

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения Российской академии наук
(ИХБФМ СО РАН)**

На правах рукописи

**КОНСТРУИРОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМЫХ НАНОКОМПОЗИТНЫХ СИСТЕМ
ИНКАПСУЛЯЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОСНОВЕ
НЕОРГАНИЧЕСКИХ МАТРИКСОВ**

ПОПОВА ВИКТОРИЯ КОНСТАНТИНОВНА

1.4.9. Биоорганическая химия

**Диссертация
на соискание степени
кандидата наук**

Научный руководитель:
кандидат химических наук
Дмитриенко Елена Владимировна

Новосибирск – 2024

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	6
2. НАНОЧАСТИЦЫ КАРБОНАТА КАЛЬЦИЯ ДЛЯ ТЕРАПИИ (обзор литературы).....	10
2.1 Синтез наночастиц карбоната кальция	13
2.1.1 Синтез наночастиц карбоната методом осаждения.....	15
2.1.2 Синтез наночастиц карбоната кальция методом газовой диффузии.....	22
2.1.3 Синтез наночастиц карбоната кальция методом эмульсии.....	27
2.1.4 Синтез наночастиц карбоната кальция с использованием природных источников	32
2.2 Применение наночастиц карбоната кальция в биомедицине	37
2.2.1 Терапия онкологии малыми лекарственными молекулами	37
2.2.3 Системы доставки нуклеиновых кислот / генная терапия	50
2.2.4 Тераностика.....	57
2.2.4.1 Терапия с использованием УЗ диагностики	57
2.2.4.2 Фотодинамическая терапия.....	59
2.2.4.3 Терапия совмещённая с МРТ.....	61
2.2.5 Тканевая инженерия.....	62
2.3 Заключение.....	67
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	68
3.1 Реагенты	68
3.2 Синтетические олигонуклеотиды	69
3.3 Оборудование.....	70
3.4 Методики экспериментов	71
3.4.1 Синтез наночастиц.....	71
3.4.1.1 Синтез наночастиц карбоната кальция (CaHЧ).....	71
3.4.1.2 Синтез наночастиц фосфата кальция (CaP).....	72
3.4.1.3 Синтез гибридных наночастиц карбоната кальция и смешанного оксида железа (Fe@CaHЧ)	72
3.4.1.4 Синтез наночастиц диоксида кремния (SiHЧ).....	73
3.4.2 Устойчивость наночастиц в водных растворах и условиях близких к физиологическим ...	74
3.4.2.1 Исследование изменения гидродинамического размера наноматериалов при хранении.	74
3.4.2.2 Исследование массы сухого остатка наноматериалов при хранении (установление диапазона pH-зависимости CaHЧ).....	74
3.4.3 Ковалентная модификация наноматериалов.....	74

3.4.3.1 Ковалентное присоединение полимера (белкового / синтетического) или олигонуклеотида с NH ₂ -группой на поверхность CaНЧ и SiНЧ	74
3.4.3.2 УФ-иммобилизация олигонуклеотидов на поверхность наночастиц, модифицированных полимером.....	75
3.4.4 Селективное присоединение биотинилированных олигонуклеотидов на поверхность наночастиц с ковалентно присоединенным стрептавидином.....	76
3.4.4.1 Приготовление цельноклеточного экстракта	76
3.4.4.2 Взаимодействие биотинилированных НК с белками клеточного экстракта.....	77
3.4.4.3 Выделения биотинилированных НК после взаимодействия с белками из клеточного экстракта.....	77
3.4.5 Нековалентная модификация наноматериалов	77
3.4.5.1 Создание комплекса наноматериалов с доксорубицином	77
3.4.5.2 Создание комплекса наноматериалов с олигонуклеотидом.....	78
3.4.5.2.1 Создание комплекса наноматериалов с олигонуклеотидом в процессе синтеза наночастиц (синтетический вариант)	78
3.4.5.2.1.1 Синтез наночастиц карбоната кальция в присутствии ОН (CaНЧ-ОН _A).....	78
3.4.5.2.1.2 Синтез гибридных наночастиц карбоната кальция и смешанного оксида железа в присутствии ОН (Fe@CaНЧ-ОН _A).....	79
3.4.5.2.1.3 Синтез наночастиц диоксида кремния в присутствии ОН (SiНЧ-ОН _A).....	79
3.4.5.2.1 Создание комплекса наноматериалов с олигонуклеотидом после синтеза наночастиц (постсинтетический вариант).....	79
3.4.6 Разрушение комплекса наноматериалов с доксорубицином.....	80
3.4.7 Исследование устойчивости индивидуальных НК и в составе наночастиц после обработки нуклеазными ферментами	80
3.5 Методы измерений и анализа	81
3.5.1 Исследование цитотоксичности наноматериалов и их композитов с БАС	81
3.5.1.1 Метод МТТ-теста.....	81
3.5.1.2 Исследование эффективности клеточного проникновения нанокомпозитов	81
3.5.2 Регистрация размера и поверхностных свойств наночастиц	82
3.5.2.1 Метод динамического светорассеяния	82
3.5.2.2 Метод просвечивающей электронной микроскопии	82
3.5.3 Регистрация ёмкостных характеристик наноматериалов по оптической плотности	82
3.5.4 Введение радиоактивного фосфата на 5'-конец НК	83
3.5.5 Осаждение олигонуклеотидов 2 % LiClO ₄ в ацетоне.....	83

3.5.6 Анализ методом гель-электрофореза в полиакриламидном геле	83
3.5.6.1 Электрофорез нанокомпозитов и нуклеиновых кислот в полиакриламидном геле	83
3.5.6.2 Электрофорез нанокомпозитов и белковых молекул в полиакриламидном геле	84
3.5.7 ИК-анализ	84
3.5.8 Статистические методы	84
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	85
4.1 Синтез неорганических наночастиц.....	86
4.1.1 Синтез наночастиц карбоната кальция.....	87
4.1.1.1 Синтез гибридных наночастиц карбоната кальция и смешанного оксида железа (Fe@CaНЧ)	92
4.1.2 Синтез наночастиц диоксида кремния	96
4.2 Исследование стабильности полученных наноматериалов в водных растворах и физиологических жидкостях.....	98
4.3 Модификация поверхности неорганических наночастиц и	101
доказательство их биомедицинской применимости.....	101
4.3.1 Ковалентная модификация наночастиц	102
4.3.1.1 Ковалентное присоединение полимера (белкового / синтетического) на поверхность CaНЧ и SiНЧ.....	102
4.3.1.2 Присоединение олигонуклеотидов на поверхность наночастиц, ковалентно модифицированных полимером.....	107
4.3.1.2.1 УФ-иммобилизация олигонуклеотидов на поверхность наночастиц (НЧ-нейлон).....	108
4.3.1.2.2 Селективное присоединение биотинилированных олигонуклеотидов на поверхность наночастиц (НЧ-St).....	109
4.3.2 Нековалентная модификация наночастиц.....	115
4.3.2.1 Дизайн систем доставки малых лекарственных молекул	116
4.3.2.1.1 Системы доставки малых лекарственных молекул на основе наноматериалов карбоната кальция	117
4.3.2.1.1.1 Создание композита доксорубицина с наночастицами на основе карбоната кальция и исследование условий разрушения этого комплекса	119
4.3.2.1.1.2 Исследование терапевтической эффективности комплекса лекарства с наночастицами на основе карбоната кальция на клеточных линиях	127
4.3.2.1.2 Системы доставки малых лекарственных молекул на основе наноматериалов диоксида кремния	132

4.3.2.1.2.1 Создание композита доксорубина с наночастицами на диоксиде кремния и исследование условий разрушения этого комплекса	132
4.3.2.1.2.2 Исследование терапевтической эффективности комплекса лекарства с наночастицами на основе диоксида кремния на клеточных линиях	136
4.3.2.2 Синтез нековалентного комплекса олигонуклеотидов с наночастицами.....	139
4.3.2.2.1 Создание композита нуклеиновой кислоты с наночастицами карбоната кальция и диоксида кремния	141
4.4 Исследование нуклеазной устойчивости олигонуклеотидов и пути их стабилизации	149
4.5 Заключение.....	156
5. ВЫВОДЫ	157
6. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	159
7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	160

1. ВВЕДЕНИЕ

Идея создания эффективных систем адресной доставки лекарственных средств привлекает особое внимание не только учёных, но и фармацевтических компаний. Главной функцией таких транспортёров является увеличение терапевтического эффекта биологически активных соединений (БАС) за счёт нивелирования недостатков индивидуальных препаратов, как фармакокинетических (увеличение пролонгированности, физиологической стабильности и растворимости), так и фармакодинамических (увеличение направленности воздействия). Разработка качественных носителей для доставки лекарственных препаратов позволит решить многие проблемы здравоохранения, такие как, повышение эффективности лечения онкологических (доставка малых лекарственных молекул), бактериальных и грибковых заболеваний (доставка антибиотиков), а также использование современных методов генной терапии (доставка НК) [1].

Использование биосовместимых наночастиц в качестве контейнеров для малых молекул, нуклеиновых кислот и других БАС является одним из перспективных вариантов доставки лекарственных препаратов. Наночастицы, по сравнению с микрометровыми аналогами, благодаря субмикронным размерам, обладают увеличенной удельной ёмкостью, улучшенным проникновением, а также дополнительной возможностью внутривенного введения в организм. Среди прочих, перспективными кандидатами являются неорганические наноматериалы карбоната кальция и диоксида кремния [2]. Интерес исследователей к этим материалам обусловлен возможностью полной биodeградации частиц на биосовместимые и биоразлагаемые компоненты, что помогает устранить проблемы отложенной токсичности и накопления частиц в печени, почках и других органах. Кроме того, пористая структура наноматериалов увеличивает их ёмкость по отношению к транспортируемым молекулам [3, 4]. Дополнительным преимуществом наноматериалов на основе карбоната кальция является рН-лабильная природа материала, предпочтительная для транспортировки БАС в области организма с пониженным показателем кислотности. Однако, минеральная природа карбоната кальция также является его слабостью: частицы склонны образовывать микрометровые кристаллы, которые не соответствуют требованиям биомедицинского применения из-за размеров, дисперсности и стабильности суспензий. Диоксид кремния обладает высокой стабильностью в различных растворителях, что обеспечивает возможность проведения реакций функционализации и придания системе новых функциональных свойств. Но высокая реакционная способность диоксида кремния приводит к формированию агрегированных частиц.

Несмотря на последние достижения в области разработки методологических подходов к синтезу наноразмерных изолированных частиц, остаются нерешёнными вопросы по сохранению их суспензионной и физиологической стабильности, а также по достижению устойчивого контролируемого связывания носителя с БАС. В случае разработки адресных систем контролируемой доставки биологически активных соединений, способных направленно доставлять транспортируемые молекулы в заданную область, возможно создание нового перспективного биодеградируемого инструмента для увеличения эффективности существующих терапевтических подходов [5]. Помимо применения таких конструкций для транспорта терапевтических молекул, разработанные наноматериалы могут быть использованы для выделения и детектирования искомым молекул в биологических жидкостях для нужд диагностики и тераностики.

Целью данной работы является синтез, функционализация и исследование потенциала биосовместимых неорганических наноматериалов для контролируемого стимул-чувствительного высвобождения низко- и высокомолекулярных молекул/БАС.

Задачи, которые необходимо решить для достижения цели:

1. разработать новые подходы к получению суспензии наноматериалов на основе карбоната кальция и диоксида кремния субмикронного размера (гидродинамический диаметр до 200 нм) и высокой степени монодисперсности (индекс полидисперсности до 0,3);
2. исследовать стабильность полученных наноматериалов в водных растворах и условиях, близких к физиологическим;
3. разработать варианты присоединения функциональных молекул к наночастицам за счёт формирования ковалентных и нековалентных связей;
4. исследовать варианты увеличения стабильности олигонуклеотидов к действию эндонуклеаз за счёт связывания с наноносителями и введения множественных фосфорилгуанидиновых модификаций;
5. исследовать биологический потенциал полученных ассоциатов наночастиц с доксорубицином и/или олигонуклеотидом на моделях *in vitro*.

Научная новизна представляемой работы заключается в подборе композиции реакционной смеси, позволяющей получать стабильную суспензию наноматериалов на основе карбоната кальция (размером до 200 нм) и наночастиц диоксида кремния с высокой долей монодисперсности (ИПД $0,09 \pm 0,01$). Впервые были получены гибридные наноматериалы карбоната кальция со смешанным оксидом железа с гидродинамическим размером 130 ± 9 нм. Предложены универсальные методы ковалентного присоединения макромолекул (синтетических и природных полимеров) на поверхность полученных наноматериалов. В исследовании продемонстрирована высокая ёмкость для всех наноматериалов по отношению к доксорубицину,

ранее не показанная в литературе. Показана возможность эффективного создания нековалентного комплекса олигонуклеотидов с полученными наноматериалами на основе карбоната кальция.

Практическая значимость исследования заключается в разработке простых, воспроизводимых и масштабируемых методик синтеза наноматериалов на основе карбоната кальция и наночастиц диоксида кремния. В работе предложен инструмент (наночастицы ковалентно модифицированные стрептавидином), производство которого может способствовать импортозамещению коммерческого аналога для выделения биотинилированных молекул из сложных смесей. В ходе выполнения работы изучены условия формирования и разрушения комплексов наночастиц с модельным лекарственным средством – доксорубицином. Данные, полученные в работе, могут ускорить дальнейший процесс создания систем доставки лекарств на основе неорганических наноматериалов. Кроме того, в работе предложены способы создания комплексов наночастиц с олигонуклеотидами, которые могут способствовать увеличению применения генной и таргетной терапии в клиническом секторе.

Методология и методы исследования

Основные результаты работы получены измерением динамического светорассеяния, излучения по Черенкову, интенсивности флуоресценции, методами просвечивающей электронной микроскопии, гель-электрофореза, оптической и ИК-Фурье-спектроскопии, а также цитометрии.

Положения, выносимые на защиту

1. Предложены новые подходы к синтезу суспензии монодисперсных частиц на основе карбоната кальция и диоксида кремния, в том числе обладающих магнитными свойствами, размером до 200 нм.

2. Все полученные наночастицы стабильны при хранении в дистиллированной воде до полугода и при инкубации в биологических жидкостях сохраняют исходный размер не менее недели. Наночастицы карбоната кальция деградируют при понижении pH раствора.

3. Ковалентная и нековалентная модификация полученных наночастиц позволяет получить носители с высокой ёмкостью по функциональным молекулам, на примере доксорубицина и олигонуклеотида, а также новыми свойствами, в случае присоединения нейлона-6 или стрептавидина.

4. Нековалентные ассоциаты наночастиц с доксорубицином характеризуются высокими ёмкостными показателями, а также pH-зависимым профилем высвобождения лекарственного препарата, эффективность которого зависит от pH раствора и типа частиц. В частности, для наночастиц карбоната кальция достигается 100 % высвобождение лекарства при pH 4 и ниже.

5. Включение олигонуклеотида в состав ассоциатов с НЧ совместно с введением в олигонуклеотид ограниченного паттерна фосфорилгуанидиновых модификаций увеличивает устойчивость олигонуклеотидов к воздействию эндонуклеаз.

6. Эффективность подавления клеточной активности для всех типов нанокompозитов с доксорубицином сопоставимая или выше по сравнению с индивидуальным препаратом.

Апробация и публикация результатов

По материалам работы опубликовано 5 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, а также получен патент РФ. Результаты, представленные в работе, достоверны и апробированы более чем на 10 научных конференциях всероссийского и международного уровня в виде устных и стендовых докладов, в том числе: X Всероссийский форум молодых исследователей «ХимБиоSeasons 2024», 77-й Международная школа-конференция молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление 2024», V Всероссийская конференция, приуроченная к 40-летию ИХБФМ СО РАН, Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов «OpenBio 2020-2023», Международная молодежная научная конференция «Современные тенденции развития функциональных материалов 2021, 2022», Саммит разработчиков лекарственных препаратов и т. д.

Личный вклад автора

Синтез и характеристика всех полученных наночастиц, нанокompозитов и их комплексов с биологически активными соединениями, а также полимерными молекулами (доксорубицин, олигонуклеотид, нейлон-6, стрептавидин), за исключением просвечивающей электронной микроскопии, цитометрии и ИК-спектроскопии. Синтез и выделение олигонуклеотидов проведены О.А. Гуляевой, Е.С. Дюдеевой и Т.Ю. Бушуевой (ЛБМХ, ИХБФМ СО РАН), материал любезно предоставлен для выполнения диссертационной работы. Пассаж и поддержание клеток проводился О.А. Гуляевой, Е.В. Григорьевой и Е.Н. Ковригиной.

Структура и объем диссертации

Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 190 страницах, содержит 63 рисунка и 24 таблицы. Библиография включает 390 литературный источник.

2. НАНОЧАСТИЦЫ КАРБОНАТА КАЛЬЦИЯ ДЛЯ ТЕРАПИИ (обзор литературы)

Развитие методологической и инструментальной базы нанотехнологии привело к значительному увеличению разнообразия природы, состава и форм наноматериалов. Прогресс области не мог не повлиять на биомедицину, ввиду привлекательности объектов наноразмерного масштаба для применения *in vivo* [6].

Формально, все наноматериалы – это объекты с видимыми границами, размеры которых, в одном и более измерений находятся в нанодиапазоне (1 – 100 нм). Далее их разделяют на наночастицы (НЧ) (размеры по трем измерениям находятся в нанодиапазоне), нановолокна (размеры по двум измерениям – в нанодиапазоне) и нанопластины (размеры по одному измерению – в нанодиапазоне) [7]. Однако, в области биомедицины, часто, НЧ называют объекты, все размеры которых находятся в пределах нескольких сотен нанометров [8, 9]. Это допущение также будет использоваться в рамках данной работы. Предполагается, что распространенное изменение границ размеров связано с сохранением благоприятных для применения *in vivo* свойств наночастиц, таких как: склонность к повышенной всасываемости слизистой при пероральном введении, способность к пассивному нацеливанию в область опухолевых тканей, увеличенная удельная поверхность и т. д. [10].

Наибольшую популярность у исследователей, разрабатывающих комплексы для терапии, получили липосомальные [11, 12], магнитные [13], белковые, полимерные НЧ [14], в том числе дендримеры [15], наноматериалы на основе благородных металлов [16], карбоната кальция [17], диоксида кремния [18] и углерода [19] (рисунок 2.1).



Рисунок 2.1 – Схематичное изображение распространенных типов наноматериалов в биомедицине и препараты на их основе одобренные для терапии

На рисунке 2.1 схематично представлены широко применимые в биомедицине наноматериалы и клинические препараты на их основе. Наиболее распространенным компонентом терапевтических препаратов на основе наноматериалов на сегодняшний день являются липосомы. На их основе уже применяют препараты для лечения рака (липосомальные формы низкомолекулярных химиотерапевтических средств, в том числе Doxil, Myocet, Onivyde и т. д.) и грибковых заболеваний (АмБизом), а также вакцины (nflexal, Eраxal, Mosquirix и Shingrix), витамины (SMARTLIFE, D3) и антисептики (Sensyses). Кроме того, ведутся клинические испытания липосомальных препаратов для лечения бактериальных и воспалительных артритных болезней [11, 20]. Полимерные наночастицы, в том числе дендримеры, также были одобрены для решения вопросов онкологии (Eligard, CRRLX101) и активно участвуют в разработках, направленных на лечение острого лучевого синдрома. Третьими из распространенных органических материалов являются белковые наночастицы, клинически доступные в качестве контрастирующих веществ и компонентов терапии онкологии. Неорганические наноматериалы пока являются менее распространенными компонентами терапевтических средств, однако их свойства могут позволить в дальнейшем использовать новые подходы в терапии, такие как: лечение онкологии путём термальной абляции, уничтожение бактерий с использованием наночастиц благородных металлов и их антибактериальных свойств и т. д. [21, 22].

Более того, помимо общих положительных свойств, связанных с малыми размерами, каждый тип наночастиц имеет преимущества и недостатки, обусловленные природой выбранного соединения. Для большинства из них главными недостатками является низкая суспензионная стабильность как в водных растворах, так и в условиях близких к физиологическим, токсичность, а также отсутствие воспроизводимых масштабируемых протоколов получения конструкций на основе наноматериалов, что значительно препятствует их применению *in vivo* [23].

Исследователи по всему миру концентрируют свои усилия для внедрения наночастиц в медицину для решения вопросов онкологических, генетических, вирусных и грибковых заболеваний [24, 25].

Наряду с прочими, наноматериалы на основе карбоната кальция (СаНЧ), обладающие рН-зависимой деградацией, перспективны в качестве систем доставки противоопухолевых агентов: сочетание пониженного рН опухоли, вызванного ускоренным гликолизом трансформированных тканей, и гидролиза карбоната кальция в этой области, позволяет высвобождать лекарство преимущественно в опухоль [26]. Кроме того, продукты гидролиза, оставшиеся от наночастиц, не накапливаются и выводятся естественным путём, что нивелирует токсичность наночастиц [27]. Однако, получение наночастиц карбоната кальция, удовлетворяющих критериям применимости в биомедицине – непростая методологическая задача, в основном связанная с недостаточной суспензионной стабильностью наноразмерных частиц (до 200 нм) и их дальнейшей агрегацией в микрометровые скопления [28].

Целью данного обзора является рассмотрение современного положения наноматериалов карбоната кальция и их нанокомпозитов для биомедицины, а именно: методов получения наноразмерных частиц карбоната кальция, а также применения систем на их основе для доставки противоопухолевых средств, нуклеиновых кислот, белков и антигенов, а также приложения СаНЧ в областях тканевой инженерии и фотодинамической терапии.

2.1 Синтез наночастиц карбоната кальция

Несмотря на увеличенный интерес исследователей по всему миру к теме систем доставки биологически активных соединений (БАС) и бесспорное активное развитие области, лишь малая часть конструкций транспорта лекарственных агентов была одобрена для применения в клинике [29]. Основная доля таких препаратов относится к липосомальным формам лекарств с выраженным профилем токсичности [30]. Однако, многие проблемы, которые могли бы быть решены применением эффективного носителя, до сих пор находятся на стадии исследования. К ним относятся: усиление терапии онкологических, бактериальных и грибковых заболеваний, а также возможность применения современных методов генной терапии [31].

При разработке носителей БАС, ещё на этапе сборки системы, необходимо учитывать композицию факторов, которые в дальнейшем могут повлиять на эффективность терапии и диагностики. К важнейшим параметрам, нужно отнести не только токсичность транспортёра и характеристики взаимодействия носителя с БАС, но и влияние физиологических условий на комплекс частица-препарат. В частности, необходимо брать во внимание аспекты, связанные с барьерами клеточной мембраны и иммунной системы [32].

Применение суспензии наночастиц карбоната кальция и их композитов в качестве контейнера для терапевтических агентов может быть перспективным вариантом программируемой доставки БАС. Пристальный интерес исследователей к материалу связан с возможностью полной рН-зависимой деградации частиц на биосовместимые и биоразлагаемые компоненты, что решает проблемы отложенной токсичности и скопления частиц в печени, почках и других органах. Кроме того, материал обладает пористой структурой, что приводит к увеличенным ёмкостным характеристикам по отношению к грузовым молекулам [3]. Но минеральная природа карбоната кальция является одновременно и недостатком соединения, так как частицы склонны формировать микрометровые кристаллы, не удовлетворяющие критериям применения в биомедицине из-за размеров, дисперсности и суспензионной стабильности. Несмотря на последние достижения в области стабилизации таких материалов и развитие методологических подходов к синтезу наноразмерного карбоната кальция, существует ряд проблем, касающихся присоединения адресующих и терапевтических молекул и дальнейшей стабильности системы в условиях организма. Но, в случае эффективного связывания пары (груз/носитель) и сохранности исходных свойств комплекса в условиях *in vivo*, может быть получен новый многообещающий биodeградируемый стимул-чувствительный инструмент для терапии и диагностики.

Создание подобных конструкций можно разделить на блоки: синтез носителя, присоединение БАС, модификация и стабилизация системы (предполагается испытание компонентов и комплекса на каждом шаге). Конструкция может быть применима *in vivo* только если на каждом этапе сборки были использованы компоненты, не обладающие выраженной токсичностью. Этот аспект накладывает значительные ограничения на выбор реактивов и методов синтеза наноматериалов. Основные подходы получения микро- и наночастиц карбоната кальция (СаНЧ) представлены на рисунке 2.2 [33].



Рисунок 2.2 – Схема вариантов методов синтеза микро- и наночастиц карбоната кальция

Несмотря на разделение вышеперечисленных методов (рисунок 2.2) по принципам формирования частиц, многие исследователи для достижения наноразмерности частиц применяют комбинацию методов. В области биомедицины наибольшую распространенность получил метод осаждения, в том числе с использованием протокола газовой диффузии, который в последние годы некоторые классификации начали приводить как отдельный метод [34]. Принципы полимеризации, в частности полимер-опосредованный синтез, нашли свое применение в синтезе СаНЧ для биомедицины, как комбинированный способ для методик осаждения и эмульсии, поэтому подход не будет рассматриваться отдельно в этой работе. В случае получения СаНЧ из природных соединений, формирование конечного продукта осуществляют путём механического воздействия, поэтому использование шарового измельчения и фильтрации будет рассмотрено в части синтеза наноматериалов из природных соединений.

Кроме того, в последних достижениях подробно рассматриваются процессы образования наноразмерного карбоната кальция микроорганизмами в нормальном круговороте природы [35]. Однако, частицы, полученные таким образом, обладают высокой степенью агрегации и не подходят для применений в биомедицине без увеличения их обособленности.

Нельзя не упомянуть, что выбранный метод и условия синтеза влияют на полиморфную форму получаемых частиц карбоната кальция (кальцит / арагонит / ватерит). Ватерит (обычно пористые сферы диаметром 0,05 – 5 мкм) имеет наиболее предпочтительные размер и форму для применения в биомедицине и является наименее стабильным вариантом из всех полиморфов [36, 37]. Имея наибольшую растворимость среди форм, без дополнительной стабилизации, ватерит при контакте с водой переходит в кальцит или арагонит. Кроме того, температурный режим этапа синтеза и хранения влияет на вариант кристалла: 25 – 40 °С – ватерит, 40 – 50 °С – все три полиморфа, 60 °С кальцит [38]. Метастабильность ватерита приводит к ограниченной суспензионной стабильности СаНЧ и, как следствие, необходимости тщательного подбора условий синтеза, стабилизации и хранения.

Подробнее компоненты и условия получения ватерита, влияющие на характеристики получаемых частиц, будут рассмотрены далее в методах осаждения, микроэмульсии и газовой диффузии. Подход с использованием природных соединений преимущественно приводит к получению арагонита и кальцита в зависимости от источника карбоната кальция.

2.1.1 Синтез наночастиц карбоната методом осаждения

Среди прочих разработанных вариантов химического синтеза наноматериалов на основе карбоната кальция метод осаждения (или соосаждения) является широко распространенным как лабораторным, так и промышленным подходом. Суть метода заключается в перенасыщении раствора путём добавления осаждающего агента при фиксированном показателе кислотности (рН). В процессе образования частиц протекают две характеристически значимые реакции: нуклеация (зародышеобразование) и последующий рост частиц. Эти шаги определяют размер и форму образующихся продуктов [39].

Быстрое зародышеобразование и медленный рост, обычно, приводят к образованию частиц меньших размеров с меньшим индексом полидисперсности. Помимо природы солей, образующих частицы, на свойства получаемых материалов значительно влияет композиция реакционной смеси (рН, температура, ионная сила раствора). Благодаря большому списку

параметров, которые можно варьировать, в рамках одного соединения могут быть получены частицы разного размера, форм, пористости и т. д.

Получение наночастиц карбоната кальция (СаНЧ) методом осаждения (спонтанного осаждения) является основным и наиболее простым вариантом. Частицы формируются при медленном гидролизе растворимых солей кальция и карбонат ионов (или при медленном растворении углекислого газа в воде) в щелочных условиях (рисунок 2.3) [33].



Рисунок 2.3 – Схема синтеза СаНЧ методом осаждения

Однако, в отсутствие дополнительных реагентов, методом осаждения получаются частицы микрометровых размеров (2 – 10 мкм) [40]. Быстрое смешение (в течение 30 с) эквимольной (0,33 М) концентрации реагентов приводит к образованию пористых сферических микрочастиц кальцита размером 4 – 6 мкм. При увеличении времени реакции (более 30 мин), размеры частиц достигают 15 – 20 мкм [41].

Отдельной методологической задачей является подбор условий для получения стабильной суспензии наноразмерных частиц карбоната кальция. Авторы провели обширную поисковую работу в области получения СаНЧ в отсутствие дополнительных прекурсоров, изучив влияние скорости перемешивания (300 – 30000 об./мин), времени реакции (30 – 180 мин), концентрации ионов кальция/карбоната (0,05 – 0,2 М) и температуры (25 – 100 °С) на размер и морфологию частиц. Исследование показало, что скорость перемешивания обратно пропорциональна размеру частиц карбоната кальция, тогда как температура реакционной смеси была прямо

пропорциональна размеру образующихся материалов. Были получены частицы с минимальным размером 30 нм (эквимолярное смешивание по 0,1 М; 60 мин.; 14000 об./мин.; 25 °С) [42]. Однако, материал характеризовался низкой суспензионной стабильностью.

Для получения стабильной суспензии наночастиц карбоната кальция методом осаждения, необходимы стабилизирующие реагенты на этапе синтеза [43, 44]. В качестве таких добавок распространённо используют синтетические полимеры, поверхностно-активные вещества и биомолекулы [33].

Подробнейшее влияние различных типов добавок и их концентраций рассмотрено в обзорах Воујоо У. и др. [33, 45]. С использованием дополнительных стабилизирующих компонентов удаётся добиться изменения физико-химических характеристик частиц (размер, дисперсность, заряд, форма), а также придать новые свойства носителю (например, инкапсуляция биологически активных веществ на этапе синтеза наноматериала).

Для изменения физико-химических характеристик частиц преимущественно применяют полимерные молекулы и поверхностно активные вещества, такие как полиэтиленгликоль [46], натриевая соль лаурилсерной кислоты [47 48], полисорбат 20 (Твин 20) [49, 50] и т.д. Такие соединения взаимодействуют с катионами Ca^{2+} , обеспечивая активные сайты для зарождения кристаллов, которые затем агломерируют в нано- или микрочастицы. Кроме того, на поверхности этих кристаллов образуется полимерный слой, фиксирующий форму и размер частиц, препятствуя дальнейшему росту [51].

Наибольшей популярностью в области разработки доставки биологически активных соединений пользуются подходы, позволяющие изменять характер влияния системы на живой организм. Так, при внесении в реакционную смесь для синтеза карбоната кальция (методом осаждения) оптимальной концентраций таких биомолекул, как крахмал [27, 52], декстран [53], коллаген [54, 55] и некоторых белков (например, бычий сывороточный альбумин [56]) образуются нано- и микро- гибридные материалы карбоната кальция с добавленным соединением [33]. Показано, что такие вещества могут обладать большей стабильностью и биодоступностью. Кроме того, благодаря мягким синтетическим условиям, в качестве инкапсулируемого вещества могут быть использованы низкомолекулярные лекарства и нуклеиновые кислоты [43, 57].

Таким образом, методом осаждения, варьируя условия синтеза и состав реакционной смеси, можно получать наноматериалы на основе карбоната кальция для различных биомедицинских целей. В таблице 2.1 рассмотрены последние достижения в области получения наноразмерных частиц методом осаждения, а также области их применения.

Таблица 2.1. Применение и условия синтеза СаНЧ, полученных методом осаждения

Размер СаНЧ, нм	Форма	Композиция реакционной смеси	Суммарное примерное время синтеза	Условия смешивания Са ²⁺ и СО ₃ ²⁻	Применение	[]
47 ± 7	Сферическая	СаCl ₂ : 0,2 М, Na ₂ CO ₃ : 0,2 М, Триса-ацетатный буфер (Трис): 0,03 М, Муцин: 6 мг/мл, Доксорубицин (DOX): 0,100 мг/мл, V _{р. смеси} : 5 мл.	10 мин	Перемешивание (S): 100 об./мин Температура (T): 25 °С	Контролируемое высвобождение малых лекарственных молекул	58
≈ 400	Сферическая	СаCl ₂ : 0,5 М, Na ₂ CO ₃ : 0,5 М, Растворимый крахмал: 5 мас.%, V _{р. смеси} : 400 мл.	24 ч	S: интенсивное T: 25 °С	Наноплатформа для доставки лекарств	59
≈ 350	Кубическая	СаCl ₂ : 0,16 × 10 ⁻³ М, Na ₂ CO ₃ : 0,16 × 10 ⁻³ М, V _{р. смеси} : 140 мл.	30 мин	S: интенсивное T: 25 °С	Нанобиогибриды бензоата кальция-гуаровой камеди для очистки растворов	60
≈ 350	Сферическая (рН 5,5)	СаCl ₂ : 0,0036 М, Na ₂ CO ₃ : 0,0036 М, Карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) (степень замещения 0,7, средний Mw ~ 250 000): 0,2 мас.%, дотитровывали 0,25 М NaOH, V _{р. смеси} : 2,73 мл.	90 мин	S: интенсивное T: 25 °С	Пероральной доставки лекарств	44
	Кубическая (рН 9,0)					
	Цилиндрическая (рН 14,0)					
570 ± 151 × 130 ± 35	Цилиндрическая	СаCl ₂ : 0,0067 М, Na ₂ CO ₃ : 0,0067 М, Фукоидан: 30 / 40 / 50 мг/мл, V _{р. смеси} : 30 мл.	90 мин	S: интенсивное T: 25 °С	рН-Чувствительные контейнеры для противоопухолевой терапии (Митоксантрон)	61
725 ± 223 × 170 ± 42						
885 ± 349 × 314 ± 71						

835 ± 196	Кубическая	CaCl ₂ : 0,99 М, Na ₂ CO ₃ : 0,76 М, Гепарин: 0,10 мг/мл V _{р. смеси} : 3,2750 мл.	17 ч	S: 650 об./мин T: 25 °С	Контейнер для лекарства и терапии рака молочной железы	40
491 ± 145	Сферическая	CaCl ₂ : 0,018 М, Na ₂ CO ₃ : 0,045 М, Этиленгликоль: 20 мг/мл, V _{р. смеси} : 22 мл				
800 ± 100	Сферическая	CaCl ₂ : 0,03 М, Na ₂ CO ₃ : 0,03 М, Рекомбинантный коллаген (РК): 4 мас. %.	48 ч	S: не указано T: 25 °С	pH-Чувствительные биосовместимые сферы для лекарств	62
60 – 80	Сферическая	CaCl ₂ : 0,033 М, Na ₂ CO ₃ : 0,033 М, Полиакриловая кислота: 1 мг/мл, V _{р. смеси} : 30 мл	2,5 ч	S: 400 об./мин T: 25 °С	CaНЧ с DOX в комбинированной противоопухолевой терапии	63
78 ± 16	Кубическая	Ca(NO ₃) ₂ ×4H ₂ O: 0,21 М, Na ₂ CO ₃ : 0,21 М, Гуммиарабик: 0,33 мг/ мл, V _{р. смеси} : 120 мл	4 ч	S: не указано T: 25 °С	Исследование фотокаталитической активности CaНЧ в отношении метиленового синего	64
200 – 250	Сферическая	Ca(NO ₃) ₂ : 0,0125М, Na ₂ CO ₃ : 0,125 М, КМЦ: 0,085 мас. %. Силикат натрия (Na ₂ O(SiO ₂) _x ×H ₂ O): 1,4 г/мл, V _{р. смеси} : 50 мл	48 ч	Под действием ультразвука (УЗ)	Исследование влияния силанов на морфологию, размер и дисперсность CaНЧ	65

669 ± 142	Сферическая	CaCl ₂ ×2H ₂ O: 0,05 М, Na ₂ CO ₃ : 0,05 М, Этиленгликоль: 0,2 об.%	2 ч	S: 625 об./мин	pH-Чувствительный контейнер с высокой ёмкостью по отношению к БАС	66
589 ± 40				S: 750 об./мин		
519 ± 29				S: 825 об./мин		
341 ± 15				S: 1125 об./мин		
213 ± 10	Сферическая	CaCl ₂ : 0,096 М, Na ₂ CO ₃ : 0,096 М, DOX: 5 мг/мл, Поливинилпирролидон (ПВП): 40 мг/мл, V _{р. смеси} : 10 мл	17 ч	S: 800 об./мин T: 25 °С	СаНЧ совместно с DOX для тераностики рака	67
12,23 ± 0,04	Сферическая	CaCl ₂ : 0,024 М, Na ₂ CO ₃ : 0,024 М, Среда от дрожжевых клеток: 0,2 мл/ мл реакционной смеси, V _{р. смеси} : 100 мл	38 ч	S: 300 об./мин T: 25 °С	СаНЧ в качестве контейнера для DOX	68
3 – 76	Трубчатая	Порошок ветвей N. Officinale: 1 мг/мл, CaCl ₂ ×2H ₂ O: 0,067 М, V _{р. смеси} : 300 мл	54 ч	S: не указано T: 80 °С	Нанотрубки карбоната кальция в качестве препарата с лейшманиозной активностью	69
269 ± 27	Сферическая	CaCl ₂ : 0,05 ммоль, Na ₂ CO ₃ : 0,05 ммоль, Поли(этиленгликоль)-b-поли(L- аспарагиновой кислоты): 5 мг/мл, S-нитрозотиол: 5 мг/мл, V _{р. смеси} : 5 мл	16 ч	S: 1000 об./мин T: 25 °С	Остеогенная дифференцировка эмбриональных стволовых клеток	70

318 ± 100	Сферическая	CaCl ₂ : 0,003 М, Na ₂ CO ₃ : 0,006 М, Полиакрилат натрия: 1,9 мг/мл, Бычий сывороточный альбумин (БСА): 0,55 мг/мл, V _{р. смеси} : 8 мл	26 ч	S: 900 об./мин T: 25 °С	Инструмент терапии сердечно- сосудистых заболеваний	71
≈ 100	Сферическая	CaCl ₂ : 0,045 М Na ₂ CO ₃ : 0,033 М полиаспарагиновая кислота (4~8 кДа,): 2,5 об.%, V _{р. смеси} : 20 мл	52 ч	S: интенсивное T: 25 °С	Платформа для перорального приема лекарств	72

Из данных, приведенных в таблице 2.1, видно, что метод осаждения позволяет получать частицы разных размеров от нанометрового до микрометрового масштаба. Форма и стабильность частиц, так же как и диаметр СаНЧ, определяется композицией реакционной смеси и условиями протекания реакции. Показано, что методом осаждения можно получать как стабилизированные СаНЧ, обладающие улучшенными характеристиками наноматериала (например, уменьшение дисперсности и размера или увеличение суспензионной стабильности [72]), так и использовать возможность инкапсулировать БАС, в том числе лекарства на этапе синтеза наноматериалов [58, 61, 67]. Кроме того, из представленной выборки видно, что подход не требует использования специфического оборудования или навыков. Стоит отметить, что в таблице 2.1 приведён параметр «суммарное примерное время синтеза» (без учета приготовления стоковых растворов, считая процедуры смешивания, сепарации и сушки, если применимо) с целью примитивной оценки возможности дальнейшего масштабирования процесса фармацевтического получения наноматериалов. Безусловно, только регистрации времени процедуры недостаточно, необходимо следить за исходным сырьем, выходами продукта и приборами, используемыми в работе. Однако, критерий времени, в случае долготекущего синтеза, может служить значительным ограничением дальнейшей применимости в клинике.

Таким образом, синтез СаНЧ методом осаждения является наиболее простым подходом с множеством параметров доступных для варьирования размера, формы и свойств частиц (рН, температура реакции, концентрация ионов, скорость перемешивания, виды растворителей и добавки). Способ нашел обширное применение в области биомедицины, в частности для разработки систем доставки лекарств, биосенсоров и компонентов тканевой инженерии [73].

Недостатком метода можно выделить низкую суспензионную стабильность получаемых частиц, что требует тщательного подбора условий синтеза, хранения и транспортировки, а, как следствие, осложняет их дальнейшую применимость в области биомедицины.

2.1.2 Синтез наночастиц карбоната кальция методом газовой диффузии

Метод газовой диффузии преимущественно используется для получения частиц карбоната кальция [17]. Концептуально метод заключается в обогащении углекислым газом раствора, который содержит катионы кальция при щелочном рН (рисунок 2.4).

Метод газовой диффузии

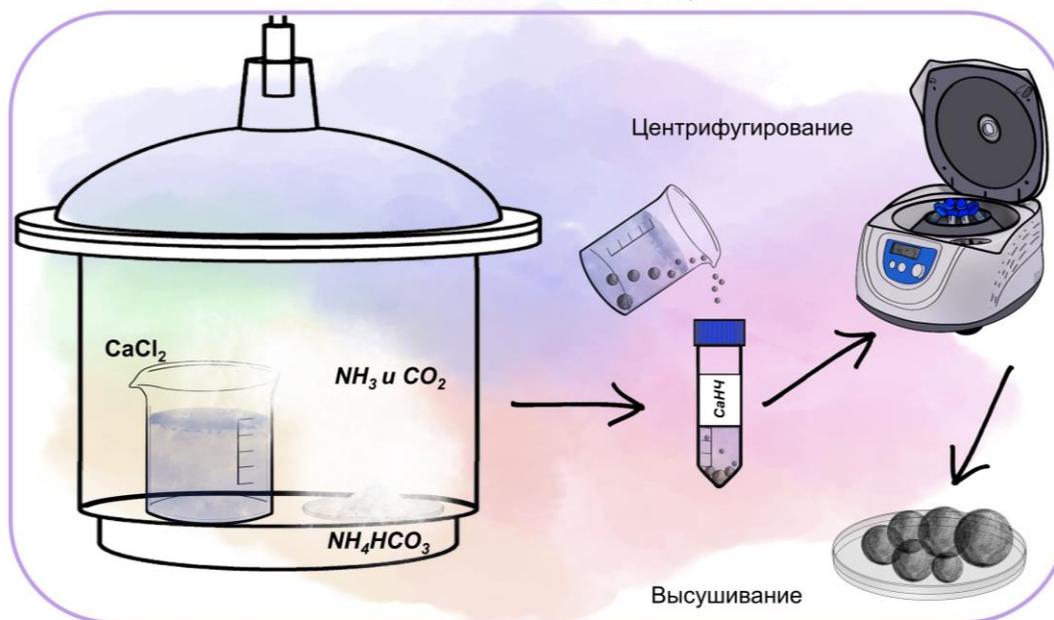


Рисунок 2.4 – Схема синтеза СаНЧ методом газовой диффузии с применением гидрокарбоната аммония (NH_4HCO_3)

Обычно метод заключается в помещении в эксикатор раствора хлорида кальция в этаноле в присутствии бикарбоната аммония. Последний постепенно разлагается на аммиак, воду и углекислый газ (при нагревании чуть выше 36°C), которые, при растворении в спирте, переходят в CO_3^{2-} и NH_4^+ . Катионы аммония создают необходимый щелочной pH, а карбонат анионы реагируют с Ca^{2+} . Контроль размера, формы и дисперсности частиц можно осуществлять путём вариации температуры, концентрации реагентов (преимущественно Ca^{2+}) и внедрения добавок, аналогичных с методом осаждения [45].

Например, группа авторов детально рассмотрела влияние температуры, времени реакции, а также количества Ca^{2+} и воды на размер получаемых СаНЧ. Показана обратная зависимость размера НЧ от количества катионов кальция: в диапазоне от 75 мг до 400 мг CaCl_2 размер НЧ уменьшался с 150 до 60 нм. И прямая: при изменении количества Ca^{2+} с 25 мг до 50 мг, размер НЧ увеличивался от 100 до 140 нм. Этот факт связан с изменением временных соотношений этапов реакции зарождения и роста кристаллов. В случае избыточного CO_2 по отношению к Ca^{2+} рост кристаллов является доминирующим процессом, что приводит к образованию более крупных частиц. Увеличение Ca^{2+} в реакционной смеси смещает равновесие в сторону преобладания стадии зародышеобразования. Быстрое формирование ядер при недостаточном количестве CO_3^{2-} в смеси приводит к получению частиц меньшего размера. Более того, показано, что содержание воды в реакционной смеси оказывает влияние на размер СаНЧ: увеличение содержания воды (с 1,6% до 2%) приводит к увеличению размера частиц со 171 до 387 нм.

