modification of Multifunctional Nanocomposite Drug Delivery Carriers with DARPin on Their Biodistribution In Vitro and In Vivo / Novoselova M., Chernyshev V.S., Schulga A., Konovalova E. V, Chuprov-netochin R.N., Abakumova T.O., German S., Shipunova V.O., Mokrousov M.D., Prikhozhdenko E., Bratashov D.N., Nozdriukhin D. V, Bogorodskiy A., Grishin O., Kosolobov S.S., Khlebtsov B.N., Inozemtseva O., Zatsepin T.S., Deyev S.M., Gorin D.A. // *ACS Applied Bio Materials* – 2022.
186. Liang Z. Recent advances in controlled pulmonary drug delivery / Liang Z., Ni R., Zhou J., Mao S. // *Drug Discovery Today* – 2015. – T. 20 – № 3 – C.380–389.
187. Novoselova M. V Focused ultrasound-mediated fluorescence of composite microcapsules loaded with magnetite nanoparticles: In vitro and in vivo study / Novoselova M. V, Voronin D. V, Abakumova T.O., Demina P.A., Petrov A. V, Petrov V. V, Zatsepin T.S., Sukhorukov G.B. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* – 2019. – T. 181 – № June – C.680–687.
188. Saikiran M. Photophysical characterization and BSA interaction of the direct ring carboxy functionalized unsymmetrical NIR cyanine dyes / Saikiran M., Sato D., Pandey S.S., Ohta T., Hayase S., Kato T. // *Dyes and Pigments* – 2017. – T. 140 – C.6–13.
189. Kwiatkowski S. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations / Kwiatkowski S., Knap B., Przystupski D., Saczko J., Kędzierska E., Knap-Czop K., Kotlińska J., Michel O., Kotowski K., Kulbacka J. // *Biomedicine & Pharmacotherapy* – 2018. – T. 106 – C.1098–1107.
190. Lermontovaa S.A. Porphyrazine Structures with Electron-Withdrawing Substituents as the Base for Materials for Photonics and Biomedicine / Lermontovaa S.A., Grigor'ev I.S., Ladilinab E.Y., Balalaeava I. V., Shilyaginaa N.Y., Klapshinaa L.G. // *Russian Journal of Coordination Chemistry* – 2018. – T. 44 – C.301–315.
191. Izquierdo M.A. Dual use of porphyrazines as sensitizers and viscosity markers in photodynamic therapy / Izquierdo M.A., Vyšniauskas A., Lermontova S.A., Grigoryev I.S., Shilyagina N.Y., Balalaeva I. V., Klapshina L.G., Kuimova M.K. // *J. Mater. Chem. B* – 2015. – T. 3 – № 6 – C.1089–1096.
192. Kuimova M.K. Molecular rotor measures viscosity of live cells via fluorescence lifetime imaging / Kuimova M.K., Yahioğlu G., Levitt J.A., Suhling K. // *Journal of the American Chemical Society* – 2008. – T. 130 – № 21 – C.6672–6673.
193. Kralj D. Vaterite growth and dissolution in aqueous solution II. Kinetics of dissolution / Kralj D., Ljerka B., Arne E.N. // *Journal of crystal growth* – 1994. – T. 143 – № 3–4 – C.269–276.
194. Estrella V. Acidity Generated by the Tumor Microenvironment Drives Local Invasion / Estrella V., Chen T., Lloyd M., Wojtkowiak J., Cornell H.H., Ibrahim-hashim A., Bailey K., Balagurunathan Y., Rothberg J.M., Sloane B.F., Johnson J., Gatenby R.A., Gillies R.J. // *Cancer research* – 2013. – T. 73 – № 5 – C.1524–1535.
195. Chan J.M. PLGA – lecithin – PEG core – shell nanoparticles for controlled drug delivery / Chan J.M., Zhang L., Yuet K.P., Liao G., Rhee J., Langer R., Farokhzad O.C. // *Biomaterials* – 2009. – T. 30 – № 8 – C.1627–1634.
196. Kallinowski F. Glucose Uptake, Lactate Release, Ketone Body Turnover, Metabolic Micromilieu, and pH Distributions in Human Breast Cancer Xenografts in Nude Rats / Kallinowski F., Vaupel P., Runkel S., Berg G., Fortmeyer H.P., Baessler K.H., Wagner K., Mueller-Klieser W., Walenta S. // *Cancer research* – 1988. – T. 48 – № 24_Part_1 – C.7264–7272.
197. Svenskaya Y. Anticancer drug delivery system based on calcium carbonate particles loaded with a photosensitizer / Svenskaya Y., Parakhonskiy B., Haase A., Atkin V., Lukyanets E., Gorin