Авторы объясняют данный факт эффективным растворением NH_3 в воде и дальнейшим проявлением его акцепторных свойств по отношению к CO_2 , с последующим образованием $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. Увеличение концентрации CO_3^{2-} приводит к увеличению скорости роста кристаллов и укрупнению частиц. Также в работе показана прямая зависимость температуры и времени реакции [74].

Основным недостатком способа получения СаНЧ методом газовой диффузии является длительность синтеза: процесс занимает более двух дней и характеризуется низкими выходами.

Другим распространённым вариантом метода газовой диффузии является барботирование углекислого газа через раствор гидроксида кальция (рисунок 2.5)

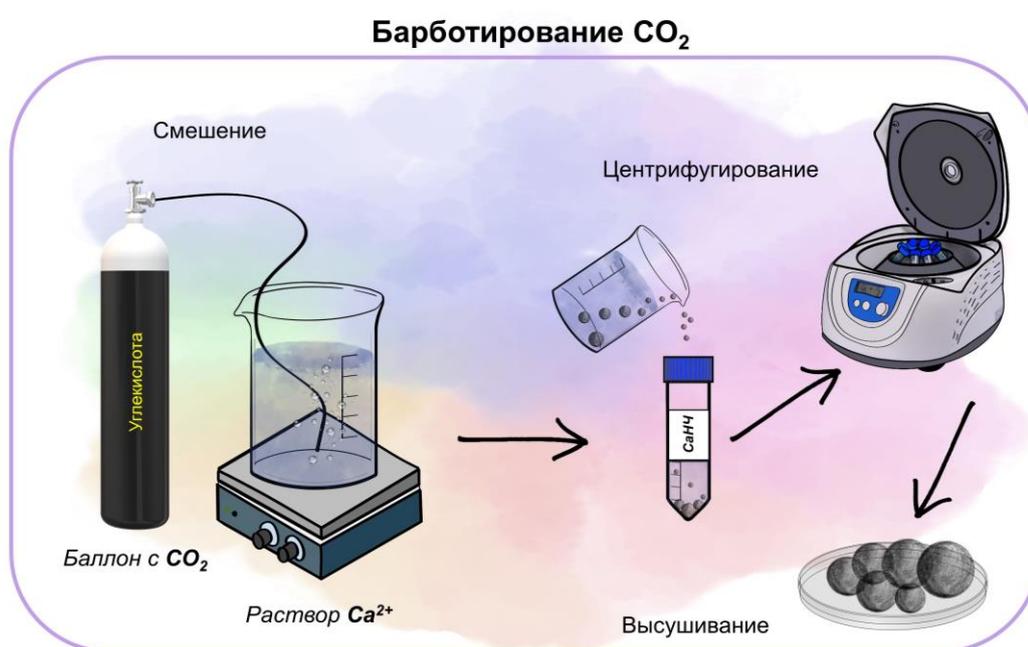


Рисунок 2.5 – Схема синтеза СаНЧ методом газовой диффузии с применением барботирования углекислым газом (CO_2)

Частицы, синтезированные способом барботирования (рисунок 2.5), обычно представляют собой сферические наночастицы или структуры сложной формы микронного размера. При этом, на характеристики получаемых в этих условиях НЧ карбоната кальция не влияют высокое давление, незначительные колебания температуры, добавки полимеров и поверхностно-активных веществ. Основной вклад в формирование частиц вносит время реакции, например, через 12 часов при эквимольном смешивании (10^{-3} М) реагентов были получены СаНЧ ромбоэдрической или сферической структуры размером ~ 500 нм, а через 48 – звездообразные скопления размером более нескольких микрон [75].

Ниже в таблице 2.2 рассмотрены последние достижения в получении частиц карбоната кальция методом газовой диффузии.

Таблица 2.2. Применение и условия синтеза СаНЧ, полученных методом газовой диффузии

Размер СаНЧ, нм	Форма	Композиция реакционной смеси	Суммарное примерное время синтеза	Условия смешивания Са ²⁺ и СО ₃ ²⁻	Применение	□
< 10	Сферическая	СаО 2,5 г (0,045 моль) в 100 мл метанола, СО ₂ : 4 бар	5 ч	S: непрерывное T: 50 °С	Получение высокопористого аморфного фосфата кальция и инкапсуляции алендроната	76
≈ 100	Сферическая	СаСl ₂ 1 г (0,046 моль) в 200 мл этанола, NH ₄ НСО ₃ : 320 г (4,05 моль)	3 дня	В вакуумном эксикаторе	Стимуляция метаболического удаления опухоли и метастазирования	77
167	Сферическая	Са(ОН) ₂ : 0,05 М, Na ₂ СО ₃ : 0,05 М, Хелатирующий агент (ХА): MGDA-Na ₃ (Метилглицин N,N-диуксусная кислота, тринатриевая соль): 0 / 0,05 / 0,1 М, GLDA-Na ₄ (N,N-Бис(карбоксилатометил)-L-глутамат тетранатрия): 0 / 0,05 / 0,1 М	> 24 ч	S: 400 об./мин T: 50 °С (общее) Без ХА	Оптимизация получения СаНЧ применением хелатирующих агентов	78
13,4	Цилиндрическая (Высокая степень агломерации в микрочастицы)	0,1 М MGDA-Na ₃				
6,4		0,2 М MGDA-Na ₃				
13,4		0,1 М GLDA-Na ₄				
7,6		0,2 М GLDA-Na ₄				
≈ 100	Сферическая	СаСl ₂ 0,15 г (0,0013 моль) и Кемпферол-3-О-рутинозид 20 мг (0,4 мг/мл) в 50 мл этанола, NH ₄ НСО ₃ : 5 г (0,063 моль)	4 д	В вакуумной сушильной камере	Терапия перегрузки кальцием для лечения онкологии	79

≈ 80	Сферическая	CaCl ₂ 0,2 г (0,0018 моль) и митоксантрон 400 мг (4 мг/мл) в 100 мл этанола, (NH ₄) ₂ CO ₃ : 20 г (0,21 моль)	14 ч	В вакуумном эксикаторе	Носитель митоксантрона для адресной терапии рака	80
110 ± 2	Сферическая	CaCl ₂ : 0,2 г (0,0018 моль) в 0,3 мл H ₂ O и 100 мл этанола, (NH ₄) ₂ CO ₃ : 6 г (0,063 моль)	2 д	В вакуумном эксикаторе при 35 °С	Увеличение стимуляции остеобластов для синергетической терапии остеопороза	81
≈ 100	Сферическая	CaCl ₂ 0,2 г (0,0018 моль) и DOX 4 мг ($6,9 \times 10^{-6}$ моль) в 100 мл этанола, (NH ₄) ₂ CO ₃ : 10 г (0,10 моль)	2 – 3 д	В вакуумном эксикаторе при 25 °С	Носитель DOX	82

Согласно данным, приведенным в таблице 2.2, реакционная смесь для получения наноматериалов карбоната кальция методом газовой диффузии состоит из доступных реактивов и не требует дополнительных стабилизаторов и/или ПАВ. Более того, частицы, полученные этим методом, обладают размерами около 100 нм и преимущественно имеют сферическую форму, что является оптимальными параметрами для дальнейшего биомедицинского применения. Подход получения частиц карбоната кальция газовой диффузией кальций содержащих растворов нашел применение не только в лабораторных, но и промышленных условиях из-за простоты масштабирования способа барботирования. Однако, в сравнении с осаждением (таблица 2.1), метод барботирования CO_2 – длительный процесс. Кроме того, для частиц, полученных методом газовой диффузии, характерна высокая степень агрегации.

2.1.3 Синтез наночастиц карбоната кальция методом эмульсии

Микроэмульсии представляют собой высокодисперсные термодинамически стабильные системы, характеризующиеся способностью формировать самоорганизующиеся структуры – нано- и микроразмерные капли. Этот тип растворов содержит по меньшей мере три основных компонента: водную, масляно-органическую и биполярную фазы (эмульгатор, чаще, поверхностно-активные вещества – ПАВ). Кроме того, могут быть добавлены сопутствующие поверхностно-активные вещества (со-ПАВ) и со-растворители (рисунок 2.6) [83].



Рисунок 2.6 – Схема компонентов реакционной смеси для метода эмульсии

На рисунке 2.6 представлены компоненты эмульсионного раствора и их распространенные примеры. Добавление со-ПАВ и со-растворителя обычно применяется для

стабилизации или улучшения свойств основного эмульгатора. Например, для повышения полярности или растворимости малорастворимых веществ.

При смешении компонентов, образующиеся пузырьки обеспечивают замкнутую среду (микрореакторы) для проведения реакции, что позволят получить нано- и микроразмерные материалы. Однако, как и в случае метода осаждения, на размер и форму получаемых частиц влияет множество параметров, например, концентрация реагентов, формирующих частицы, тип и количество ПАВ, температура реакции, очередность смешения фаз, техника эмульгирования и т.д. Считается, что ключевое влияние на характеристики частиц оказывает выбор ПАВ [83].

Микроэмульсионные методы синтеза можно разделить на два подхода: прямой (масло в воде – М/В) и обратный (вода в масле – В/М) варианты. В обеих системах дисперсная фаза состоит из монодисперсных капель в диапазоне 1 – 100 мкм [84]. Только в первом случае дисперсная фаза состоит из масла и непрерывная – из воды, а во втором – из воды и масла соответственно. Эмульсии такого типа называют простыми. В случае добавления фаз до вариантов «масло в воде в масле» (М/В/М) или наоборот (В/М/В) эмульсии характеризуют как множественные или двойные. Для получения таких растворов, объединяют капли большего и меньшего размера, путём последовательного диспергирования всех фаз. В таких вариантах размер капель может быть уменьшен до 10 – 200 нм [85].

Благодаря возможности контролировать размер частиц и широкий спектр варьируемых параметров, микроэмульсионные методы также нашли применение в области получения СаНЧ [86, 87]. В частности, распространённо применяются варианты обращённой и двойной эмульсии. Концептуально первый заключается в смешении двух микроэмульсий, каждая из которых содержит частицы, образующие ионы (Ca^{2+} и CO_3^{2-}), воду и масло (рисунок 2.7). Метод двойной эмульсии применяют аналогично методу обратной. Только, при смешении, растворимые соли кальция прибавляют в виде дисперсного раствора (по типу В/М), а карбонат содержащая фракция ресуспендирована в большом количестве водной фазы.

Метод эмульсии

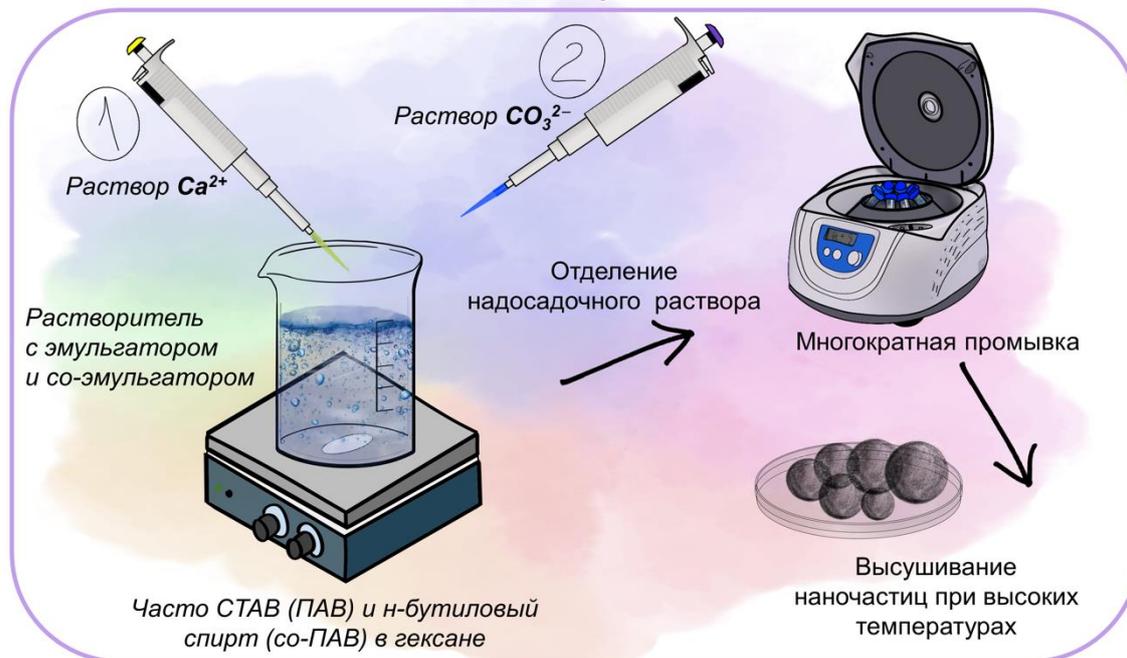


Рисунок 2.7 – Схема синтеза CaNC методом эмульсии

Последние достижения в области получения наночастиц карбоната кальция микроэмульсионными подходами рассмотрены в таблице 2.3.

Таблица 2.3. Применение и условия синтеза CaНЧ, полученных микроэмульсионным методом

Размер CaНЧ, нм	Форма	Композиция реакционной смеси	Суммарное примерное время синтеза	Условия смешивания Ca ²⁺ и CO ₃ ²⁻	Применение	[]
≈ 270	Кубическая	CaCl ₂ : 0,002 М, Na ₂ CO ₃ : 0,02 М, Циклогексан: 63,8 об.%, Triton X-100: 15,1 об.%, 1-гексанол: 13,6 об.%, Белковые частицы: 4,3 мг/мл, V _{р. смеси} : 11,75 мл	18 ч	В/М S: непрерывное T: 25 °С	Репрограммирование лизосом CD8+Т-клеток с помощью минерализованного металлоорганического каркаса для иммунотерапии рака	88
≈ 100	Сферическая	CaCl ₂ : 0,0089 М, Na ₂ CO ₃ : 0,0089 М, СТАВ: 0,091 г/мл, Н-бутиловый спирт: 22,3 об.%, Гексан: 76,8 об.%, V _{р. смеси} : 22,45 мл	36 ч	В/М S: 1000 об./мин T: 25 °С	Носители доксорубина, направленные на рН-зависимое индуцирование свертывания крови и лечения онкологии	89
≈ 200	Сферическая	CaCl ₂ : 0,0010 М, Na ₂ CO ₃ : 0,0010 М, Циклогексан: 70,0 об.%, Triton X-100: 16,5 об.%, Флуоресцентный зонд: 10 ⁻⁶ М, V _{р. смеси} : 10,71 мл	1 ч	В/М S: УЗ T: 25 °С	<i>In vitro</i> и <i>in vivo</i> детекция опухоли	90
≈ 100	Сферическая	CaCl ₂ : 0,071 М, Na ₂ CO ₃ : 0,35 М, мРНК: 2,36 мкг/мл, Циклогексан: 70,8 об.%, Triton X-100: 14,2 об.%, Гексанол: 9,4 об.%, V _{р. смеси} : 21,2 мл	1 ч	В/М S: непрерывное T: 25 °С	Синергическая иммунотерапия и улучшенная трансфекция мРНК под воздействием ультразвукового облучения	91

≈ 130	Сферическая	CaCl ₂ : 0,003 М, Na ₂ CO ₃ : 30 мкл (0,001 М), БСА: 0,23 мкг/мл, Пропиленгликоль: 9,4 об.%, Спиртовой раствор яичного фосфатидилхолина: 3,8 мг/мл, 1,2-диолеоил-3-триметиламмоний пропан: 0,37 мг/мл, Паклитаксел: 0,024 мг/мл, Глюкоза: 8,2 об.%, N-(Карбонил- метоксиполиэтиленгликоль 2000)- 1,2-дистеароил-сн-глицеро-3- фосфоэтаноламин: 1,5 мг/мл, V _{р. смеси} : 4,27 мл	2 ч	В/М S: непрерывное T: 25 °С	Направленная совместная доставка белка и лекарства к опухоли <i>in vivo</i>	92
≈ 200	Сферическая	CaCl ₂ : 0,01 М в 15 мл раствора Циклогексан/Igeral CO-520 (71:29), Na ₂ CO ₃ : 0,005 М в 15 мл раствора Циклогексан/Igeral CO-520 (71:29), Цисплатин: 0,016 мг/мл, Дигидроксифенилаланин: 0,13 мг/мл, V _{р. смеси} : 31,05 мл	1 – 2 ч	М/М/В S: непрерывное T: 25 °С	Носитель цисплатина для усиления апоптоза со сниженной гепатотоксичностью	93
≈ 200	Сферическая	CaCl ₂ : 0,017 М, Na ₂ CO ₃ : 0,016 М, Циклогексан: 64,9 об.%, Triton X-100: 15,2 об.%, Гексанол: 13,8 об.%, V _{р. смеси} : 7,24 мл	18 ч	М/В S: непрерывное T: 25 °С	Система замедленного высвобождения лекарства для противоопухолевой терапии	94
≈ 55	Сферическая	CaCl ₂ : 0,001 М, DOX: 0,09 мг/мл Циклогексан: 15,8 об.%, Triton X-100: 4,5 об.%, Гексанол: 2,3 об.%, Na ₂ CO ₃ : 0,001 М, АРТЭС: 2 мг/мл, V _{р. смеси} : 22,6 мл	18 ч	М/В S: непрерывное T: 25 °С	Химиотерапия рака молочной железы	95

Как показано в таблице 2.3, микроэмульсионным методом получают преимущественно сферические наночастицы от 100 до 200 нм. Наиболее распространенным в практике типом эмульсии является В/М. Также можно заметить, что используется многокомпонентная реакционная смесь, содержащая органические растворители и ПАВ, наличие которых, требует тщательного тестирования каждой составляющей синтеза для их дальнейшего применения в пищевых продуктах и фармацевтических препаратах. Например, организации Европейское агентство по безопасности продуктов питания (EFSA) и Управление по контролю за продуктами и лекарствами США (FDA), допускают к применению преимущественно природные ПАВ (например, такие, как лецитины), растительные масла и ограниченный ряд органических фаз (например, этанол, пропано-1, пропиленгликоль и глицерин) [96].

Но, несмотря на это, микроэмульсионные методы нашли многочисленные применения в области получения других одобренных FDA наноматериалов, особенно для разработки эмульгированных форм биологически активных веществ, таких как простагландин E1, галотан, прегнанонон, паклитаксел, флурбипрофенаксетил (Липфен®), подофиллотоксин, такролимус, доксорубин и д. р., а также различных пептидных и белковых соединений [85].

2.1.4 Синтез наночастиц карбоната кальция с использованием природных источников

Биогенные методы получения частиц карбоната кальция из скорлупы (раковины моллюсков и ракушек, яичная скорлупа) или с помощью микроорганизмов в последние два десятилетия привлекли особое внимание исследовательских групп. Повышенный спрос связан, во-первых, с возможностью получения наноразмерных частиц, а, во-вторых, с экологическим аспектом (переработка отходов в материал для дальнейшего применения; продвижение общества к жизни с нулевыми отходами) [97].

Методы получения частиц карбоната кальция из скорлупы делят на прямые и косвенные подходы. Первые также называют необработанные способы и заключаются они в физическом измельчении скорлупы/раковин с помощью шаровых мельниц или ступки и пестика. Обычно, материалы, полученные таким методом, обладают высоким индексом полидисперсности (ИПД) и низкой суспензионной стабильностью, что значительно ограничивает их дальнейшее применение в области биомедицины. Однако, благодаря доступности метода, такие частицы широко применяют в инженерных, электрохимических и экологических технологиях [97].

Косвенные или механохимические методы основаны на химических процессах получения частиц и позволяют контролировать размеры синтезируемого материала. Например, яичная скорлупа или отходы морских ракушек могут быть переварены кислотой и преобразованы в строго контролируемых условиях методом осаждения (рисунок 2.8).

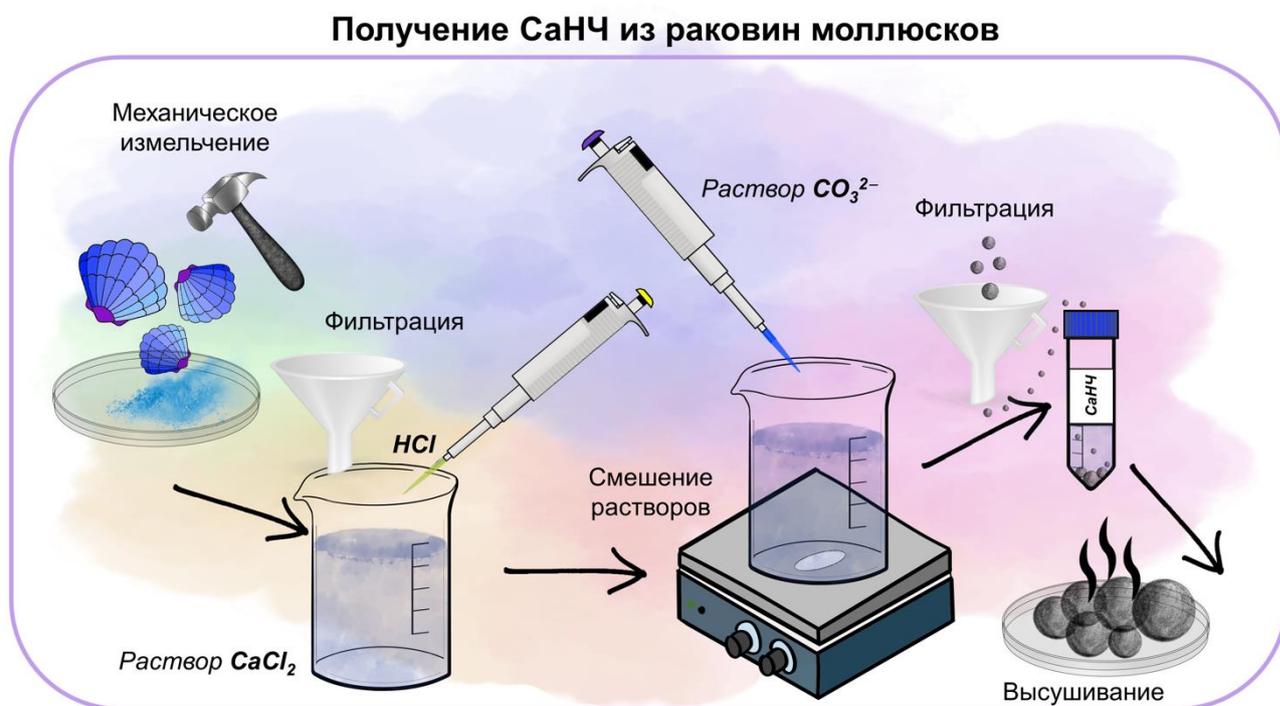


Рисунок 2.8 – Схема синтеза СаНЧ биогенным методом

Характеристики частиц карбоната кальция, полученных механохимическим методом, можно контролировать вариацией концентрации ионов кальция, добавлением полиэлектролитов (неионные или ионные) с различной молекулярной массой и концентрации [98].

Ряд последних достижений обсуждаемого подхода представлены в таблице 2.4.

Таблица 2.4. Применение и условия синтеза CaНЧ, полученные с использованием скорлупы

Размер CaНЧ, нм	Форма	Композиция реакционной смеси	Суммарное примерное время синтеза	Условия обработки очищенных раковин	Применение	□
29 ± 5	Сферическая	Порошок (≈ 75 мкм), полученный из раковин <i>Anadara granosa</i> : 2 г, Додецил диметил бетаинин: 0,5 мл, V _{р. смеси} : 0,5 мл	3 д	S: 1000 об./мин T: 27 °С	Контейнер доксорубицина (куркумина, тимохинона – Thym), для терапии рака молочной железы	52, 99, 100, 101, 102, 103
≈ 40 (частицы с высокой степенью агрегации)	Сферическая	Порошок (≈ 10 – 63 мкм), полученный из раковин ракообразных: 5 г, 5 М Соляная кислота: 20 мл, 0,4 М K ₂ CO ₃ : 10 мл, V _{р. смеси} : 30 мл	4 д	S: не указано T: 25 °С	Разработка промышленного метода производства наночастиц	104
64 ± 22 (частицы с высокой степенью агрегации)	Сферическая	Порошок (≈ 75 мкм), полученный из раковин ракообразных: 2 г Твин 80: 1 мл, V _{р. смеси} : 21 мл	3,5 д	УЗ (15 мин) далее S: 1100 об./мин T: 25 °С	Система доставки лекарств	105

В таблице 2.4, представлены несколько вариантов получения СаНЧ, из которых первый является наиболее распространённым. Концептуально все варианты состоят из трех этапов: 1) механическое измельчение раковин/панцирей ракообразных до микрометровых частиц, 2) дальнейшее измельчение частиц с помощью химической или, реже, физической обработки, 3) фильтрация и высушивание СаНЧ.

Преимуществами этого метода являются экологичность и масштабируемость подхода. Основным недостатком механохимического процесса является вероятность наличия примесей из биогенных отходов и высокая вероятность загрязнения материала в процессе измельчения, а также высокая степень агрегации частиц [106].

В этом же разделе хотелось бы упомянуть про способность денитрифицирующих микроорганизмов образовывать карбонат кальция [107]. Большинство карбонатных отложений, природного происхождения имеют следы деятельности живых организмов. В настоящее время, большинство опубликованных исследований о формировании карбонатных минералов кальция с участием микроорганизмов рассматривают процесс формирования макро- и микрочастиц с возможностью их дальнейшего применения в промышленности строительных материалов [35]. Возможность получения таким способом наноматериалов и их дальнейшее приложении в биомедицине на данном этапе рассмотрена намного меньше [108]. Тем не менее, показано, что при минералообразовании, нуклеация минералов и взаимодействие между компонентами клеток и неорганическими компонентами растворов происходит на наноразмерном уровне. На данном этапе, компоненты, получаемые таким способом, характеризуются высокой степенью агрегированности и микро- / макро- размерным рядом [35, 109].

Таким образом, в первой части обзора литературы рассмотрены основные методы получения наночастиц карбоната кальция, применимых в биомедицине. Преимущества и недостатки каждого из описанных подходов представлены в таблице 2.5.

Таблица 2.5. Преимущества и недостатки основных методов получения наночастиц CaCO_3

Метод	Преимущества	Недостатки	□
Осаждения	Техническая простота; широкий диапазон размера получаемых частиц (10 – 20000 нм)	Требуется тщательный подбор условия синтеза и композиции раствора для получения стабильной суспензии монодисперсных СаНЧ; неравномерный размер и морфология)	110
Микроэмульсии	Высокая степень монодисперсности	Необходима качественная стадия удаления органических добавок, в том числе ПАВ; удаление стабилизирующих веществ может привести к дальнейшей агломерации частиц	111
Газовой диффузии	Низкая стоимость	Длительный синтез с низким выходом	112
Биогенный (механохимический)	Экологичность, масштабируемость	Наличие примесей из биогенных отходов	97

Самыми широко применяемыми подходами из перечисленных являются биогенные методы и осаждение, благодаря масштабируемости, технической простоте и низкой себестоимости. Однако, выбор метода в большей степени зависит от цели дальнейшего применения частиц карбоната кальция, которые будут рассмотрены далее.

2.2 Применение наночастиц карбоната кальция в биомедицине

Наночастицы карбоната кальция и композиты на их основе нашли широкий спектр применений в биомедицине, в том числе в сферах доставки биологически активных соединений, тканевой инженерии, биосенсоров, стоматологии и других [33] (рисунок 2.9).

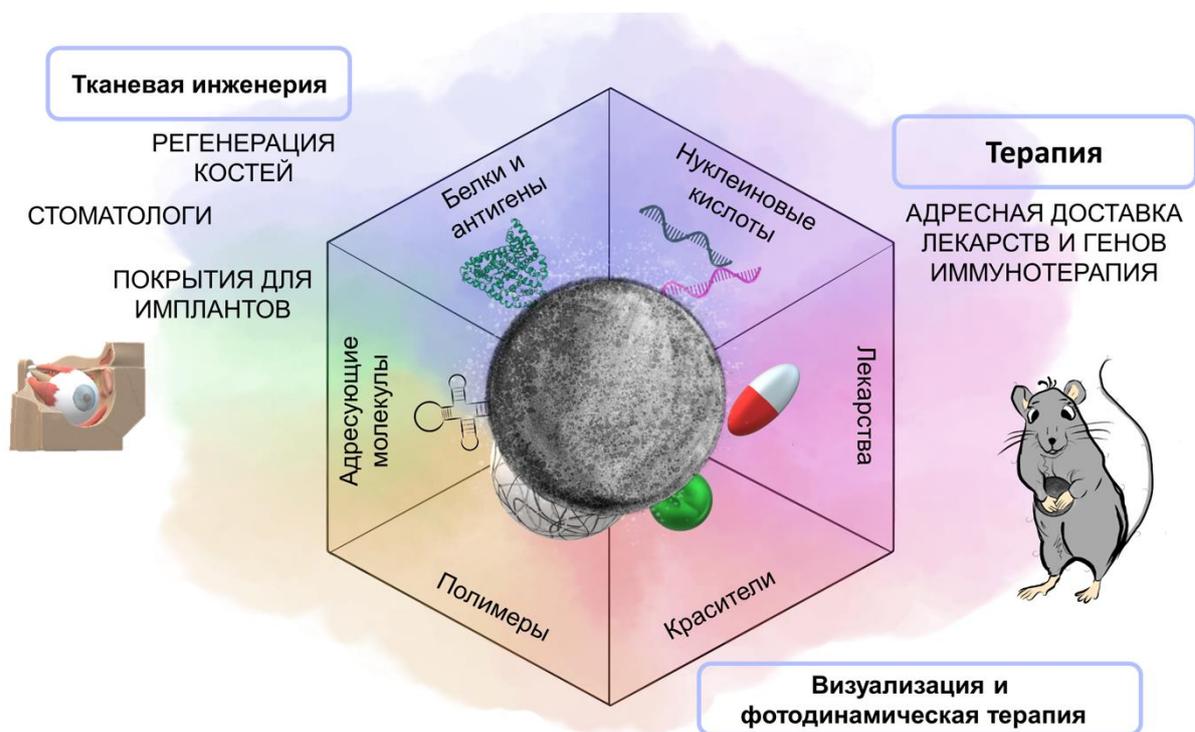


Рисунок 2.9 – Варианты гибридных СаНЧ и области их применения в биомедицине

Повышенный интерес исследователей к применению СаНЧ в первую очередь связан с биосовместимостью, биоразлагаемостью и pH-чувствительностью наноматериалов на основе карбоната кальция, а также доступностью синтетических методов и реагентов [17].

Далее будут рассмотрены варианты применения наноматериалов на основе карбоната кальция и их перспективность для биомедицины, начиная с противораковой терапии.

2.2.1 Терапия онкологии малыми лекарственными молекулами

Разработка новых методов лечения онкологии с применением СаНЧ преимущественно связана с модернизацией форм уже существующих клинически доступных лекарственных препаратов, путём создания «умного» носителя, способного улучшить фармакодинамику и

кинетику малых лекарственных молекул. Увеличение терапевтического эффекта БАС достигается нивелированием недостатков индивидуальных лекарственных препаратов, таких как высокая токсичность, низкая растворимость, недостаточное время полувыведения, отсутствие избирательного действия и т. д. [113].

Направленная доставка противораковых лекарств преимущественно заключается в использовании характерных аномалий и стимулов вблизи опухоли, способствующих концентрированию терапевтического лекарства в область-мишень. К распространенным подходам можно отнести выбор оптимального размера наноматериала, сопоставимого с новообразованными порами вблизи опухолевых сосудов. В таком случае возникает эффект повышенной проницаемости и удержания, характерный для опухолевых тканей (EPR – enhanced permeability and retention, Рисунок 2.10).

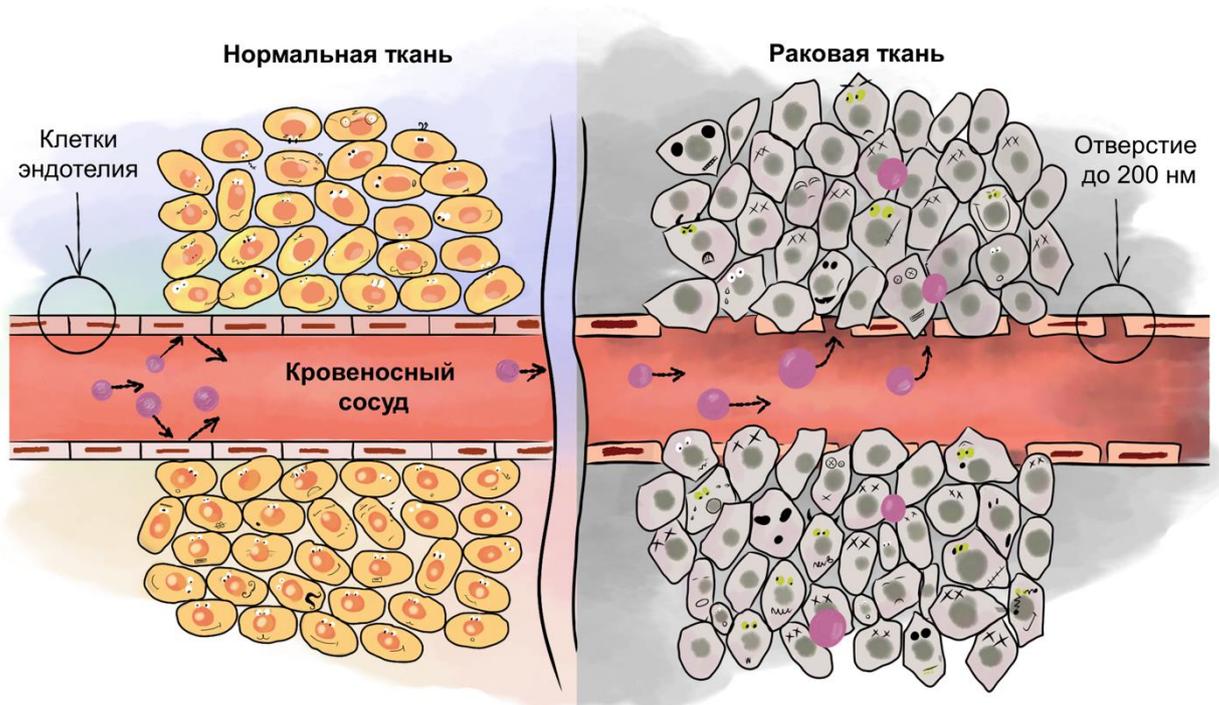


Рисунок 2.10 – Схематичное изображение эффекта EPR

Предпочтительно через такие отверстия между клеток эндотелия проходят наночастицы размером 100 – 200 нм (рисунок 2.10) [114]. Сосуды вблизи опухоли из-за деформации обладают повышенной проницаемостью к частицам сопоставимого с порами размера и концентрируют их в области опухоли. Таким образом, эффект EPR является одним из самых распространённых вариантов пассивного нацеливания [115].

Кроме того, образующаяся деформированная сосудистая сеть часто обладает сниженной способностью доставлять питательные вещества и удалять метаболические отходы из быстро пролиферирующих клеток. В ходе чего формируются гипоксические участки вблизи опухоли протяженностью более чем 100 мкм [116]. Быстрорастущие трансформированные клетки нуждаются в большем количестве энергетических ресурсов, а низкая эффективность транспортировки провоцирует ещё более активный гидролиз (в опухоли уровень гликолиза почти в 200 раз выше, чем в нормальных тканях).

Солидные опухоли дополнительно синтезируют основную часть своего аденозинтрифосфата (АТФ) путём наиболее быстрого окислительного метаболизма с образованием молочной кислоты (рКа 3,86), что приводит к меньшему выделению протонов. Но раковые клетки экспрессируют карбоангидразы, связанные с плазматической мембраной (CAIX – белок, состоящий в семействе цинк-металлопротеиновых ферментов, катализирующий обратимое превращение CO_2 с H^+ в HCO_3^- и H^+). CAIX обеспечивает ускоренную гидратацию образующегося CO_2 из пути окисления пирувата до кислоты угольной кислоты (рКа 6,35) [117, 118]. [119].

Таким образом, ускоренный метаболизм и потребность в АТФ приводит к изменению внеклеточного рН с физиологического (кровоток 7,36 – 7,42) на опухолевый (6,0 – 7,0) [120].

Получение новых носителей противораковых средств – актуальная область исследований. На сегодняшний день не было предложено универсального носителя, способного увеличить терапевтические свойства лекарств и нивелировать их побочные действия до такого уровня, чтобы проблема онкологии перестала быть второй по численности причиной смертности [121]. рН-лабильная природа наночастиц карбоната кальция делает системы доставки на их основе перспективными транспортёрами биологически активных соединений в области с пониженным рН, к которым, в первую очередь, относятся опухолевые ткани [122].

Скорость деградации карбоната кальция увеличивается при уменьшении рН [123]. В литературе представлены детальные исследования растворимости материала, которую определяют, как равновесную концентрацию соли кальция, находящейся в растворе в присутствии избытка твёрдого вещества. Более того, экспериментальные условия сформулированы для определения растворимости солей кальция в зависимости от рН с учетом давления углекислого газа (pCO_2) (рисунок 2.11) [124].

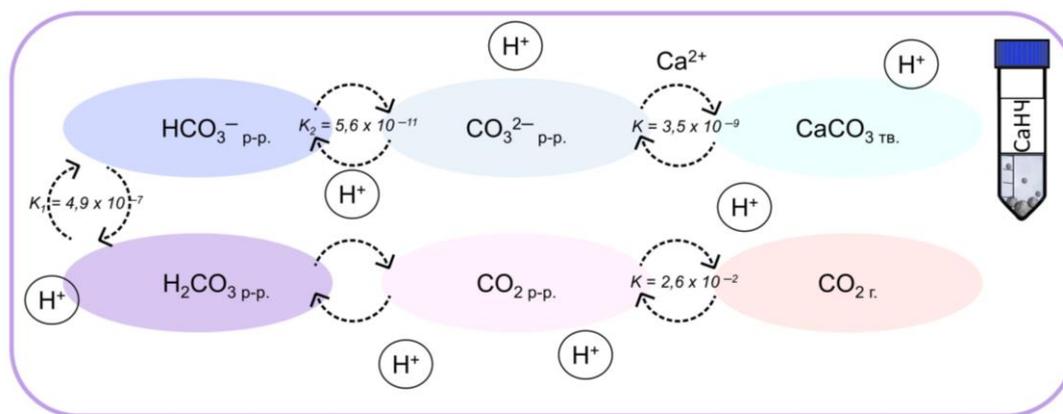


Рисунок 2.11 – Схема равновесных форм карбоната кальция

Из схематичного изображения переходов форм карбоната кальция (CaCO_3) видно, что, при растворении, образуются карбонат-анион (CO_3^{2-}) и бикарбонат (HCO_3^-), секретлируемые кишечником для повышения pH (рисунок 2.11). Анионы находятся в равновесном соотношении с растворенным CO_2 , и, при изменении его концентрации, равновесие будет изменяться, значительно меняя растворимость CaCO_3 .

Для перорального и внутривенного путей введения эта зависимость имеет большое влияние в дополнение к локальным изменениям pH по пути транспорта [125]. Моделируя различные условия кишечной флоры и варьируя количество CaCO_3 , авторы установили, что доля нерастворившегося карбоната кальция увеличивается по мере увеличения исходной массы. В частности, плато процесса достигается при введении 100 мг (CaCO_3 , 50K0205 and 17406EB, Sigma-Aldrich). Дальнейшее увеличение массы карбоната кальция не приводит к сопоставимому увеличению количества растворимых ионов кальция. Кроме того, эффективность разложения зависит от размера частиц: скорость деградации увеличивается с уменьшением частиц, вплоть до появления дополнительных ограничений, связанных с низкой стабильностью наночастиц карбоната кальция размером до 200 нм (гидродинамический диаметр) [50].

При разработке новых наноматериалов на основе карбоната кальция, необходимо детально исследовать не только условия связывания частиц с носителем, но и выход биологически активного соединения из состава комплекса с CaHCl. В отличие от большинства наночастиц, этот процесс будет протекать не только из-за нарушения связи «носитель-БАС», но и благодаря полной или частичной деградации матрицы носителя в условиях с пониженным pH (рисунок 2.12).

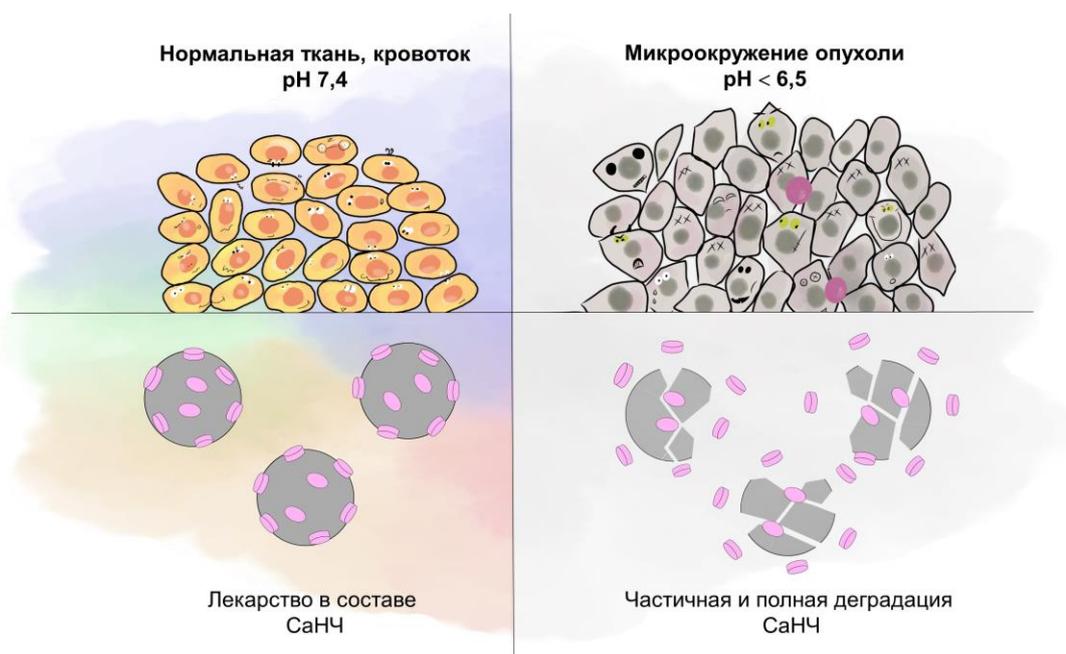


Рисунок 2.12 – Схема равновесных форм карбоната кальция

Разрушение наноматериала в области-мишени может значительно увеличить эффективность извлечения ($E_{f_{rel}}$, %) терапевтического агента вплоть до 100 % (рисунок 2.12) [126, 127]. Для немодифицированных частиц карбоната кальция (200 нм) показано 100% $E_{f_{rel}}$ при pH ниже 5, что обусловлено полной деградацией матрицы носителя, и не более 15 % в условиях, близких к физиологическим [50]. Такие значения $E_{f_{rel}}$ являются не всегда достижимыми для наноносителей другой природы. Например, при $pH \approx 5$, наноматериалы диоксида кремния [128], смешанного оксида железа [129, 130] и их гибриды [131, 132, 133] высвобождают в пределах 40 – 80% от связанного лекарства за первые 24 ч (далее концентрация выходит на плато).

Однако, pH-зависимая деградация наноразмерных частиц карбоната кальция является преимуществом и недостатком материала из-за значительных ограничений при выборе растворов хранения, способа синтеза и дальнейшего использования [134]. В большинстве исследований для стабилизации материала используют модифицированные аналоги наноносителей, часто для этих целей применяют полимерные молекулы [135]. Помимо увеличения коллоидной стабильности при хранении, функционализация поверхности материала также может быть использована для придания новых свойств системе доставки БАС и увеличения терапевтической эффективности (рисунок 2.13).

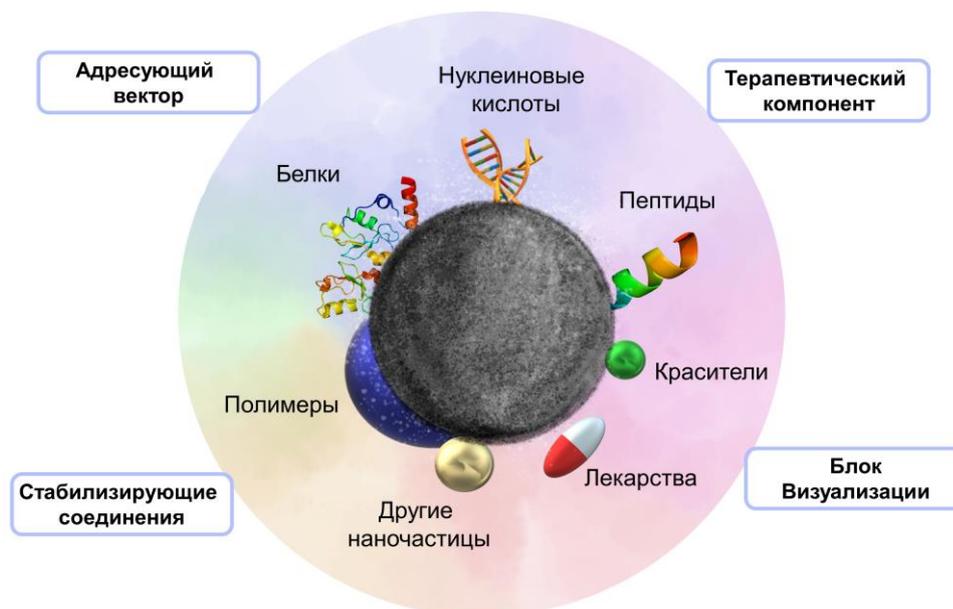


Рисунок 2.13 – Компоненты систем доставки БАС

На рисунке 2.13 приведены наиболее распространённые элементы «умных» систем доставки. Выбор конкретного сочетания функционализирующих покрытий зависит от конечной цели транспортёра.

Зачастую полимерные и белковые слои используются для стабилизации материала, а также увеличения пролонгированности высвобождения лекарственного препарата и времени циркуляции наночастиц в организме [136]. Красители обеспечивают возможность детекции фармакокинетики в организме [137]. Комбинацию с другими наночастицами, обычно, применяют для суперпозиции физико-химических свойств двух типов наноматериалов и обеспечения синергетического эффекта. Например, в случае получения гибрида карбоната кальция со смешанным оксидом железа, возможно объединение магнитных свойств и pH-лабильности [138]; с золотыми наночастицами – появление оптических свойств, способствующих гипертермии [139]. Биомолекулы могут обладать как терапевтическим потенциалом, так и придавать системе адресность. Например, нуклеиновые кислоты могут обладать терапевтической активностью индивидуально и совместно с лекарственными молекулами, и обеспечивать активное нацеливание в область-мишень [140].

Использование адресующих молекул для увеличения эффективности концентрирования транспортера в заданной области – метод, основанный на узнавании транспортером специфических свойств опухоли. Распространённо применяют нацеливание на дендритные клетки, опухолеассоциированные макрофаги и фибробласты [141].

В таблице 2.6 будут просуммированы последние достижения в области доставки противораковых сред системами на основе СаНЧ.

Таблица 2.6. Системы доставки лекарств на основе СаНЧ

Носитель	БАС	Характеристики	Основные результаты	□
СаНЧ-Гепарин (СаНЧ-Нер); СаНЧ-Этиленгликоль (СаНЧ-Еg)	Изоотиоцианат родамина В (Rho)	СаНЧ: 3580 нм; СаНЧ-Нер: 835 нм; СаНЧ-Еg: 564 нм; Ёмкость (E) _{СаНЧ-Нер} : 50,4 мкг/моль; E _{СаНЧ-Еg} : 130,5 мкг/моль	E_{rel} СаНЧ-Еg: при pH 6 – 65%; при pH 7 ≤ 10% (плато за 3 дня). После инкубации с СаНЧ-Еg метаболическая активность клеток MDA-MB-231 составила 70,4 %, SK-BR- 3 – 81,2 % и MCF10A – 88,7 %.	40
СаНЧ	DOX	СаНЧ: 204 ± 8 нм; СаНЧ@DOX: 204 ± 8 нм; E : 659 ± 5 мкг/мг	E_{rel} : при pH 5 – 80%; pH 7 – 20% (плато за 2 ч). IC 50 (A549): СаНЧ/DOX 0,97 ± 0,04 мкМ; DOX 2,41 ± 0,02 мкМ.	50
СаНЧ	фотосенсибилизатор (хлорин е6, Се6)/ DOX	СаНЧ: < 100 нм	При внутриопухолевом введении СаНЧ, накопление частиц в опухоли >97%, при внутривенном – 12,4 %. После комбинированной фото- и химиотерапии СаНЧ@DOX/Се6 вес опухоли меланомы B16-F10 у мышей сократился на 94% при внутриопухолевом введении и на 71% – при внутривенном.	63
СаНЧ, полученные в присутствии ПВП и DOX	DOX	СаНЧ/DOX: 213 ± 10 нм; Доля DOX: 4.6%.	E_{rel} : при pH 6 – 39 %; при pH 7 – 12,6 % (плато за 6 ч). IC 50 (CT26): СаНЧ/DOX и DOX имели близкую эффективность. <i>In vivo</i> показаны эффективное проникновение СаНЧ в опухоль и возможность ультразвуковой детекции.	67

CaHЧ	Гемцитабин (GEM)/Триапин (ингибитором нуклеотидредуктазы)	CaHЧ: 106 ± 5 нм; CaHЧ@GEM/Триапин: 129 ± 7 нм; <i>E</i> к GEM: ≈ 400 мкг/мг; <i>E</i> к Триапин: ≈ 1 мг/мг.	При pH 5,7 GEM в течение 24 часов высвободилось ≈ 80 % и при pH 7,4. не более 40%. Триапин имел близкие численные показатели, но более пролонгированный профиль высвобождения. На 7-е сутки темпы изменения объема опухоли в группах контроля, CaHЧ, GEM, Триапин, GEM/Триапин и CaHЧ@GEM/Триапин составили $466 \pm 57\%$, $476 \pm 18\%$, $408 \pm 30\%$, $302. \pm 3\%$, $103 \pm 18\%$, $17 \pm 5\%$ соответственно.	142
CaHЧ, полученные из раковин ракушек	DOX/тимохинон (Thym)	CaHЧ: 29 ± 5 нм	IC 50 (MDA-MB-231): CaHЧ@DOX $2,2 \pm 0,1$ мкг/мл; CaHЧ@Thym $14,1 \pm 0,2$ мкг/мл; CaHЧ@ DOX/Thym $2,36 \pm 0,04$ мкг/мл; DOX $2,75 \pm 0,03$ мкг/мл; Thym $16,9 \pm 0,2$ мкг/мл. CaHЧ@Thym оказывал наименьшее влияние на инвазию клеток через базальную мембрану (97,7%), за ним следовали CaHЧ@DOX (80,1%), DOX (71,3%), Thym (54%) и CaHЧ@ DOX/Thym (51,8%) по сравнению с контролем DOX/Thym (41,8%).	102
CaHЧ, полученные из раковин ракушек с использованием Твина 80	Гефитиниб (GEF)/ Паклитаксел (PTXL)	CaHЧ: 64 ± 22 нм; CaHЧ@GEF: 84 ± 28 нм; CaHЧ@PTXL: 78 ± 26 нм; CaHЧ@GEF/PTXL: 87 ± 27 нм; <i>E</i> : < 200 мкг/мг	E_{rel} для GEF и PTXL при различных значениях pH 7,4, 6,5 и 5,6 не превышали 30% за 100 ч.	105; 143

CaHЧ	DOX/Thym	CaHЧ: 54 ± 10 нм; CaHЧ@DOX/Thym: 60 ± 11 нм	При pH 4,8 достигнуто 100% высвобождения лекарственного средства, pH 6 – 70%, pH 7,4 – 50%. Жизнеспособность клеток составляла 80% при концентрации CaHЧ 1000 мкг/мл. IC 50 (MDA-MB-231): CaHЧ@DOX $0,97 \pm 0,08$ мкг/мл; CaHЧ@Thym $1,5 \pm 0,1$ мкг/мл; CaHЧ@DOX/Thym $0,47 \pm 0,06$ мкг/мл; DOX $0,3 \pm 0,2$ мкг/мл; Thym $0,56 \pm 0,08$ мкг/мл; DOX/Thym $0,5 \pm 0,1$.	127, 144
CaHЧ, модифицированные индоцианиновым зелёным (ICG), совместно с DOX, инкапсулировали в хондроитинсульфате (PSC)	DOX	CaHЧ: 123 ± 10 нм; CaHЧ-ICG: 221 ± 12 нм; CaHЧ-ICG-PSC: 335 ± 30 нм; CaHЧ-ICG-PSC@DOX: 407 ± 30 нм; Доля DOX: 6.79%.	E _{rel} : при pH 5 – 43,8 %; 29,6% – при pH 7 (плато за 96 ч). IC 50 (4T1): CaHЧ-ICG-PSC@DOX 5 мкг/мл; DOX 7 мкг/мл. Объем опухоли (4T1 у мышей Balb/c) уменьшился сильнее в 2 раза при обработке CaHЧ-ICG-PSC@DOX в сравнении с индивидуальным DOX.	145
CaHЧ-SiO ₂ , фторированные и покрытие слоем фосфолипидов (CaHЧ-SiO ₂)	DOX	CaHЧ-SiO ₂ : 353 ± 54 нм	E _{rel} из CaHЧ-SiO ₂ было дополнительно инициировано ультразвуком эффективнее в 1,6 раза в кислых водных условиях, чем в физиологических. Гистологические исследования продемонстрировали возможность вызывать кавитационную активность наночастиц <i>in vivo</i> , провоцируя разрушение сосудов и повышая интенсивность флуоресценции DOX в области опухоли в три раза.	146

<p>Наногибрид СаНЧ и фосфата кальция (СаР), модифицированный липидным слоем и нацеленный на рецептор фолиевой кислоты (ФА),</p>	<p>α-токоферилсукцинат (α-TOS)/мРНК</p>	<p>СаНЧ-СаР@ α-TOS: 40 нм; Доля α-TOS: 15%; СаНЧ-СаР@ α-TOS/мРНК: 50 нм; Доля мРНК: 40 мкг/мг.</p>	<p>Клеточное поглощение СаНЧ-СаР-ФА усиливается за счёт ФА-опосредованного пути до 55% проникновения при 10% мас. ФА. Совместная доставка α-TOS/мРНК усиливает апоптотический эффект за счёт взаимодействия между выделением реактивных видов кислорода. Доля клеток, обработанных СаНЧ-СаР@ α-TOS/мРНК, находившееся в позднем апоптозе оставила $35 \pm 2 \%$, а некротических – $17 \pm 3 \%$</p>	<p>147, 148</p>
<p>СаНЧ, модифицированы аптамерами MUC1-димера (сверхэкспрессирующая мишень)</p>	<p>Эпирубицина (Epi), Мелиттин (Mel)</p>	<p>СаНЧ: 300 нм; E_{Epi}: 22,7 нмоль/мг; E_{Mel}: 6,4 нмоль/мг</p>	<p>Efrel (Epi): при pH 5 – 80%; при pH 7 – 30% (плато за 48 ч). Жизнеспособность клеток (MCF-7) после обработки СаНЧ, Mel, Epi, СаНЧ-MUC1@Epi, СаНЧ-MUC1@Mel и комбинация двух последних составила $95,79 \pm 3\%$, $91,9 \pm 2,5\%$, $86,3 \pm 8\%$, $39,48 \pm 2,8\%$, $82,95 \pm 6\%$ и $16 \pm 3\%$ соответственно. Жизнеспособность клеток (C26) для тех же соединений: $97,7 \pm 3\%$, $81,9 \pm 7,64\%$, $86,5 \pm 1,8\%$, $44,8 \pm 5,2\%$, $67,15 \pm 8\%$ и $18,18 \pm 3\%$. Размеры опухолей мышей в группах PBS, Epi и комплекс СаНЧ-MUC1@Epi, СаНЧ-MUC1@Mel после 22 дней лечения составили $6832,26 \pm 218 \text{ мм}^3$, $3743,38 \pm 285 \text{ мм}^3$ и $2162 \pm 223 \text{ мм}^3$ соответственно.</p>	<p>149</p>

CaHЧ, модифицированные циклодекстрином и глицерином	Ацетат токоферола (АТ)	CaHЧ: 200 нм; <i>E</i> : 550 мкг/мг	$E_{f_{rel}}$: при pH 5 > 90%; при pH 7 – высвобождения не наблюдается.	150
CaHЧ с магнитным ядром (Fe ₃ O ₄)	DOX	CaHЧ: 204 ± 8 нм; CaHЧ-Fe ₃ O ₄ : 121 ± 6 нм CaHЧ-Fe ₃ O ₄ @DOX: 129 ± 3 нм; <i>E</i> : 160 -1900 мкг/мг	$E_{f_{rel}}$: при pH 5 > 90%; 20% – при pH 7. IC 50 (HeLa): CaHЧ-Fe ₃ O ₄ @DOX 1,2 ± 0,1 мкМ; DOX 2,8 ± 0,1 мкМ; IC 50 (MCF-7): CaHЧ-Fe ₃ O ₄ @DOX 2,0 ± 0,1 мкМ; DOX 3,1 ± 0,3 мкМ.	151

Развитие методов и подходов нанотехнологии за последние годы позволило добиться получения наноразмерных частиц карбоната кальция и разработать подходы их стабилизации. Размеры, оптимальные для внутривенного введения и применения эффекта EPR, совместно с pH-зависимой стабильностью позволили найти применение карбонату кальция не только в качестве пищевых и промышленных добавок, но и в составе компонента систем доставки лекарств (таблица 2.6).

Дополнительно к описанным подходам применения СаНЧ в качестве транспортёра лекарств, в недавних исследованиях показана возможность использования противораковой специфической терапии путём искусственной модуляции внутриклеточной концентрации кальция (Ca^{2+}), что нашло применение в иммунотерапии. Ca^{2+} регуляция имеет решающее значение для нормального функционирования клеточной биохимии. Буферная способность митохондрий к Ca^{2+} может быть нарушена комбинацией кислорода и переизбытка катионов кальция, что будет способствовать апоптозу клеток. Аномальная частота передачи сигналов Ca^{2+} в раковых клетках, из-за ускоренного деления, обеспечивает избирательность подхода, который заключается в одновременной доставке Ca^{2+} и кислорода [152].

Авторы показали эффективность применения СаНЧ для устранения физико-химических нарушений опухолевого микроокружения для стимуляции противоопухолевой иммунитетта организма. В следствие иммуносупрессивности микроокружения опухоли (повышенная кислотность и уровень активных форм кислорода (АФК), гипоксия) происходит значительное снижение иммунитетта и, как следствие, инфильтрации противоопухолевых иммунных клеток. Иммунотерапевтические СаНЧ, нагруженные каталазой (СаНЧ@CAT), были исследованы в качестве универсального мультимодулятора для нормализации микроокружения опухоли (рисунок 2.14) [153].

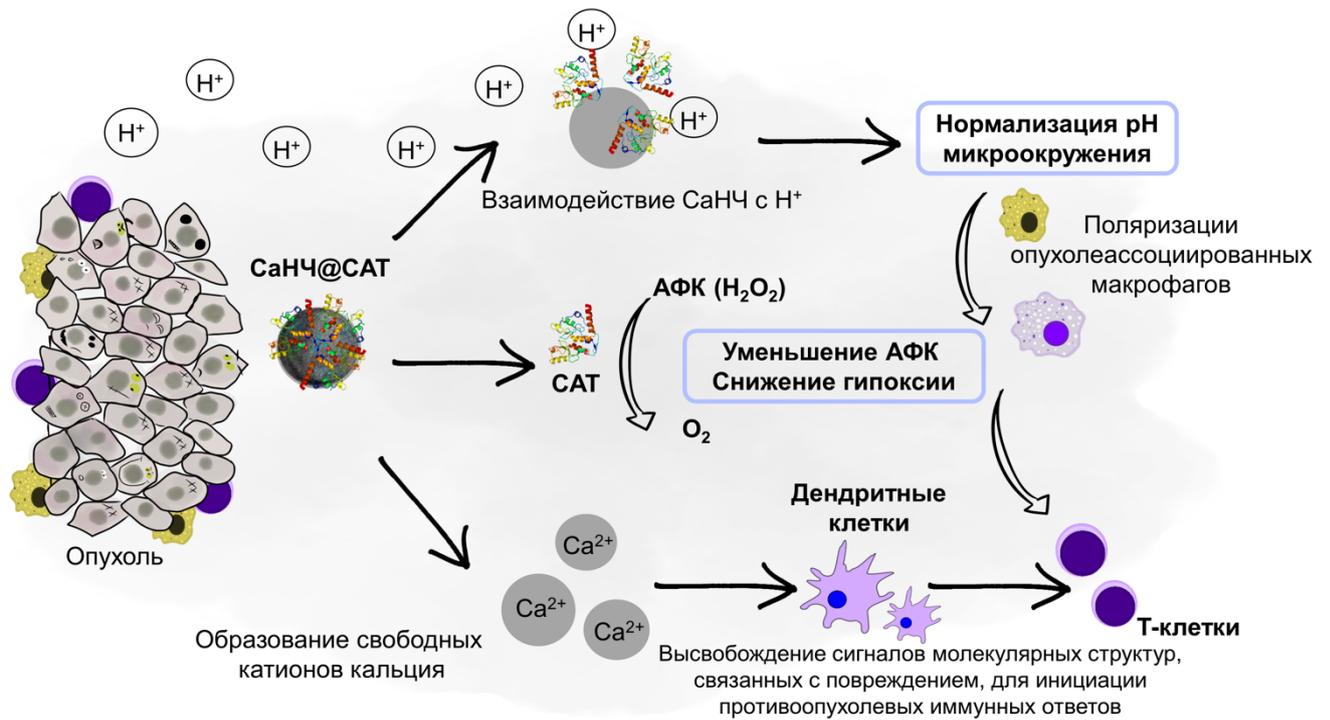


Рисунок 2.14 – Схема совместного действия каталазы и CaHЧ [153]

CaHЧ могут реагировать с избыточными протонами опухолевого микроокружения для нормализации pH. Каталаза ускоряет разложение АФК, генерируя O₂. Высвобождение Ca²⁺ приводит к избытку кальция в опухолевых клетках, что способствует запуску сигналов, связанных с апоптозом и инициацией противоопухолевых иммунных ответов. В работе были получены методом осаждения CaHЧ, инкапсулированные каталазой (доля каталазы 4%). Размер композита составил 187 нм в нормальных условиях (pH 7,4) и 40 нм при pH близком к опухолевому (pH 6,5). Показано, что нормализация опухолевого окружения способствует улучшенной восприимчивости к препарату aPD-1 и контролю роста опухоли (как леченных, так и первичных случаев) [153].

Аналогично, в исследовании использовали совместное влияние избытка Ca²⁺ и противоопухолевого препарата куркумина. CaHЧ (≈ 100 нм) с лекарством обрабатывали фосфолипидом для стабилизации платформы (≈ 500 нм). Доля лекарства в составе композита – 5,12 %. Полученные результаты показывают, что система может специфически повышать внутриклеточную концентрацию Ca²⁺ (до 82 % за 6 ч), вызывая перегрузку катионов кальция и запуск апоптоза на клетках MCF-7, сохраняя при этом нормальные гепатоциты (L02) [152].

Понимание состояния испытаний CaHЧ в качестве носителей БАС на лабораторных животных является важным для прогнозирования дальнейшего применения материала в биомедицине [154]. И, как было показано ранее, эффективность конструкции зависит от выбора стратегии введения носителя, которая определяется областью-мишенью, а также недостатками

БАС, которые могут быть решены с помощью СаНЧ [63, 155]. Для СаНЧ в исследованиях *in vivo* преимущественно применяют внутривенные [63, 90, 126 156, 157, 158, 159] и внутримышечные инъекции [160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167]. Кроме того, опубликованы результаты исследований на модельных животных применения перорального пути введения наночастиц карбоната кальция [44, 168, 169, 170, 171], интраназального [172, 173, 174], лёгочного [175, 176, 177, 178] и трансдермального [179, 180, 181, 182, 183, 184, 185] введений.

Применение наночастиц карбоната кальция в терапии онкологии представляет собой перспективное направление, которое может значительно изменить подходы к лечению злокачественных опухолей. СаНЧ обладают специфическими свойствами, такими как высокая биосовместимость, рН-лабильность и высокая ёмкость по отношению к противоопухолевым препаратам, что делает их перспективными наноносителями для использования в таргетной терапии.

Однако, несмотря на полученные результаты, необходимы дополнительные исследования для оценки долгосрочной безопасности наночастиц, их метаболизма и потенциальных токсических эффектов. Кроме того, важна возможность масштабируемого стандартизуемого воспроизводимого синтеза таких наноконструкций.

В заключение, наночастицы карбоната кальция могут стать широко применимым инструментом для реализации новых путей лечения раковых заболеваний. Однако, для реализации этого потенциала, необходим комплексный подход, включающий междисциплинарные исследования, которые помогут преодолеть существующие барьеры и обеспечить безопасное и эффективное применение этих технологий в клинической практике.

2.2.3 Системы доставки нуклеиновых кислот / генная терапия

Проблема отсутствия подходов к сохранению терапевтических свойств нуклеиновых кислот (НК, например, плазмидные ДНК, антисмысловые олигонуклеотиды, миРНК) внутри организма значительно ограничивает применение современных успехов генной терапии, в частности для разработки эффективных вакцин и терапевтических средств нового поколения [186]. Решением этой проблемы могут быть конструкции, препятствующие деградации БАС внутренними защитными системами организма, приводящих к утрате терапевтических свойств НК (ферментативная деградация в кровотоке, фагоцитоз, почечная экскреция, и т. д.) [187]. Причём для эффективного использования такого метода необходим носитель, способный к

транспорту терапевтических молекул внутрь клетки-мишени, что значительно ограничивает применение существующих вариантов систем доставки [188].

Одним из основных направлений исследований в этой области является использование вирусных векторов в качестве носителя. Показано, что такие конструкции могут эффективно доставлять нуклеиновые кислоты в целевые области. Однако, несмотря на бесспорные преимущества, вирусные частицы имеют ряд недостатков, связанных с иммунным ответом организма пациента, ограниченной ёмкостью для переноса генетической информации, а также сложностью и стоимостью производства таких транспортёров. В качестве альтернативы для решения проблемы доставки генов рассматривают широкий выбор не вирусных частиц (например, липосомальные, полимерные, неорганические частицы). Однако, несмотря на сниженную иммуногенность, по сравнению с вирусными частицами, их эффективность всё ещё ниже, чем у вирусных векторов [189]. Наиболее распространённым носителем для доставки биологически активных веществ (не только НК, но и лекарственные агенты) являются липосомальные частицы. Благодаря природе материала, при формировании, частицы образуют защитный слой вокруг НК, который позволяет модифицировать транспортер для дальнейшего увеличения эффективности доставки в конкретные клетки или ткани. Подход обеспечивает целевое воздействие НК, что способствует снижению побочных эффектов и увеличению эффективности терапии. Однако, липосомальные носители не лишены недостатков, связанных с низкой коллоидной стабильностью, агрегацией, ограниченным сроком хранения, а также взаимодействием транспортёра с белками крови и другими биомолекулами из биологических растворов, что приводит к образованию "белковой короны". Формирование такого комплекса значительно искажает изначальные фармакокинетические свойства липосомальной композиции (размер, поверхностный заряд, свойства и т. д.) [190].

Другой перспективной альтернативой из ряда биodeградируемых частиц могут выступать материалы на основе карбоната кальция, благодаря отсутствию токсичности и рН-лабильности [17, 191]. Перспективность этого подхода заключается в том, что при попадании таких частиц в клетку, они будут склонны к деградации и, как следствие, высвобождению нуклеиновой кислоты внутрь клетки. Однако, получение стабильной суспензии монодисперсных частиц карбоната кальция, содержащих терапевтическое количество НК, является отдельной материаловедческой задачей, что связано с природой материала, одноименностью зарядов носителя и транспортируемой молекулы, а также склонностью частиц к агрегации [122].

В ряде работ авторы повысили эффективность присоединения НК к частицам карбоната кальция, путём оптимизации состава нанокompозита и включением в него дополнительных компонентов.

Chao-Qun Wang и коллеги получили бифункциональные наночастицы для доставки НК (KALA/PS/CaCO₃/НК) на основе карбоната кальция, катионного клеточно-проникающего пептида (KALA) и протамин сульфата (PS, специфический антагонист гепарина) (рисунок 2.15) [192].

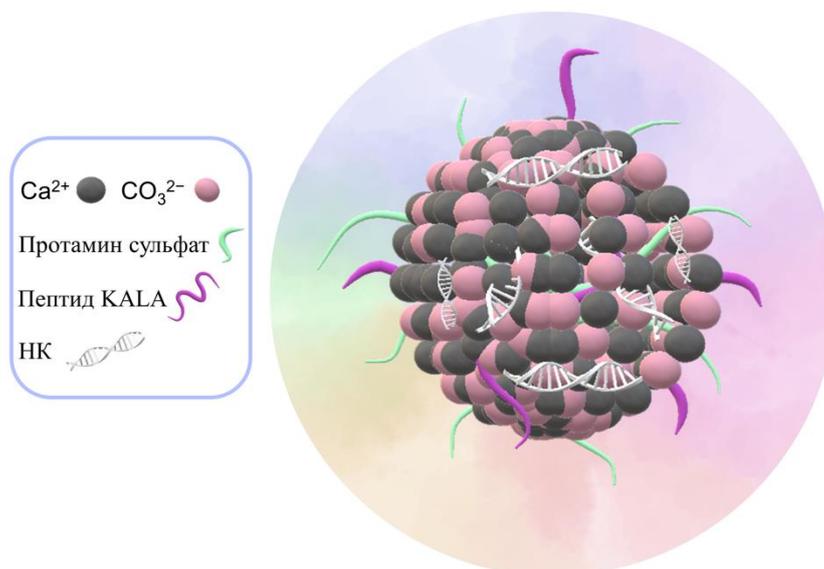


Рисунок 2.15 – Дизайн системы доставки НК: KALA/PS/CaCO₃/НК [192]

Функционализированные наночастицы были приготовлены методом осаждения в присутствии ионов, образующих CaCO₃, и всех функциональных компонентов (KALA, PS, НК). В качестве контролей были также приготовлены CaCO₃, содержащие одну или две функциональных единицы: CaCO₃/НК, PS/CaCO₃/НК, KALA/CaCO₃/НК. Полученные в работе результаты обобщены в таблице 2.7.

Таблица 2.7. Сравнительные характеристики (гидродинамический размер (d), дзета-потенциал (ζ), Эффективность присоединения НК,) образцов CaCO₃/НК, PS/CaCO₃/НК, KALA/CaCO₃/НК, KALA/PS/CaCO₃/НК [192]

Образец	d, нм	ζ , мВ	Эффективность присоединения НК, %*
CaCO ₃ /НК	323 ± 24	-0,9 ± 0,2	62
PS/CaCO ₃ /НК	231 ± 9	2,2 ± 0,7	95
KALA/CaCO ₃ /НК	318 ± 5	0,2 ± 0,4	67
KALA/PS/CaCO ₃ /НК	196 ± 12	2,8 ± 1,2	98

* – за 100 % брали 1 мг НК.

Измерения гидродинамического размера (d) и дзета-потенциала (ζ) показали, что наночастицы KALA/PS/CaCO₃/НК демонстрируют наименьший размер и наибольший дзета-потенциал. Детекция трансфекции генов *in vitro* (на линиях 293Т и HeLa) показала, что, по сравнению с немодифицированными (CaCO₃/НК) и монофункционализированными наночастицами (PS/CaCO₃/НК и KALA/CaCO₃/НК), наночастицы с двойным функционалом (KALA/PS/CaCO₃/НК) продемонстрировали значительно более высокую эффективность проникновения НК в клетку, даже в сравнении с НК, обработанной липофектамом (разница более 25 %). В обсуждаемой работе авторы повысили эффективность присоединения НК к наночастице более, чем на 30 % за счёт применения протамин сульфата в композиции с карбонатом кальция. Вероятно, компонент способствовал изменению отрицательного заряда транспортёра на положительный, и как следствие, участие не только гидрофобных, но и электростатических взаимодействий в образовании комплекса НК-НЧ. Также в работе показано эффективное клеточное проникновение наносистемы клеточный барьер, который является одним из значительных ограничений практического применения генной терапии.

В другой работе исследовали возможность доставки малой интерферирующей РНК (siRNA), нацеленной на фактор роста эндотелия сосудов-С (VEGF-С – важный индуктор опухолевого лимфангиогенеза). Путём длительного осаждения (синтез более 4 д) в присутствии SDS и цитрата натрия были получены СаНЧ диаметром 58 нм и дзета-потенциалом +28,6 мВ. Благодаря нетипичному положительному заряду, СаНЧ предпочтительно провзаимодействовали с ДНК посредством электростатических взаимодействий. Показано увеличение физиологической стабильности НК: ДНК не разрушается в 10% FBS при 37 °С в течение 12 ч. Более того, включение НК в СаНЧ обеспечивало высокую эффективность трансфекции, как и липофектин (приблизительно 65%). В исследовании продемонстрирована значительно меньшая токсичность ДНК (на линии SGC-7901) в комплексе СаНЧ/ДНК (2:30 мкг) в сравнении с липосомальным аналогом (10:2 мкг). Этот эффект авторы объясняют субмикронным размером комплекса, а также тем, что двухвалентный катион металла Ca²⁺ может образовывать ионные комплексы с остовом нуклеиновой кислоты и дополнительно стабилизировать структуры ДНК. Все эти свойства способствуют эффективному проникновению через мембрану клетки посредством эндоцитоза, опосредованного ионными каналами [193].

Авторы в своём исследовании синтезировали CaCO₃ (900 нм) и модифицировали материал полиэтиленгликолем (PEI), получив композит PEI-CaCO₃ для адсорбции гена p53. После трансфекции p53 нагруженные PEI-CaCO₃ значительно снижали пролиферацию опухолевых клеток. Несмотря на крупные размеры композита, авторами показано отсутствие токсичности частиц до 5 мг/мл [194].

Несмотря на потенциал систем доставки НК наночастицами карбоната кальция, количество статей демонстрирующий результаты исследований за последние годы невелико, с чем связано отсутствие обзоров, полностью посвящённых этой теме. Вероятно, это явление связано с методологическими преградами устойчивого соединения СаНЧ и НК из-за отрицательного заряда, большого размера и легкой деградации частиц [17].

Область генной терапии является одной из самых быстроразвивающихся и открытой для новых решений. Многие проблемы, которые могли бы быть решены применением эффективного носителя, до сих пор находятся на стадии исследования. К ним относятся увеличение эффективности лечения онкологических, бактериальных и грибковых заболеваний. В случае успешной доставки НК и сохранения ее биологической активности, станет возможно не только продлить, но и значительно увеличить качество жизни людей с наследственными генетическими патологиями, такими, как муковисцидоз, нарушения иммунной системы, гемофилия и другие [31]. Помимо терапии, ожидается, что применение нуклеиновых кислот значительно увеличит чувствительность диагностических методов *in vivo*, за счёт селективности узнавания последовательностей мишени [195].

Кроме того, возможность одновременного использования препаратов на основе химиотерапии и нуклеиновых кислот позволит значительно снизить множественную лекарственную устойчивость и повысить эффективность лечения, путём синергии свойств биологически активных соединений. Этот метод чаще применим в исследованиях, направленных на повышение эффективности лечения онкологии, использованием сочетания методов совместной доставки химиотерапевтических препаратов и нуклеиновых кислот [196].

В следующей работе двуцепочную тетраэдрическую НК (тДНК), полученную технологией ДНК-оригами, использовали не как терапевтический агент, а в качестве ограничительного каркаса минерализации кристаллов СаНЧ. Показано, что тДНК является эффективным носителем интеркалирующих препаратов (на примере DOX), однако, её нестабильность в физиологических условиях создает проблемы для контролируемого высвобождения лекарств [36]. Таким образом, СаНЧ использовали для сохранения стабильности тДНК (длина ребра тетраэдра 7,14 нм) в физиологических условиях. Комплекс тДНК-СаНЧ (треугольная форма, диаметр ≈ 50 нм; высота ≈ 10 нм) получали методом осаждения, после этапа синтеза, композит инкубировали с DOX для получения DOX/тДНК-СаНЧ (61 ± 7 нм) (рисунок 2.16).

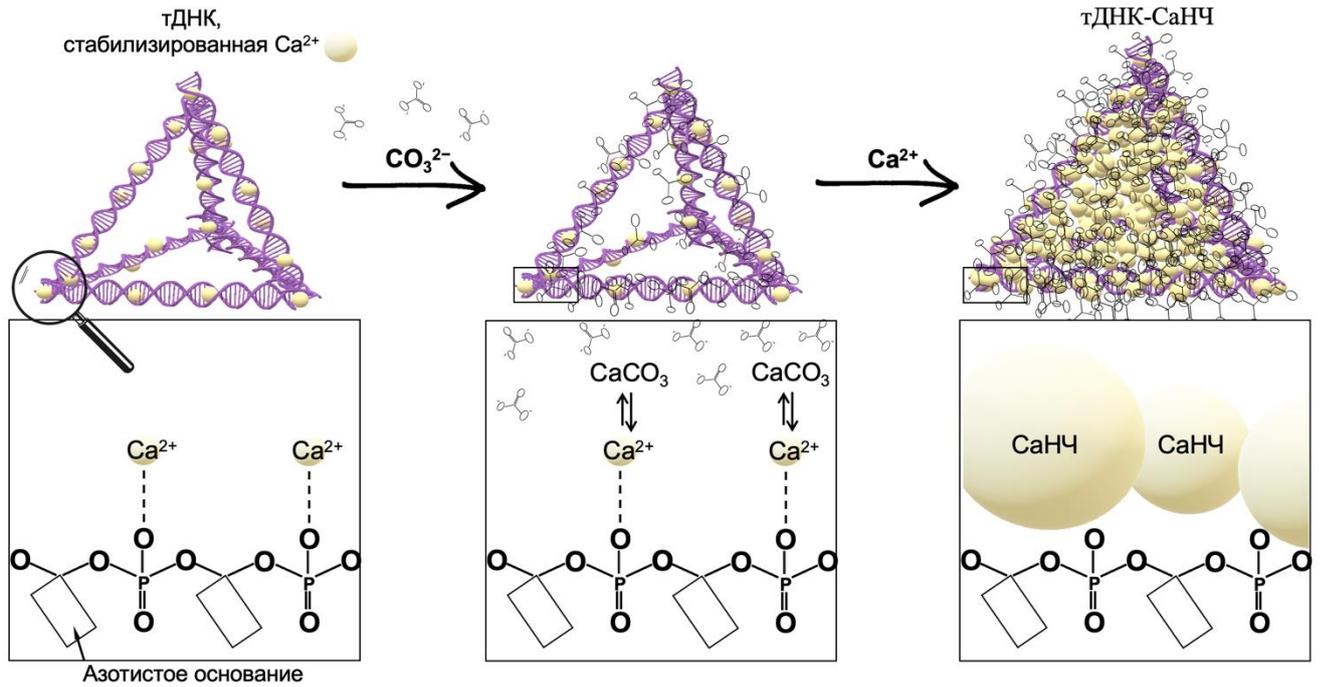


Рисунок 2.16 – Дизайн комплекса тДНК-СаНЧ [43]

Эффективность связывания лекарства с носителем без потери дисперсности частиц составила 36,0 % (при молярном соотношении DOX к тДНК-СаНЧ как 18:1). Более того, в работе продемонстрирована pH-лабильность конструкции: при pH 5,5 из DOX/тДНК-СаНЧ ($d \approx 10$ нм) высвободилось 80 % DOX (за 5 ч) в то время, как при pH 7,4 ($d \approx 50$ нм) – 45 %. Показано отсутствие токсичности DOX/тДНКDN-СаНЧ вплоть до 100 нМ [43]. Несмотря на то, что авторы напрямую не подтвердили сохранение физиологических свойств НК (например, такие как экспрессия генов), косвенным доказательством биологической активности можно выделить сохранение тетраэдрической формы комплекса, а также высокую эффективность удерживания DOX, которая характерна двуцепочному состоянию. Работа Cheng J. и коллег демонстрирует дальнейший потенциал для эффективной одновременной инкапсуляции НК и малых лекарственных молекул для терапии.

Группа исследователей разработала покрытые липидом наночастицы карбоната кальция для совместной доставки сорафениба (низкомолекулярное противоопухолевое средство) и miR-375 (супрессор опухолей) (рисунок 2.17) [197].

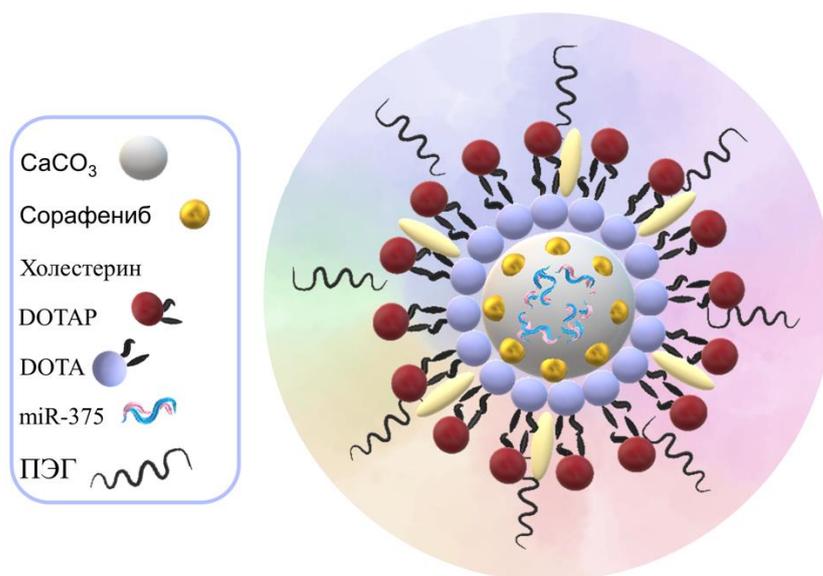


Рисунок 2.17 – Дизайн системы доставки сорафениба и miR-375 на основе CaНЧ [197]

Композит ($d: 101 \pm 12$ нм; $\zeta: 40 \pm 3$ мВ) характеризуется сферической формой с тёмным ядром из карбоната кальция и светлой липидной оболочкой. Эффективность связывания частиц с сорафенибом и miR-375 составила $35 \pm 9\%$ и $55 \pm 12\%$ соответственно. Авторы продемонстрировали, что включение БАС в состав CaНЧ значительно увеличивает их стабильность, пролонгированность и направленность высвобождения как miR-375, так и сорафениба. Более того, ингибирование аутофагии посредством miR-375 значительно повысило эффективность сорафениба в терапии. Многообещающие данные *in vitro* и *in vivo*, полученные в исследовании, демонстрируют что модуляция аутофагии в раковых клетках с помощью комбинации miR-375 и сорафениба может быть перспективным путём лечения прогрессирующей гепатоцеллюлярной карциномы [197].

Немногочисленное количество работ демонстрируют успешные результаты совместной доставки терапевтических средств. Несмотря на полученные достижения, много вопросов остаются для дальнейших исследований, такие как эффективность связывания БАС с CaНЧ, отложенная токсичность, приобретенная устойчивость и т. д.

Однако, необходимо продолжать исследования в этой области, чтобы улучшить эффективность и безопасность методов транспорта нуклеиновых кислот и преодолеть препятствия, связанные с барьерами клеточной мембраны и иммунной системы. В случае разработки эффективных подходов к доставке, химия нуклеиновых кислот может быть использована для создания новых лекарственных препаратов, что является важным направлением в фармацевтической индустрии [32].

2.2.4 Тераностика

Тераностика — это область медицины, которая объединяет диагностику и терапию. Она позволяет использовать один и тот же препарат, как для выявления заболевания, так и для его лечения. Возможность одновременного применения лечения и визуализации открывает новые возможности для персонализированной медицины, позволяя более точно подбирать лечение в зависимости от индивидуальных особенностей пациента и его заболевания [198].

Для материалов на основе CaCO_3 показана диагностическая возможность, что делает их перспективными кандидатами применения в области тераностики [199]. Такие платформы на основе CaCO_3 можно разделить на три типа в зависимости от режима визуализации:

- терапия с использованием ультразвуковой (УЗ) диагностики;
- фотостимулированная терапия;
- терапия под действием направленного магнитного поля (метод магнитно-резонансной томографии, МРТ) [17].

2.2.4.1 Терапия с использованием УЗ диагностики

Ультразвуковое исследование (УЗИ) — один из самых информативных неинвазивных диагностических инструментов визуализации. Из-за схожести свойств нормальных и трансформированных клеток, УЗИ трудно отличить опухоли от нормальной ткани тела. Наночастицы карбоната кальция могут быть использованы для улучшения разрешения ультразвуковой визуализации. При деградации CaCO_3 в области опухоли из-за пониженного pH, генерируются пузырьки CO_2 , которые контрастны при УЗ диагностике (рисунок 2.18).

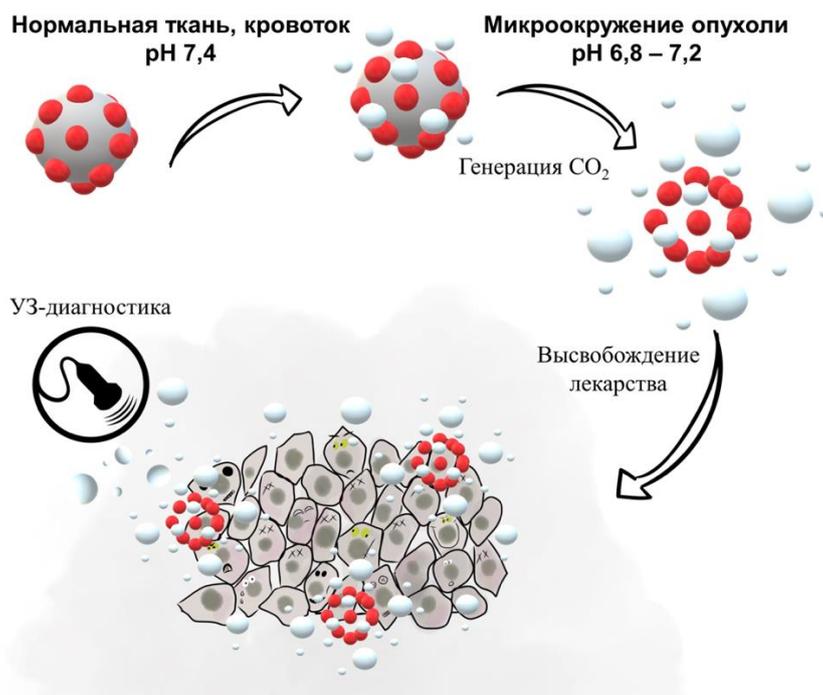


Рисунок 2.18 – Схема реализации УЗ диагностики при генерации CO₂ в процессе деградации CaCO₃

Min K. H. и коллеги следили за генерацией CO₂ ультразвуковой визуализацией при постепенном разложении карбоната кальция, связанного с DOX [200]. В работе продемонстрирован сильный устойчивый эхогенный сигнал, а также направленное высвобождение DOX, усиливающееся под действием УЗ.

Chiang P. H. и др. сконструировали многокомпонентный гибридный наночастицу (CaNC) и фосфата кальция (CaP), модифицированный диоксидом кремния, со фторированной поверхностью [146]. После чего, использовали фосфолипидный слой для ослабления агрегации и повышения биосовместимости материала. Внешний гидрофобный слой способствовал генерации пузырьков, что вызывало кавитацию при ультразвуковой обработке. Кроме того, показано, что при инкапсуляции DOX, его высвобождение усиливалось при обработке ультразвуком в 1,6 раза в условиях пониженного pH. Экспериментальные результаты *in vivo* показали, что ультразвук может вызывать кавитационную активность таких композитов и вызывать разрыв сосудов со значительным увеличением интенсивности флуоресценции DOX в местах опухоли.

В другой работе авторы продемонстрировали возможности CaNC, связанных с монометиловым эфиром гематопорфирина (HMME, соносенсибилизатор) [201]. Под воздействием УЗ, пузырьки CO₂ могут приводить к кавитационно-опосредованному некрозу. HMME был использован для генерации активных форм кислорода и реализации сонодинамической терапии. Эта комбинация препаратов обеспечила возможность проведения

кавитационно-сонодинамической терапии под контролем УЗИ для лечения онкологических заболеваний.

Комбинация химиотерапии с УЗИ является перспективным вариантом, в первую очередь, благодаря распространенности метода, а также его информативности и безопасности.

2.2.4.2 Фотодинамическая терапия

Фотодинамическая терапия — это метод лечения, основанный на использовании облучения светом на определенной длине волны светочувствительных веществ — фотосенсибилизаторов. Фотохимическая реакция приводит к образованию синглетного кислорода и высокоактивных кислородсодержащих радикалов, которые вызывают гибель клеток по механизму некроза и апоптоза [202].