- D., Antolini R. // *Biophysical chemistry* – 2013. – T. 182 – C.11–15.
198. Jain R.K. Delivering nanomedicine to solid tumors. / Jain R.K., Stylianopoulos T. // *Nature reviews. Clinical oncology* – 2010. – T. 7 – № 11 – C.653–64.
199. Kamoun W.S. Simultaneous measurement of RBC velocity, flux, hematocrit and shear rate in vascular networks / Kamoun W.S., Chae S., Lacorre D.A., Tyrrell J.A., Mitre M., Gillissen M.A., Fukumura D., Jain R.K., Munn L.L. // *Nature methods* – 2010. – T. 7 – № 8 – C.655–660.
200. Wilhelm S. Analysis of nanoparticle delivery to tumours / Wilhelm S., Tavares A.J., Dai Q., Ohta S., Audet J., Dvorak H.F., Chan W.C.W. // *Nature reviews materials*, 1(5), 1-12. – 2016. – T. 1 – № 5 – C.1–12.
201. Ven A.L. Van De Rapid tumoritropic accumulation of systemically injected plateloid particles and their biodistribution / Ven A.L. Van De, Kim P., Haley O.H., Fakhoury J.R., Adriani G., Schmulen J., Moloney P., Hussain F., Ferrari M., Liu X., Yun S., Decuzzi P. // *Journal of Controlled Release* – 2012. – T. 158 – № 1 – C.148–155.
202. Danhier F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? / Danhier F. // *Journal of Controlled Release* – 2016. – T. 244 – C.108–121.
203. Rzhnevskiy A.S. Modelling drug flux through microporated skin / Rzhnevskiy A.S., Guy R.H., Anissimov Y.G. // *Journal of Controlled Release* – 2016. – T. 241 – C.194–199.
204. Ahmed L. Study the Using of Nanoparticles as Drug Delivery System Based on Mathematical Models for Controlled Release / Ahmed L., Atif R., Eldeen T.S., Yahya I., Omara A., Eltayeb M. // *IJLTEMAS* – 2019. – T. 8 – № 5 – C.52–56.
205. Crank J. *The mathematics of diffusion* / J. Crank – Oxford university press, 1979.
206. Guo R. Three-dimensional poly (lactic- co -glycolic acid)/ silica colloidal crystal microparticles for sustained drug release and visualized monitoring / Guo R., Sun X., Zhang Y., Wang D., Yang C., Xu Z. // *Journal of Colloid And Interface Science* – 2018. – T. 530 – C.465–472.
207. Gupta A.K. Naftifine: A Review / Gupta A.K., Ryder J.E., Cooper E.A. // *Journal of Cutaneous Medicine and Surgery* – 2008. – T. 12 – № 2 – C.51–58.
208. Smith, E. B., Wiss, K., Hanifin, J. M., Jordon, R. E., Rapini, R. P., Lasser, A. E., ... & Roenigk Jr H. Comparison of once-and twice-daily naftifine cream regimens with twice daily clotrimazole in the treatment of tinea pedis / Smith, E. B., Wiss, K., Hanifin, J. M., Jordon, R. E., Rapini, R. P., Lasser, A. E., ... & Roenigk Jr H. // *Journal of the American Academy of Dermatology* – 1990. – T. 22 – № 6 part 1 – C.1116–1117.
209. Millikan L.E. Naftifine cream 1 % versus econazole cream 1 % in the treatment of tinea cruris and tinea corporis / Millikan L.E., Galen W.K., Gewirtzman G.B., Horwitz S.N., Landow R.K., Nesbitt L.T., Roth H.L., Sefton J., Ph D., Day R.M., Ph D. // *Journal of the American Academy of Dermatology* – 1988. – T. 18 – № 1 – C.52–56.
210. Jordon R.E. Once-Daily Naftifine Cream 1 % in the Treatment of Tinea Cruris and Tinea Corporis / Jordon R.E., Rapini R.P., Rex I.R.A.H., Katz H.I., Hickman J.G., Bard J.W., Medansky R.S., Lew-kaya D.A., Pharm D., Sefton J., Degryse R.E., Killely A.N.D.F.P. // *International journal of dermatology* – 1990. – T. 29 – № 6 – C.441–442.
211. Meyerson, M. S., Scher, R. K., Hochman, L. G., Cohen, J. L., Pappert, A. S., & Holwell J.E. Open-label study of the safety and efficacy of naftifine hydrochloride 1 percent gel in patients with distal subungual onychomycosis of the fingers / Meyerson, M. S., Scher, R. K., Hochman, L. G.,