Наночастицы карбоната кальция могут быть сконструированы как наноплатформы для фотодинамической терапии посредством совместной доставки флуоресцентного контраста и терапевтических агентов. Huang H. и др. разработали тераностическую систему на основе CaHЧ, DOX и флуоресцентного контрастного препарата — индоцианинового зеленого (ICG) для химиотерапии и флуоресцентной/УЗ-визуализации в двух режимах. Распределение CaHЧ/DOX/ICG в модели подкожной опухоли оценивалось с помощью визуализации в ближнем инфракрасном диапазоне. Флуоресценция ICG широко распространяется по всему телу мыши через 6 ч после введения HЧ, а через 24 ч продемонстрировано значительное накопление препарата в области опухоли. Более того, в работе показано улучшение контраста УЗ-изображений в течение 30 мин после инъекции композита (эффект сохраняется 100 мин) [67].

В другом исследовании разработали гибридный материал на основе наночастиц карбоната кальция и наностержней золота (AuHЧ), покрытый декстраном (DX) и фосфолипидом (POPS) для включения терапевтических агентов, включая DOX, 17-(аллиламино)-17-деметоксигелданамицин (17-AAG), афатиниб и амилазу (AuHЧ@CaHЧ@POPS-AcDX) (рисунок 2.19) [203].

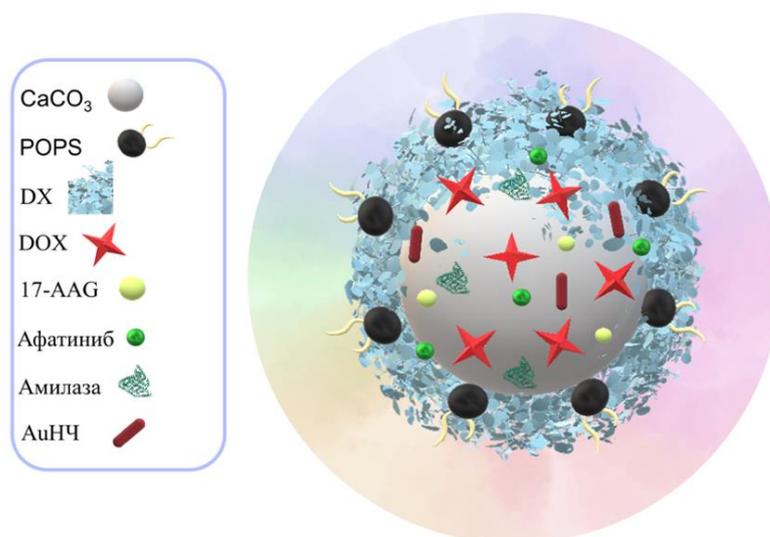


Рисунок 2.19 – Дизайн системы AuNC@CaNC@POPC-DX [203]

В работе разработаны перспективные биоразлагаемые фототермические и pH-чувствительные гибридные частицы AuNC@CaNC@POPC-DX ($d: 189 \pm 47$ нм) в качестве платформы совместной доставки гидрофильных и гидрофобных терапевтических средств, а также для ферментов или антител. В первую очередь интересно, что композит AuNC@CaNC@POPC-DX способен к pH-зависимому и термолабильному высвобождению AuNC из состава нанокомпозита. Показана высокая эффективность одновременной инкапсуляции в состав системы DOX, 17-AAG и амилазы (до 86 %) и также pH опосредованный путь их извлечения. Более того, доказана сохранность ферментативных свойств БАС после пролонгированного высвобождения из гибридной системы. Этот факт потенциально может быть использован для дальнейшего включения НК, антител и / или иммуночувствительных препаратов [203].

Повышенная противоопухолевая эффективность за счёт фотодинамической терапии и синергического лечения с перегрузкой Ca^{2+} была показана с применением гликозилированных (12,9 мас. % гликозаминогликана) ковалентно-связанных органических каркасов, содержащих 2,2 мас. % BODIPY (фотосенсибилизатор) и 35,3 мас. % CaNC (≈ 180 нм). Гликозаминогликан является нацеливающим агентом на рецепторы CD44 (опухолевые клетки пищеварительного тракта). В исследовании показано, что при освещении зеленой светодиодной лампой на мышей с опухолями HCT116 и MCF-7 генерируется O_2 , который способствует апоптозу раковых клеток и митохондриальной дисфункции вследствие избытка Ca^{2+} . Подход может приводить к снижению размера опухоли более чем на 90 % при оптимальном выборе комбинированной терапии [204].

Yakubova A. A. и коллеги разработали систему для комбинированной химиофотодинамической терапии фотосенсибилизатором (Хлорин е6, Се6) и

химиотерапевтическим агентом (доксорубин, DOX) на основе CaHЧ (d: CaHЧ: 60 – 80 нм; E: 96 мг DOX и 0,16 мг Се6 на 9,45 мг CaHЧ). В работе показана эффективность терапии в зависимости от пути введения препарата. Предложенный подход позволил добиться уменьшения опухоли меланомы (B16-F10) примерно на 94% при локальной инъекции и на 71% при внутривенной. Более того, индивидуальные наночастицы показали незначительную токсичность *in vivo* по отношению к жизненно важным органам, таким как сердце, легкие, печень, почки и селезенка. Таким образом, эта работа демонстрирует успешный подход к повышению эффективности противоопухолевой терапии [63].

Группа исследователей под руководством Jin Ren получили гибридные частицы (407 нм), содержащие доксорубин, карбонат кальция и индоцианиновый зеленый для химио-фототермической терапии рака. Благодаря карбонату кальция и связанному с ним сополимеру, дисульфидной связью наночастицы продемонстрировали чувствительное к pH высвобождение лекарственного средства. Кроме того, для наночастиц показан эффективный фототермический эффект при облучении лазером в ближнем инфракрасном диапазоне и улучшенное клеточное поглощение (линия рака молочной железы 4T1). В отличие от одиночной химиотерапии или фототермической терапии, химиофототермическое лечение привело к синергическому подавлению роста клеток 4T1 [145].

За последние годы этот подход нашел широкое распространение, однако необходимо продолжение исследований в этой области.

2.2.4.3 Терапия совмещённая с МРТ

Одним из последних направлений в комбинированной терапии можно назвать её сочетание с МРТ технологиями. Распространённым магнитным компонентом является смешанный оксид железа (Fe_3O_4). Недавние исследования демонстрируют успехи разработанных нанокомпозитов $Fe_3O_4@CaCO_3$ ($Fe@CaHЧ$) [205,138]. Такие препараты демонстрируют высокий потенциал для адсорбции ионов, красителей, лекарств и применения в тераностике [206, 207].

Наночастицы карбоната кальция обладают большим потенциалом для применения в тераностике, предлагая многообещающие возможности для улучшения диагностики, лечения и мониторинга заболеваний. Дополнительные исследования позволят раскрыть полный потенциал этих наноматериалов и сделать их более доступными для широкого круга клинических применений.

2.2.5 Тканевая инженерия

Тканевая инженерия — это область биомедицины, которая занимается созданием искусственных тканей и органов с целью восстановления, замены или улучшения функций поврежденных или утраченных тканей в организме.

Наночастицы, благодаря своим свойствам, таким как малый размер, антимикробные свойства (серебряные наночастицы), флуоресцентные свойства (квантовые точки), электро- и теплопроводность (углеродные наночастицы), делают их перспективными компонентами систем для тканевой инженерии [33].

Системное лечение распространённых костных инфекций, таких как остеомиелит, требует высоких сывороточных концентраций антибиотиков в течение длительного времени. В этом контексте актуально местное лечение с меньшим количеством побочных эффектов. На сегодняшний день некоторые системы доставки лекарств были использованы для профилактики или лечения хронического остеомиелита, с использованием имплантов, которые по завершению необходимо инвазивно удалять [208].

Идеальный материал для костной пластики должен постепенно деградировать и, в течение времени, быть заменен костной тканью. Исходя из этого, предпочтителен материал, способный к биорезорбции (биологический механизм, с помощью которого матрица материалов частично или полностью рассасывается в течение определенного периода времени в биологической среде). Кроме того, благоприятным свойством является остеокондуктивность – способность вещества обеспечивать основу для роста кости. Пористость является основным фактором эффективности для этих параметров (остеокондуктивность и биорезорбируемость). Более крупные поры способны благоприятствовать ускорению деградации и, как следствие, увеличивают рост новой костной ткани [209].

Среди биodeградируемых материалов, карбонат кальция, как сообщается, является биорезорбируемым, биodeградируемым и остеокондуктивным [209, 210].

Lucas A. и др. разработали макропористый носитель на основе карбоната кальция, связанного с сульфатом гентамицина (антибиотик, активный в отношении *Staphylococcus aureus*, вызывающих остеомиелит) для одновременного замещения костной ткани и высвобождения лекарств. По данным авторов, кинетика резорбции разработанного композита быстрее, чем у распространенного типа биокерамики (гидроксилапатит/трикальцийфосфат). Кроме того, продукты деградации карбоната кальция способны метаболизироваться в компоненты костной ткани, ускоряя терапию [211].

В другой работе СаНЧ использовали для иммуномодуляции и продления долгосрочного выживания на модели хронической трансплантации сердца у мышей. Композитные СаНЧ совместно с СаР, модифицировали гепарином и аптамером (≈ 112 нм), специфичным к лиганду 21 мотива хемокина СС (CCL21). Система (СаНЧ-СаР-CCL21) на основе СаНЧ предназначена для увеличения эффективности накопления иммунодепрессанта гидрохлорида финголимода (FTY720) в дренирующих лимфатических узлах. Показано постепенное высвобождение FTY720 из СаНЧ-СаР-CCL21@FTY720: 60% совокупного высвобождения за 7 дней. Кроме того, продемонстрировано, что аллотрансплантат из группы, обработанной СаНЧ-СаР-CCL21@FTY720, является наиболее живым с энергичным биением и наименьшим фиброзом на поверхности трансплантата. Тогда как контрольная группа демонстрирует значительный фиброз и более слабое сердцебиение. В исследовании предлагается эффективная стратегия повышения выживаемости после трансплантации органов [212].

Одним из направлений с широким спектром применения наноматериалов в области тканевой медицины стал сектор создания искусственных каркасов методом трёхмерной печати (3d-печать). Однако, существуют проблемы, связанные с внедрением таких конструкций в организм пациента из-за отторжения имплантов, иммунного ответа, аллергических реакций и т. д. [213].

Внедрение различных биосовместимых добавок является наиболее часто используемой стратегией для улучшения функциональности полимерных каркасов для регенерации костей. Наночастицы карбоната кальция перспективны для использования в качестве компонентов полимерных каркасов и улучшения свойств существующих материалов. Более того, в области картриджей, требования к размеру частиц имеют микрометровый предел, что удаляет проблему низкой суспензионной стабильности частиц до 200 нм. Диаметр сопла 3d-принтера для высококачественной печати составляет примерно 300 – 400 мкм, частицы меньшего размера не будут блокировать процесс. Но, несмотря на большой диапазон размеров, частицы должны быть стабильны и монодисперсны в суспензионном виде, для обеспечения равномерного послойного нанесения [214]].

Н. Shaked и коллеги исследовали влияние связующего полимера (этиленгликоля (EG), триэтиленгликоля (TEG), и глицерина (GLY)) на стабильность изделий из пасты на основе частиц карбоната кальция. Изготовленные 3D-модели сохраняли свои первоначальные размеры и сложные пространственные структуры, что не всегда достижимо в отсутствие металлических структур (например, титановых элементов). Однако, варианты, содержащие EG и TEG сохраняли аморфную природу моделей в течение нескольких месяцев после печати, тогда как GLY-образец усиливал их кристаллизацию, возможно, из-за своей высокой гигроскопичности. GLY был единственным связующим агентом, который способствовал медленной кристаллизации во время

обработки в печи, тогда как в присутствии EG или TEG процесс был быстрым. Более медленные скорости роста приводили к образованию больших пористых кристаллов, тогда как быстрая кристаллизация способствовала образованию более мелких и монодисперсных слоев. Несмотря на отсутствие биологического блока исследования, для *in vivo* применений наибольший дальнейший интерес представляют каркасы на основе CaCO_3 и этиленгликоля / триэтиленгликоля.

Исследователи в своей работе получили пористые каркасы на основе L-полимолочной кислоты с различными источниками карбоната кальция: измельченные и очищенные порошки яичной скорлупы (d 400 – 1200 нм) / жемчуга (d 350 – 1100 нм)/ панцирей ракообразных (300 – 610 нм) (рисунок 2.20).



Рисунок 2.20 – Схема получения чернил на основе карбоната кальция [215]

Клеточные тесты показали, что каркасы обладают макро- и микроскопическими порами и способствуют улучшенной миграции, росту и адгезии клеток, в сравнении с чернилами только из L-полимолочной кислоты. Этот эффект связывают с наличием наноразмерных пор в образцах, содержащих карбонат кальция. Полости увеличивают площадь поверхности, что значительно способствует клеточной адгезии. Кроме того, в сравнении с контролем, присутствие CaCO_3 стимулирует пролиферацию и дифференциацию клеток [215].

Другим подходом к увеличению биосовместимости имплантов является нанесение на уже изготовленный каркас покрытия.

Авторы представили метод покрытия каркасов из полимолочной кислоты частицами карбоната кальция с помощью давления и нагрева. Модифицированные каркасы были равномерно поверхностно функционализированы СаНЧ (степень покрытия поверхности > 60 %). Тонкий слой карбоната кальция (~ 20 мкм) обеспечил значительное увеличение механических свойств (на 14 %) и шероховатости и гидрофильность поверхности. Результаты исследования деградации подтвердили, что покрытые каркасы были способны поддерживать рН среды во время испытания ($\sim 7,6 \pm 0,1$), в отличие от немодифицированных ($5,07 \pm 0,1$). Стабилизация микроокружения благоприятна для увеличения адгезии клеток и снижения иммуногенности. Разработанные каркасы с кальций карбонатным покрытием показали потенциал для дальнейших применений в инженерии костной ткани [216].

Кроме того, как для варианта включения карбоната кальция в пасту на этапе 3d-печати, так и для метода последующей обработки каркаса, пористая структура карбоната кальция и гидрофильная природа материала, может быть использована для инкапсуляции терапевтических свойств, например, антибиотиков или антимикробных агентов [217].

Chernozem R. V. и соавторы в работе для реконструкции костей разработали многофункциональную биоактивную платформу на основе биоразлагаемых волокнистых каркасов из полигидроксibuтирата. Поверхность каркаса была равномерно биоминерализована биосовместимыми частицами карбоната кальция. Покрытые CaCO_3 каркасы продемонстрировали снижение прочности на разрыв и деформации разрушения на 31% и 67% соответственно. Слой карбоната кальция позволил увеличить эффективность иммобилизации фермента щелочной фосфатазы (ALP) и гликопептидного антибиотика ванкомицина (VCM) в 3,5 и 4,6 раз соответственно. В отличие от каркасов без антибиотиков, структуры с иммобилизованным VCM, обладали выраженным антибактериальным эффектом против грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus*. Таким образом, гибридные каркасы, модифицированные слоями CaCO_3 и VCM/ALP, являются перспективными материалами в инженерии костной ткани [218].

В другой работе, авторы, для регенерации тканей, применили композитные каркасы на основе полимерных волокон поликапролактона, покрытые пористыми структурами карбоната кальция с дубильной кислотой (антиоксидантный препарат). Ёмкость загрузки составила $25 \pm 6\%$ по отношению к общему весу матрицы (на $1 \text{ см} \times 1 \text{ см}$ матрицы весом $1,6 \text{ мг} - 0,4$ лекарства), что в 5 раз превзошло результаты связывания агента в отсутствие покрытия карбоната кальция. Продемонстрировано улучшение стабилизации кровеносных сосудов в области имплантации каркаса. Перекристаллизация ватерита в кальцит индуцировала высвобождение загруженного препарата и улучшение антиоксидантных свойств. Загрузка дубильной кислоты в покрытие каркаса из карбоната кальция имеет перспективы для контроля васкуляризации и регуляции

биодegradации каркаса для реконструкции костей с улучшенной функциональностью доставки лекарств. [219]

Ren B. и др. предложили гидрогели на основе полисахаридов с наночастицами гидроксиапатита (улучшение механические свойства и стабилизация сети гидрогелей) и карбоната кальция (носитель антибиотика – тетрациклина гидрохлорида) для регенерации костей. В работе показаны пролонгированное высвобождение лекарства до 21 дня и антибактериальная активность композитного геля в отношении *E. coli* (грамотрицательных) и *S. aureus* (грамположительных) бактерий. Более того, гелевый каркас, благодаря его вязкости, может быть введен *in vivo* через инъекционную иглу, а после не нуждается в инвазивном удалении [220].

Таким образом, материалы на основе CaCO_3 обладают потенциалом для двойного применения (терапевтическое/каркасное) в лечении костных заболеваний.

Следует отметить, что были сделаны важные открытия в секторе использования карбоната кальция в тканевой инженерии. Кроме того, многие исследования подчеркивают потенциал этих систем для увеличения механических и адгезивных свойств композитов [215–217]. Однако доклинические долгосрочные эксперименты, направленные на длительное исследование стабильности и биосовместимости таких каркасов в сочетании с частицами карбоната кальция, всё ещё необходимы.

Таким образом, в данной части обзора рассмотрены последние успехи доставки БАС конструкциями на основе наноразмерных частиц кальция. Несмотря на многообещающие результаты, полученные за последние 5 лет, на данном этапе нет препаратов на основе СаНЧ, допущенных до клинических испытаний. Вероятно, что это временное явление, связанное с концентрированием исследователей на разработке протоколов контролируемого получения стабильной суспензии наночастиц карбоната кальция. Методы получения высококачественных СаНЧ, в большей степени, были разработаны за последние годы. Однако, не все технологические проблемы были решены, например, такие как масштабируемость, стабильность при хранении и т.д.

2.3 Заключение

За последние годы значительно увеличилось количество опубликованных работ о методах получения не только микро-, но и наночастиц карбоната кальция [221]. Такие наноматериалы, обладая рН-зависимой стабильностью и биоразлагаемостью, продемонстрировали высокий потенциал применения в области биомедицины в качестве компонентов систем доставки БАС. И, несомненно, материал занял свою нишу среди других наноносителей, таких как липосомы, наночастицы золота, смешанного оксида железа, диоксида кремния и т.д. [222].

В данном обзоре продемонстрированы современные подходы получения СаНЧ и рассмотрены данные об увеличении терапевтической эффективности БАС с их помощью. На сегодняшний день нет клинически одобренных препаратов на основе наночастиц карбоната кальция, возможно это связано с некоторыми нерешенными вопросами. В первую очередь, недостаточно информации об отложенных потенциальных рисках, связанных с введением СаНЧ пациентам. Несмотря на то, что появилась новая тенденция применения перегрузки катионов кальция в иммунотерапии для нейтрализации микроокружения пораженной области, данные о долгосрочном влиянии подобного смещения кальциевого баланса неисчерпывающие [223, 224]. В исследованиях рассматриваются только кратковременная токсичность и биораспределение путём регистрации повреждений органов и иммунных реакций после инъекции. Отсюда следует дополнительная проблема, связанная с методами детекции, основанными на применении красителей, искажающих исходные свойства СаНЧ (преимущественно размер, поверхностный заряд). Теория о безопасности применения СаНЧ основана на данных об использовании карбоната кальция в пищевой промышленности, но это не до конца правильно из-за добавления новых химических реагентов в синтезе для стабилизации наноразмера частиц. Иначе говоря, для каждой новой методики синтеза необходима систематическая оценка кратковременной и отложенной токсичности для дальнейшего внедрения в клинику полученных материалов [199].

Во-вторых, современные процессы получения СаНЧ нуждаются в усовершенствовании либо из-за повышенной склонности к агрегации частиц, приводящей к значительному укрупнению размеров, либо из-за отсутствия масштабируемых подходов [17, 225].

И, в заключение, недостаточно данных о рассмотрении взаимодействия БАС с компонентами биологических жидкостей и их влиянии на кинетику высвобождения БАС как в физиологических условиях, так и в области-мишени [17, 226]. Однако, продемонстрированный высокий потенциал применения наноматериалов на основе карбоната кальция в биомедицине несомненно приведет к решению вышеперечисленных вопросов в ближайшее время и СаНЧ займет свою нишу в области терапии, тераностики и тканевой инженерии.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 Реагенты

В работе были использованы следующие вещества, ферментативные системы (фермент, буфер) и растворители: гидрокарбонат натрия, хлорид кальция, раствор хлорида магния, нейлон-6, альбумин, (3-аминопропил) триэтоксисилан (APTES), ацетат натрия (NaOAc), 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол (Трис), тетраэтоксисилан (ТЭОС), среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), Твин 20, Triton X-100, меркаптоэтанол-2, БСА (все Sigma-Aldrich, США), DMEM (Servicebio, Китай), Твин 20 (BioFroxx, Германия), (2,2,2-трифторэтанол (ТФЭ), формамид, натрий углекислый кислый, магниевый хлористый 6-водный (все PanReac AppliChem, Испания), доксорубицин (TEVA, Израиль), L-аргинин гидрохлорид (Roanal, Будапешт), н-гексан, ацетон (о.с.ч.), диметилсульфоксид (ДМСО), этанол, соляная кислота, уксусная кислота (все Реахим, Россия), раствор антибиотиков-антимикотиков (GIBCO, Life Technologies, США), 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид (МТТ), мочевины, акриламид, этидиум бромид (все AppliChem, Германия), физиологический раствор (МОСФАРМ, Россия), натрий-фосфатный буфер (PBS), трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), N,N-метилен(бис)акриламид, бромфеноловый синий, ксиленцианол FF, эхротилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА), додецилсульфат натрия (все Amresco, США), цетилтриметиламмоний бромид (СТАВ), гексадецилтриметиламмоний бромид (НТАВ) (Хеликон, Россия), полиэтиленгликоль (ПЭГ) 1000/2000/6000 (Carl Roth, США), стрептавидин-щелочная фосфатаза, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED), перхлорат лития, Родамин Б (все Acros Organics, Бельгия), хромогенные субстраты BCIP и NBT (Molecular Probes, США), питательная среда для клеток RPMI-1640, фетальная бычья сыворотка (FBS), ТрупLE (все GIBCO, Invitrogen, США), аммиак водный (ОАО «Аурат», Россия), ацетонитрил (AcN) (Компонент-реактив, Россия), ДНКазы I (DNase I, RNase-free) и нуклеазы S1 (S1), Кумасси R-250, 4-нонилфенилполиэтиленгликоль (NP-40), дитиотреитол (ДДТ), Coomassie protein assay reagent (все Thermo Scientific™, США), термолабильная экзонуклеаза I (Exo I) (New England Biolabs, США), γ [³²P]-АТФ, полинуклеотидкиназа фага Т4 (Биосан, Россия), Stains All, перхлорат лития, персульфат аммония (APS) (все Acros, США), фосфат натрия двузамещенный додекагидрат (АльфаХимПлюс, Россия), фосфат натрия однозамещенный дигидрат (Реатэкс, Россия), Cyanine5 карбоновая кислота (ООО Люмипроб РУС, Россия), полиэтиленгликоль 2000 (Aladdin Scientific, США), кальций хлористый (Химпром, Россия), гидрофосфат натрия (Альфахим плюс, Россия),

4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (ХЕПЕС) (Диаэм, Россия). Клеточные линии НЕК293, A549, HeLa, MCF приобретены у Российского отделения ЭТКС (Санкт-Петербург, Россия). Пассаж и содержание клеточных линий проведены сотрудниками ЛБМХ ИХБФМ СО РАН (О.А. Гуляевой, Е.В. Григорьевой и Е.Н. Ковригиной). Растворители были очищены Т.Ю. Бушуевой (ЛБМХ СО РАН).

В работе использовали буферные системы: 50 мМ боратный раствор pH 8,5 (SBB) (Вектор-Бест, Россия), 200 мМ ацетатный раствор (pH 3,0-7,0) (AcNa), трис-боратный буферный раствор (ТВЕ) (89 мМ Трис, 89 мМ H_3BO_3 , 2 мМ ЭДТА, pH 8,3), PBS (2,3 мМ NaH_2PO_4 , 7,7 мМ Na_2HPO_4 , 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, pH 7,4), TE_x1 (50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 1 мМ ЭДТА (pH 8,0)), 0,5-SSC (75 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 75 мМ NaCl), буфер-1 (50 мМ Tris-HCl (pH 9,4), 2 М NaCl), буфер-2 (75 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 50 мМ NaCl), буфер для нанесения 4х (200 мМ Tris-HCl (pH 6,8), 400 мМ меркаптоэтанол-2, 4 % SDS, ~0.01 % Кумасси R 250, 40 % глицерин), буфера-1 для цельноклеточных экстрактов (10 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 200 мМ NaCl), буфера-2 для цельноклеточных экстрактов (10 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 200 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА (pH 8,0), 40 % глицерин, 0,2 % NP-40, 2 мМ ДДТ).

Все растворы приготовлены с использованием воды, очищенной Millipore Simplicity 185 («Millipore», США).

3.2 Синтетические олигонуклеотиды

Синтез и выделение олигонуклеотидов проведены О.А. Гуляевой, к.х.н. Е.С. Дюдеевой и Т.Ю. Бушуевой (ЛБМХ, ИХБФМ СО РАН), материал любезно предоставлен для выполнения диссертационной работы.

В работе использовали следующие олигонуклеотиды (таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Олигонуклеотиды, использованные при выполнении работы

Шифр	Последовательность (5'-3') ¹
T10-B ₇	Биотин-ТТТТТТТТТТ
g ₃	T*C*G*CCCTTGCTCAC*C*A*T*
g ₃ -Tamra	Tamra-T*C*G*CCCTTGCTCAC*C*A*T*
g ₃ -Cy5	Cy5-T*C*G*CCCTTGCTCAC*C*A*T*
M30	CTGTTGTTTAGCTACGTCCAGGAGCGCACC
Go	GGTGCGCTCCTGGACGTAGC
G1,2	GGTGCGCTCCTGGACGTAG*C*
G3	GGTGCGCTCCTGGACGTA*GC
G8	GGTGCGCTCCTGG*ACGTAGC
G8,9	GGTGCGCTCCTG*G*ACGTAGC
Gh2-1	G*GT*GC*GC*TC*CT*GGACGTAGC
Gh	G*G*T*G*C*G*C*T*C*C*T*GGACGTAGC
Ghf	G*GT*GC*GC*TC*CT*GG*AC*GT*AG*C
G2/1	G*GTG*CGC*TCC*TGG*ACG*TAG*C
G3/1	G*GTGC*GCTC*CTGG*ACGT*AGC
G4/1	G*GTGCG*TCCT*GGACG*TAGC
G5/1	G*GTGCGC*TCCTGG*ACGTAG*C
G8/1	G*GTGCGCTCC*TGGACGTAG*C

¹ – * обозначает фосфорилгуанидиновую группу (1,3-диметил-2-идазолидиниминофосфорильную группу) (рисунок 3.1).

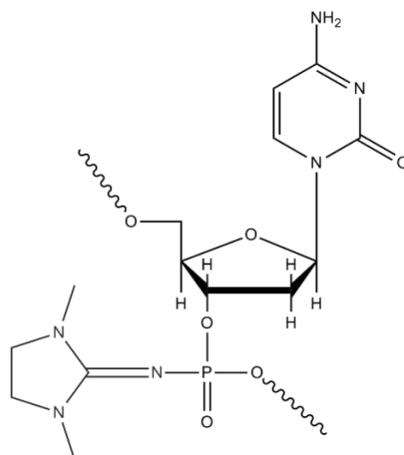


Рисунок 3.1 – Фосфорилгуанидиновый олигонуклеотид (ФГО)

3.3 Оборудование

Измерения размера частиц методом динамического светорассеяния (ДСР) и дзета-потенциала (ζ -потенциала) проводили на приборе Malvern Zetasizer Nano (Malvern Instrument Ltd., Великобритания). Изображения просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) были получены на JEM-1400 (Jeol, Япония). УФ-видимые спектры записывали на спектрофотометре UV-2100 (Shimadzu, Япония) и микропланшетном ридере Clariostar (BMG, Германия). Спектры ИК-Фурье измерялись на ИК-Фурье-спектрометре 640 ИК (Varian, США) в диапазоне от 4000 до

400 см⁻¹ при комнатной температуре в сочетании с таблеткой KBr. Наночастицы концентрировали и / или отделяли от супернатанта методом центрифугирования в центрифуге (Eppendorf, Германия). НЧ индивидуально и совместно с БАС инкубировали в термостате Biosan (Россия). Электрофорез проводили с использованием источников питания Эльф-8 (ДНК-Технология, Россия) и PowerPac HC (Biorad, США). Активность γ [³²P]-меченных олигонуклеотидов измеряли счетчиком сцинтилляции Tri-Carb 2800TR (Perkin-Elmer, США). Активность γ [³²P]-меченных НК, нанесенных на гель, детектировали с помощью фоточувствительного экрана (K-screen, Kodak) после экспонирования с гелем с использованием сканера Molecular Imager Pharos FX Plus (BioRad, США). Ультразвуковую (УЗ) обработку растворов проводили в УЗ-мойке Elmasonic S10H (Elma, Германия) или на ультразвуковом гомогенизаторе (Bandelin, Германия). Эффективность клеточного проникновения наноматериалов исследовали методом цитометрии на приборе BD FACSCanto II (БиоЛайн, Россия).

3.4 Методики экспериментов

3.4.1 Синтез наночастиц

3.4.1.1 Синтез наночастиц карбоната кальция (CaНЧ)

Частицы карбоната кальция получали методом осаждения, путём смешивания двух растворов солей на ультразвуковой мойке или гомогенизаторе: 100 мкл раствора CaCl₂ (0,007-0,100 М) по каплям добавляли к 1 мл водного раствора NaHCO₃ (0,1 М) в отсутствии и в присутствии таких добавок, как ПЭГ (с молекулярной массой 1000/2000/6000) в концентрации 0,1 мг/мл, детергенты (Твин 20, Triton X-100, додецилсульфат натрия или цетилтриметиламмоний бромид) в количестве 1,0 об.%, DMEM до 0,2 – 10,0 об.% и/или MgCl₂ (0,005 – 0,010 М) [227]. Добавки вводили как по отдельности, так и в виде смеси. Реакцию формирования CaНЧ в спиртовой смеси Твин 20 и ПЭГ 2000 проводили аналогично реакции в воде, путём замены растворителя на изопропанол [228]. После формирования, CaНЧ центрифугировали в течение 10 мин при 13200 об./мин и редиспергировали в деионизированной воде, хранили при комнатной температуре. Разработанный способ получения наноматериалов опубликован и запатентован [50, 229].

3.4.1.2 Синтез наночастиц фосфата кальция (CaP)

Частицы на основе фосфата кальция получали методом осаждения, путём смешивания двух растворов на ультразвуковой мойке: 100 мкл раствора, содержащего CaCl_2 (0,01 М), DMEM 10,0 об.% и MgCl_2 (0,01 М), по каплям добавляли к 1 мл водного раствора Na_2HPO_4 (0,1 М) в присутствии таких добавок, как ПЭГ 2000 в концентрации 0,1 мг/мл, Твин 20 в количестве до 1,0 об.% и DMEM 10,0 об.%. После формирования, CaP центрифугировали в течение 10 мин при 13200 об./мин и редиспергировали в деионизированной воде, хранили при комнатной температуре.

3.4.1.3 Синтез гибридных наночастиц карбоната кальция и смешанного оксида железа (Fe@CaНЧ)

Синтез наночастиц Fe@CaНЧ проводили в два этапа: синтез магнитных наночастиц смешанного оксида железа (FeНЧ) и дальнейшее получение наноматериала карбоната кальция на основе магнитной сердцевины. Методика образования FeНЧ была адаптирована из работ Ковригина и др. и Ван и др. [230, 231]. Навеску 0,28 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 ммоль) и 0,1 г $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0,5 ммоль) растворяли в 10 мл HCl (1 М), раствор нагревали в течение 20 мин при 85°C. Далее по каплям добавляли 95 мкл олеиновой кислоты (0,3 ммоль) в ацетоне и перемешивали в течение 5 минут при 85 °C (750 об./мин). После инкубации добавляли 2 мл NaOH (8 М) до pH 11,0 при перемешивании (750 об./мин) в течение 30 мин при 85 °C. Смесь охлаждали до комнатной температуры. После этого добавляли 9 мл HCl (1 М) до pH 2,0. Полученные FeНЧ отделяли от супернатанта магнитной сепарацией и промывали 1,0 мл ацетона (трижды) и 1,0 мл деионизированной воды (трижды). Наночастицы редиспергировали в деионизированной воде и хранили при комнатной температуре.

Наноконпозиты Fe@CaНЧ получали путём адаптации методики синтеза. Навеску 0,45 – 4,5 мг FeНЧ и 0,1 г полиэтиленгликоля 2000 растворяли в 0,8 мл деионизированной воды. К полученной смеси добавляли 0,1 мл бикарбоната натрия (1 М), 0,1 мл Твин 20 (1 об.%) и 0,1 мл DMEM. Раствор объемом 0,1 мл, содержащий 0,010 мл хлорида кальция (0,1 М), 0,010 мл хлорида магния (0,1 М) и 0,010 мл DMEM, медленно добавляли под воздействием ультразвука в ультразвуковой бане в течение 2 мин. Смесь перемешивали в течение 20 минут при 25 °C (750 об./мин). Полученные Fe@CaНЧ отделяли от супернатанта магнитной сепарацией и

редиспергировали в деионизированной воде. Суспензию хранили в деионизированной воде при 25 °С. Разработанная методика опубликована [151].

3.4.1.4 Синтез наночастиц диоксида кремния (SiНЧ)

Способы получения SiНЧ были адаптированы из публикаций Rao K. S. и др. (спиртовой гидролиз ТЭОС в присутствии NH₃) [232], Masalov V. M. и др. (микроэмульсионный вариант с гидрохлоридом L-аргинина) [233] и Vazquez N. I. и др. (синтез в присутствии детергентов – СТАВ/НТАВ) [234].

Спиртовой 0,01 – 0,2 М раствор ТЭОС, содержащий 28 % до 1 М аммиака, инкубировали в течение 20 ч при 25 °С (750 об./мин). SiНЧ отделяли от реакционного раствора и супернатанта центрифугированием в течение 10 мин при 13400 об./мин, осадок промывали трижды 98 % этанолом [232].

Смешивали 3,5 мл 6 мМ водного раствора гидрохлорида L-аргинина, нагретого до 60°С, с 0,5 мл смеси ТЭОС/н-гексан в объемном соотношении V(гексан):V(ТЭОС) = 6:5. Инкубацию проводили в течение 12 ч при 60 °С (300 об./мин). Были получены и сегментированы три фракции: органическая, промежуточная и водная. SiНЧ из каждого слоя выделяли центрифугированием в течение 10 мин при 7000 об./мин, осадок промывали трижды 98 % этанолом [233].

Смешивали водный раствор 25 мг/мл СТАВ или НТАВ 25 мкл/мл триэтаноламина. Раствор инкубировали в течение 1 ч при 95 °С (1400 об./мин). Далее по каплям к смеси добавили 75 мкл/мл ТЭОС и перемешивали в течение 1 ч при 40 °С (1400 об./мин). SiНЧ отделяли центрифугированием (13400 об./мин). SiНЧ отделяли центрифугированием в течение 10 мин при 13400 об./мин, осадок промывали трижды водой [234].

3.4.2 Устойчивость наночастиц в водных растворах и условиях близких к физиологическим

3.4.2.1 Исследование изменения гидродинамического размера наноматериалов при хранении

Стабильность размера 100 мкг НЧ анализировали в 1 мл 100 мМ ацетатного буфера (рН от 4,0 до 6,0), 10 мМ PBS (рН 7,4), DMEM и 10 % FBS при 25 °С и перемешивании (750 об./мин). В различные моменты времени отбирали аликвоту раствора, анализировали её методом динамического светорассеяния (ДСР) и возвращали к реакционной смеси для дальнейшего исследования. Регистрацию размера проводили как в растворах хранения, так и в очищенной воде.

3.4.2.2 Исследование массы сухого остатка наноматериалов при хранении (установление диапазона рН-зависимости СаНЧ)

Стабильность массы сухого остатка размера 100 мкг СаНЧ анализировали в 1 мл 100 мМ ацетатного буфера (рН от 3,0 до 7,0) при 25 °С и перемешивании (750 об./мин). Спустя 24 ч частицы центрифугировали в течение 10 мин при 13200 об./мин, отделяли супернатант, осадок высушивали в течение 12 ч при 60 °С. Массу сухого остатка определяли аналитическим взвешиванием.

3.4.3 Ковалентная модификация наноматериалов

3.4.3.1 Ковалентное присоединение полимера (белкового / синтетического) или олигонуклеотида с NH₂-группой на поверхность СаНЧ и SiНЧ

К 1 мг СаНЧ или SiНЧ в 0,95 мл этанола 98 % добавляли 0,050 мл раствора (3-аминопропил)-триэтоксисилана (APTES), смесь инкубировали в течение 2 ч при 25 °С и перемешивании (1400 об./мин). Модифицированные наночастицы отделяли центрифугированием и промывали 98 % этанолом (3 × 1 мл). Затем к осадку добавляли 0,5 мл раствора хлорангидрида циануровой кислоты (цианурхлорид) (10 мг/мл) в ацетонитриле (AcN).

Реакцию проводили в течение 2 ч при 25 °С и перемешивании (1400 об./мин). НЧ отбирали центрифугированием и промывали АсN (3 × 3 мл) и 2,2,2-трифторэтанолом (ТФЭ) (1 × 3 мл).

К 10 – 15 мг/мл поверхностно-активным НЧ добавляли 4 % раствор нейлона-6 в ТФЭ, или раствор стрептавидина в PBS (1 мг/мл), или олигонуклеотида с концевой аминогруппой (10^{-5} М) в растворе 50 мМ карбонат-бикарбонатный буфер (рН 9,0). Инкубацию проводили в течение 12 – 18 ч при 25 °С и перемешивании (1400 об./мин). Полученные нанокomпозиты центрифугировали в течение 5 мин (13400 об./мин) и промывали трифторэтанолом (3 × 1 мл) и водой (1 × 1 мл), для вариантов с нейлоном-6, или водой (4 × 1 мл), для композитов со стрептавидином и олигонуклеотидом.

3.4.3.2 УФ-иммобилизация олигонуклеотидов на поверхность наночастиц, модифицированных полимером

УФ-иммобилизацию ОН проводили путём добавления к суспензии частиц (НЧ-нейлон) (0,5 – 1 мг/мл) в 5 М NaCl биотинилированного олигодезоксирибонуклеотида (TTTTTTTTTTT-bio – T10-B7) до концентрации 10^{-6} М. Полученную смесь в чашке Петри («Corning», США, 35 мм×10мм) 10 мин обрабатывали источником ультрафиолетового света (2 ртутных лампы низкого давления ДБ-15, $\lambda = 253,7$ нм) на расстоянии 12 см. Далее собирали частицы центрифугированием, отмывали очищенной водой (3 раза × 5 мл), 98 % EtOH (2 раза × 5 мл). Высушивали на воздухе.

Выявление остатка биотина в составе иммобилизованного олигонуклеотида проводили для НЧ, после иммобилизации биотинилированного олигонуклеотида, и на контрольных частицах — без модификации. К 25 мкл суспензии частиц (0,5 – 1 мг/мл), добавляли 1 мл раствора, содержащего 0,1 % яичного альбумина, 0,5 % Твин 20 в буфере, содержащем 20 мМ Tris-HCl, рН 7,5, 100 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂, композицию инкубировали 25 мин при перемешивании 700 об./мин и 25 °С. После отделения наночастиц центрифугированием, добавляли 100 мкл раствора, содержащего конъюгат стрептавидин-щелочная фосфатаза в концентрации 1 мкг/мл в буферном растворе, содержащем 1М NaCl, 20мМ MgCl₂, 200 мМ Tris (рН 7,5), 0,05 % SDS, 0,05 % Triton X-100, помещали в термошейкер на 30 мин при перемешивании 700 об./мин и 25 °С. Далее НЧ последовательно отмывали раствором, содержащим 20 % этанол, 0,5 % Твин 20 в буферном растворе, содержащем 20 мМ Tris-HCl, рН 7,5, 100 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂ (4 раза × 0,5 мл); раствором 0,1 % Твин 20 в буфере, содержащем 20 мМ Tris-HCl, рН 9,5, 100 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂ (1 раз × 0,5 мл). НЧ собирали центрифугированием и добавляли 150 мкл раствора хромогенных субстратов 0,6 мг BCIP и 0,495

мг NBT в буфере, содержащем 20 mM Tris-HCl, pH 9,5, 100 mM NaCl, 2 mM MgCl₂. Визуализацию результата анализа проводили в течение 60 минут, фиксируя изменения окраски частиц.

3.4.4 Селективное присоединение биотинилированных олигонуклеотидов на поверхность наночастиц с ковалентно присоединенным стрептавидином

Связывание олигонуклеотидов с НЧ-St и железной смолой (Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles, MPP) проводили путём инкубации в течении 60 мин (250 об./мин при 25 °С) 15 мкл ОН* (10^{-6} М, внутри которой 10 % горячего ОН*) и 150 мкл стрептавидиновых частиц (1 мг/мл), обработанных равным объёмом буфера 0,5-SSC (75 mM Tris-HCl (pH 7,5), 75 mM NaCl). Далее смесь промывали 3 раза буфером-1 (50 mM Tris-HCl (pH 9,4), 2 M NaCl) и 2 раза буфером-2 (75 mM Tris-HCl (pH 7,5), 50 mM NaCl). Далее добавляли 45 мкл буфера для нанесения, пробы нагревали в течение 20 мин при 80 °С. Для анализа смеси использовали белковый форец (концентрирующий слой 5 %, разделяющий 10 %). Окрашивание геля проводили в Кумасси R-250.

3.4.4.1 Приготовление цельноклеточного экстракта

Приготовление цельноклеточного экстракта проводили на линиях НЕК293 / HeLa. Клетки собирали в пробирку в объёме 1 мл и отделяли от культуральной среды путём центрифугирования в течение 5 минут при 700 об./мин 4°С. Клетки ресуспендировали в 5 мл PBS и центрифугировали, как описано выше. Далее процедуру проводили во льду. Осадок ресуспендировали в 1 мл буфера-1 для цельноклеточных экстрактов и инкубировали в растворе 10 мин. К смеси прибавили 2 мл буфера-2 для цельноклеточных экстрактов и выдержали во льду 60 мин. Для удаления клеточных осколков суспензию центрифугировали в течение 10 минут при 14000 об./мин 25°С. Супернатант, содержащий клеточный экстракт, собирали и хранили при -70°С. Концентрацию полученных экстрактов определяли с использованием раствора Coomassie protein assay reagent относительно эталонного раствора БСА.

3.4.4.2 Взаимодействие биотинилированных НК с белками клеточного экстракта

Реакцию смеси олигонуклеотидов и их радиоактивно-меченных аналогов (ОН*) с клеточным лизатом проводили путём инкубации во льду 2,5 мкл лизата клеток НЕК293 / HeLa. (1,3 мкг/мкл), 6,5 мкл буфера TEx1 (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM ЭДТА (pH 8,0) и 1 мкл ОН* (10^{-5} M, радиоактивно-меченного ОН 10 %) в течение 5 мин. Далее добавляли 2,5 мкл буфера для нанесения 4х (200 mM Tris-HCl (pH 6,8), 400 mM меркаптоэтанол-2, 4 % SDS, ~0.01 % Кумасси R 250, 40 % глицерин). Для анализа смеси использовали белковый форец (концентрирующий слой 5 %, разделяющий 10 %). Окрашивание геля проводили в Кумасси R 250.

3.4.4.3 Выделения биотинилированных НК после взаимодействия с белками из клеточного экстракта

Предварительно перед реакцией НЧ-St / MPP ресуспендировали в равном объёме буфера 0,5-SSC (75 mM Tris-HCl (pH7,5), 75 mM NaCl), далее супернатант отделяли. Выделение олигонуклеотидов, связанных с белками из клеточного лизата, проводили путём взаимодействия 150 мкл (1 мг/мл) НЧ-St / MPP и 15 мкл ОН (10^{-5} M, радиоактивно-меченного ОН 10 %) ранее обработанного белками из клеточного экстракта в течение 60 мин при перемешивании 250 об./мин и 25 °C. Далее, для удаления неспецифической сорбции, НЧ-St-ОН/ MPP-ОН промывали 3 раза буфером-1 (50 mM Tris-HCl pH9.4, 2 M NaCl) и 2 раза буфером-2 (75 mM Tris-HCl pH7.5, 50 mM NaCl). Далее добавляли 45 мкл буфера для нанесения 4х. Для анализа смеси использовали белковый форец (концентрирующий слой 5 %, разделяющий 10 %). Окрашивание геля проводили в Кумасси R250.

3.4.5 Нековалентная модификация наноматериалов

3.4.5.1 Создание комплекса наноматериалов с доксорубицином

Навеску 0,025 – 3,2 мг НЧ редиспергировали в 0,8 мл деионизированной воды, добавляли 0,1 – 0,3 мл DOX (100 – 300 мкг, 1 мг/мл) и 0,1 мл натрийборатного буфера, pH 8,0 (10 mM). Смесь инкубировали при 25 °C в течение 12 ч при перемешивании (750 об./мин). Нанокomпозиты отбирали либо магнитной сепарацией (для Fe@CaНЧ), либо центрифугированием в течение 7

мин (13400 об./мин). Осадок трижды промывали натрий-боратным буфером pH 8,0 (10 мМ) и редиспергировали в натрий-боратном буфере pH 8,0 (10 мМ). Концентрацию DOX в супернатанте определяли спектрофотометрически ($\lambda = 480$ нм). Количество связавшегося лекарственного средства определяли как ёмкость, по уравнению: $E = (DOX_0 - DOX)/m$, где DOX_0 – общее добавленное количество лекарства (мкг), DOX – количество препарата в надосадочном растворе (мкг), m – количество НЧ в нанокompозите (НЧ-DOX) (мг).

3.4.5.2 Создание комплекса наноматериалов с олигонуклеотидом

Создание комплекса наноматериалов с олигонуклеотидами (НЧ-ОН) было проведено двумя вариантами: в процессе синтеза (синтетический вариант) после формирования наночастиц (постсинтетический вариант).

3.4.5.2.1 Создание комплекса наноматериалов с олигонуклеотидом в процессе синтеза наночастиц (синтетический вариант)

3.4.5.2.1.1 Синтез наночастиц карбоната кальция в присутствии ОН (CaНЧ-ОН_A)

Наночастицы на основе карбоната кальция в присутствии ОН получали методом осаждения, путём смешивания двух растворов на ультразвуковой мойке: 100 мкл раствора, содержащего ОН (10^{-5} М), $CaCl_2$ (0,01 М), DMEM 10,0 об.% и $MgCl_2$ (0,01 М), по каплям добавляли к 1 мл водного раствора $NaHCO_3$ (0,1 М) в присутствии таких добавок, как ПЭГ 2000 в концентрации 0,1 мг/мл, ХЕПЕС – 11,9 мг/мл, Твин 20 в количестве до 1,0 об.% и DMEM 10,0 об.%. После, нанокompозит центрифугировали в течение 10 мин при 13200 об./мин. Осадок собирали, к надосадочному раствору добавляли 10 мкл 1 М $CaCl_2$. Суспензию обрабатывали ультразвуком в течение 2 мин. Далее образец центрифугировали в течение 10 мин при 13200 об./мин. Процедуру повторяли трижды. В конечном итоге объединяли четыре осадка и их редиспергировали в деионизированной воде, хранили при комнатной температуре. Количество присоединенного ОН определяли спектрофотометрически.

3.4.5.2.1.2 Синтез гибридных наночастиц карбоната кальция и смешанного оксида железа в присутствии ОН (Fe@CaНЧ-ОН_A)

Наноконпозиты Fe@CaНЧ получали путём адаптации методики синтеза. Навеску 0,45 мг FeНЧ, 0,1 г полиэтиленгликоля 2000 и 11,9 мг/мл ХЕПЕС растворяли в 0,8 мл деионизированной воды. К полученной смеси добавляли 0,1 мл бикарбоната натрия (1 М), 0,1 мл Твин 20 (1 об.%) и 0,1 мл DMEM. Раствор объёмом 0,1 мл, содержащий 0,010 мл 10⁻⁴ М ОН, 0,010 мл хлорида кальция (0,1 М), 0,010 мл хлорида магния (0,1 М) и 0,010 мл DMEM, медленно добавляли под воздействием ультразвука в ультразвуковой бане в течение 2 мин. Смесь перемешивали в течение 20 минут при 25 °С (750 об./мин). Полученные Fe@CaНЧ отделяли от супернатанта магнитной сепарацией и релдиспергировали в деионизированной воде. Количество присоединенного ОН определяли спектрофотометрически.

3.4.5.2.1.3 Синтез наночастиц диоксида кремния в присутствии ОН (SiНЧ-ОН_A)

Спиртовой 0,01 – 0,2 М раствор ТЭОС, содержащий 28 % до 1 М аммиака и 10⁻⁵ М ОН, инкубировали в течение 20 ч при 25 °С (750 об./мин). SiНЧ отделяли от реакционного раствора и супернатанта центрифугированием в течение 10 мин при 13400 об./мин, осадок промывали трижды 98 % этанолом.

Количество связавшегося ОН определяли как ёмкость, по уравнению: $E = (OH_0 - OH) / m$, где OH_0 – общее добавленное количество ОН, OH – количество препарата в надосадочном растворе, m – количество наноконпозита после стадии синтеза (НЧ-ОН), которое определяли методом регистрации сухого остатка после образования комплекса.

3.4.5.2.1 Создание комплекса наноматериалов с олигонуклеотидом после синтеза наночастиц (постсинтетический вариант)

К суспензии 1 мг НЧ, в 80 мкл 25 мМ карбонат-бикабонатного буфера (рН 8,5), добавляли 20 мкл ОН в концентрации 10⁻⁵ М. Смесь инкубировали в течение 14 ч при перемешивании (800 об./мин) и 25°С. Образовавшиеся комплексы НЧ-ОН_Б декантировали магнитной сепарацией или центрифугированием в течение 7 мин (13400 об./мин). Осадок промывали карбонат-

бикарбонатным буфером pH 8,5 (25 мМ) и редиспергировали в очищенной воде. Концентрацию ОН в супернатанте определяли спектрофотометрически ($\lambda = 290$ нм). Количество связавшегося ОН определяли как ёмкость, по уравнению: $E = (\text{ОН}_0 - \text{ОН})/m$, где ОН_0 – общее добавленное количество ОН, ОН – количество препарата в надосадочном растворе, m – количество НЧ в нанокompозите (НЧ-ОН).

3.4.6 Разрушение комплекса наноматериалов с доксорубицином

Высвобождение DOX исследовали при 15 – 45 °С в 1 мл 100 мМ натрий-ацетатного буфера (pH от 3,0 до 6,5) или 10 мМ фосфатно-солевого буфера (pH 7,4), содержащих НЧ/DOX (переменное количество DOX с 0,1 – 0,25 мг НЧ) при постоянном перемешивании (750 об./мин). Количество DOX, выделившегося в раствор, определяли по оптической плотности раствора в разные моменты времени.

3.4.7 Исследование устойчивости индивидуальных НК и в составе наночастиц после обработки нуклеазными ферментами

Инкубация олигонуклеотидов с ДНКазы I / S1 / Eho I проводили в 1х буферном растворе, путём смешения 1 мкл соответствующих олигонуклеотидов до концентрации 10^{-5} М и 2 мкл фермента в количестве 2 – 5 е.а. в течение 10 мин при 25 °С и постоянном перемешивании (1400 об./мин). Инактивацию проводили добавлением в реакционную смесь ЭДТА до концентрации 5 мМ с последующим нагреванием проб в течение 10 мин до 70 °С. Далее пробы анализировали методом гель-электрофореза для белковых проб.

3.5 Методы измерений и анализа

3.5.1 Исследование цитотоксичности наноматериалов и их композитов с БАС

3.5.1.1 Метод МТТ-теста

Линии опухолевых клеток аденокарцинома легкого (A549), аденокарцинома молочной железы человека (MCF-7) и рака шейки матки (HeLa) (Российское отделение ЭТКС, Санкт-Петербург, Россия) высевали в 96-луночные культуральные планшеты (5×10^3 клеток на лунку) в среде DMEM с добавлением 10 % FBS, 1% GlutaMax и 1% раствора антимикотического антибиотика в течение 24 ч при 37 °C и 5 % CO₂.

Исследования цитотоксичности проводили с помощью колориметрического анализа, основанного на расщеплении 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ) митохондриальными дегидрогеназами в жизнеспособных клетках, что приводит к образованию синего цвета формазана. К клеткам добавляли среду, содержащую наноматериалы: НЧ (0,1 – 1000 мкг/мл), НЧ/DOX (0,08 – 73,4 мкг/мл), НЧ-ОН (0,5 – 2000 мкг/мл), DOX (0,1 – 10,0 мкМ) и ОН (1 – 10 мкМ), обработку проводили в течение 48 ч при 37 °C и 5 % CO₂. В качестве контроля использовали клетки, инкубированные со средой. После инкубации среду удаляли, добавляли 200 мкл раствора МТТ (0,25 мг/мл в культуральной среде, содержащей 1 % раствор антимикотического антибиотика) и инкубировали в течение 4 ч в тех же условиях. После этого, среду удаляли и формазан растворяли в 0,1 мл ДМСО. Оптическую плотность измеряли на многоканальном планшетном ридере Clariostar при длине волны 570 нм (пик). Процент выживших клеток рассчитывали по полученной оптической плотности в процентах от контрольных значений. Полумаксимальную ингибирующую концентрацию (IC 50) рассчитывали графически.

3.5.1.2 Исследование эффективности клеточного проникновения нанокompозитов

За день до трансфекции, клетки A549 высевали в 24-луночный планшет в количестве $1,2 \times 10^5$ клеток на лунку. Клетки промывали 250 мкл/лунку PBS, далее добавляли 250 мкл/лунку DMEM, содержащий нанокompозит или индивидуальный олигонуклеотид с конечной концентрацией по олигонуклеотиду до 5 мкМ. Через 48 ч клетки отмывали и отделяли от

пластины с помощью TrypLE, ресуспендировали в среде DMEM, содержащей 10 % FBS, и затем центрифугировали в течение 5 мин при 800 об./мин. Далее клетки анализировали на проточном цитометре.

3.5.2 Регистрация размера и поверхностных свойств наночастиц

3.5.2.1 Метод динамического светорассеяния

Измерения динамического рассеяния света (ДСР) и дзета-потенциала (ζ -потенциала) проводили на приборе Malvern Zetasizer Nano. Для ДСР-исследований НЧ разводили в деионизированной воде (если не сказано другого) в концентрации 100 мкг/мл. Все измерения проводили при комнатной температуре. Регистрировали средние значения, рассчитанные по числу частиц.

3.5.2.2 Метод просвечивающей электронной микроскопии

Изображения методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) были получены на приборе JEM-1400 с помощью цифровой камеры Veleta с боковым креплением (EM SIS, Мюнстер, Германия). Образцы исследовали нанесёнными на медные сеточки с формваровыми пленками диаметром с 3 мм при ускоряющем напряжении 80кВ.

3.5.3 Регистрация ёмкостных характеристик наноматериалов по оптической плотности

УФ-визуальные спектры регистрировали на спектрофотометре UV-2100 (Shimadzu, Япония) и микропланшетном ридере Clariostar (BMG, Германия). В работе детектировали пики оптического поглощения для DOX ($\lambda = 480$ нм), ОН ($\lambda = 260$ нм), Су 5 ($\lambda = 638$ нм), Тамра ($\lambda = 560$ нм), Rod B ($\lambda = 535$ нм), МТТ ($\lambda = 520$ нм). Установления концентрационных значений находили путём построения калибровочных кривых (зависимость оптической плотности раствора от эталонной концентрации) не менее, чем по четырём точкам, для всех соединений в растворителях и диапазоне концентрации аналогичных исследуемым образцам.

3.5.4 Введение радиоактивного фосфата на 5'-конец НК

Радиоактивный фосфат вводили на 5'-конец ОН (100 нмоль) в течение 2 ч при 37 °С с использованием 10 е.а. полинуклеотидкиназы фага Т4 и 0,1 мCi [γ ³²P]АТФ в 10 мкл раствора буфера для кинирования: 50 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM MgCl₂, 5mM ДДТ. Реакционную смесь подвергали флеш-хроматографии с использованием сорбента Waters C18 125 Å 55–105 мкм.

3.5.5 Осаждение олигонуклеотидов 2 % LiClO₄ в ацетоне

Раствор ОН в объёме 20 – 100 мкл ресуспендировали 0,5 мл 2 % растворе перхлората лития (LiClO₄) в ацетоне. Осадок декантировали центрифугированием в течение 5 мин при 13400 об./мин, после удаления супернатанта прибавляли 1 мл ацетона. Надосадочную жидкость отделяли, сухой остаток сушили на термостате при 37 °С.

3.5.6 Анализ методом гель-электрофореза в полиакриламидном геле

3.5.6.1 Электрофорез нанокомпозитов и нуклеиновых кислот в полиакриламидном геле

Анализ результатов методом денатурирующего гель-электрофореза проводили в 20 % полиакриламидном геле (акриламид (АА) : бисакриламид (БАА) = 29:1) в присутствии 8М мочевины в 100 mM трис-боратном буферном растворе (ТВЕ: 89 mM Трис, 89 mM H₃BO₃, 2 mM ЭДТА (pH 8,3)) при напряжённости электрического поля 20 В/см и температуре 30 – 40 °С. Пробы наносили в составе 5 мкл буфера (2,5 мг/мл бромфеноловый синий, 2,5 мг/мл кселенцианоловый в 8М мочеvine). Визуализацию результатов проводили окрашиванием геля водным раствором 0,07 % StainsAll в 50 % водном растворе формамида.

3.5.6.2 Электрофорез нанокомпозитов и белковых молекул в полиакриламидном геле

Электрофоретическое разделение белковых образцов проводили в полиакриламидном геле с двумя слоями: 10 % разрешающий (2 мл 30 % АА с 0,4 % бАА; 1,5 мл буфера 1,5 М Tris-HCl (pH 8,8), 0,4 % SDS; 2,5 мл очищенной воды) и 5 % концентрирующий слой (0,3 мл 30 % АА с 0,4 % бАА; 0,45 мл буфера 0,5 М Tris-HCl (pH 6,8), 0,4 % SDS; 1,05 мл очищенной воды). Для полимеризации геля добавляли 36 мкл APS и 3,6 мкл TEMED. Пробы наносили в составе 5-25 мкл буфера для нанесения 4х (200 mM Tris-HCl (pH 6,8), 400 mM меркаптоэтанол-2, 4 % SDS, ~0.01 % Кумасси R 250, 40 % глицерин). Визуализацию результатов проводили окрашиванием геля Кумасси (на 100 мл: 0,25 г Кумасси R250, 45 % этанола, 10 % уксусной кислоты, 45 % очищенной воды) на орбитальной шейкере в течение 30 мин. Избыток краски удаляли многократной промывкой геля водой 80 – 90 °С.

3.5.7 ИК-анализ

ИК-Фурье спектры измеряли на ИК-Фурье спектрометре 640-IR (Varian, США) в диапазоне от 4000 до 400 см⁻¹ при комнатной температуре в сопровождении гранул KBr в ЦКП НИОХ СО РАН.

3.5.8 Статистические методы

Все результаты были воспроизведены три и более раз. Статистическую обработку проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Доверительный интервал и математические расчёты проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Excel.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на увеличенный интерес исследователей по всему миру к теме систем доставки биологически активных соединений (БАС) и бесспорное активное развитие области, лишь малая часть конструкций транспорта агентов была одобрена для применения в клинике [29]. Основная доля таких препаратов относится к липосомальным формам лекарств с выраженным профилем токсичности [30]. Однако, многие проблемы, которые могли бы быть решены применением эффективного носителя, до сих пор находятся на стадии исследования. К ним относятся увеличение эффективности лечения онкологических заболеваний, бактериальных и грибковых, а также возможность применения современных методов генной терапии. В случае достижения последнего, станет возможно не только продлить, но и значительно увеличить качество жизни людей с наследственными генетическими патологиями, такими как муковисцидоз, нарушения иммунной системы, гемофилия и т. д. [31]. Кроме того, возможность одновременного использования препаратов на основе химиотерапии и нуклеиновых кислот позволит достичь синергетического эффекта в лечении многих социально-значимых заболеваний [195].

Однако, необходимо продолжать исследования в этой области, чтобы улучшить эффективность и безопасность методов транспорта БАС и преодолеть препятствия, связанные с барьерами клеточной мембраны и иммунной системы. В случае разработки эффективных подходов к доставке нуклеиновых кислот и малых лекарственных станет возможно создание новых лекарственных препаратов, в том числе с применением химии синтетических нуклеиновых кислот, что является важным направлением в фармацевтической индустрии [32].

Одним из перспективных вариантов решения этой проблемы, может быть применение суспензии наночастиц неорганических наночастиц, в первую очередь карбоната кальция, диоксида кремния и их композитов, в качестве контейнера для БАС. Пристальный интерес исследователей к этим вариантам связан с возможностью полной (рН-зависимой, в случае карбоната кальция) деградации частиц на биосовместимые и биоразлагаемые компоненты, что решает проблемы отложенной токсичности и накопления частиц в печени, почках и других органах. Кроме того, материалы обладают пористой структурой, что приводит к увеличенным ёмкостным характеристикам по отношению к грузовым молекулам [235].

Однако, возможность дальнейшей применимости в биомедицине накладывает ряд ограничений ни только на природу материала, но ещё и на параметры наночастиц, которые не всегда соблюдаются в опубликованных методиках. Например, минеральная природа карбоната кальция, обеспечивающая возможность рН-лабильной деградации, является одновременно и

недостатком соединения, так как частицы склонны формировать микрометровые кристаллы, не удовлетворяющие критериям применения в биомедицине из-за размеров, дисперсности и суспензионной стабильности. Соединения на основе диоксида кремния, в связи с природой реагентов, склонны к агрегации в процессе синтеза, приводящей к потере изолированности частиц и, как следствию, укрупнению индивидуальных наноматериалов и композитов на их основе [236].

Несмотря на последние достижения в области стабилизации таких материалов в условиях, близких к физиологическим, и развитие методологических подходов к синтезу наноразмерного карбоната кальция и монодисперсного диоксида кремния, существует ряд проблем, касающихся эффективного присоединения БАС и исследования их дальнейшей стабильности [50]. Но, в случае эффективного связывания пары (груз/носитель) и сохранности исходных свойств комплекса в условиях *in vivo*, может быть получен новый многообещающий биodeградируемый инструмент для терапии и диагностики.

4.1 Синтез неорганических наночастиц

Благодаря активному развитию методологической и приборной базы за последние несколько десятилетий, многие подходы синтеза и характеристики наночастиц стали доступны, например, гетерофазный синтез в эмульсии и методы динамического светорассеяния. Однако, многие практические вопросы получения и стабилизации наноматериалов в суспензионном виде до сих пор не решены [237, 238]. Поэтому, первая часть данной главы будет посвящена детальному изучению влияния композиции реакционной смеси на размер, дисперсность и суспензионную стабильность частиц диоксида кремния, карбоната кальция и их композитов для разработки методик получения наноматериалов до 200 нм. Наночастицы такого размера могут быть введены внутривенно, не вызывая тромбоза. Кроме того, материал такого размера может накапливаться и удерживаться в опухолях из циркулирующей крови благодаря эффекту повышенной проницаемости и удержания (ЭПР). Однако для проникновения через сосудистые структуры оптимальный размер наночастиц должен быть менее 150–200 нм. Напротив, наночастицы размером менее 10–20 нм быстро выводятся посредством почечной фильтрации. Таким образом, данная работа была направлена на синтез нанокомпозитов оптимального размера.

4.1.1 Синтез наночастиц карбоната кальция

Материалы на основе карбоната кальция (CaCO_3) широко используются в медицине и биомедицинских исследованиях, в качестве биоразлагаемых биосовместимых носителей, биологически активных добавок и т.д. Зависимость стабильности CaCO_3 от показателя кислотности среды (pH) делает материалы на его основе перспективными переносчиками терапевтических агентов в участки с пониженным значением pH, такие как опухолевая ткань. Однако, в литературе не представлено протоколов получения стабильной суспензии наночастиц карбоната кальция размером (CaНЧ) до 200 нм (пороговое значение объектов для внутривенного введения и использования EPR-эффекта (enhanced permeability and retention) [239], ввиду склонности частиц формировать кристаллы от 1 мкм и более.

Синтез наночастиц методом соосаждения — простой способ, не требующий дорогостоящего оборудования и установок. Однако, при его применении для синтеза CaCO_3 и эквимольном смешивании CaCl_2 и NaHCO_3 , в отсутствие дополнительных реагентов, получаются частицы микрометрового масштаба (данные динамического светорассеяния (ДСР): гидродинамический диаметр (d) 2950 ± 400 нм, индекс полидисперсности (ИПД) $0,1 \pm 0,05$).

Для получения частиц субмикронного размера было тщательно изучено влияние композиции реакционной смеси на размеры получаемых частиц. В первую очередь оценивали влияние стехиометрических соотношений катионов кальция (Ca^{2+}) и карбонат анионов (CO_3^{2-}) на размер образующихся частиц. Варьируя концентрацию хлорида кальция (0,007–0,100 М) при постоянной концентрации карбонат аниона и наоборот, установлено, что размер образующихся частиц при всех испытанных концентрациях превышал 1 мкм. По данным ДСР, использование 10-кратного избытка CO_3^{2-} над Ca^{2+} позволяет получить частицы наименьшего размера в исследованном диапазоне (d = 1470 ± 180 нм, ИПД = $0,635 \pm 0,002$), эти пропорции были использованы здесь и далее при синтезе CaCO_3 .

Добавление поверхностно-активных веществ и высокомолекулярных соединений широко используется для получения наночастиц размером до 200 нм [240]. Исследовали влияние добавления в реакционную смесь следующих поверхностно-активных веществ: додецилсульфат натрия (анионный детергент), бромид цетилтриметиламмония (катионный детергент), Твин 20, Triton X-100 (неионогенные детергенты) и высокомолекулярных соединений полиэтиленгликоля (ПЭГ-1000, -2000 и -6000). По данным ДРС, только добавление детергента Твин 20 приводило к значительному уменьшению размера частиц (d = 450 ± 30 нм, ИПД = $0,11 \pm 0,03$). При добавлении ПЭГ, независимо от молекулярной массы образовывались частицы размером более 700 нм.

Далее исследовали эффекты комбинированного добавления ПЭГ и Твин 20. Совместное добавление этих соединений (ПЭГ 2000, Твин 20) привело к получению СаНЧ с наименьшим гидродинамическим размером ($d = 340,2 \pm 0,3$ нм, ИПД = $0,177 \pm 0.003$).

Чтобы повысить стабильность и монодисперсность СаНЧ, а также уменьшить их размер, далее исследовали влияние добавления в ранее выбранную реакцию смесь ($\text{CO}_3^{2-}:\text{Ca}^{2+} = 10:1$, ПЭГ 2000, Твин 20) культуральной среды (DMEM) совместно и / или индивидуально с катионами Mg^{2+} [241]. Образцы были охарактеризованы методами ДСР (Таблица 4.1) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) (рисунок 4.1).

Таблица 4.1 – Влияние изменения одного параметра в реакционной смеси на гидродинамический размер (d) и индекс полидисперсности частиц (ИПД)

Шифр	Особые условия	d , нм	ИПД	Рис. 4.1
СаНЧ ₁	—	339 ± 4	$0,20 \pm 0,01$	А
СаНЧ ₂	Растворитель: изопропанол	2637 ± 125	$0,33 \pm 0,05$	В
СаНЧ ₃	MgCl_2 , 0,01 М	278 ± 4	$0,15 \pm 0,01$	С
СаНЧ ₄	DMEM, 2 об.%	333 ± 2	$0,26 \pm 0,01$	Д
СаНЧ ₅	MgCl_2 , 0,01 М; DMEM, 2 об.%	326 ± 6	$0,26 \pm 0,01$	Е
СаНЧ ₆	MgCl_2 , 0,05 М; DMEM, 2 об.%	332 ± 1	$0,19 \pm 0,01$	Ф
СаНЧ ₇	MgCl_2 , 0,01 М; DMEM, 10 об.%	200 ± 10	$0,10 \pm 0,01$	Г
СаНЧ ₈	MgCl_2 , 0,05 М; DMEM, 10 об.%	276 ± 4	$0,10 \pm 0,01$	Н

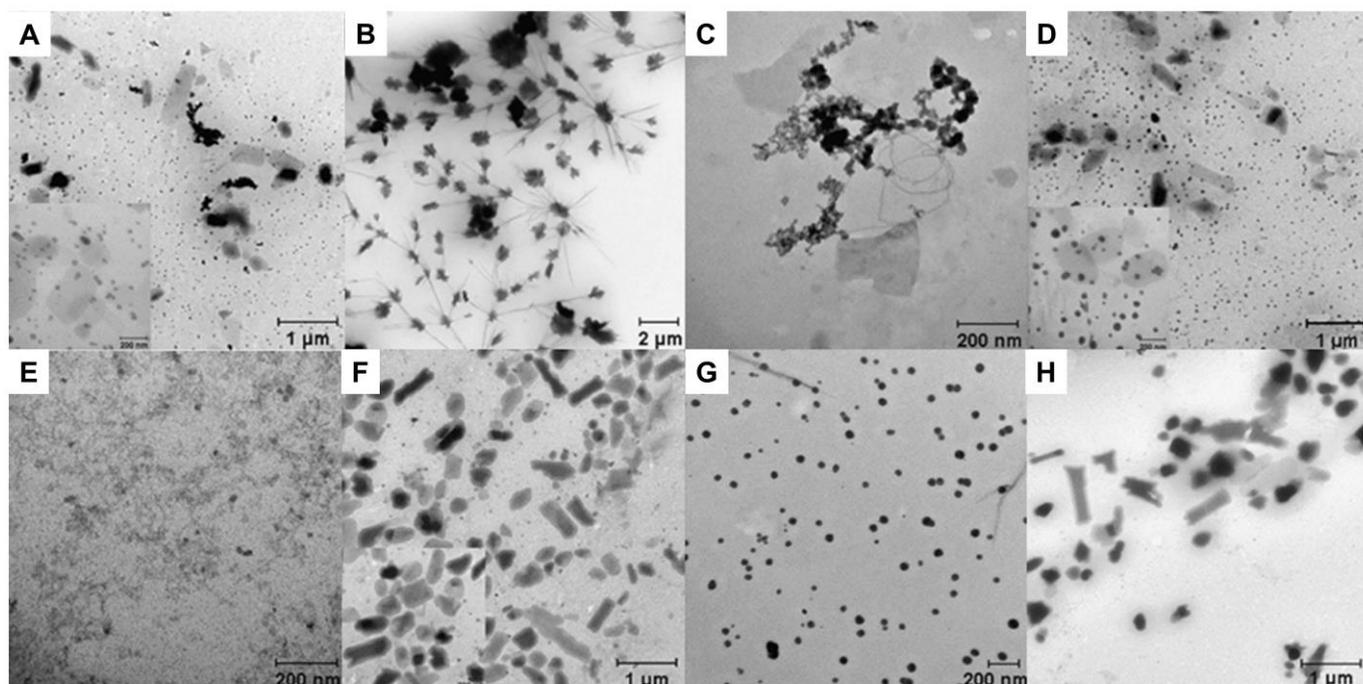


Рисунок 4.1 – Данные ПЭМ о СаНЧ₁ (А), СаНЧ₂ (В), СаНЧ₃ (С), СаНЧ₄ (Д), СаНЧ₅ (Е), СаНЧ₆ (Ф), СаНЧ₇ (Г) и СаНЧ₈ (Н), шкала 1 мкм (А, Д, Н); 2 мкм (В); 0,2 мкм (С, Е, Г)
(Авторы приносят благодарность Полетаевой Ю.Е. и проф., д.б.н, г.н.с. Рябчиковой Е.И.)

Видно, что диаметр наночастиц по данным ПЭМ и ДРС сильно различается (таблица 4.1, рисунок 4.1). Вероятно, этот эффект связан с эффективным взаимодействием молекул воды с отрицательно заряженной поверхностью частиц и, как следствие, появлением сольватной оболочки, достаточной для регистрации методом ДРС. Иначе говоря, этот эффект может быть связан с различной пробоподготовкой образцов к анализу: метод ПЭМ детектирует сухие препараты, а ДРС – частицы в растворе с учётом вклада гидратной оболочки (или других молекул из раствора хранения) в размер частиц [126, 242].

Таким образом, показано, что состав реакционной смеси при синтезе СаНЧ существенно влияет на морфологические свойства наночастиц: размер и ультраструктуру (Таблица 4.1, Рисунок 4.1). Как упоминалось выше, присутствие ПЭГ-2000 и Твин 20 (СаНЧ₁, Рисунок 4.1 А) привело к получению СаНЧ с широким распределением по размерам, за пределами диапазона, оптимального для биомедицинских приложений. Замена водного растворителя на органический способствовала увеличению эффективности роста кристаллов и увеличению размера частиц (СаНЧ₂, Рисунок 4.1 В). Образцы, полученные в присутствии Mg²⁺ без дополнительных компонентов, склонны к агрегации. Поскольку преодолеть эту проблему ни химическими, ни физическими методами не удалось, далее материал был отбракован. Добавление DMEM в отсутствие хлорида магния не вызвало кардинальных отличий от образца, полученного в присутствии Твин 20 и ПЭГ (рисунок 4.1 А, D). При сравнении изображений Е–Н (рисунок 4.1) видно, что совместное добавление 10% DMEM и 0,01 М MgCl₂ (СаНЧ₇, Рисунок 4.1G) оптимально.

В настоящей работе для получения высококачественной суспензии СаНЧ была использована смесь стабилизирующих агентов, таких как полиэтиленгликоль 2000 (ПЭГ 2000) и Твин 20, в присутствии клеточной среды DMEM. Новизна подхода, помимо использования различного состава реакционной смеси на этапе формирования СаНЧ, заключается в отсутствии необходимости постсинтетической стабилизации материала, изменяющей его характеристики, в том числе чувствительность к рН и дальнейшую восприимчивость лекарственным препаратам. ПЭГ-2000 и Твин 20 являются хорошо известными амфифильными поверхностно-активными веществами, распространённо применяемыми для изменения свойств системы, например, улучшения растворимости [243] или увеличения пролонгированности [244] (рисунок 4.2).

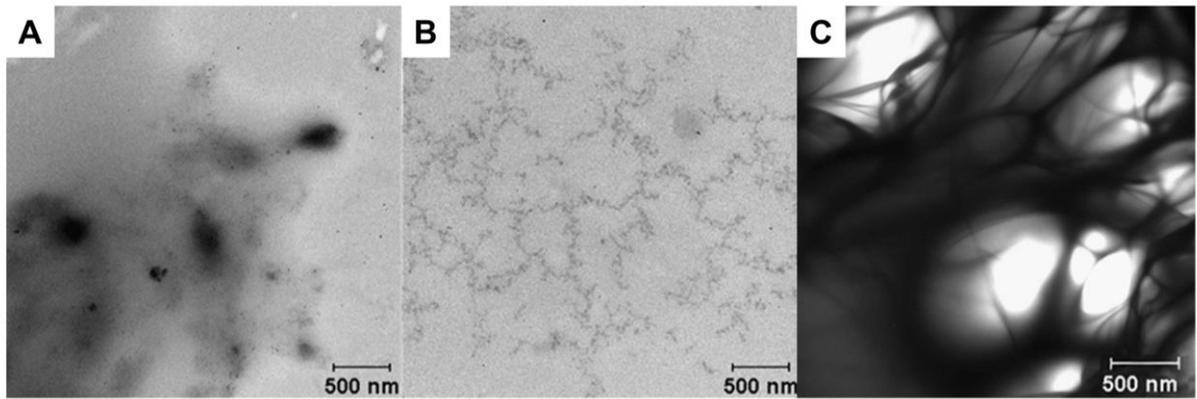


Рисунок 4.2 – Данные ПЭМ Твин 20 (А), ПЭГ-2000 (В), композиция Твин 20 и ПЭГ-2000 (С), шкала 500 нм

Данные просвечивающей электронной микроскопии демонстрируют формирование полимерной структуры которая служит матрицей, ограничивающей рост частиц на стадии нуклеации, и, по всей видимости, оказывающей влияние на дальнейшую стабилизацию материала [50, 243, 244]. Более того, из литературы известно, что ПЭГелированные материалы характеризуются уменьшенным неспецифическим взаимодействием с белками, улучшенной биосовместимостью и циркуляцией [245]. Аминокислоты, витамины и соли, содержащиеся в DMEM предположительно стабилизируют наночастицы.

Тщательным отбором состава и концентраций компонентов реакционной смеси получены суспензионно стабильные моодисперсные сферические CaНЧ₇ (далее CaНЧ) размером 200 ± 10 нм. Однако, в связи с многокомпонентным составом рационного раствора, для подтверждения кальций карбонатной природы материала, был проведен рентгеноструктурный анализ (рисунок 4.3).

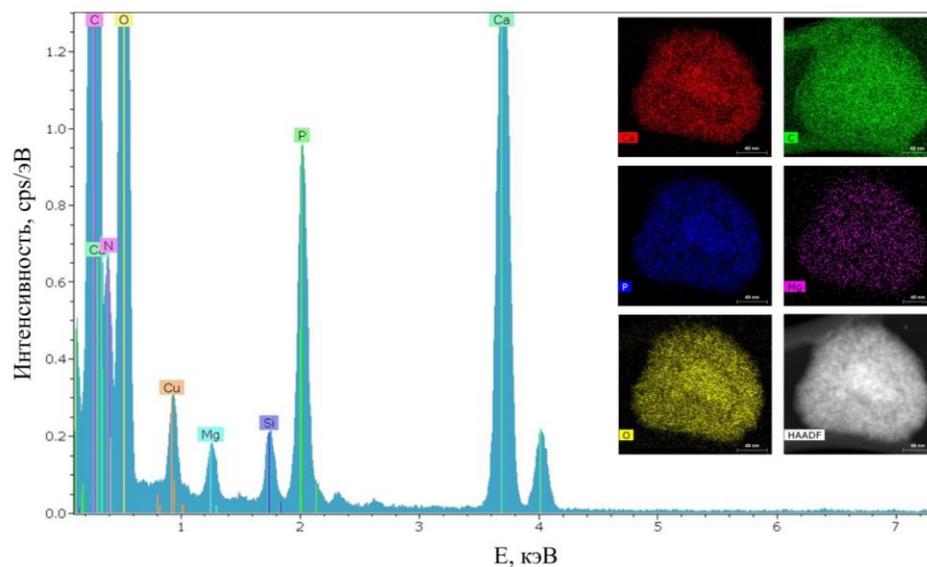


Рисунок 4.3 – Данные рентгеноструктурного анализа любезно предоставлены ЦКП ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН (Авторы приносят благодарность Хмеленину Д.Н.)

Характеристические пики на рентгенограмме (рисунок 4.3) доказывают преимущественное содержание главных элементов CaCO_3 в образце, что согласуется с поэлементными снимками, показывающими равномерное распределение материалов в образце.

Пористая структура материала была подтверждена методом ПЭМ большого разрешения в ЦКП ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН (рисунок 4.4).

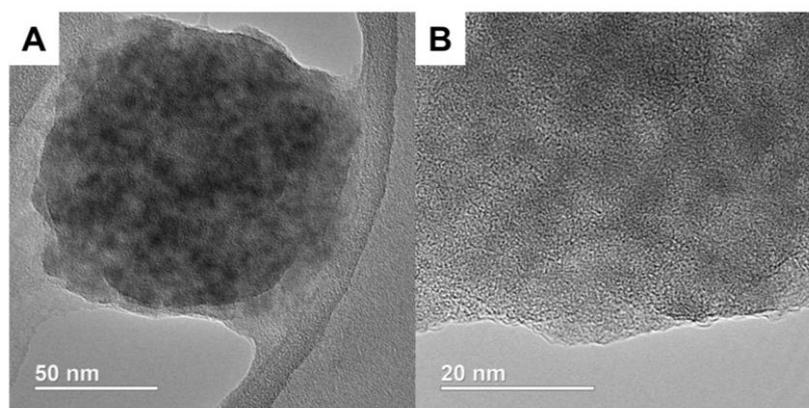


Рисунок 4.4 – Данные ПЭМ о СаНЧ шкала 50 нм (А) и 20 нм (В) получены ЦКП ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН (Авторы приносят благодарность Хмеленину Д.Н.)

На просвечивающей электронной фотографии (рисунок 4.4) отчетливо видна пористая поверхность наночастиц, что, в перспективе, может обеспечивать увеличенную сорбционную способность материала по отношению к БАС.

Далее разработанная методика получения наноматериалов карбоната кальция была протестирована на масштабируемость и стандартизуемость. Увеличение реакционного объема в пятьдесят раз не привело к изменению размера частиц (195 ± 5 нм).

Второе испытание проводили путём смены всех реагентов на аналогичные позиции отличных производителей. Показано, что характеристики получаемых наноматериалов не зависят от производителя исходных солей и добавок. Более того, на примере фосфата кальция продемонстрирована применимость подхода для получения других наночастиц нерастворимых солей кальция до 200 нм. В реакции гидрофосфата натрия и хлорида кальция с сохранением ранее выбранной композиции и стехиометрии реакционной смеси были получены наночастицы на основе фосфата кальция гидродинамическим размером 130 ± 4 нм и индексом полидисперсности $0,16 \pm 0,01$ (рисунок 4.5).

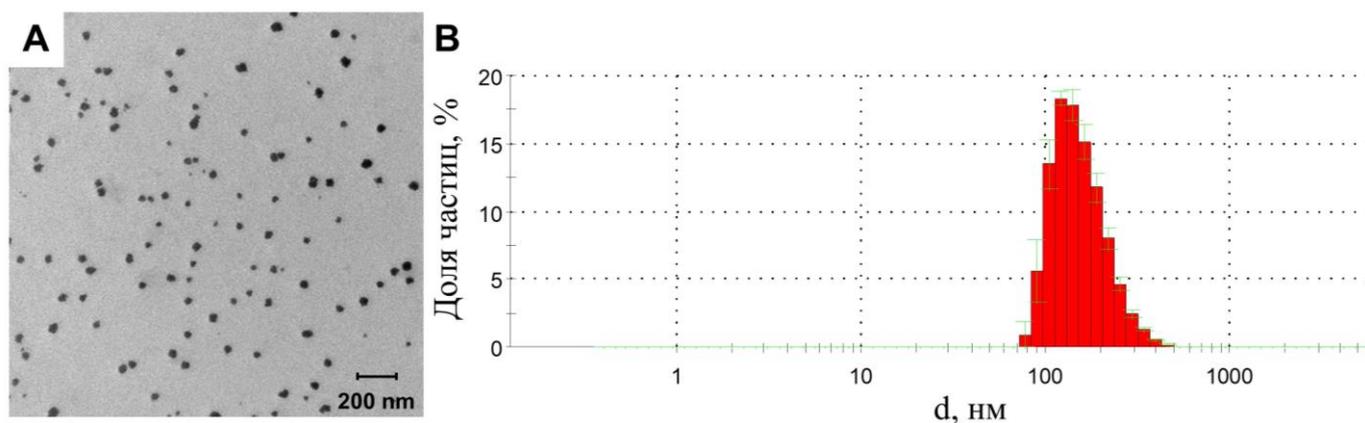


Рисунок 4.5 – Данные ПЭМ, шкала 200 нм (А) и ДСР (В) о размере биodeградируемого материала фосфата кальция

На рисунке 4.5 видно, что биodeградируемый материал фосфата кальция характеризуется размером от 20 до 50 нм и отсутствием агломератов микрометровых частиц. Возможность получения других монодисперсных материалов на основе кальция размером до 200 нм подчеркивает перспективность и универсальность предложенного способа для биомедицины.

Таким образом, разработанные протоколы прошли все необходимые испытания для возможности дальнейшего коммерческого применения и автоматизации, а протокол синтеза был запатентован [246]. Синтезированные материалы характеризуются размером до 200 нм, высокой степенью монодисперсности и пористой структурой. Параметры частиц делают их перспективными кандидатами для применения в качестве компонентов системы доставки БАС, в частности противоопухолевых препаратов (малые лекарственные молекулы, нуклеиновые кислоты).

4.1.1.1 Синтез гибридных наночастиц карбоната кальция и смешанного оксида железа (Fe@CaНЧ)

В продолжении работы с наноматериалом карбоната кальция, для придания направленности системе, был получен гибридный наноматериал, обладающий комбинированными свойствами: рН-лабильностью карбоната кальция и магнитным моментом смешанного оксида железа (Fe_3O_4). Добавление металлического ядра в дальнейшем может обеспечить возможность применения материала в магнитно-резонансной томографии, гипертермической терапии, тераностики и магнитной сепарации [247, 248]. Индивидуальные магнитные наночастицы (МНЧ) являются перспективным инструментом для целевой доставки противораковых агентов с помощью внешнего магнитного поля. Однако для безопасного применения *in vivo* поверхность МНЧ должна быть модифицирована

высокобиосовместимым материалом для достижения улучшенной стабильности, растворимости и снижения токсичности [138]. Таким образом, гибридный нанокompозит магнитное ядро/неорганическая оболочка обладает заметным преимуществом перед другими МНЧ.

Однако лишь в нескольких работах показано возможное терапевтическое применение Fe@CaНЧ, в связи с проблематичным контролируемым получением наноразмерного слоя карбоната кальция на поверхности МНЧ [206].

Синтез нанокompозитов проводили в две последовательные стадии: синтез магнетитового ядра с последующим синтезом карбонатного покрытия. Магнитные наночастицы оксида железа были синтезированы классическим методом соосаждения. Процедура заключается в соосаждении солей Fe²⁺/Fe³⁺ в присутствии ПАВ (олеиновая кислота) и основания [230]. Слой CaCO₃ был синтезирован, путём адаптации ранее описанного протокола получения наночастиц карбоната кальция. Для выбора оптимального количества магнитной компоненты, было синтезировано несколько вариантов гибридов с содержанием МНЧ от 0,45 до 4,5 мкг/мл. Поверхностный заряд, размер и морфология наночастиц являются важными факторами, влияющими на интернализацию клеток и тканей. Как и в случае карбоната кальция, задачей было получить частицы размером до 200 нм, однако, для индивидуальных МНЧ характерно формирование частиц до 20 нм, что является неоптимальным размером для поставленной задачи. Маленькие наночастицы (5–20 нм) демонстрируют высокий почечный клиренс. Наночастицам большого размера (>200 нм) трудно пройти через клеточные мембраны [249]. Полученные наноразмерные Fe@CaНЧ были охарактеризованы методами динамического светорассеяния (Таблица 4.2) и просвечивающей электронной микроскопии (рисунок 4.6). В качестве контроля в тех же условиях были синтезированы наночастицы CaНЧ.