- Cohen, J. L., Pappert, A. S., & Holwell J.E. // *Cutis* – 1993. – T. 51 – № 3 – C.205–207.
212. Gold, M. H., Bridges, T., Avakian, E., Plaum, S., Pappert, E. J., Fleischer, J. A., & Hardas B. An open-label study of naftifine hydrochloride 1% gel in the treatment of tinea versicolor / Gold, M. H., Bridges, T., Avakian, E., Plaum, S., Pappert, E. J., Fleischer, J. A., & Hardas B. // *Skinmed* – 2011. – T. 9 – № 5 – C.283–286.
213. Zaias, N., Astorga, E., Cordero, C. N., Day, R. M., DeGryse, R., Rojas, R. F., & Sefton J. Naftifine cream in the treatment of cutaneous candidiasis / Zaias, N., Astorga, E., Cordero, C. N., Day, R. M., DeGryse, R., Rojas, R. F., & Sefton J. // *Cutis* – 1988. – T. 42 – № 3 – C.238–240.
214. Mühlbacher J.M. Naftifine: A Topical Allylamine Antifungal Agent / Mühlbacher J.M. // *Clinics in dermatology* – 1991. – T. 9 – № 4 – C.479–485.
215. Parks L.W. Metabolism of sterols in yeast / Parks L.W., Adams B.G. // *CRC critical reviews in microbiology* – 1978. – T. 6 – № 4 – C.301–341.
216. Ryder N.S. Effect of the Antimycotic Drug Naftifine on Growth of and Sterol Biosynthesis in *Candida albicans* / Ryder N.S., Seidl G., Troket P.F. // *Antimicrobial agents and chemotherapy* – 1984. – T. 25 – № 4 – C.483–487.
217. Barrett-Bee K. Biochemical aspects of ergosterol biosynthesis inhibition Boston, MA.: Springer, 1992. – 410–436c.
218. Ryder N.S. Squalene epoxidase inhibitors: structural determinants for activity and selectivity of allylamines and related compounds. / под ред. W.D. Nes, E.J. Parish, J.M. Trzaskos. Washington, DC: American Chemical Society, 1992. – 192–204c.
219. Georgopoulos A. In vitro activity of naftifine, a new antifungal agent / Georgopoulos A., Petranyi G., Mieth H., Drews J. // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* – 1981. – T. 19 – № 3 – C.386–389.
220. Monk J.P. Naftifine / Monk J.P., Brogden R.N. // *Drugs* – 1991. – T. 42 – № 4 – C.659–672.
221. Stoughton, R. B., Sefton, J., & Zeleznick L. In vitro and in vivo cutaneous penetration and antifungal activity of naftifine / Stoughton, R. B., Sefton, J., & Zeleznick L. // *Cutis*, 44(4), 333–335. – 1989. – T. 44 – № 4 – C.333–335.
222. Senff, H., Tholen, S., Stieler, W., Reinel, D., & Hausen B.M. Allergic contact dermatitis to naftifine / Senff, H., Tholen, S., Stieler, W., Reinel, D., & Hausen B.M. // *Dermatology* – 1989. – T. 178 – № 2 – C.107–108.
223. Goday J.J. Allergic contact dermatitis from naftifine in a child without cross-reaction to terbinafine / Goday J.J., González-Güemes M., Yanguas I., Ilardia R., Soloeta R. // *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* – 1998. – T. 11 – № 1 – C.72–73.
224. Jones T.C. Treatment of dermatomycoses with topically applied allylamines : naftifine and terbinafine / Jones T.C. // *Journal of Dermatological Treatment* – 1990. – T. 1 – № sup2 – C.29–32.
225. Parish L.C. A randomized, double-blind, vehicle-controlled efficacy and safety study of naftifine 2% cream in the treatment of tinea pedis / Parish L.C., Parish J.L., Routh H.B., Fleischer J.A., Avakian E. V., Plaum S., Hardas B. // *Journal of drugs in dermatology: JDD* – 2011. – T. 10 – № 11 – C.1282–1288.
226. L.C. P. A double-blind, randomized, vehicle-controlled study evaluating the efficacy and safety of naftifine 2% cream in tinea cruris / L.C. P., J.L. P., H.B. R., E. A., B. O., E.J. P., S. P., A.B. F., B. H. // *Journal of Drugs in Dermatology: JDD* – 2011. – T. 10 – № 10 – C.1142–1147.
227. Stein Gold L.F. Efficacy and safety of naftifine HCl Gel 2% in the treatment of interdigital and