Таблица 4.2 – Влияние содержания МНЧ в композите Fe@CaНЧ на гидродинамический размер (d), размер частиц, определенный методом ПЭМ (D), индекс полидисперсности частиц (ИПД) и поверхностный заряд (ζ-Потенциал)

МНЧ, мкг/мл	d, нм	D, нм	ИПД	ζ-Потенциал, мВ	Рис. 4.5
4,5	130 ± 2	13 ± 2	0,26 ± 0,01	-15,0 ± 0,3	С
1,8	118 ± 3	16 ± 2	0,248 ± 0,004	-14,9 ± 0,3	D
0,9	130 ± 9	18 ± 3	0,31 ± 0,01	-15,5 ± 0,4	E
0,45	121 ± 6	22 ± 1	0,221 ± 0,004	-15,6 ± 0,5	F
МНЧ	88 ± 5	11 ± 4	0,14 ± 0,02	21,6 ± 0,7	A
CaНЧ	204 ± 8	26 ± 3	0,26 ± 0,01	-17,3 ± 0,4	B

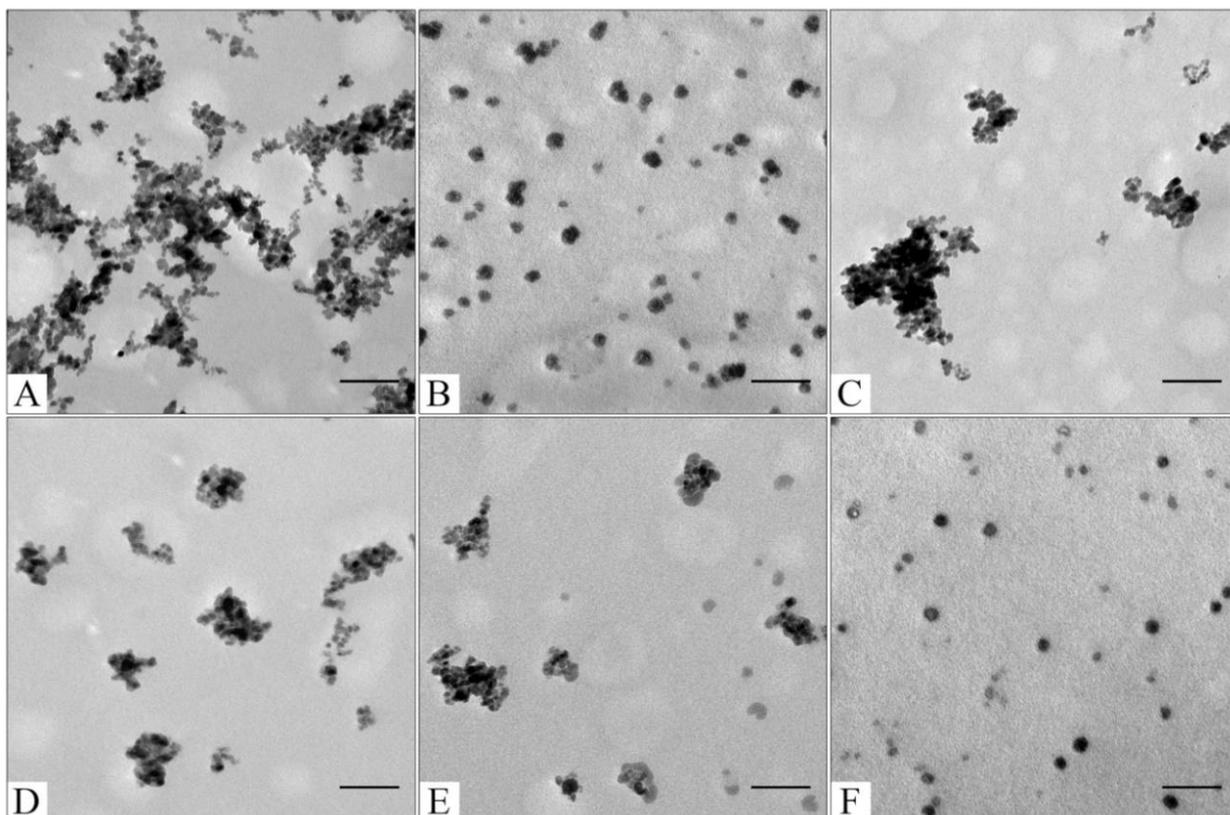


Рисунок 4.6 – Данные ПЭМ об исходных МНЧ (А); контрольных СаНЧ (В); Fe@СаНЧ, полученный с использованием 4,5 мг/мл (С); 1,8 мг/мл (D); 0,9 мг/мл (Е); 0,45 мг/мл (F) МНЧ, шкала 100 нм

По данным ДСР, нанокompозиты Fe@CaНЧ имеют гидродинамический размер 120–130 нм, что на 30 нм больше исходных МНЧ и оптимально для применения наногибридов в качестве основы системы доставки БАС. Однако, диаметр наночастиц по данным ПЭМ и ДРС сильно различаются, как и в случае индивидуальных СаНЧ [250]. Также видно (рисунок 4.6), что, при уменьшении количества магнитного ядра в образце, доля карбонатной составляющей увеличивается, а степень агрегации исходных частиц снижается (рисунок 4.6 В–Е), что наглядно выражено на рисунке 4.6 Е.

Таким образом, основываясь на дисперсности частиц, для дальнейшего исследования был выбран магнитный нанокompозит с наименьшим количеством МНЧ (0,45 мкг/мл) и наибольшим содержанием карбонатной компоненты (рисунок 4.6 F). Высокое сходство между изображениями ПЭМ выбранного образца и индивидуальных СаНЧ (рисунок 4.6 В) может указывать на отсутствие магнитного сердечника. Однако, образец обладает магнитными свойствами, что доказано с помощью магнитной сепарации (рисунок 4.7).

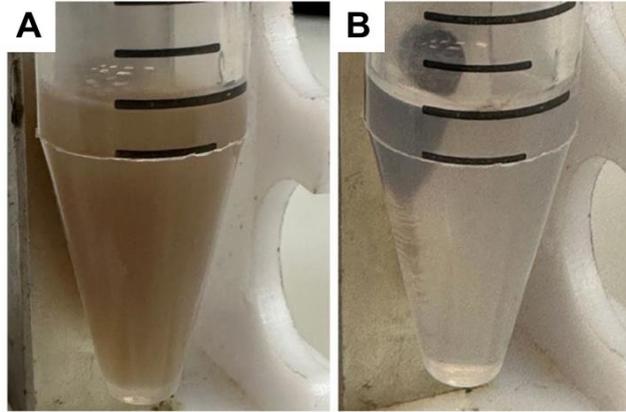


Рисунок 4.7 – Фотографии Fe@CaHЧ (0,45 мкг/мл), помещенных на магнитный штатив в начальный момент времени (А) и через 15 секунд (В)

На рисунке 4.7 видно, что, с помощью магнита, можно декантировать выбранный композит из раствора за 15 секунд. Кроме того, для подтверждения наличия в составе гибрида карбонатной и магнитной компонент, образец анализировали методом инфракрасной спектроскопии (ИК-Фурье спектроскопия, Рисунок 4.8).

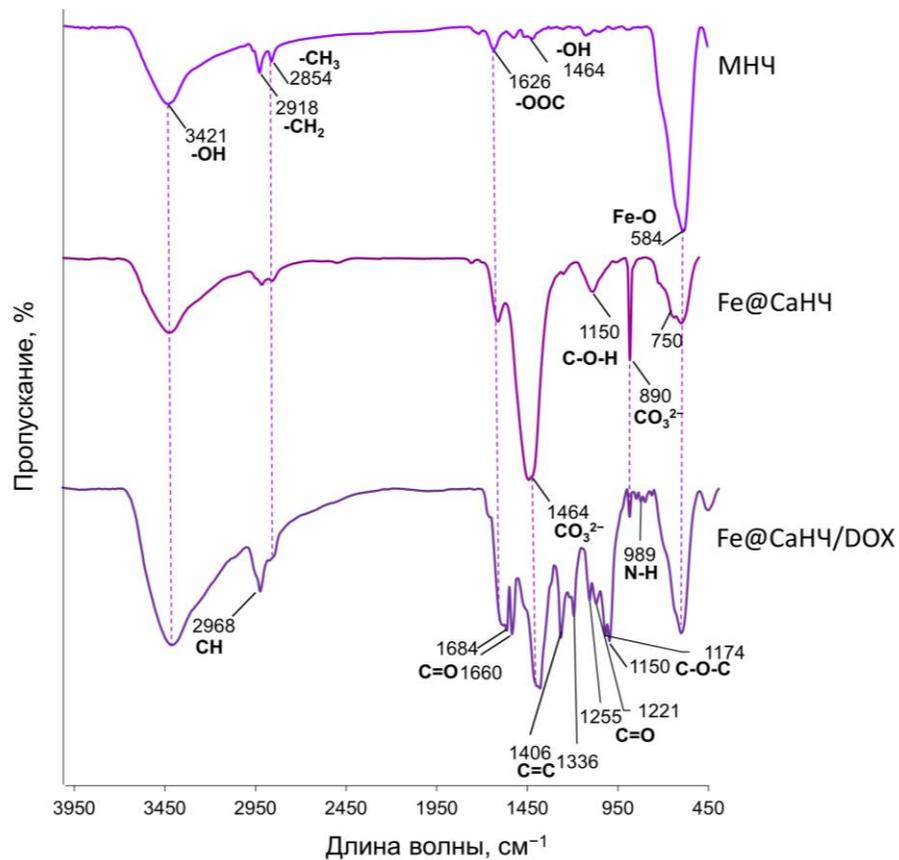


Рисунок 4.8 – ИК-спектры нанокompозитов MnЧ, Fe@CaHЧ и Fe@CaHЧ/DOX

На ИК-спектрах наночастиц смешанного оксида железа (II, III), покрытых олеиновой кислотой (МНЧ), видны характерные пики для этого типа материалов: при 3421, 2918 (асимметричный участок $-\text{CH}_2$), 2854 (симметричный участок $-\text{CH}_2$), 1626 ($-\text{COO}$ группа), 1464 (колебание $-\text{OH}$ в плоскости) и 584 см^{-1} (колебание $\text{Fe}-\text{O}$) [251, 252]. В спектре $\text{Fe}@\text{CaHЧ}$ видны чёткие пики от МНЧ и дополнительные пики, подтверждающие наличие карбоната в образце: 1464 (основной асимметричный участок), 1150 (симметричный участок), 890 (внеплоскостной изгиб) и $\sim 750 \text{ см}^{-1}$ (плоскостной изгиб), что соответствует CO_3^{2-} [251, 253, 254].

Таким образом, в данной части работы синтезирован композитный наноматериал, получение которого в литературе описано на момент публикации преимущественно только для микрометровых аналогов [151]. Размер ($121 \pm 6 \text{ нм}$), дисперсность ($0,221 \pm 0,004$) и магнитные свойства материала делают его перспективным кандидатом для применения в биомедицине в качестве компонента систем терапии и диагностики *in vivo*.

4.1.2 Синтез наночастиц диоксида кремния

С одной стороны, диоксид кремния (SiO_2) является химически реакционноспособным материалом и, в отличие от карбоната кальция, не подвержен деградации в органических растворителях, что позволяет проводить широкий спектр реакций функционализации его поверхности. С другой стороны, наночастицы на основе этого материала применимы в биомедицине благодаря биосовместимости и биоразлагаемости (переходит в кремниевую кислоту, которая выводится почками) [255]. На сегодняшний день такие материалы нашли свое применение не только в лабораторных исследованиях, но и в пищевой промышленности, в качестве различных компонентов упаковок и добавок [256].

Однако, в случае разработки протокола синтеза наночастиц диоксида кремния (SiHЧ) для биомедицинских применений, несложно получить частицы размером до 200 нм, используя существующие методики [257]. Основная проблема таких материалов, полученных по стандартным протоколам, заключается в склонности частиц к агрегации на этапе синтеза.

В работе были апробированы методы получения наночастиц диоксида кремния (SiHЧ) с использованием трех различных подходов, основанных на гидролизе тетраэтоксисилана (ТЭОС): микроэмульсионный вариант [258], синтез в присутствии детергентов (СТАВ, НТАВ) [234] и спиртовой подход в присутствии аммиака [259]. Материалы были охарактеризованы методами ДСР и ПЭМ (Таблица 4.3, Рисунок 4.9).

Таблица 4.3 – Влияние выбранного метода синтеза SiНЧ на гидродинамический размер (d) и индекс полидисперсности частиц (ИПД)

Метод	Вариации	d, нм	ИПД	Рис. 4.9
В присутствии детергентов	СТАВ	447 ± 9	$0,15 \pm 0,01$	А
	НТАВ	376 ± 28	$0,18 \pm 0,01$	В
Микроэмульсионный	Органическая фракция	558 ± 3	$0,19 \pm 0,02$	—
	Промежуточная фракция	107 ± 10	$0,32 \pm 0,01$	С
	Водная фракция	118 ± 8	$0,28 \pm 0,01$	—
Спиртовой гидролиз аммиака	0,010 М ТЭОС	$11,5 \pm 0,3$	$0,25 \pm 0,01$	—
	0,018 М ТЭОС	65 ± 5	$0,09 \pm 0,01$	Е, F
	0,040 М ТЭОС	23 ± 6	$0,13 \pm 0,01$	D
	0,200 М ТЭОС	166 ± 3	$0,10 \pm 0,02$	G, H

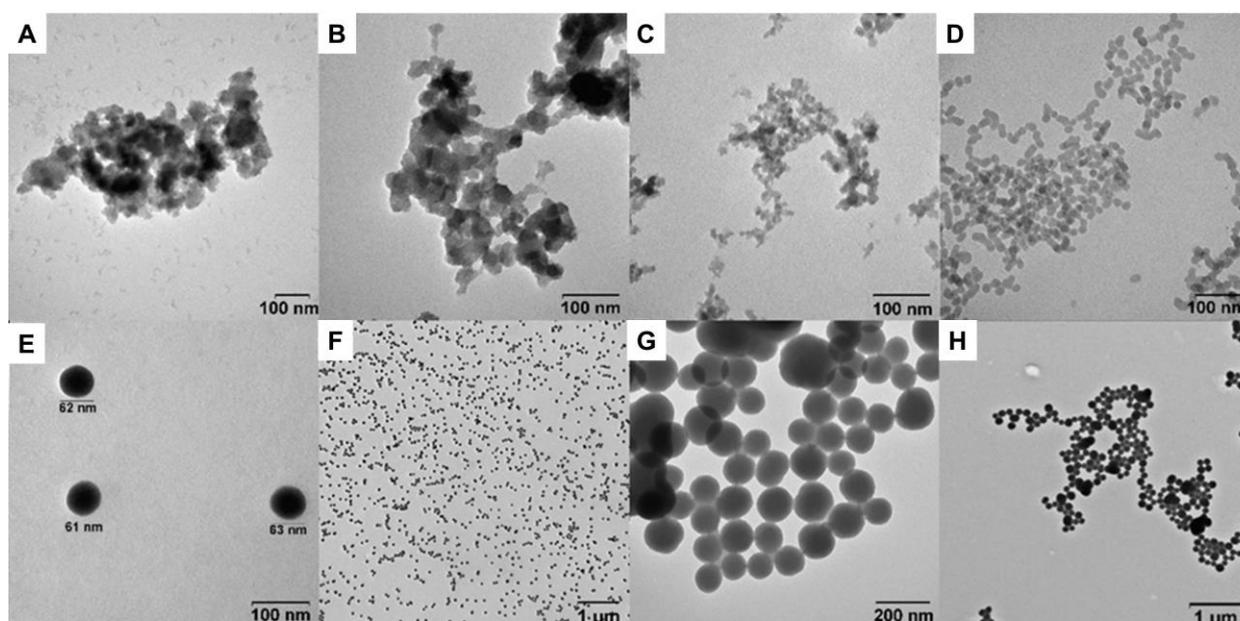


Рисунок 4.9 – Микрофотографии ПЭМ SiНЧ, полученных в присутствии СТАВ (А) и НТАВ (В), микроэмульсионным вариантом (С) и с добавлением 0.040 М (D), 0.018 М (Е, F), 0.200 М ТЭОС (G, H), шкала 100 нм (А – Е), 1 мкм (F, H), 200 нм (G)

На ПЭМ-изображениях (рисунок 4.9 А – С) видно высокую степень агрегации частиц. Кроме того, SiНЧ, полученные микроэмульсионным методом (рисунок 4.9 С), нестабильны в водных растворах при хранении. Сферические частицы небольшого размера были получены третьим способом (Таблица 4.3, Рисунок 4.9 D – H). SiНЧ, полученные в диапазоне концентраций ТЭОС 0,018 – 0,040 М, имеют оптимальный размер для биологических приложений. Для дальнейших исследований были выбраны частицы, полученные при гидролизе 0,018 М ТЭОС

(рисунок 4.9 Е), ввиду наибольшей однородности материала и отсутствия агрегации (слипания) частиц, что явно выражено у образца, представленного на Рисунке 4.9 Г.

Таким образом, были исследованы способы получения монодисперсных биоразлагаемых биосовместимых наноматериалов на основе карбоната кальция и диоксида кремния размером до 200 нм. Разработаны новые протокол получения суспензии наночастиц карбоната кальция размером 200 ± 10 нм и их нанокомпозита с МНЧ 121 ± 6 нм, а также оптимизированы методы синтеза SiНЧ 65 ± 5 нм с высокой долей обособленности наночастиц.

Стабильность материалов, как в водных растворах, так и в условиях, близких к физиологическим, критична для дальнейшей применимости наноматериалов и будет рассмотрена далее.

4.2 Исследование стабильности полученных наноматериалов в водных растворах и физиологических жидкостях

Стабильность наночастиц в водных растворах и в условиях, близких к физиологическим, является важным фактором, как для биомедицинских исследований, так и для возможности их дальнейшего клинического применения. Для полученных CaНЧ, Fe@CaНЧ и SiНЧ регистрировали изменение гидродинамических размеров от времени в разных растворах хранения: натрий ацетатный буфер (AcBuf: pH 4,0 – 6,0) для моделирования условий опухолевого микроокружения, натрий-фосфатный буфер (PBS: pH 7,4) используется для внутривенных инъекций, DMEM и 10% фетальная бычья сыворотка (FBS) – имитация условий *in vivo* (Таблица 4.4).

Таблица 4.4 – Влияние раствора хранения на изменение размера частиц CaНЧ, Fe@CaНЧ и SiНЧ в начальный момент времени (через 5 минут инкубации частиц в растворе) и спустя 7 дней проведения эксперимента. Регистрацию гидродинамического размера проводили в растворе хранения

НЧ Исходный d, нм		CaНЧ 205 ± 6		Fe@CaНЧ 125 ± 3		SiНЧ 63 ± 4	
Раствор хранения	pH	d, нм (5 мин)	d, нм (7 дней)	d, нм (5 мин)	d, нм (7 дней)	d, нм (5 мин)	d, нм (7 дней)
AcBuf	4,0	—	—	90 ± 7	85 ± 5	63 ± 1	70 ± 1
	5,0	—	—	95 ± 2	86 ± 4	62 ± 1	68 ± 3
	6,0	—	—	130 ± 3	157 ± 9	77 ± 5	75 ± 3
PBS	7,4	320 ± 7	330 ± 8	370 ± 20	350 ± 7	73 ± 2;	70 ± 1
DMEM	7,4	620 ± 6	610 ± 10	870 ± 15	760 ± 9	66 ± 1	68 ± 2
FBS, 10%	7,5	250 ± 20	215 ± 10	98 ± 10	115 ± 8	82 ± 3	80 ± 5

В таблице 4.4 видно, что SiНЧ демонстрируют стабильное сохранение гидродинамического размера во всех исследованных растворах хранения в течение одной недели, что согласуется с химической стабильностью диоксида кремния [18, 260]. В условиях с пониженным значением pH (ацетатный буфер с pH 4 – 6) материалы CaНЧ и Fe@CaНЧ ведут себя индивидуально, что объясняется наличием pH-лабильной компоненты карбоната кальция в образцах. Для Fe@CaНЧ в растворах буфера с pH 4,0 и 5,0 наблюдается уменьшение размера частиц, что, вероятно, связано с частичной или полной деградацией карбонатной компоненты. CaНЧ не удалось проанализировать аналогичным вариантом из-за быстротекущего разрушения сферической структуры материала. В PBS для CaНЧ и Fe@CaНЧ наблюдается увеличение размера до 350 – 330 нм, что, вероятно, связано с изменением гидратной оболочки, в связи с изменением солевого содержания растворителя. Ещё большее увеличение композитов карбоната кальция (до 620 нм) в DMEM можно объяснить сложным составом клеточной среды (соли, аминокислоты, витамины) и возможной сорбцией её компонентов на поверхность наноматериалов. Ожидаемо, что инкубация в 10 % FBS не привела к значительному изменению размера образцов, что согласуется с литературой и применением фетальной сыворотки для стабилизации наноматериалов [261, 262].

Для подтверждения рассуждений об изменении гидратной оболочки частиц, а не увеличения их размера, через 8 дней инкубации CaНЧ и Fe@CaНЧ, хранившиеся в PBS и DMEM, были изъяты из растворов хранения, ресуспендированы в деионизированной воде и, без обработки ультразвуком, проанализированы с методом ДСР. Гидродинамический размер для всех образцов вернулся к исходному, с изменением размера не более, чем на 10 %.

В продолжении работы установления стабильности CaНЧ был проведен технический простой эксперимент, устанавливающий pH-зависимую деградацию частиц. Для этого равную массу частиц (95 мг) инкубировали в растворах 100 мМ натрий ацетатного буфера pH 3,0 – 7,0 в течение 24, далее частицы отделяли от надосадочной жидкости, а массу сухого остатка регистрировали (Таблица 4.5).

Таблица 4.5 – Влияние раствора хранения на массы сухого остатка частиц после инкубации 24 ч

pH	m, мг
3,0	0,0 ± 0,1
4,0	0,0 ± 0,1
5,0	30 ± 5
6,0	75 ± 1
7,0	95 ± 1

Установлено, что карбонат кальция проявляет pH чувствительность в диапазоне pH 3 – 6: эффективность разложения увеличивается с уменьшением показателя кислотности. Эти данные,

дополнительно к биоразлагаемости, делают СаНЧ перспективным доставщиком в области с пониженным рН, в том числе в области опухолевых тканей. Однако, рН-зависимость накладывает ограничения на условиях хранения частиц в суспензионном виде.

Аналогичная процедура исследования степени рН-деградации была проведена для наноматериалов фосфата кальция. Однако, материал продемонстрировал меньшую рН-лабильность, в сравнении с карбонатом кальция в аналогичных условиях (данные не представлены), поэтому далее СаР не исследовался.

На следующем этапе для СаНЧ, Fe@СаНЧ и SiНЧ регистрировали изменение размера частиц при хранении в дистиллированной воде при 7°C в концентрации 5 мг/мл до полугода (рисунок 4.10).

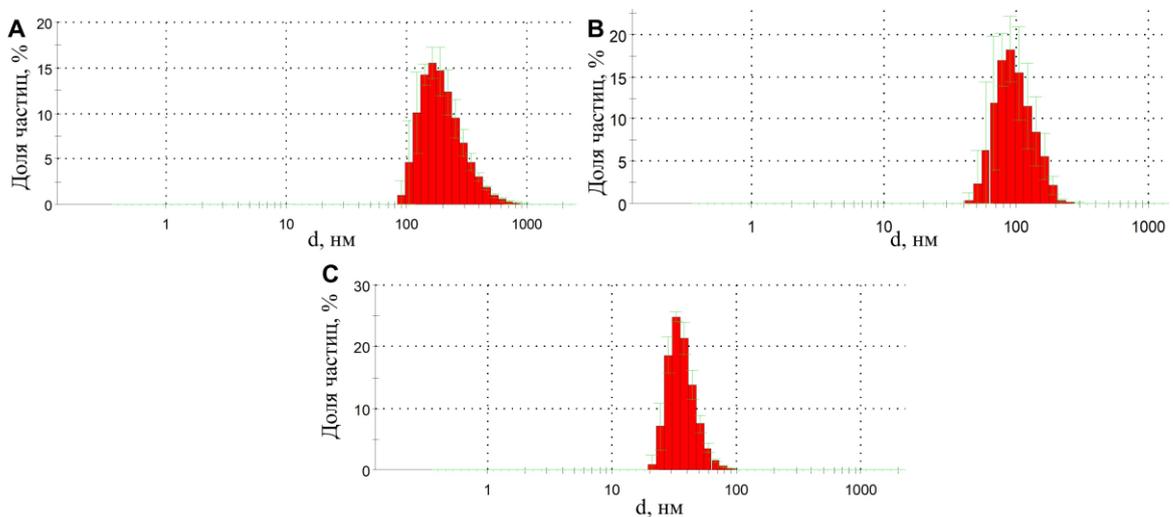


Рисунок 4.10 – Распределение по размеру частиц СаНЧ (А), Fe@СаНЧ (В), SiНЧ (С), полученное методом ДСР спустя полгода хранения в дистиллированной воде при 7°C.

Гидродинамический размер составил 197 ± 7 нм, 139 ± 5 и 67 ± 2 нм для СаНЧ, Fe@СаНЧ, SiНЧ соответственно

Видно (рисунок 4.10), что, при хранении в воде, частицы сохраняют гидродинамический размер и узкое распределение по размерам до полугода без дополнительной стабилизации, что является достаточным для совершения необходимых экспериментальных манипуляций. Кроме того, частицы демонстрируют стабильность в условиях, близких к физиологическим, до 7 дней, что достаточно для полного естественного выведения материалов из организма [263].

Таким образом, показана суспензионная стабильность полученных наноматериалов в водных растворах и в условиях, близких к физиологическим. Кроме того, исследована область и эффективность разложения СаНЧ при рН близком к показателям кислотности опухолевого микроокружения.

Следующая глава будет посвящена модификации поверхности наночастиц для специализации их дальнейшего приложения.

4.3 Модификация поверхности неорганических наночастиц и доказательство их биомедицинской применимости

Модификация наночастиц направлена на специализацию наноматериалов для дальнейшей применимости, путём присоединения функциональных групп или молекул [264, 265]. На поверхность наноматериалов могут быть нанесены синтетические полимеры (полиэтиленгликоль, полиэтиленмин, Твин 20 и т.д.) [266, 267, 268], неорганические наноматериалы (золото, диоксид кремния и др.) [269, 270, 271], в том числе оболочки солей (например, карбоната кальция) [205, 242], или биоинспирированные материалы (белки, углеводы, нуклеиновые кислоты, аптамеры, полидопамин) [272, 273 , 274]. (рисунок 4.11).

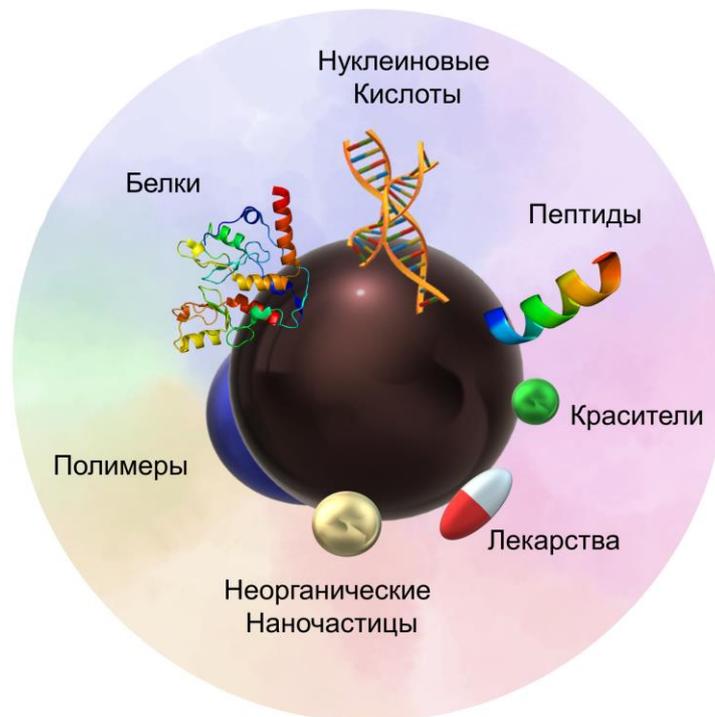


Рисунок 4.11 – Схема гибридных материалов, которые могут быть получены функционализацией наночастиц

Нанесение на поверхность наноматериалов дополнительных групп может обеспечить не только придание новых свойств системе (адресность, избирательность, детектируемость, терапевтическая активность и т. д.), но и увеличить качество модифицируемых образцов (повышение стабильности наночастиц, монодисперсности, растворимости, биосовместимости и т. д.) [138].

В общем, функционализацию поверхности наночастиц можно разделить на два варианта: ковалентный и нековалентный (последний способ можно подразделить на инкапсуляцию и сорбцию). Выбор пути присоединения и модификатора зависит от преследуемой цели. Однако,

существуют следующие закономерности: ковалентное присоединение является более устойчивым, а нековалентное – более лабильным [275, 276]. Иначе говоря, в случае присоединения молекулы, которая должна быть далее избирательно высвобождена (например, лекарство) эффективнее применимо нековалентное соединение (если система не направлена на нуклеазное расщепление и т. п.). Напротив, при фиксации соединения в состав наиболее стабильного комплекса с носителем, который может быть разрушен стимул-чувствительно в области мишени, следует остановиться на пути ковалентной модификации [277].

Применение функционализированных наночастиц широко используется в различных областях, и особенно в биомедицине для создания эффективных конструкций терапии, диагностики и выделения.

В следующем разделе будут рассмотрены перспективные варианты модификации разработанных наночастиц (CaНЧ и SiНЧ) ковалентным методом (синтетический полимер, белок, нуклеиновая кислота) и нековалентным способом (малая лекарственная молекула, олигонуклеотид).

4.3.1 Ковалентная модификация наночастиц

В данной части работы будет рассмотрена ковалентная функционализация CaНЧ и SiНЧ синтетическим полимером – нейлоном (НЧ-нейлон) и белком – стрептавидином (НЧ-St), а также дальнейшее присоединение к полученным НЧ-нейлон и НЧ-St олигонуклеотида, путём УФ-иммобилизации или образования специфического комплекса «стрептавидин-биотин». Кроме того, композиты типа «НЧ-St» могут быть использованы, как эффективные инструменты молекулярной биологии и биотехнологии для выделения и очистки биотинилированных молекул из раствора [278].

4.3.1.1 Ковалентное присоединение полимера (белкового / синтетического) на поверхность CaНЧ и SiНЧ

В работе апробирован метод присоединения обширного ряда молекул, содержащих первичную аминогруппу (синтетические полимеры, белки, аминокислоты, аминокислотосодержащие олигонуклеотиды, некоторые антибиотики и т. д.), к поверхности всех полученных наноматериалов [279, 280] (рисунок 4.12).

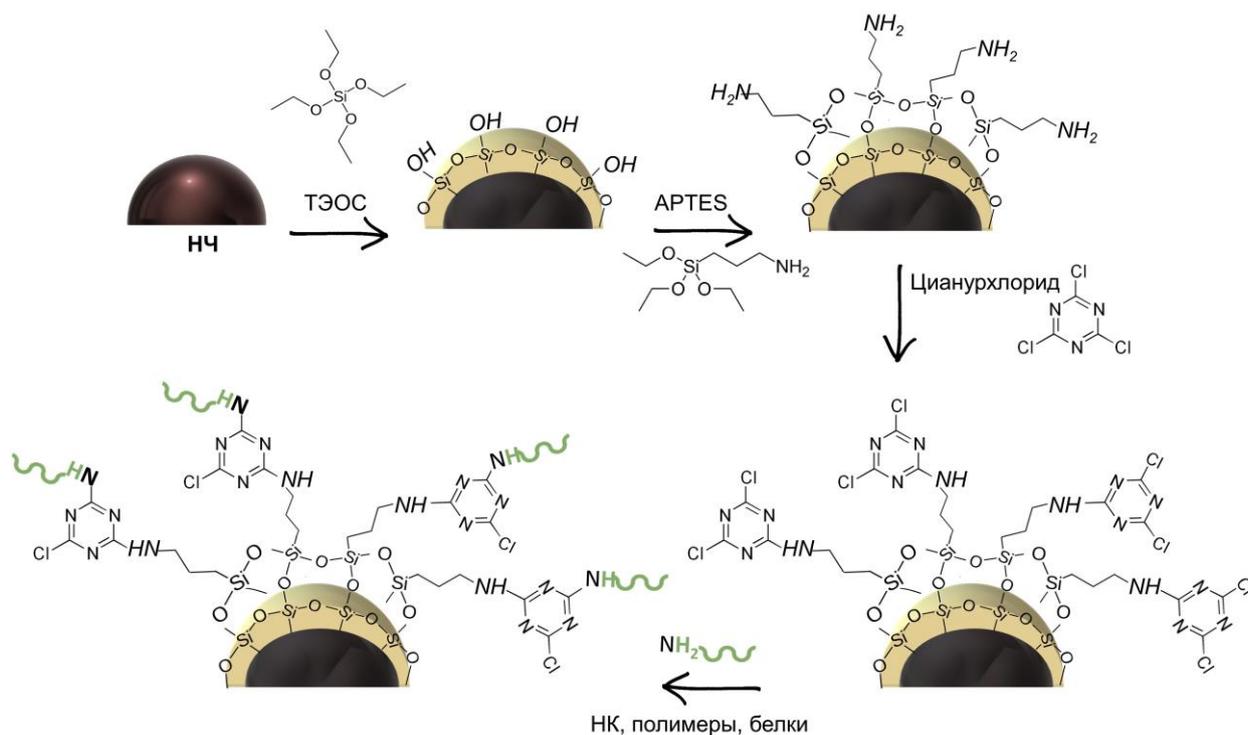


Рисунок 4.12 – Схема ковалентной модификации поверхности НЧ

Подход, основанный на ряде последовательных реакций: два этапа взаимодействия НЧ с модифицированными силанами (ТЭОС, использованный ранее для получения SiНЧ, и (3-аминопропил) триэтоксисилан — АPTES) с дальнейшим присоединением функциональных молекул через трифункциональный агент — цианурхлорид (рисунок 4.12). Каждая стадия реакции направлена на введение новой функциональной группы, по которой далее пойдет присоединение (S_{N2}).

В качестве примеров функциональных покрытий выбраны синтетический полимер — нейлон-6 и белок — стрептавидин, а также модельный олигонуклеотид (ёмкость по OH, присоединённому ковалентно: SiНЧ – $1,22 \pm 0,01$ наномоль/мг, CaНЧ – $4,84 \pm 0,04$ наномоль/мг). Нейлон-6 выбран в качестве полимерного слоя благодаря биосовместимости и отсутствию токсичности. Данный материал позволяет формировать развитую трёхмерную оболочку на поверхности НЧ, способную к ковалентной модификации различными биологически активными соединениями, например, олигонуклеотидами [281, 282]. Кроме того, твердотельная основа может быть удалена для получения полых структур (CaНЧ: мягкие слабокислых условиях; SiНЧ: концентрированная сильная кислота при нагревании), которые должны характеризоваться увеличенной ёмкостью по отношению к гостевым молекулам. Полые полимерные структуры были получены путём растворения корового ядра в закисленных условиях (CaНЧ удалили в 200 мМ AcBuf pH 2, SiНЧ – 1M HF). Стрептавидин – белок, образующий с биотином прочный высокоспецифичный комплекс, который может быть использован для специфичного узнавания молекул, несущих биотиновый остаток. Это явление получило прикладное приложение в

качестве лабораторной системы селективного выделения биомолекул, как в исследовательской деятельности, так и в коммерчески доступных наборах для молекулярной биологии и диагностики [283, 284].

Характеристики полученных материалов представлены в таблице 4.6 (изменение гидродинамического размера до и после модификации) и рисунке 4.13 (изменение ультраструктуры образцов).

Таблица 4.6 – Гидродинамический размер CaНЧ и SiНЧ после ковалентного присоединения полимеров (НЧ-нейлон и НЧ-Str) и образования полых структур (капсул)

Композит	CaНЧ				SiНЧ			
	D, нм	ИПД	ζ , мВ	Рис.	D, нм	ИПД	ζ , мВ	Рис.
НЧ	200 ± 10	0,10 ± 0,02	-17,3 ± 0,4	4.1 G	63 ± 1	0,09 ± 0,01	-28,6 ± 0,2	4.9 E, F
НЧ-нейлон	421 ± 8	0,17 ± 0,02	22,5 ± 0,5	4.13 D	110 ± 2	0,26 ± 0,01	30,0 ± 0,4	4.13 A
Капсулы	456 ± 9	0,45 ± 0,03	—	4.13 E	293 ± 10	0,41 ± 0,02	—	4.13 B
НЧ-Str	301 ± 9	0,27 ± 0,02	-18,4 ± 0,2	4.13 F	298 ± 8	0,35 ± 0,03	-29,7 ± 0,3	4.13 C

Ожидаемо (таблица 4.6), что гидродинамический размер частиц после каждого этапа модификации увеличился при сохранении монодисперсности (ИПД). Нейлоновые капсулы, полученные путём удаления твердотельной сердцевины, обладают наибольшим размером, хотя ожидалось, что, в сравнении с НЧ-нейлон, размер не должен значительно измениться. Этот факт, предположительно, можно объяснить потерей оформленной сферической структуры капсул, что значительно усложняет регистрацию гидродинамического размера частиц в растворе. Изменение поверхностного заряда частиц, также свидетельствует об успешном формировании функционального слоя на поверхности наноматериалов.

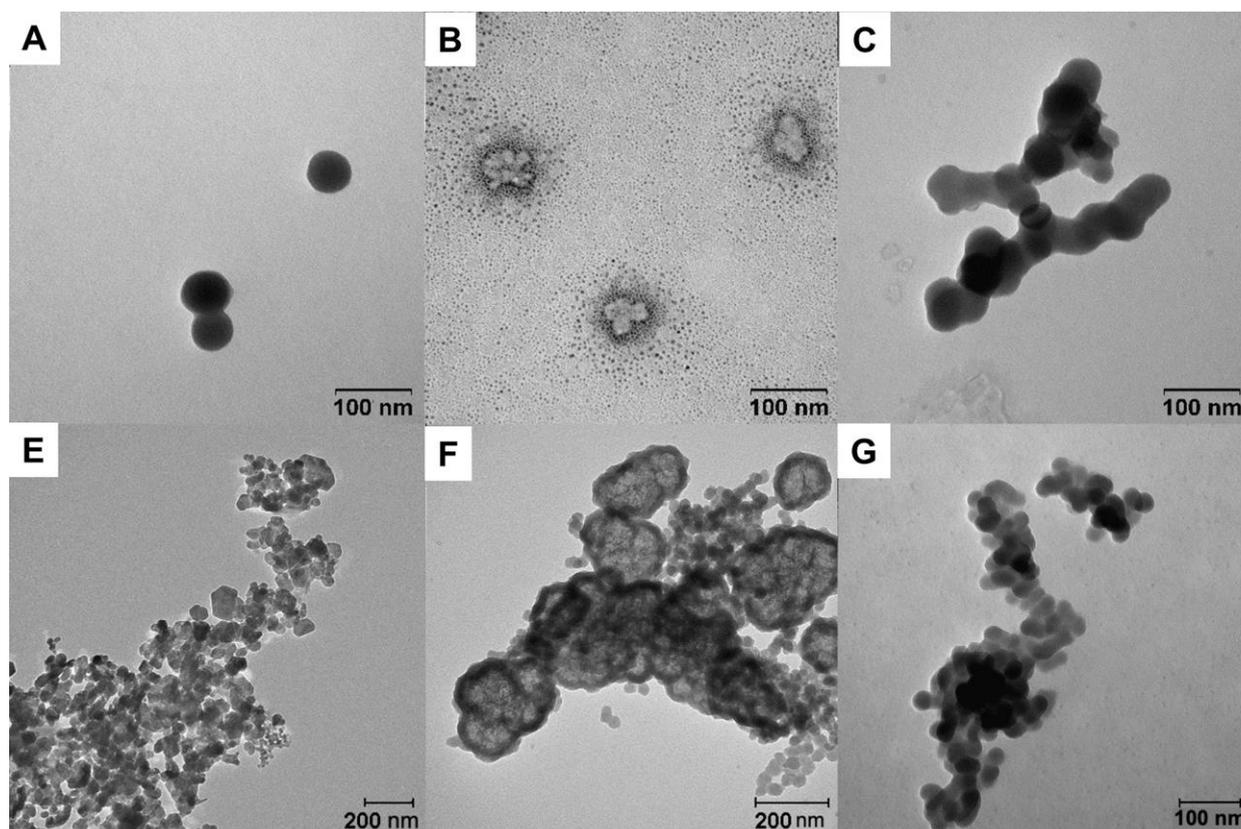


Рисунок 4.13 – Микрофотографии ПЭМ SiNC-нейлон (A), полых капсул после удаления SiNC (B), SiNC-St (C) и CaNC-нейлон (D), полых капсулы после удаления CaNC (E), CaNC-St (F), шкала 100 нм (A – C, F), 200 нм (D, E)

Несмотря на не завышенные показатели ИПД (ИПД, таблица 4.6), ПЭМ-изображения для модифицированных наноматериалов (рисунок 4.13) демонстрируют образование коллективной оболочки на несколько частиц (за исключением SiNC-нейлон) (рисунок 4.13). На рисунках, соответствующих капсулам (рисунок 4.13 B, E) видно, что электронная плотность в центре ядра частиц меньше, чем на периферии. Размер капсул незначительно изменился после удаления твердотельной основы, однако была утеряна оформленность и сферичность частиц, что, вероятно, и повлияло на увеличение гидродинамического размера, как обсуждалось ранее. Процедура получения полых капсул, для дальнейшей применимости в качестве транспортеров БАС, должна быть оптимизирована, и детальное внимание необходимо направить на стабилизацию и снижение агрегации частиц (что будет выполнено за рамками данной работы).

Из полученных модифицированных частиц размером до 200 нм монодисперсностью обладают только SiNC-нейлон, которые будут испытаны далее в качестве носителя лекарственного агента в сравнении с немодифицированными SiNC. Однако, несмотря на потерю обособленности частиц CaNC-нейлон и NC-St, такой материал может быть использован не для введения *in vivo*, а в качестве инструмента селективного выделения биотинилированных молекул (эффективность будет исследована далее).

На примере наноматериалов на основе диоксида кремния, присутствие полимерных молекул в составе нанокомпозитов подтверждали методом ИК-спектроскопии (рисунок 4.14).

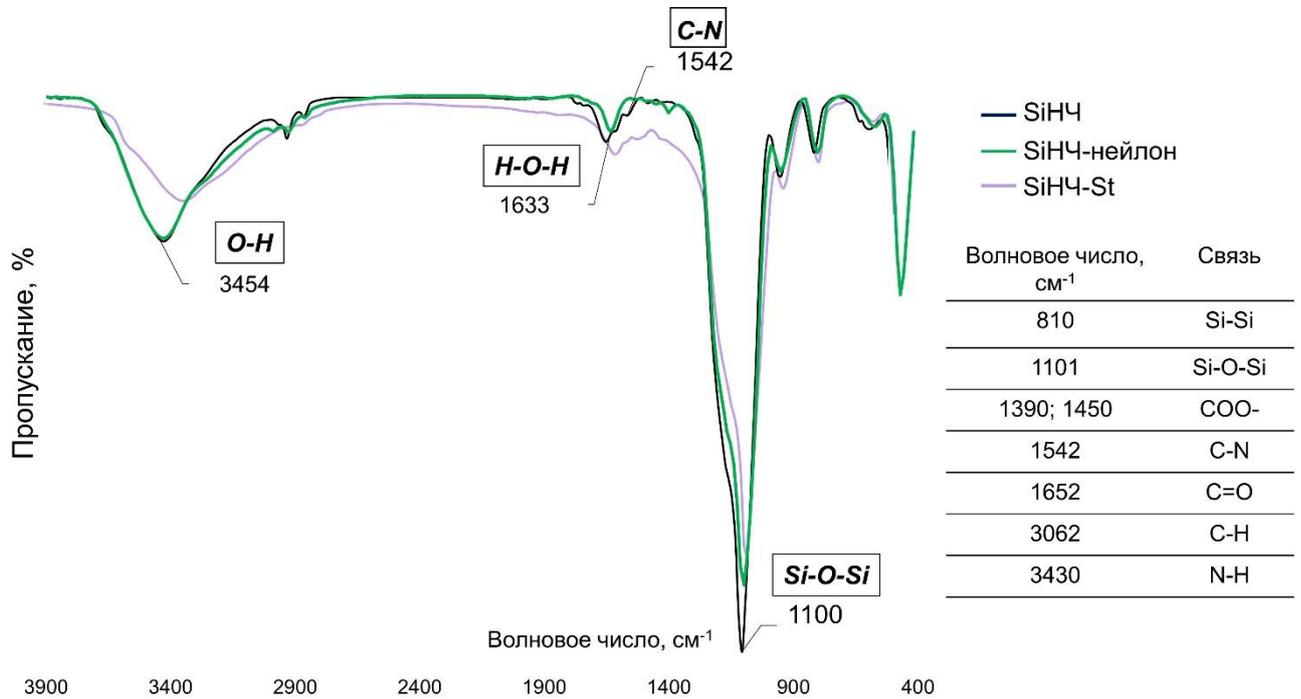


Рисунок 4.14 – ИК-спектры нанокомпозитов SiHЧ, SiHЧ-нейлон и SiHЧ-St

Вероятно, отсутствие интенсивных отличий в спектрах исходных и модифицированных частиц связано с низкой концентрацией модифицирующего агента. На всех полученных спектрах (рисунок 4.14) можно выделить характерные пики для наночастиц диоксида кремния, отнесённые к симметричным (495 и 810 см⁻¹) и асимметричным (1101 см⁻¹) растяжениям Si-O-Si, а также к растягивающим колебаниям Si-OH (948 см⁻¹) [285, 286]. На спектрах SiHЧ-нейлон зарегистрированы дополнительные полосы, соответствующие нейлону-6, в том числе характерная полоса 1652 см⁻¹, соответствующая C=O растяжению амидной группы. Для SiHЧ-St пик поглощения, наблюдаемый при 3340 см⁻¹, отнесён к колебаниям -NH₂, поглощение при 1273 см⁻¹ вызвано амидной связью молекулы стрептавидаина, которая смещается к 1633 см⁻¹ в наноматериалах, функционализированных стрептавидином [287, 288].

Также для пары SiHЧ и SiHЧ-нейлон была проведена качественная реакция с ионом N-(2-гидроксиэтил)-феназиния. В присутствии нейлона образовался окрашенный в сине-фиолетовый цвет продукт (рисунок 4.15).

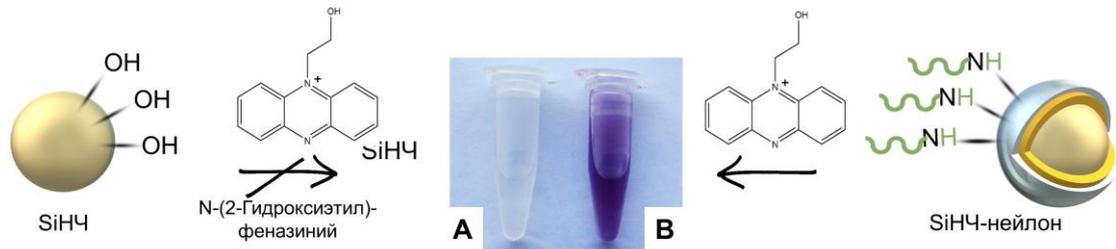


Рисунок 4.15 – Схема качественной реакции SiNC и SiNC-нейлон на детекцию концевой аминогруппы

В данной части работы предложены протоколы модификации поверхности наночастиц полимерными молекулами, в качестве которых использовали синтетический полимер – нейлон-6 и природный – стрептавидин. Для дальнейших приложений нейлоновая оболочка может служить для присоединения адресующих и терапевтических олигонуклеотидов и/или получения полых полимерных структур. Частицы, модифицированные стрептавидином, широко применяются в инструментарии молекулярной биологии и биотехнологии в качестве конструкций, позволяющих специфично выделять биотинилированные молекулы.

Эффективность полученных НЧ-St в выделении биотинилированных олигонуклеотидов и SiNC-нейлон в качестве носителя для малых лекарственных молекул и нуклеиновых кислот рассмотрена далее.

4.3.1.2 Присоединение олигонуклеотидов на поверхность наночастиц, ковалентно модифицированных полимером

Наноматериалы, способные эффективно присоединять олигонуклеотиды (ОН), могут быть эффективным инструментом медицины и молекулярной биологии. В том числе, такие объекты могут выступать компонентами следующих систем:

1. доставка лекарств (олигонуклеотиды могут использоваться для придания функции направленности или специфичности) [289];
2. диагностика (олигонуклеотиды могут быть спроектированы для обнаружения конкретных биомаркеров или генетических последовательностей, что позволяет проводить высокоспецифичную детекцию мишени) [290, 291];
3. генная терапия (олигонуклеотиды могут корректировать определенные участки ДНК или РНК в клетках для исправления генетических дефектов или модуляции экспрессии генов) [292, 293];

4. реагенты для исследований (олигонуклеотиды также широко используются в научных целях для изучения различных биологических процессов, включая взаимодействие с клетками, транскрипцию генов и т. д.) [294, 295].

Наноматериалы, в качестве носителя олигонуклеотидов, применяются для увеличения стабильности ОН *in vitro* и *in vivo*, обеспечения возможности создания многокомпонентной системы или оптимизации процессов сепарации [289].

Таким образом, наночастицы, способные эффективно присоединять олигонуклеотиды, имеют широкий спектр приложений и могут быть использованы для решения достаточного ряда важнейших задач здравоохранения и здоровосбережения.

Однако, существуют методологические проблемы, которые на сегодняшний день не были полностью решены: низкая эффективность присоединения ОН, потеря их активности, неспецифическое связывание, а также токсичность. Для преодоления этих преград необходимо проводить тщательную оптимизацию протоколов присоединения олигонуклеотидов к наноматериалам, учитывая свойства обоих компонентов и требования конкретного приложения.

В данной работе рассмотрены различные варианты присоединения олигонуклеотидов путём ковалентной модификации НЧ, как ковалентная иммобилизация непосредственно ОН, так и опосредовано – путём взаимодействия с молекулами на поверхности.

4.3.1.2.1 УФ-иммобилизация олигонуклеотидов на поверхность наночастиц (НЧ-нейлон)

На примере модифицированных нейлоном наночастиц диоксида кремния (SiНЧ-нейлон) была показана возможность ковалентного присоединения олигонуклеотидов на поверхность наноматериалов, функционализированных нейлоном-6. В качестве модельного олигонуклеотида использовали декатимидилатную последовательность, содержащую биотиновую метку на 5'-конце (ОН-В₇). Отрицательным контролем были выбраны исходные немодифицированные НЧ (SiНЧ). Присоединение ОН-В₇ проводили путём УФ-иммобилизации [296]. После удаления не связавшегося олигонуклеотида, НЧ обрабатывали раствором конъюгата стрептавидин-щелочная фосфатаза (SAP). Качественную регистрацию результата проводили путём фиксации изменения окраски суспензии частиц после добавления раствора хромогенных субстратов BCIP и NBT (рисунок 4.16).

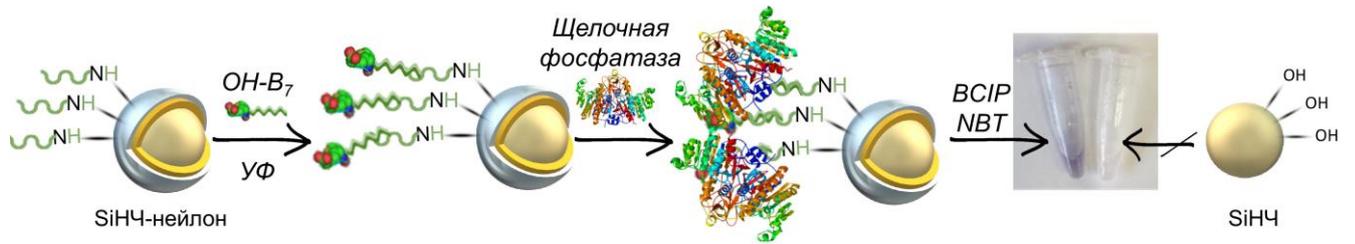


Рисунок 4.16 – Схема и фото НЧ после реакции с биотинилированным олигонуклеотидом: SiHЧ (неокрашенный раствор на фото слева), и SiHЧ-нейлон (окрашенный раствор на фото справа)

Появление синего окрашивания для образца НЧ-нейлон после присоединения олигонуклеотида и обработки раствором хромогенных субстратов подтверждает факт ковалентного присоединения OH-B₇. По данным ДСР не зарегистрировано значительного изменения отслеживаемых параметров: $d = 124 \pm 4$ нм, ИПД = $0,16 \pm 0,01$.

На данном этапе работе была показана возможность УФ-иммобилизации ОН на нейлоновый слой. Далее будут подробнее рассмотрены специфичность и количественные показатели процесса на примере прикладного приложения – выделения биотинилированных олигонуклеотидов из смеси путём их аффинного связывания со стрептавидином на поверхности наночастиц.

4.3.1.2.2 Селективное присоединение биотинилированных олигонуклеотидов на поверхность наночастиц (НЧ-St)

Стрептавидин представляет собой биотин-связывающий белок, способный с высокой аффинностью и селективностью связывать до четырех молекул биотина (B₇) посредством множественных водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Такой комплекс «стрептавидин-биотин» (St-B₇) считается одним из наиболее специфичных и стабильных нековалентных взаимодействий, константа диссоциации которого примерно в 10^3 - 10^6 раз выше, чем у взаимодействия антиген-антитело [297, 298]. Высокая аффинность связывания имеет прикладной аспект, например, для выделения целевых молекул из смеси и усиления сигнала, что значительно повышает способность к обнаружению очень низких концентраций аналита и одновременно уменьшает количество этапов, необходимых для измерения. Более того, комплекс St-B₇ характеризуется высокой химической устойчивостью к манипуляциям, в том числе к протеолитическим ферментам, перепадам температуры и pH, агрессивным органическим реагентам, а также другим денатурирующим реагентам [299]. Эти свойства обеспечили применимость комплекса в качестве зондов и аффинных матриц для широкого спектра

приложений в области биотехнологии, таких как биохимические анализы, диагностика, аффинная очистка и доставка лекарств [300]. Присоединение одного из компонентов пары к наночастицам позволило упростить сепарацию материалов, а также увеличить эффективность конструкции, благодаря добавлению свойств от наноматериалов (рисунок 4.17).

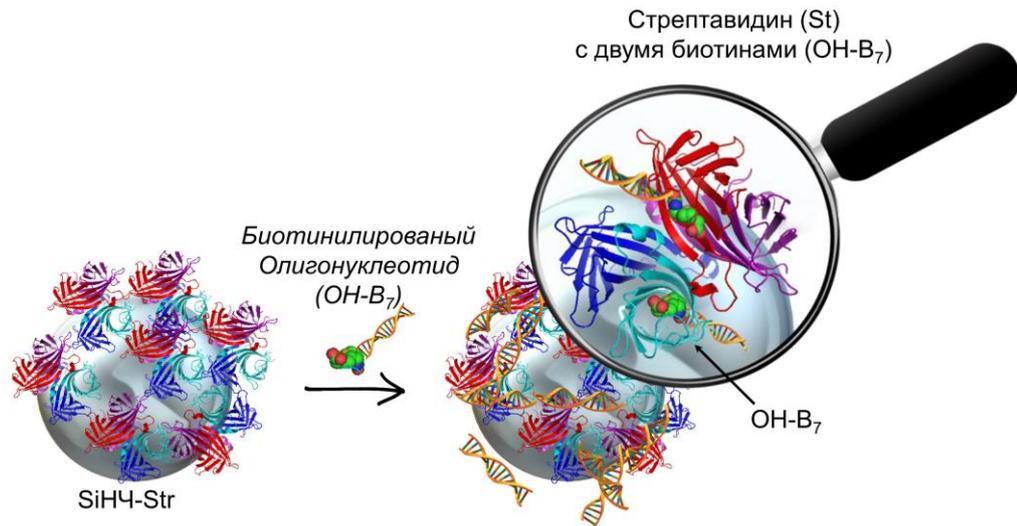


Рисунок 4.17 – Схема связывания наночастиц, модифицированных стрептавидином с биотинилированными молекулами

Выбор типа наноматериала определяется задачей конструкции, однако, чаще распространены в качестве основы наночастицы золота, магнитные и полимерные носители [283, 301, 302, 303].

Более того, магнитные материалы, покрытые стрептавидином, представлены в качестве коммерческого препарата у ряда производителей, в том числе New England Biolabs (S1421 S), Thermo FS (65001, 65305, 21344, ...), Beckman Coulter (A63880, A63881, A63882). Реагенты предоставляются для очистки ДНК-содержащих проб, в том числе для выделения биотинилированных молекул из реакционных растворов. В данной работе полученные ранее НЧ-St были протестированы в сравнении с дорогостоящим высокоэффективным препаратом (Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles from Promega, MPP) для селективного выделения биотинилированных олигонуклеотидов из раствора. Схема эксперимента включала регистрацию результата методом электрофореза (рисунок 4.18).

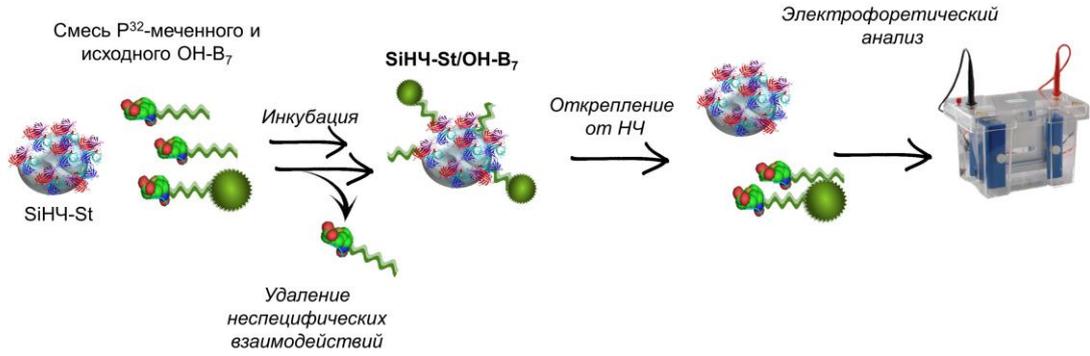


Рисунок 4.18 – Схема связывания наночастиц, модифицированных стрептавидином с биотинилированными олигонуклеотидами

Предварительно НЧ-St, полученные на прошлом этапе, кэпировали бычьим сывороточным альбумином (БСА) для минимизации неспецифической сорбции олигонуклеотидов на поверхность наночастиц. В качестве отрицательного контроля использовали НЧ, обработанные БСА, но не функционализированные стрептавидином. К пробе, содержащей ОН-В₇ был добавлен 5'-[³²P]-меченный аналог соответствующего олигонуклеотида (в соотношении 1:10), для возможности применения метода обнаружения радиоактивных атомов в осадке с наноматериалами и в супернатанте с помощью газоразрядного счетчика. Установлено, что на препаратах SiHЧ и CaHЧ, не модифицированных стрептавидином, сорбции радиоактивного олигонуклеотида не происходит (рисунок 4.19). Важно сказать, что, для исключения неспецифической сорбции ОН на наночастицы при отделении несвязавшегося олигонуклеотида от НЧ-St, использовали протоколы, идентичные стандартным [304].

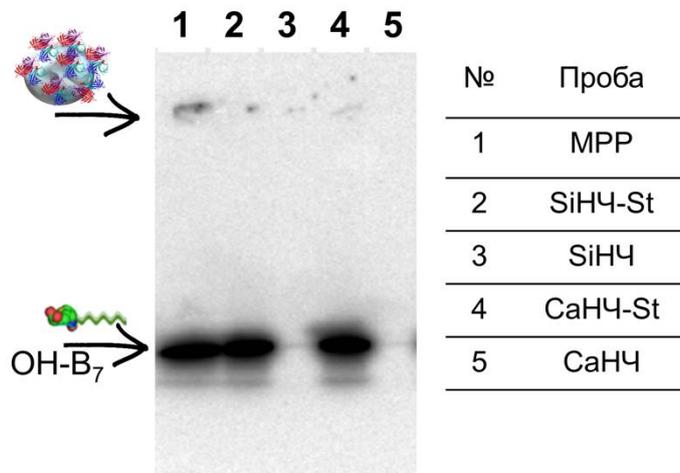


Рисунок 4.19 – Авторадиограмма MPP (слева направо) 1), SiHЧ-St (2), SiHЧ (3), CaHЧ-St (4), CaHЧ (5), связанных с ОН-В₇, несущим радиоактивную метку

Видно (рисунок 4.19), что на НЧ без стрептавидина ОН нет (дорожки 3,5). А НЧ-St на основе CaНЧ и SiНЧ по эффективности равны и выше коммерческого аналога (концентрации брали равные для все типов НЧ).

Далее для определения количественных характеристик связывания наночастиц с биотинилированными олигонуклеотидами и дальнейшего сравнения этих показателей с МРР, варьировали концентрацию добавляемого олигонуклеотида при постоянной концентрации наночастиц (0,02 мг) так, чтобы подобрать концентрации ОН-В₇, при которых наблюдается избыток не связавшегося олигонуклеотида / избыток наноматериала по отношению к олигонуклеотиду. Регистрацию количественных характеристик проводили с помощью Черенковского детектора (таблица 4.7, рисунок 4.20). Важно отметить, что, для анализа эффективности связывания наноматериалов с ОН-В₇, во всех концентрациях ОН-В₇, было добавлено равное количество 5'-[³²P]-меченного аналога, соответствующего олигонуклеотидам в постоянной (10⁻⁷ М, не менее 250 Бк) концентрации.

Таблица 4.7 – Количественные характеристики формирования комплекса НЧ-St/ОН-В₇

НЧ	Добавленный ОН-В ₇ , пикомоль	Доля связавшегося ОН-В ₇ , %	<i>E</i> , 10 ⁶ моль/мг
SiНЧ-St	200	58,8 ± 0,3	10,8 ± 0,7
	50	73,6 ± 0,5	
	20	75 ± 1	
CaНЧ-St	200	50 ± 1	9,9 ± 0,5
	50	65 ± 2	
	20	69 ± 3	
МРР	200	4,8 ± 0,2	0,95 ± 0, 01
	50	5,4 ± 0,2	
	20	14,7 ± 0,1	

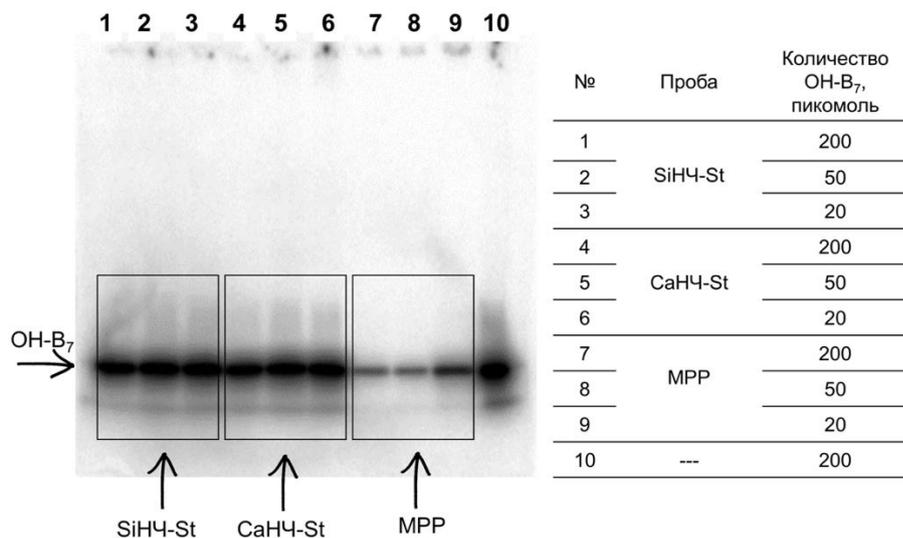


Рисунок 4.20 – Авторадиограмма SiНЧ-St/ОН-В₇ (слева направо 1 – 3), CaНЧ-St/ОН-В₇ (4 – 6), МРР/ОН-В₇ (7 – 9), к которым было добавлено от 20 до 200 пикомоль ОН-В₇ и ОН-В₇

Для визуализации эффективности связывания, пробы, содержащие модифицированные частицы и олигонуклеотиды анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле. При этом частицы оставались в карманах, а олигонуклеотиды под действием тока распределялись по гелю. В таблице 4.7 видно, что эффективность связывания SiНЧ-St и CaНЧ-St с олигонуклеотидом превосходит MPP, что согласуется с количественным показателем ёмкости материалов. Однако, количественные характеристики разрушения комплекса оценить по автордиограмме и интегральной плотности бендов затруднительно, так как во все пробы было добавлено равное количество радиоактивно меченного ОН (рисунок 4.20).

В ходе исследования показано, что, при сохранении равных доз (объем частиц, концентрация), НЧ-St превосходит MPP более чем в 10 раз и имеют более широкий диапазон рабочих концентраций: начиная от 10 мкл (10 мкг) НЧ-St позволяют эффективно выделять биотинилированные олигонуклеотиды из раствора в то время, как для MPP необходимо количество, как минимум вдвое больше частиц.

Таким образом были протестированы парамагнитные частицы Streptavidin MagneSphere (MPP), которые используются для магнитного разделения и очистки различных биотинилированных молекул нуклеиновых кислот или белков. Они имеют высокую стоимость (от 124 тыс./5 мг), однако удобны в использовании, благодаря отсутствию необходимости в центрифугировании. Полученные в работе конструкции НЧ-St, несмотря на отсутствие парамагнитных свойств, легко отделяются кратковременным центрифугированием (5 минут) и имеют большую ёмкость к целевым молекулам, что делает их перспективными для выделения и очистки биотинилированных нуклеиновых кислот и белков.

Благодаря высокой эффективности взаимодействия разработанных наночастиц с биотинилированными олигонуклеотидами, полученные инструменты были использованы для структурно-специфического выделения белков из клеточного лизата и дальнейшего масс-спектроскопического анализа.

Вне рамок данной работы получены последовательности олигонуклеотидов, формирующие узлы TW-типа: последовательность, состоящая из последовательно соединенных линкерными участками попарно комплементарных блоков [305]. Выдвинута гипотеза, что такие конструкции с заданной последовательностью обладают биологической ролью, которую косвенно можно подтвердить путём установления структур, взаимодействующих с TW-олигонуклеотидами в организме.

На первом этапе был получен цельноклеточный лизат линий клеток рака шейки матки (HeLa) и эмбриональных почек человека (HEK293T). Биотинилированные олигонуклеотиды TW-типа (TW-B₇) инкубировали с белками из клеточного экстракта как индивидуально, так и в

присутствии стрептавидиновых наночастиц (MPP, CaНЧ-St, SiНЧ-St). Далее полученные комплексы анализировали методом гель-электрофореза в нативных условиях, регистрировали радиацию лазерным сканером и окрашивали гель Coomassie (рисунок 4.21).

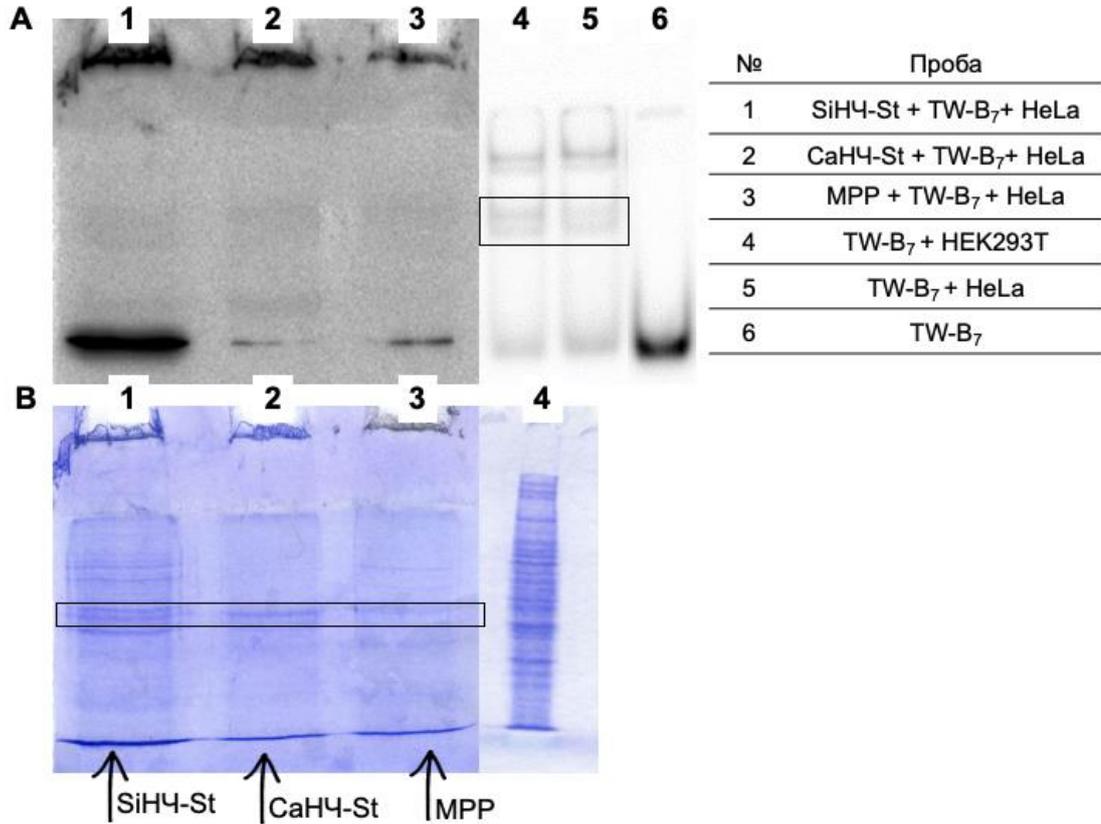


Рисунок 4.21 – Авторадиограмма (А) и скан геля, окрашенного Coomassie (В), демонстрирующие взаимодействие биотинилированного олигонуклеотида TW-типа с белками из клеточного лизата HeLa и SiНЧ-St (№ 1), CaНЧ-St (№ 2) и MPP (№ 3), а также продукты инкубации ОН с белками HEK293T (№ 4) и HeLa (№ 5) в сравнении с индивидуальным TW-B₇ (№ 6)

Из данных на рисунке 4.21А видно, что, после взаимодействия с набором белков из клеточного лизата, на скане радиоактивности появляются дополнительные полосы (дорожки № 4-5), отсутствующие у индивидуального олигонуклеотида. Из-за детекции их радиоактивности можно предположить, что это связанные с олигонуклеотидом искомые белки. Окрашивание белковых продуктов Coomassie на рисунке 4.21В (дорожки №4) демонстрирует, что, без селективной сепарации белков, связанных с TW-ОН из раствора, невозможно извлечь комплекс. В то время, как разработанные частицы SiНЧ-St, CaНЧ-St обеспечивают эту возможность и превосходят по эффективности коммерческий аналог MPP.

Для дальнейшего выделения и качественного анализа состава полосы, соответствующей комплексу TW-B₇ и белка, были выбраны наночастицы на основе кремния (SiНЧ-St). После трипсинолиза целевого белка и последующего элюирования из геля проведён масс-спектрометрический анализ с использованием LC-MS Orbitrap (рисунок 4.22).

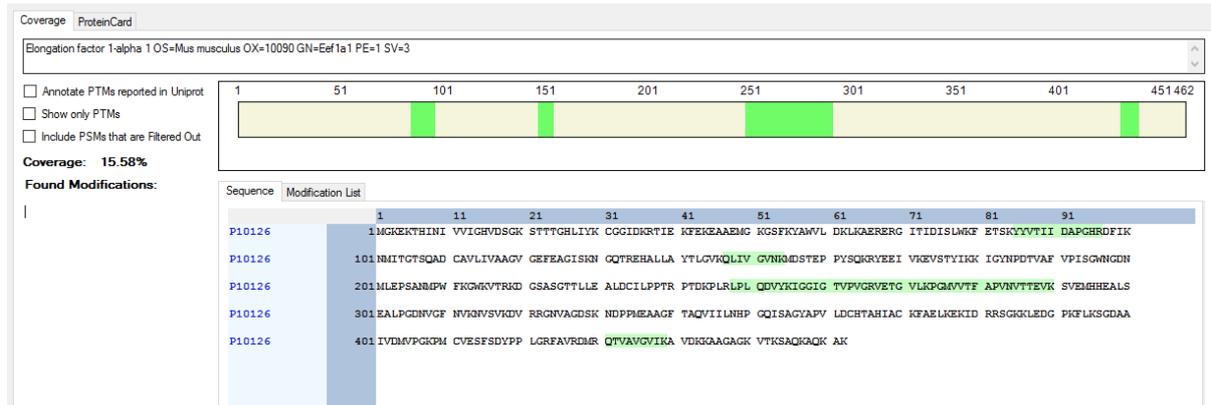


Рисунок 4.22 – Результаты масс-спектрометрического анализа (LC-MS Orbitrap) белка, связывающегося с олигонуклеотидом TW1C-bio, после трипсинолиза

В результате обнаружено 10 фрагментов белка, с покрытием 15,6% и высоким уровнем достоверности идентификации. Молекулярный вес образца составил 50,1 кДа, что коррелирует с его подвижностью в геле (рисунок 4.21). Белок является фактором элонгации 1-альфа, идентифицированный как белок домашней мыши, который достоверно близок к аналогичному белку человека.

Таким образом, полученные наночастицы, модифицированные белком стрептавидином, применимы для структурно-специфического выделения белков из клеточного лизата, и превосходят исследованный коммерческий аналог по эффективности более, чем в 10 раз. Наноразмерность основы конструкции выделения молекул обеспечивает увеличенную удельную площадь поверхности даже в сравнении с микрометровыми аналогами, что, в дальнейшем, приводит к большей ёмкости по отношению к гостевой молекуле, а, следовательно, и к увеличению эффективности системы.

4.3.2 Нековалентная модификация наночастиц

Развитие химико-физических методов позволило получать и исследовать объекты, размеры которых сопоставимы с органеллами клеток. Большинство наночастиц активно применяют в разработках и, даже, некоторые из них, в фармакологической промышленности, более 50 лет. Среди прочих, перспективным направлением является применение наночастиц в качестве носителей терапевтических средств, нуждающихся в коррекции фармакодинамики и / или фармакокинетики. К таким соединениям в первую очередь относят лекарства с высоким профилем токсичности, в том числе противораковые агенты, соединения с низкой физиологической стабильностью, например, нуклеиновые кислоты или бактериофаги, а также

препараты с низкой эффективностью проникновения в клетку (широкий ряд антибиотиков, терапевтических олигонуклеотидов и т. д.) [306, 307].

Данная глава работы будет сконцентрирована на дизайне эффективных носителей для двух широких классов БАС, нуждающихся в адаптации путей их распространения *in vivo*: малые лекарственные молекулы и нуклеиновые кислоты.

4.3.2.1 Дизайн систем доставки малых лекарственных молекул

Малые лекарственные молекулы имеют массу обычно менее 900 дальтон (Da) и могут легко проникать через клеточные мембраны. Однако, их основная проблема – отсутствие направленного действия и, как следствие, широкий спектр тяжелых побочных эффектов. К таким соединениям относятся антибиотики, в том числе противораковые препараты, необходимость создания систем доставки, для которых, была остро обозначена уже более 50 лет назад и не потеряла свою актуальность на сегодняшний день [308].

В 2019 был поддержан крупный проект «Борьба с онкологическими заболеваниями». Его реализация способствовала существенному улучшению качества терапии и диагностики за счёт переоснащения медицинских организаций. Отмечено годовое снижение показателя смертности на территории Новосибирска и области 2021 г (относительно 2020 г) на 8% [309]. Однако, несмотря на оптимистичные показатели, злокачественные образования занимают третье место в списке причин смерти. Более того, Россия стремится привести смертность от онкологии к показателям европейских стран к 2024 г, но, до сих пор, этот показатель обозначен, как выше намеченного. Применение новых стратегий введения существующих препаратов должно ослабить проблему. Подход позволит улучшить фармакокинетику терапевтических средств, преимущественно за счёт изменения их биораспределения, физиологической стабильности, скорости реализации и растворимости. Однако, в связи с поступательным развитием нанотехнологии, сравнительно недавно стало возможно синтезировать наноразмерные объекты удовлетворительного качества для эффективной транспортировки препаратов внутри организма. Исследования в области создания таких носителей на сегодняшний день являются актуальными и не до конца изученными. В случае создания носителей, способных к транспорту малых лекарственных молекул, станет доступно использование новых путей эффективного лечения не только онкологии, но и генетических и вирусных заболеваний.

Среди разрабатываемых носителей для терапевтических средств широко распространены липосомы, полимерные носители, моноклональные антитела и неорганические наночастицы. Эти соединения обладают различной природой и преимуществами, однако, проблемы, связанные с

иммунным ответом организма, накоплением материалов в органах, низкой направленностью и физиологической стабильностью так и не решены полномерно [310].

Среди прочих, наноматериалы на основе карбоната кальция особенно перспективны для решения обозначенной проблемы благодаря совпадению аномального pH опухолевого микроокружения и деградации материала в этой области [207]. Интерес применения диоксида кремния в качестве основы для системы доставки терапевтических агентов связан, с одной стороны, с высокой стабильностью материала, а, с другой стороны, с его выведением естественным путём и решением проблемы нежелаемого накопления частиц в органах [311].

Таким образом, далее будут рассмотрены пути эффективного создания комплекса «НЧ-лекарство» и условия разрушения их взаимодействия, в том числе с исследованием биологического эффекта *in vitro*. В качестве модели малой лекарственной молекулы выбран клинический антибиотик широкого спектра – доксорубицин, токсичность которого ограничивает его эффективность применения [312]. В качестве наноносителей будут рассмотрены две группы материалов: СаНЧ и его гибрид с МНЧ, а также индивидуальные SiНЧ, в противопоставление с полимерным аналогом SiНЧ-нейлон.

4.3.2.1.1 Системы доставки малых лекарственных молекул на основе наноматериалов карбоната кальция

Система доставки БАС должна быть способна эффективно присоединять агент, избирательно его высвобождать в целевую область, а также сохранять терапевтическую способность препарата [313]. В этой части будут протестированы наночастицы на основе карбоната кальция в разрезе этих аспектов.

При трансформации онкологических клеток происходит неконтролируемый клеточный рост, нарушающий привычную геометрию микроокружению тканей и сосудов. Чрезмерное разрастание (ангиогенез), приводит к появлению вблизи опухоли отверстий до 200 нм – эффект «повышенной проницаемости и удержания» (enhanced permeability and retention, EPR) [314]. Исследователи показали, что такую аномалию можно использовать для пассивного нацеливания наноматериалов в область опухоли: частицы с размером, сопоставимым с порами в сосудах вблизи опухоли, могут преимущественно накапливаться в опухоли мишени [114, 315].

Кроме того, повышенная скорость деления клеток приводит к увеличению выделения продуктов клеточного метаболизма, в том числе молочной кислоты, что заметно снижает pH

опухолевого микроокружения на 0,5 – 1,5 относительно окружающей нормальной ткани [316, 317].

Итак, pH-зависимые наноносители карбоната кальция могут локализоваться в области опухоли благодаря эффекту EPR, а аномальная кислотность опухолевых тканей будет влиять на постепенную деградацию матрицы CaHCO₃ и, как следствие, высвобождение терапевтического агента в область-мишень.

Однако, несмотря на распространенность использования эффекта EPR в разработках, метод является пассивным способом нацеливания и, в индивидуальном применении, малоэффективен: накопление частиц в области солидной опухоли до 1% от введённой дозы [318, 319]. Комбинирование подходов нацеливания может способствовать заметному улучшению направленности терапии [320].

Ранее в работе были получены гибридные наноносители, обладающие свойствами pH-лабильности и магнитной восприимчивостью (рисунок 4.23).

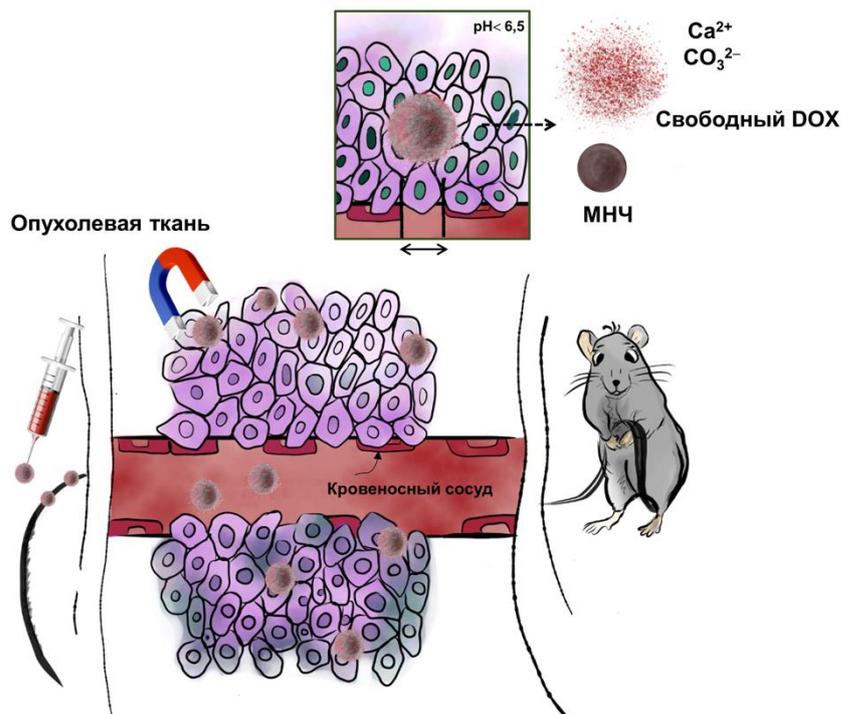


Рисунок 4.23 – Схема получения Fe@CaHCO₃ и описания принципа избирательности действия противоракового агента

Перспективность таких материалов (рисунок 4.23) заключается в том, что контейнер будет предпочтительно концентрироваться в области опухоли не только благодаря размерам меньше пор сосудов опухоли, но ещё и благодаря действию направленного магнитного поля [321].

Таким образом, все теоретические аспекты подчеркивают перспективность использования кандидатов (CaНЧ, Fe@CaНЧ) в качестве компонентов систем доставки противораковых средств.

4.3.2.1.1.1 Создание композита доксорубицина с наноносителями на основе карбоната кальция и исследование условий разрушения этого комплекса

Существует три метода конъюгации биологически активного соединения с носителем. Водорастворимые терапевтические агенты могут быть соосаждены во время синтеза наноматериалов [322]. Другой подход основан на обработке сформированных частиц раствором лекарственного средства при постоянном перемешивании [323]. При этом, связывание полученных наночастиц с лекарственным средством может быть достигнуто преимущественно путём адсорбции. Третий вариант конъюгации наноматериала с лекарством основан на испарении растворителя, содержащего лекарство, при пониженном давлении. Последние два метода позволяют загружать плохо растворимые в воде лекарства, к которым относится доксорубин. В данной главе рассмотрен второй вариант постсинтетической обработки частиц препаратом.

Эффективность связывания лекарственного препарата доксорубицина (DOX) с наноносителями CaНЧ и Fe@CaНЧ исследовали с помощью УФ-спектроскопии (480 нм) и анализа интенсивности флуоресценции (возбуждения 490 нм; испускания 590 нм). Оптическую плотность буферного раствора с лекарственным средством оценивали до и после инкубации с наночастицами, что позволило рассчитать ёмкость контейнеров по отношению DOX. Ранее для загрузки лекарственного средства были выбраны условия инкубации: натрий боратный буфер (10 мМ, рН 8,0), 25°C, в течение 12 часов [230].

Ёмкость (E) оценивали как количество DOX (мкг), связанного с 1 мг наночастиц. Установлено, что, если на реакцию инкубации брать 1 мг CaНЧ и Fe@CaНЧ, связывается 335 ± 6 и $73,2 \pm 0,4$ мкг лекарства соответственно. Гидродинамический радиус частиц при этом сохраняется в пределах нанометрового диапазона: 230 ± 15 (CaНЧ) и 128 ± 3 нм (Fe@CaНЧ). Различия в эффективности взаимодействия можно объяснить разным количественным содержанием карбонатной составляющей, которая увеличивает эффективность связывания препарата в состав композита [5]. Кроме того, Fe@CaНЧ/DOX был охарактеризован методом ИК-Фурье-спектроскопии (рисунок 4.8). Связывание носителя с препаратом приводит к появлению интенсивных специфических пиков адсорбции DOX на спектре при 2968 (C-H колебание), 1684

(C=O колебание, хинон), 1660 (C=C колебание кольца), 1406 (C-C), 1336, 1255, 1221 (=C-O-CH₃) и 1150 см⁻¹ (C-O-C) [324, 325].

Однако, несмотря на устойчивое формирование комплекса НЧ-лекарство, исходя из литературных данных, полученные показатели *E* не являются высокими [326]. Один из способов увеличения ёмкостного показателя является уменьшение количества частиц, взятых на реакцию инкубирования с лекарством, при сохранении содержания DOX. Максимально уменьшая исходную концентрацию частиц в реакции инкубации до 0,4 СаНЧ и 0,025 мг Fe@СаНЧ были получены *E* равные 659 ± 5 (215 ± 10 нм) и 1900 ± 27 (d: 105 ± 3 нм) мкг/мг соответственно. Отличное количество исходно взятых частиц объясняется разными методами извлечения наноматериалов из реакционного раствора: СаНЧ выделяли методом центрифугирования (не позволяет достоверно отделить менее 0,4 мг СаНЧ), Fe@СаНЧ – магнитной сепарацией.

На основании литературных данных предполагается, что полученные в данной работе наноконпозиты имеют хорошие перспективы для практического применения, поскольку более чем в три раза превосходят большинство аналогов по эффективности инкапсуляции DOX [327, 328].

Однако, если в случае индивидуального карбоната кальция полученная эффективность связывания является оптимальной, основываясь на данных эффективности высвобождения DOX из комплекса СаНЧ/DOX (рисунок 4.24), то состав Fe@СаНЧ/DOX будет оптимизирован далее.

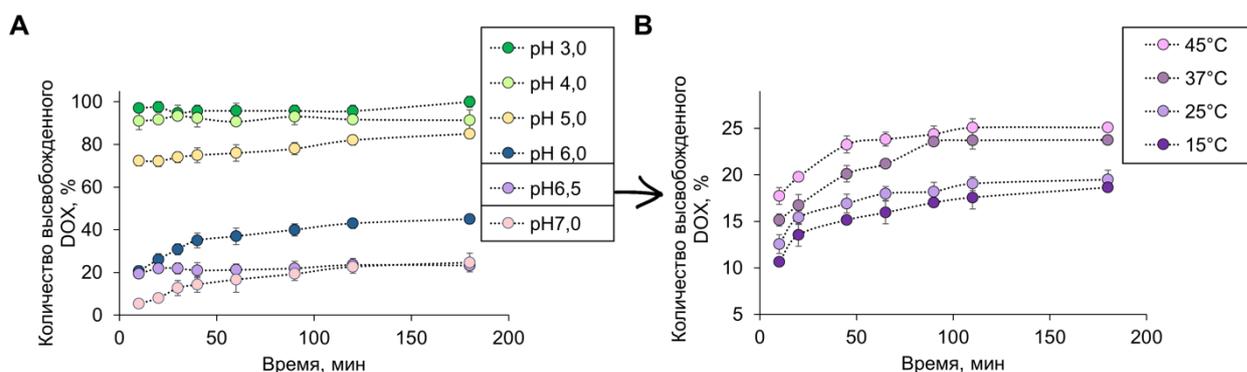


Рисунок 4.24 – График эффективности высвобождения DOX из СаНЧ/DOX от времени при pH 3,0 – 7,0. Образцы, протестированные в разных растворах pH были одинаковыми и содержали 0,2 мг СаНЧ и 132 мкг DOX

Перспективно, что СаНЧ при физиологических значениях pH сохраняет более 75% загруженного лекарственного средства (рисунок 4.24) внутри комплекса с лекарством, что, в дальнейшем, может обеспечить высокую селективность распределения лекарственного средства в условиях сайт-активируемой терапии. В то время, как, при понижении pH до опухолевых значений, эффективность высвобождения >80%. Этот эффект может способствовать увеличению

эффективности пассивного нацеливания препарата на опухолевые ткани и снижению токсического действия на нормальные [329]. В будущих приложениях чувствительность к слабокислоте рН микроокружения опухоли может способствовать эффективной высокоспецифичной доставке и замедленному высвобождению противораковых препаратов в экспериментах *in vivo*.

Для учёта влияния температуры на показатели эксперимента при значениях рН, близких к физиологическим (рН 6,5), где наблюдалась только низкая эффективность высвобождения лекарственного средства (рисунок 4.24 А), повторили аналогичный эксперимент при температурах 15, 25, 37 и 45 °С (рисунок 4.24 В).

Эффективность высвобождения DOX увеличивалась с повышением температуры: разница между 45 и 15 °С составляла ~ 7% в каждой точке эксперимента (рисунок 4.24 В). Диапазон температур был выбран максимальный и содержал краевые точки, отсутствующие в живом организме. Однако, в связи с незначительным отличием комнатной температуры от физиологической, далее влияние этого параметра не рассматривали.

Возвращаясь к ранее полученному комплексу Fe@CaHЧ/DOX, его оптимальный состав по содержанию лекарства был тщательно рассмотрен в связи с более сложной гибридной природой композита, и, как следствие, отсутствием полной деградации матрицы носителя. Этот момент может оказывать значительное неочевидное влияние на эффективность высвобождения лекарства из состава нанокompозита для разноёмкостных контейнеров.

Варьируя количества Fe@CaHЧ (от 0,025 до 3,2 мг/мл) на этапе загрузки лекарства в состав нанокompозита, были получены значения ёмкости от 25 до 1900 мкг/мг (Таблица 4.8, Рисунок 4.25).