- moccasin type tinea pedis: pooled results from two multicenter, randomized, double-blind, vehicle-controlled trials / Stein Gold L.F., Parish L.C., Vlahovic T., Plaum S., Kircik L., Fleischer A.B.J., Verma A., Olayinka B., B. H. // *Journal of Drugs in Dermatology: JDD* – 2013. – T. 12 – № 8 – C.911–918.
228. Hazot Y. Hydroalcoholic foam formulations of naftifine / Hazot Y., Feiman J.N.B., Tamarkin D., Schuz D., Caley S.M., Hardas Y.B. – 2017.
229. Vankeirsbilck T. Applications of Raman spectroscopy in pharmaceutical analysis / Vankeirsbilck T., Vercauteren A., Baeyens W., Weken G. Van der, Verpoort F., Vergote G., Remon J.P. // *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* – 2002. – T. 21 – № 12 – C.869–877.
230. Socrates G. Infrared and Raman characteristic group frequencies: tables and charts / G. Socrates – John Wiley & Sons, 2004. Вып. 3rd.
231. Behrens G. Raman Spectra of Vateritic Calcium Carbonate / Behrens G., Kuhn L.T., Ubig R., Heuer A.H. // *Spectroscopy letters* – 1995. – T. 28 – № 6 – C.983–995.
232. Wehrmeister U. Raman spectroscopy of synthetic, geological and biological vaterite: A Raman spectroscopic study / Wehrmeister U., Soldati A.L., Jacob D.E., Häger T., Hofmeister W. // *Journal of Raman Spectroscopy* – 2010. – T. 41 – № 2 – C.193–201.
233. Ogino T. The rate and mechanism of polymorphic transformation of calcium carbonate in water / Ogino T., Suzuki T., Sawada K. // *Journal of Crystal Growth* – 1990. – T. 100 – № 1–2 – C.159–167.
234. Wang X. Role of ovalbumin in the stabilization of metastable vaterite in calcium carbonate biomineralization / Wang X., Kong R., Pan X., Xu H., Xia D., Shan H., Lu J.R. // *The Journal of Physical Chemistry B* – 2009. – T. 113 – № 26 – C.8975–8982.
235. Nagaraja A.T. Poly (vinylsulfonic acid) assisted synthesis of aqueous solution stable vaterite calcium carbonate nanoparticles / Nagaraja A.T., Pradhan S., McShane M.J. // *Journal of colloid and interface science* – 2014. – T. 418 – C.366–372.
236. Gao H. Ligand modified nanoparticles increases cell uptake, alters endocytosis and elevates glioma distribution and internalization / Gao H., Yang Z., Zhang S., Cao S., Shen S., Pang Z., Jiang X. // *Scientific reports* – 2013. – T. 3 – C.2534.
237. Villanueva A. The influence of surface functionalization on the enhanced internalization of magnetic nanoparticles in cancer cells / Villanueva A., Canete M., Roca A.G., Calero M., Veintemillas-Verdaguer S., Serna C.J., Puerto Morales M. del, Rodolfo M. // *Nanotechnology* – 2009. – T. 20 – № 11 – C.115103.
238. Gratton S.E.A. The effect of particle design on cellular internalization pathways / Gratton S.E.A., Ropp P.A., Pohlhaus P.D., Luft J.C., Madden V.J., Napier M.E., Desimone J.M. // *Proceedings of the National Academy of Sciences* – 2008. – T. 105 – № 33 – C.517–522.
239. Yang X. Advanced Nanocarriers Based on Heparin and Its Derivatives for Cancer Management / Yang X., Du H., Liu J., Zhai G. // *Biomacromolecules* – 2015. – T. 16 – № 2 – C.423–436.
240. Javid A. Novel biodegradable heparin-coated nanocomposite system of anticancer drug encapsulation for targeted drug delivery / Javid A., Ahmadian S., Akbar Saboury A., Mehdi Kalantar S., Rezaei-Zarchi S. // *RSC Advances* – 2014. – T. 4 – № 26 – C.13719–13728.
241. Ting S.R.S. Cellular uptake and activity of heparin functionalised cerium oxide nanoparticles in monocytes / Ting S.R.S., Whitelock J.M., Tomic R., Gunawan C., Yang W., Amal R., Lord M.S. // *Biomaterials* – 2013. – T. 34 – № 17 – C.4377–4386.

242. Capila I. Heparin - Protein Interactions / Capila I., Linhardt R.J. // *Angewandte Chemie International Edition* – 2002. – T. 41 – № 3 – C.390–412.
243. Chung Y.-I. The effect of surface functionalization of PLGA nanoparticles by heparin- or chitosan-conjugated Pluronic on tumor targeting / Chung Y.-I., Chul Kim J., Ha Kim Y., Tae G., Lee S., Kim K., Chan Kwon I. // *Journal of Controlled Release* – 2010. – T. 143 – № 3 – C.374–382.
244. Ryder N. *Allylamine Antifungal Drugs*, 1992. – 158–188c.
245. Mieth H. The early development of allylamine antimycotics / Mieth H. // *Journal of Dermatological Treatment*, 1(sup2), 5-6. – 1990. – T. 1(sup2) – C.5–6.
246. Ryder N.S. Selective action of allylamines and its therapeutic implications / Ryder N.S. // *Journal of dermatological treatment* – 1992. – T. 3 (sup1) – C.3–7.
247. Ryder N.S. Squalene epoxidase as the target of antifungal allylamines / Ryder N.S. // *Pesticide Science* – 1987. – T. 21 – № 4 – C.281–288.
248. Bloch K.E. Sterol, structure and membrane function / Bloch K.E. // *Critical Reviews in Biochemistry* – 1983. – T. 14 – № 1 – C.47–92.
249. Nes R. The functional importance of structural features of ergosterol in yeast / Nes R., Sekula C., Nes W.D., Adler J.H. // *Journal of Biological Chemistry* – 1978. – T. 253 – № 17 – C.6218–6225.
250. Georgopapadakou N.H. Effect of antifungal agents on lipid biosynthesis and membrane integrity in *Candida albicans* / Georgopapadakou N.H., Dix B.A., Smith S.A., Freudenberger J., Funke P.T. // *Antimicrobial agents and chemotherapy* – 1987. – T. 31 – № 1 – C.46–51.
251. Parks L.W. Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast / Parks L.W., Casey W.M. // *Annual review of microbiology* – 1995. – T. 49 – № 1 – C.95–116.
252. Shepherd M.G. *Candida albicans*: biology, genetics, and pathogenicity / Shepherd M.G., Poulter R.T.M., Sullivan P.A. // *Annual review of microbiology* – 1985. – T. 39 – № 1 – C.579–614.
253. Carrillo-Munoz A.J. Comparative study of the in vitro antifungal activity of bifonazole, naftifine and sertaconazole against yeasts / Carrillo-Munoz A.J., Tur-Tur C., Bornay-Llinares F.J., Arévalo P. // *Journal of chemotherapy*, 11(3), 187-190. – 1999. – T. 11 – № 3 – C.187–190.
254. Mallié M. Antifungal activity of naftifine against various yeasts and dermatophytes: determination of minimal inhibitory concentrations and revelation of cell wall alterations by scanning electron microscopy / Mallié M., Butty P., Montes B., Jouvart S., Bastide J.M. // *Canadian journal of microbiology* – 1991. – T. 37 – № 12 – C.964–970.
255. Havlickova B. Epidemiological trends in skin mycoses worldwide / Havlickova B., Czaika V.A., Friedrich M. // *Mycoses* – 2008. – T. 52 – C.2–15.
256. Akhtar N. Topical Delivery of Drugs for the Effective Treatment of Fungal Infections of Skin / Akhtar N., Verma A., Pathak K. // *Current Pharmaceutical Design* – 2015. – T. 21 – № 20 – C.2892–2913.
257. Odds F.C. Antifungal agents: mechanisms of action. / Odds F.C., Brown A.J.P., Gow N.A.R. // *Trends in microbiology* – 2003. – T. 11 – № 6 – C.272–279.
258. Erdal, M. S., Özhan, G., Mat, M. C., Özsoy, Y., & Güngör S. Colloidal nanocarriers for the enhanced cutaneous delivery of naftifine : characterization studies and in vitro and in vivo evaluations / Erdal, M. S., Özhan, G., Mat, M. C., Özsoy, Y., & Güngör S. // *International journal*

of nanomedicine – 2016. – T. 11 – C.1027–1037.

259. Barakat, H. S., Darwish, I. A., El-Khordagui, L. K., & Khalafallah N.M. Development of naftifine hydrochloride alcohol-free niosome gel / Barakat, H. S., Darwish, I. A., El-Khordagui, L. K., & Khalafallah N.M. // Drug development and industrial pharmacy – 2009. – T. 35 – № 5 – C.631–637.

260. Meidan V.M. Methods for quantifying intrafollicular drug delivery: a critical appraisal / Meidan V.M. // Expert Opinion on Drug Delivery – 2010. – T. 7 – № 9 – C.1095–1108.

261. Patzelt A. The increasing importance of the hair follicle route in dermal and transdermal drug delivery Berlin, Heidelberg.: Springer, 2015. – 43–53c.

262. Plaum S. Detection and relevance of naftifine hydrochloride in the stratum corneum up to four weeks following the last application of naftifine cream and gel, 2% / Plaum S., Verma A., Fleischer Jr. A.B., Olayinka B., Hardas B. // Journal of Drugs in Dermatology – 2013. – T. 12 – № 9 – C.1004–1008.

263. Patzelt A. Drug delivery to hair follicles / Patzelt A., Lademann J. // Expert Opinion on Drug Delivery – 2013. – T. 10 – № 6 – C.787–797.

264. Wosicka H. Targeting to the hair follicles: Current status and potential / Wosicka H., Cal K. // Journal of Dermatological Science – 2010. – T. 57 – № 2 – C.83–89.