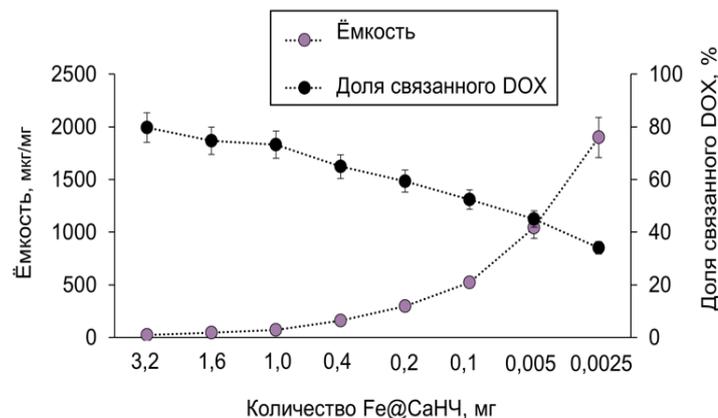


Рисунок 4.25 – Зависимость ёмкости Fe@CaHЧ (мкг/мг) и эффективности связывания DOX (%) от концентрации наночастиц

Таблица 4.8 – Диаметр Fe@CaНЧ/DOX по данным ДСР (d) и ПЭМ (D), ИПД, ζ-потенциал, ёмкость (E) наноконпозитов, содержавших разное количество DOX

НЧ, мг/мл	d, нм	D, нм			ИПД	ζ, мВ	E, мкг/ мг	Эф. DOX*, %	Рис. 4.16
		НЧ	Агломе рат	Слой DOX					
3,2	133 ± 3	—			0,234 ± 0,005	-14,7 ± 0,7	25 ± 1	79,7 ± 0,2	—
1,6	130 ± 2	—			0,192 ± 0,008	-13,0 ± 0,2	45 ± 2	74,7 ± 0,1	—
1,0	128 ± 3	10 ± 2	75 ± 13	4,6 ± 0,3	0,144 ± 0,006	-18,8 ± 0,6	73,2 ± 0,4	73,2 ± 0,4	—
0,40	129 ± 3	—			0,130 ± 0,002	-14,9 ± 0,4	160 ± 2	64,9 ± 0,6	A
0,20	135 ± 5	11 ± 3	125 ± 31	18 ± 2	0,14 ± 0,01	-15,0 ± 0,3	295 ± 2	59,4 ± 0,3	—
0,10	111 ± 3	9 ± 3	149 ± 45	46 ± 9	0,30 ± 0,01	-16,5 ± 0,3	525 ± 3	52,4 ± 0,4	B
0,050	113 ± 5	9 ± 5	201 ± 35	158 ± 46	0,28 ± 0,03	-12,4 ± 0,2	1045 ± 10	45 ± 2	C
0,025	105 ± 3	—			0,29 ± 0,01	-19,0 ± 0,5	1900 ± 27	34 ± 4	D
Fe@Ca НЧ	121 ± 6	—			0,31 ± 0,01	-15,6 ± 0,5	—	—	—

*Эф. DOX – эффективность связывания наноконпозита с DOX, рассчитывали, как долю связавшегося препарата от добавленного, %. Показатель учитывает осмысленность увеличения концентрации лекарства относительно количества носителя.

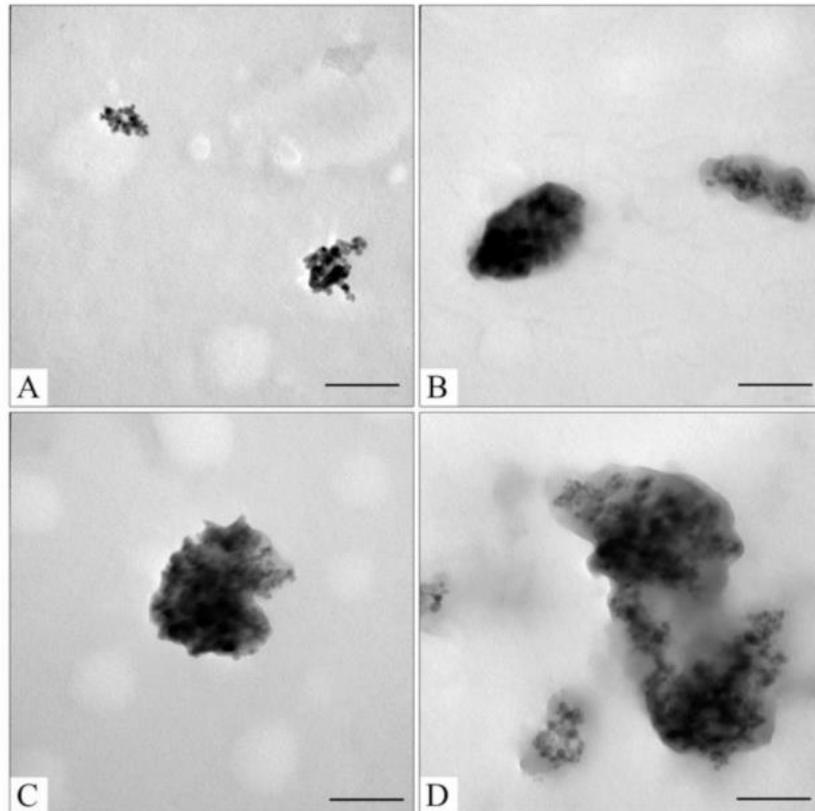


Рисунок 4.26 – ПЭМ-изображения Fe@CaНЧ/DOX₇₃ (A); Fe@CaНЧ/DOX₂₉₅ (B); Fe@CaНЧ/DOX₅₂₅ (C); Fe@CaНЧ/DOX₁₀₄₅ (D), где нижним индексом указана ёмкость наноконпозитов в соответствии с таблицей 4.8, шкала 100 нм

В таблице 4.8 показана зависимость ёмкости Fe@CaHЧ (мкг/мг) и эффективности связывания DOX (%) от концентрации наночастиц. На графике видно, что высокая концентрация частиц приводит к снижению ёмкости при высокой эффективности загрузки препарата. График имеет линейную зависимость в представленном диапазоне концентраций. Для численно высокой загрузки лекарства требуется низкая концентрация частиц. Однако, использование столь низкой концентрации (0,025 мг/мл) Fe@CaHЧ для получения Fe@CaHЧ/DOX методически затруднительно (низкая эффективность извлечения из раствора), немасштабируемо, а также приводит к большому перерасходу антибиотика и требует доказательства терапевтической целесообразности применения.

Сравнение параметров физико-химических и морфологических параметров разноёмкостные (25 до 1045 мкг/мг) Fe@CaHЧ/DOX резюмированы в таблице 4.8, где видно, что все образцы имеют схожие гидродинамический диаметр и ζ-потенциал. Небольшое уменьшение размера частиц с увеличением ёмкости, возможно, связано с увеличением плотности упаковки DOX, что подтверждается изменением плотности наночастиц, измеренной методом ПЭМ (рисунок 4.26). Изменения ζ-потенциала и размера частиц в Fe@CaHЧ/DOX с высокой ёмкостью 1900 мкг/мг, вероятно, вызваны изменением преобладающих взаимодействий от типа наночастица/DOX (электростатические взаимодействия) к типу DOX/DOX (гидрофобные взаимодействия) (рисунок 4.27).

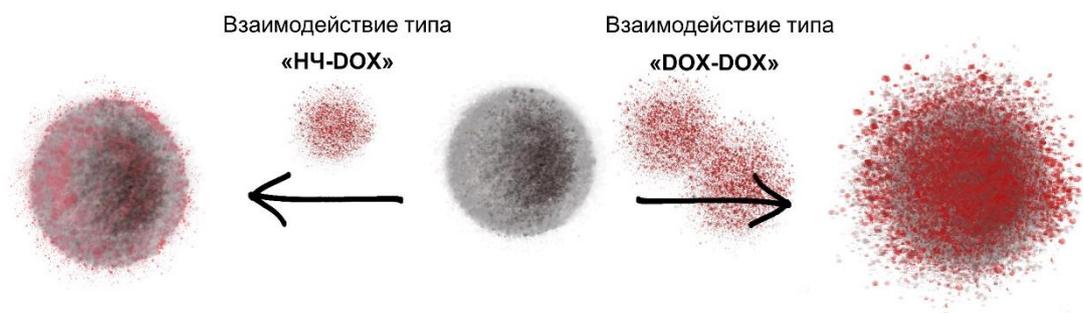


Рисунок 4.27– Схема связывания малых и избыточных концентраций DOX

Предполагается (рисунок 4.27), что, при увеличении концентрации доксорубина, возрастает доля препарата, сорбированного самого на себя, а не на поверхность наночастиц. Вероятно, наличие «плотной упаковки препарата» может изменять дальнейшие кинетику и эффективность направленного и нецелевого воздействия.

Таким образом, согласно рисунку 4.25, кривые ёмкости и эффективности пересекаются в точке 1045 мкг/мг. Это соотношение препарата к носителю является оптимальным с точки зрения

расхода терапевтического агента. Однако, исходя из физико-химических параметров, выдвинуто предположение, что происходит смена преобладающих межмолекулярных взаимодействий, что, далее, может привести к изменению эффективности высвобождения препарата, чувствительного к pH, что будет исследовано ниже.

Так как ранее на примере индивидуального карбоната кальция был исследован широкий диапазон pH (рисунок 4.24), экстраполируя полученные данные, для дальнейших тестов pH был выбран от показателя кислотности плазмы крови (7,4) до имитирующего микроокружение опухоли и эндосомы клеток (pH~5) (Таблица 4.9, Рисунок 4.28).

Таблица 4.9. Эффективность выделения DOX из Fe@CaHЧ/DOX при pH 4,0–7,4 при 25 °C в течение 24 ч

Нанокompозит	pH 4,0		pH 5,0		pH 6,0		pH 7,4	
	С DOX, %	С DOX, мкг/мл	С DOX, %	С DOX, мкг/мл	С DOX, %	С DOX, мкг/мл	С DOX, %	С DOX, мкг/мл
Fe@CaHЧ/DOX ₂₅	98 ± 4	2,4 ± 0,1	99 ± 1	2,48 ± 0,03	68 ± 3	1,69 ± 0,05	60 ± 4	1,5 ± 0,1
Fe@CaHЧ/DOX ₄₅	94 ± 6	4,2 ± 0,3	98 ± 2	4,41 ± 0,09	49 ± 4	2,2 ± 0,2	57 ± 4	2,6 ± 0,1
Fe@CaHЧ/DOX ₇₃	71 ± 5	5,2 ± 0,4	65 ± 4	4,8 ± 0,3	38 ± 1	2,8 ± 0,1	37 ± 4	2,7 ± 0,1
Fe@CaHЧ/DOX ₁₆₀	65 ± 6	10 ± 1	59 ± 5	9,4 ± 0,8	26 ± 2	4,2 ± 0,3	18 ± 2	3,0 ± 0,1
Fe@CaHЧ/DOX ₂₉₅	44 ± 4	13 ± 1	32 ± 3	9,4 ± 0,9	17 ± 1	5,0 ± 0,3	12 ± 2	3,5 ± 0,1
Fe@CaHЧ/DOX ₅₂₅	23 ± 2	12 ± 1	25 ± 2	13 ± 1	11,4 ± 0,4	6,0 ± 0,2	9 ± 3	4,7 ± 0,2
Fe@CaHЧ/DOX ₁₀₄₅	23 ± 2	24 ± 2	25 ± 3	26 ± 3	11,1 ± 0,8	12,1 ± 0,8	7 ± 2	7,3 ± 0,2
Fe@CaHЧ/DOX ₁₉₀₀	21 ± 2	44 ± 4	17 ± 1	32 ± 2	6,8 ± 0,5	13 ± 1	4 ± 1	7,6 ± 0,3

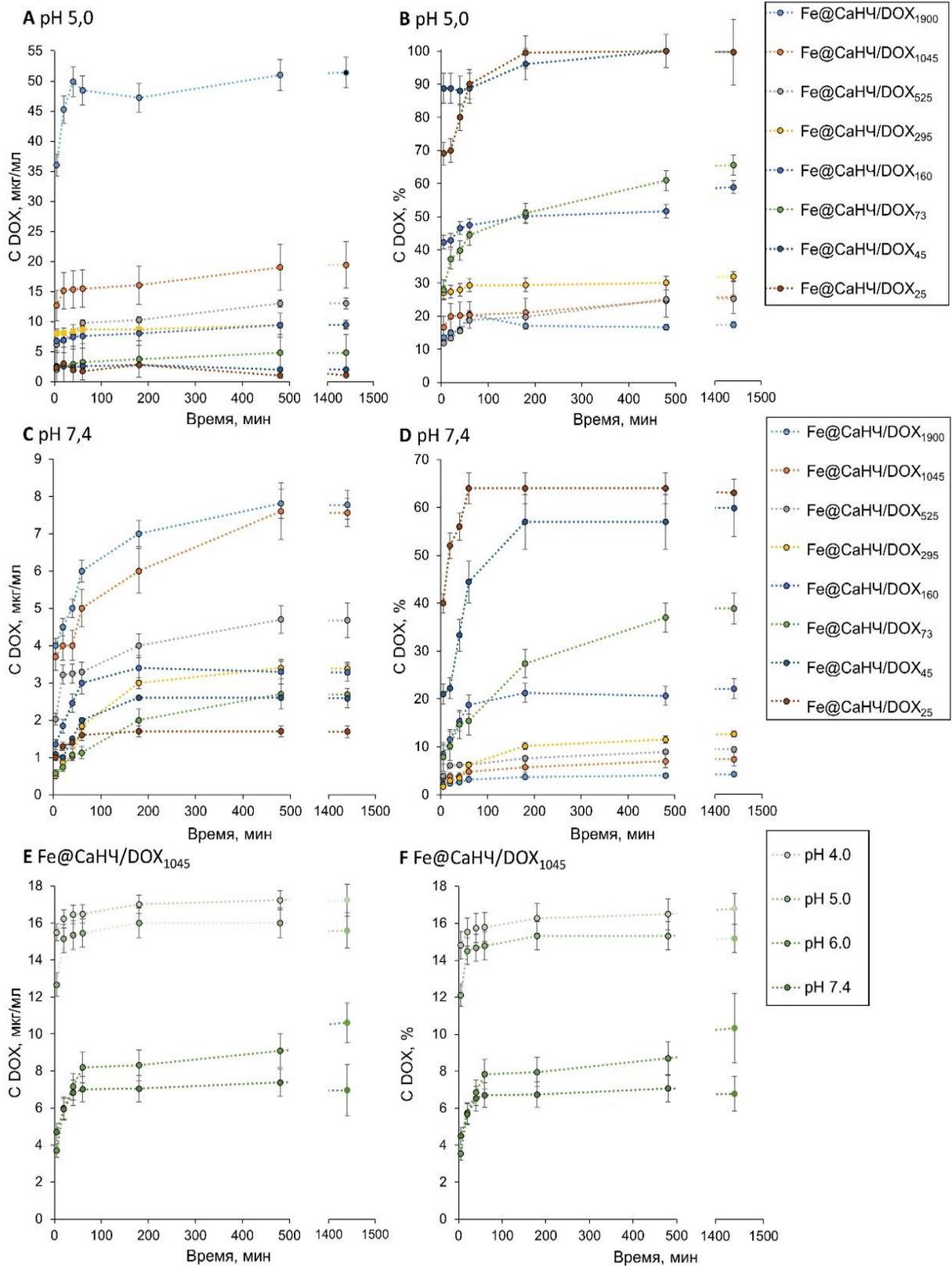


Рисунок 4.28 – Разрушение комплекса Fe@CaH₄/DOX, содержащих DOX от 25 до 1900 мкг/мг при pH 5,0 (А,В) и pH 7,4 (С,Д) при 25 °С. Высвобождение DOX из Fe@CaH₄/DOX с ёмкостью 1045 мкг/мг при pH 4,0 – 7,4 при 25 °С (Е,Ф)

Все наноконпозиты продемонстрировали рН-зависимое высвобождение препарата вне зависимости от загрузки, что хорошо согласуется с ранее полученными результатами. Сравнение терапевтической перспективности проводили с учётом не только абсолютных значений (мкг/мл) высвобожденного лекарства, но и эффективности высвобождения DOX в процентах от исходного количества DOX в составе наноконпозита. Данные на рисунке 4.27 В и в таблице 4.9 подтверждают 100% высвобождение препарата при рН 5,0 из Fe@CaHЧ/DOX₂₅₋₄₅. Дальнейшее увеличение содержания DOX в составе наноконпозита приводит к снижению эффективности высвобождения лекарства до 44-70 % (Fe@CaHЧ/DOX₇₃₋₂₉₅) и 21-23 % (Fe@CaHЧ/DOX₅₂₅₋₁₉₀₀).

Наблюдается тенденция к снижению процента высвобождения DOX с увеличением ёмкости наноконпозита во всем изученном диапазоне рН (рисунок 4.28, Таблица 4.9). Наноконпозиты с наибольшей ёмкостью Fe@CaHЧ/DOX₁₉₀₀ и с наилучшим соотношением эффективности высвобождения (%) к абсолютной высвобожденной концентрации DOX (мкг/мл) Fe@CaHЧ/DOX₁₆₀ обладают всего трёхкратным различием дозы высвобожденного препарата при рН 5,0 несмотря на более, чем десятикратное отличие по содержанию DOX в составе наноконпозита (1900/160). Более того, Fe@CaHЧ/DOX₁₆₀ при рН 7,4 высвобождает в 2,5 раза меньше лекарства, чем Fe@CaHЧ/DOX₁₉₀₀.

Эти показатели являются перспективными для дальнейших исследований наночастиц в качестве контейнера для противораковых препаратов. Более того, на данном этапе из полученных наноконпозитов можно выделить частицы с ёмкостью 1900 мкг/мл (как наиболее эффективные по абсолютным значениям, мкг/мл) высвобождаемого препарата и 160 мкг/мл (как частицы, продемонстрировавшие наилучшее соотношение эффективности высвобождения (%) к реальной концентрации (мкг/мл)).

Таким образом, для двух типов частиц получены наноконпозиты, содержащие терапевтический агент (CaHЧ/DOX и Fe@CaHЧ/DOX). Благодаря полной деградации матрицы CaHЧ при рН 5,0, с этим материалом не возникает проблема снижения эффективности высвобождения препарата, что позволяет достигать высоких ёмкостных характеристик вплоть до 659±5, ограниченных исключительно концентрацией, при которой возможна магнитная сепарация (до 5 мкл, 0,03 мг). В то время, как, благодаря возможности магнитной сепарации Fe@CaHЧ, была получена ёмкость вплоть до 1900 мкг/мл. Однако, эффективность применения таких конпозитов ограничивает доля высвобождаемого DOX относительно содержащегося лекарства.

Ожидается, что исследования на клеточных линиях окончательно позволят выявить наилучшего кандидата среди Fe@CaHЧ и сравнить его с CaHЧ.

4.3.2.1.1.2 Исследование терапевтической эффективности комплекса лекарства с наночастицами на основе карбоната кальция на клеточных линиях

В первую очередь, перед доказательством эффективности комплекса лекарства с наночастицами стояла задача подтвердить биобезопасность разработанных частиц (CaHЧ и Fe@CaHЧ). Несмотря на то, что наноматериалы на основе карбоната кальция широко применяются не только в фармацевтических разработках, но в пищевой промышленности, сложный состав реакционной смеси, теоретически, мог исказить токсический профиль материала. Кроме того, для возможности использования полученных магнитных нанокомпозитов далее в биомедицине, требовалось доказательство их отсутствия токсичности. Существуют данные, прогнозирующие опасное влияние МНЧ на живые системы [330, 331], в то же время другие исследователи доказывают их безопасность [332, 333]. Однако, уже существуют одобренные FDA (Food and Drug Administration, FDA) препараты на основе железа, применяемые для терапии (Feraheme®, Rienso®), диагностики (Feridex I.V.) и в пищевой промышленности (Gastromark,) [334].

Цитотоксичность полученных CaHЧ и Fe@CaHЧ, а также их комплексов с лекарством DOX (CaHЧ/DOX и Fe@CaHЧ/DOX) оценивали стандартным МТТ-тестом, позволяющим калориметрически оценить процент выживших клеток после воздействия на них препаратом. Ожидаемо показано отсутствие токсичности индивидуальных наночастиц карбоната кальция: до 22,5 мг/мл жизнеспособность обработанных клеток не снижалась ниже 98% (клеточные линии карциномы легких – A549, эмбриональной почки человека 293 – HEK293), что согласуется с литературой [335, 336].

Композит без антибиотика (Fe@CaHЧ) показал крайне низкую цитотоксичность в широком диапазоне концентраций до 2 мг/мл (рисунок 4.29).

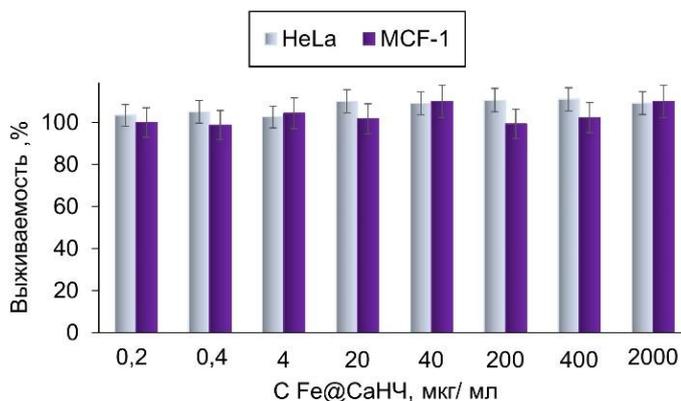


Рисунок 4.29 – Анализ жизнеспособности клеток HeLa (рак шейки матки) и MCF-7 (аденокарцинома протоков молочной железы) после инкубации с Fe@CaHCl в течение 48 ч

Несмотря на то, что частицы Fe@CaHCl безопасны в меньшем диапазоне концентраций, чем CaHCl, этого достаточно для достижения терапевтической дозы DOX при учёте ёмкости наноматериала [337]. В то время, как в литературе показана безопасность наноразмерного Fe@CaHCl до 0,8 мг/мл [205].

Оценку эффективности ингибирования роста клеток нанокompозитами, содержащими доксорубицин, проводили в сравнении с одним индивидуальным DOX (рисунок 4.30 – 31).

Однако, в связи со спецификой клеточных испытаний, таких, как острая зависимость эффективности деления от температуры, влажности, времени года и т. д., строгое качественное сравнение образцов можно проводить только между одной партией экспериментов [338, 339]. Для выбора оптимального состава Fe@CaHCl/DOX по количеству DOX, далее данные будут скомпонованы по типу частиц и ниже резюмированы для оценочного сравнения их эффективности.

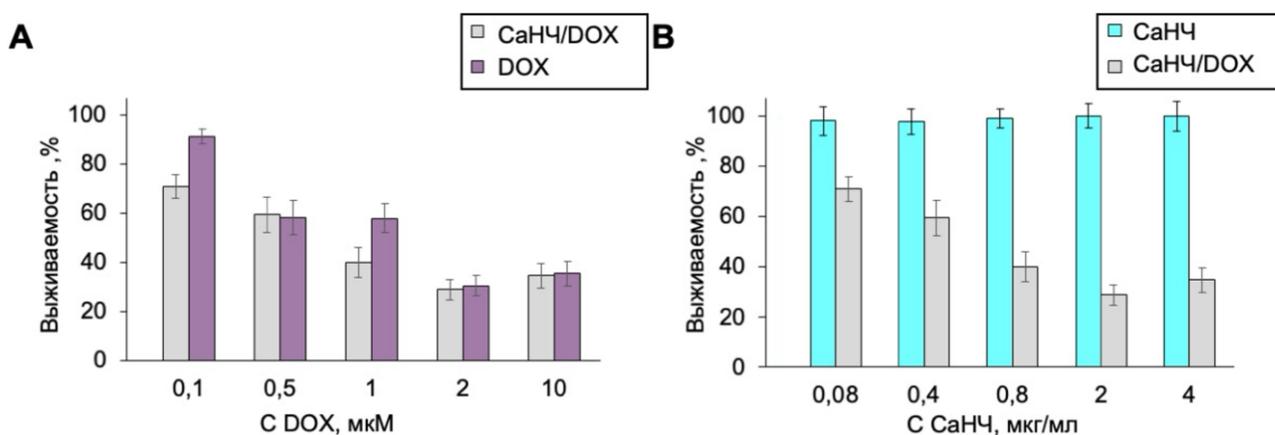


Рисунок 4.30 – Анализ жизнеспособности клеток A549 в зависимости от количества DOX в образце (А) или концентрации наночастиц (В) после инкубации с CaHЧ/DOX и DOX в течение 48 ч

На рисунке 4.30 показано эффективное ингибирование роста раковых клеток наноккомпозитом на основе карбоната кальция и противоопухолевого агента (DOX), сравнимое с индивидуальным лекарством. Что согласуется с численным показателем концентрации полумаксимального ингибирования (IC 50): $0,97 \pm 0,04$, $2,41 \pm 0,02$ мкМ для CaHЧ и DOX соответственно.

С помощью этого испытания не было возможности показать избирательность или адресность воздействия препарата, а только подтвердить сохранность терапевтических свойств доксорубина после включения в состав наноккомпозита и дальнейшего высвобождения. Поэтому ожидалось, что IC 50 будут сопоставимы. Вероятно, большая эффективность наноккомпозитного доксорубина связана с пролонгированным высвобождением препарата из состава комплекса, в сравнении с «единовременной инъекцией». Несмотря на то, что в работе не показана pH-зависимость *in vivo*, в литературе имеются данные о том, что pH-чувствительные материалы, демонстрирующие многообещающие результаты *in vitro*, могут быть ещё более эффективными *in vivo* [103, 125, 340, 341, 342].

Для уточнения оптимального состава Fe@CaHЧ/DOX и подтверждения рассуждений в прошлой главе, все полученные композиты с ёмкостью 25 – 1900 были протестированы на двух клеточных линиях.

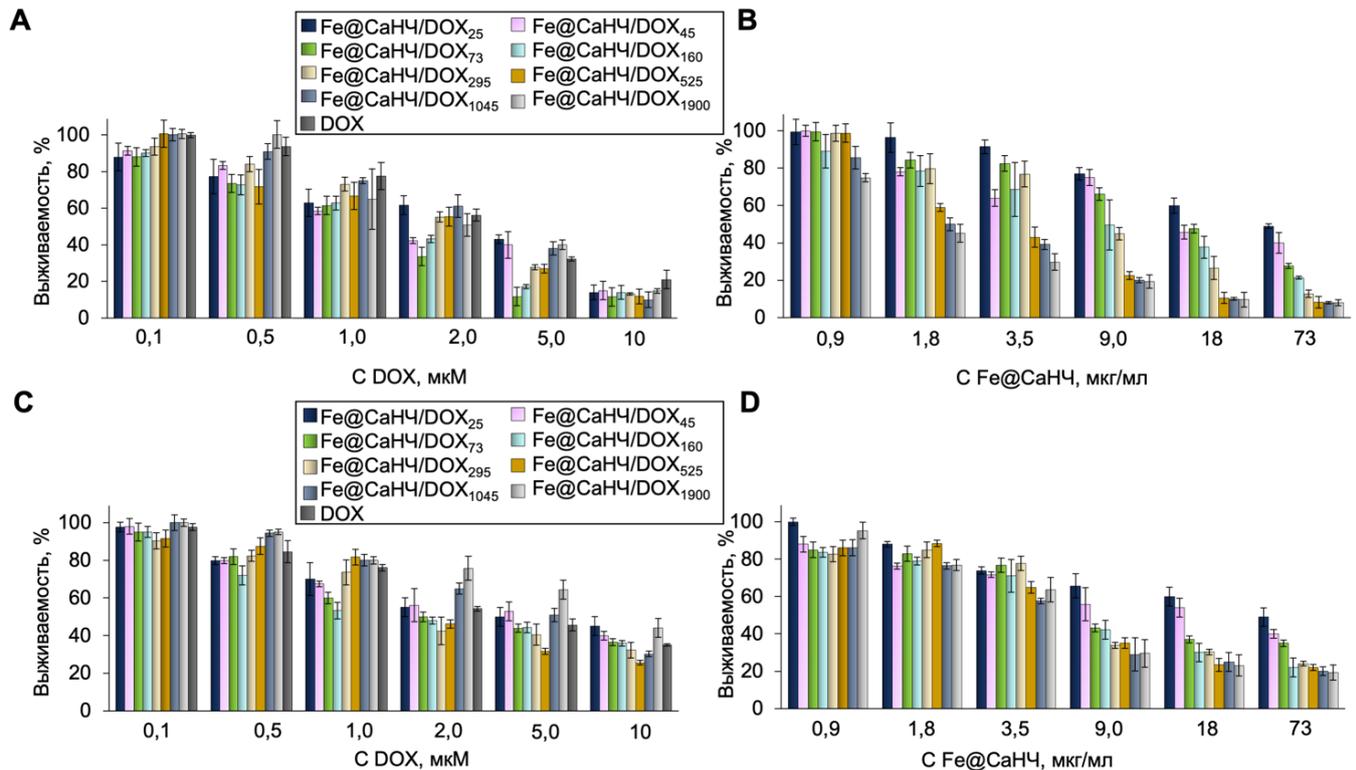


Рисунок 4.31 – Выживаемость клеток HeLa и MCF-7 в зависимости от количества DOX в образце (А – HeLa, С – MCF-7) или концентрации наночастиц (В – HeLa, D – MCF-7), обработанных Fe@CaH4/DOX и DOX в течение 48 ч

Образцы нормировали двумя вариантами: на концентрацию частиц (рисунок 4.31-слева, в каждом ряду разное количество частиц с учетом ёмкости) и на количество лекарства (рисунок 4.31-справа, в каждой точке равное количество, но разное DOX).

Наноконпозиты Fe@CaH4/DOX₂₅ – 1900 продемонстрировали эффективное подавление клеточной активности. Клетки, обработанные Fe@CaH4/DOX₁₉₀₀, показали более высокую жизнеспособность, что может быть объяснено длительным высвобождением препарата. Подобный эффект проявляется в меньшей степени для других наноконпозитов, содержащих высокую концентрацию DOX (рисунок 4.31-слева). Этот факт подтверждают данные по эффективности высвобождения DOX при физиологическом pH (таблица 4.9, столбцы %). Диаграмма на рисунке 4.31 справа коррелирует с данными по высвобождению в абсолютных значениях (таблица 4.9, столбцы мкг/мл). Графические данные были аппроксимированы для фиксации IC 50 (таблица 4.10).

Таблица 4.10. IC 50 различных типов Fe@CaHЧ/DOX и DOX на клетках HeLa и MCF-7

Нанокompозит	HeLa		MCF-7	
	IC 50, мкМ DOX	IC 50, мкг/мл Fe@CaHЧ/DOX	IC 50, мкМ DOX	IC 50, мкг/мл Fe@CaHЧ/DOX
Fe@CaHЧ/DOX ₂₅	3,0 ± 0,3	49,5 ± 0,5	5,2 ± 0,4	60,0 ± 0,5
Fe@CaHЧ/DOX ₄₅	1,8 ± 0,2	22,0 ± 0,2	4,5 ± 0,4	41,6 ± 0,4
Fe@CaHЧ/DOX ₇₃	1,6 ± 0,2	13,8 ± 0,2	2,5 ± 0,2	16,4 ± 0,1
Fe@CaHЧ/DOX ₁₆₀	1,2 ± 0,1	7,0 ± 0,6	2,0 ± 0,2	9,9 ± 0,1
Fe@CaHЧ/DOX ₂₉₅	2,3 ± 0,1	5,81 ± 0,3	2,2 ± 0,3	7,6 ± 0,1
Fe@CaHЧ/DOX ₅₂₅	2,4 ± 0,2	2,4 ± 0,02	3,1 ± 0,3	4,3 ± 0,4
Fe@CaHЧ/DOX ₁₀₄₅	2,5 ± 0,2	1,93 ± 0,3	5,2 ± 0,4	4,1 ± 0,5
Fe@CaHЧ/DOX ₁₉₀₀	2,6 ± 0,3	1,54 ± 0,09	5,7 ± 0,4	3,5 ± 0,6
DOX	2,8 ± 0,3	—	3,1 ± 0,3	—

Показатели полумаксимальной ингибирующей концентрации (Таблица 4.10) в зависимости от Fe@CaHЧ/DOX (мкг/мл) выглядят согласованно и подтверждают все полученные ранее результаты, а также сохранение ингибирующей активности DOX в нанокompозите. При нормировании результатов МТТ-теста на концентрацию DOX, лучший (с наибольшей ингибирующей способностью) IC 50 у частиц с более высокой эффективностью высвобождения в процентах (Fe@CaHЧ/DOX₁₆₀), а при нормировании на концентрацию наночастиц – у частиц с максимальной грузочной способностью (Fe@CaHЧ/DOX₁₉₀₀). Эти данные доказывают высокий терапевтический потенциал Fe@CaHЧ/DOX с ёмкостью 160 мкг/мг.

Таким образом, в этой части работы внимание было сконцентрировано на рассмотрении осмысленности применения высоких нагрузок лекарственных препаратов на сложносоставные поверхности. И было показано, что, в рассмотренном варианте, использование композитов с высоким содержанием препарата и низкой эффективностью его извлечения может привести к нецелевому расходу дорогостоящих лекарств и искажению желаемых кинетических профилей воздействия терапевтического агента. В то время, как, в случае применения индивидуального карбоната кальция, такой проблемы не установлено и было достигнуто 100% извлечение препарата и высокая эффективность ингибирования клеточной активности. Конкретный выбор наилучшего транспортёра зависит от дальнейшей цели применения и области доставки БАС. CaHЧ и Fe@CaHЧ являются перспективными транспортёрами лекарственных молекул, а полученные данные заслуживают дальнейших исследований *in vivo*.

4.3.2.1.2 Системы доставки малых лекарственных молекул на основе наноматериалов диоксида кремния

Наночастицы диоксида кремния (SiНЧ) являются перспективными кандидатами для адресной доставки лекарственных средств, в том числе противораковых и противовирусных [343, 344]. Применением SiНЧ в качестве транспортера БАС можно обеспечить положительное изменение фармакодинамики препарата, путём обеспечения следующих функций:

- адресность (химическая устойчивость SiНЧ разрешает пути функционализации для нацеливания на специфические рецепторы, экспрессируемые в целевых областях [345, 346]);
- контролируемое высвобождение (пористая морфология SiНЧ обеспечивает пролонгированный процесс выхода БАС из состава композита) [3];
- увеличенная физиологической стабильности (стабильность SiНЧ в условиях *in vivo* предотвращает БАС от преждевременной деградации, а также увеличивает время полувыведения препаратов) [347];
- сниженная резистентность при терапии антибиотиками (достигается благодаря улучшенному проникновению SiНЧ непосредственно в цитоплазму клеток) [348, 349];
- улучшенная биосовместимость (благодаря биосовместимости SiНЧ) [350].

Кроме того, ранее в работе был получен нанокомпозит SiНЧ с биосовместимым полимером – нейлоном-6 (SiНЧ-нейлон). Ожидается, что, благодаря более развитой объемной поверхности наноматериала, будет достигнута большая ёмкость к препарату и дальнейшая пролонгированность его высвобождения. Далее SiНЧ и SiНЧ-нейлон будут протестированы на перспективность применения в качестве носителей противоопухолевого антибиотика – доксорубицина (DOX).

4.3.2.1.2.1 Создание композита доксорубицина с наноносителями на диоксиде кремния и исследование условий разрушения этого комплекса

Процедуры связывания SiНЧ и SiНЧ-нейлон с препаратом, а также регистрации количественных показателей были аналогичны случаю с композитами карбоната кальция: инкубацию частиц с лекарством проводили в 100 мМ боратном буфере натрия (рН 8,0), 25 °С, в течение 12 часов, далее фиксировали оптическую плотность надосадочных растворов на 480 нм.

Выбор оптимального состава комплекса НЧ/DOX, проводили путём вариации количества частиц и препарата, данные о ёмкости и эффективности связывания представлены в таблице 4.11.

Таблица 4.11. Ёмкость и эффективность связывания с DOX для SiНЧ и SiНЧ-нейлон в зависимости от концентрации частиц и препарата

Концентрация НЧ, мг/мл		Концентрация DOX, мкг/мл	<i>E</i> , мкг/мг	Эффективность связывания НЧ с DOX, %
SiНЧ	SiНЧ-нейлон			
1	—	300	145 ± 8	49
1	—	200	127 ± 4	64
1	—	100	79 ± 7	79
0,8	—	100	83 ± 4	66
0,6	—	100	105 ± 3	63
0,4	—	100	122 ± 5	49
0,2	—	100	258 ± 6	52
—	1	200	160 ± 15	80
—	1	100	87 ± 10	87
—	0,8	100	112 ± 20	90
—	0,2	100	493 ± 38	98

Наибольшая ёмкость для SiНЧ была рассчитана как 258 мкг/мг (DOX/SiNPs). Однако, эффективность загрузки препарата составляет всего 52 %. Несмотря на это, для этого типа материала эти показатели являются превосходящими литературные данные [351, 352, 353, 354, 355, 356]. Для SiНЧ-нейлон наибольшая полученная ёмкость была рассчитана как 493 мкг/мг что в 2 раза выше, чем для SiНЧ. В химической структуре нейлона б представлены два домена разной полярности. Как полярная амидная группа, так и неполярная углеводородная цепь могут взаимодействовать с амфифильным препаратом DOX, способствуя его сорбции. При максимальной загрузке DOX на SiНЧ и SiНЧ-нейлон, гидродинамический размер наночастиц сразу увеличивается до 147 ± 5 нм (ИПД = $0,232 \pm 0,002$, Рисунок 4.22) и 137 ± 2 нм (ИПД = $0,209 \pm 0,002$), соответственно. ζ -потенциал изменяется до $0,01 \pm 0,08$ (SiНЧ/DOX) и $1,71 \pm 0,07$ (SiНЧ-нейлон/DOX) мВ.

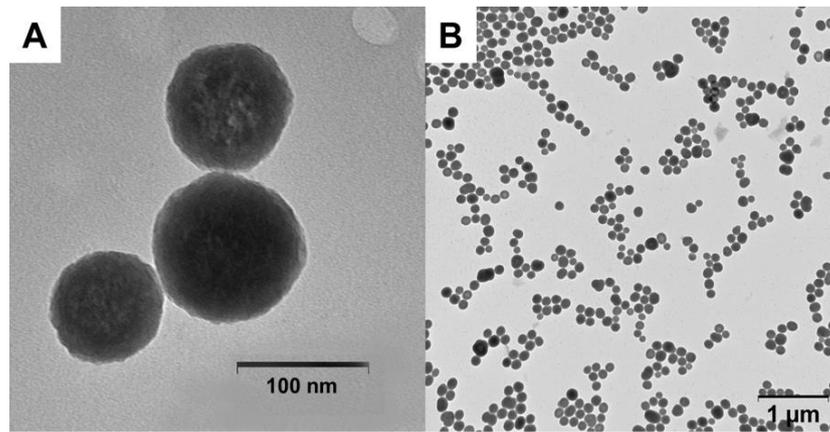


Рисунок 4.32 – ПЭМ-изображения SiNH₄/DOX шкала 200 нм (А) и 1 мкм (В)

Исходя из ранее полученных данных о нанокompозитах карбоната кальция, ожидалось, что ёмкостные показатели SiNH₄ и SiNH₄-нейлон не достигли процесса плотной упаковки препарата самого на себя. Это предположение подтвердили эксперименты по эффективности высвобождения DOX из SiNH₄/DOX и SiNH₄-нейлон/DOX (рисунок 4.33), содержащий наибольшее количество лекарства из полученных (258 мкг/мг и 493 мкг/мг соответственно).

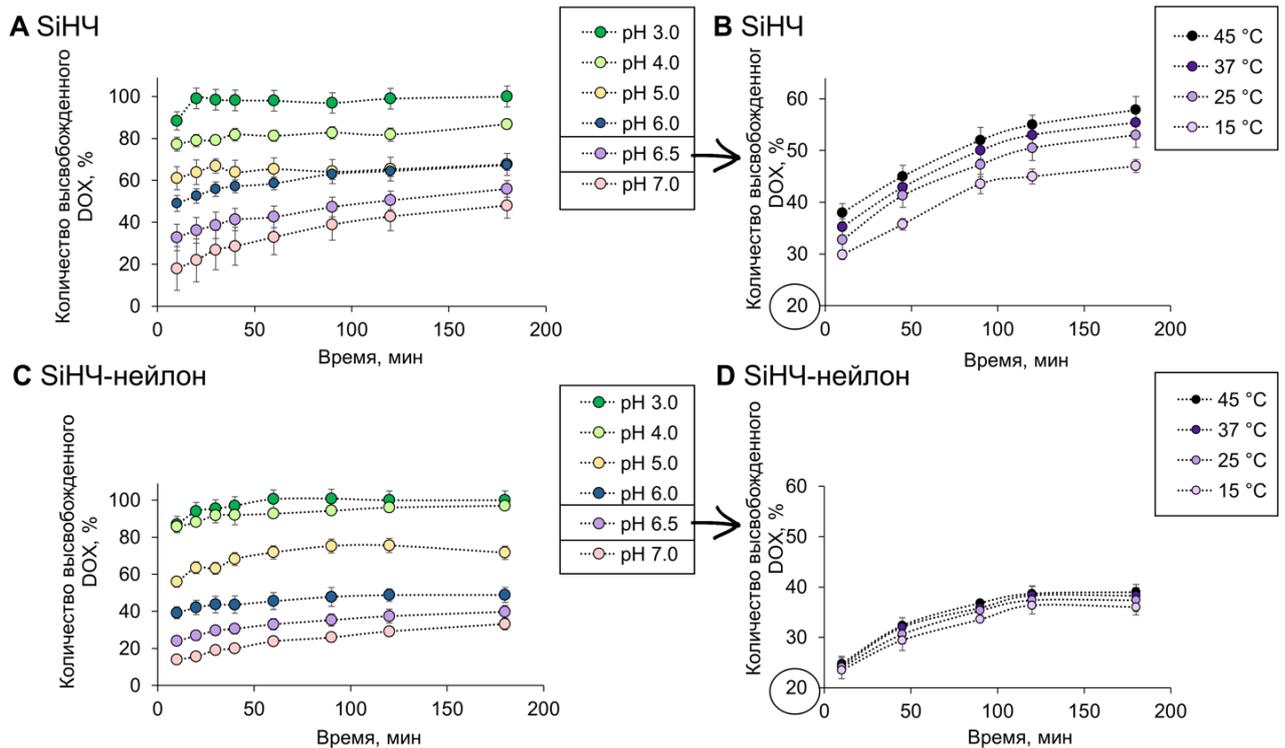


Рисунок 4.33 – Высвобождение DOX из SiNH₄/DOX (А, С) и SiNH₄-нейлон/DOX (В, D) при pH 3,0 – 7,0 при 25 °С (вверху) и pH 6,5 при 15 – 45 °С (внизу)

В связи с большей химической устойчивостью материалов диоксида кремния по сравнению с СаНС, были рассмотрены экстремально закисленные условия (pH 3 – 4) для более наглядного проявления pH-зависимого высвобождения лекарства из состава композитов

высвобождения (рисунок 4.33 А,В), а также влияние температуры на кинетические профили высвобождения (рисунок 4.33 С,Д).

Материалы SiНЧ/DOX и SiНЧ-нейлон/DOX характеризуются рН-зависимым высвобождением препарата, что связано не с деградацией матрицы носителя (Таблица 4.4), как в случае с СаНЧ, а с изменением рН раствора и, как следствие, изменением электростатических взаимодействий между НЧ и DOX, которые являются преобладающими в их связывании. Однако, несмотря на меньшую выраженность рН-зависимости (в сравнении с СаНЧ), избирательность высвобождения при опухолевом рН сохраняется: в нейтральном рН высвобождается не более 40% (SiНЧ/DOX) и 25% (SiНЧ-нейлон/DOX) DOX, а в рН 5 высвобождение составляет более 60% для обоих типов НЧ. Следует отметить, что эффективность высвобождения DOX для SiНЧ при рН 5 и 6 практически одинакова. В то время, как для SiНЧ-нейлон эффективность при рН 5 значительно выше, чем при рН 6, что лучше для селективного высвобождения DOX в опухолевых клетках.

Несмотря на то, что SiНЧ/DOX и SiНЧ-нейлон/DOX имеют схожие кинетические профили высвобождения препарата, модифицированный полимером нанокомпозит обладает большей лекарственной ёмкостью и, соответственно, более высоким количественным высвобождением DOX (мкг/мл). Более того, эффективность высвобождения DOX немного увеличивается с повышением температуры (рисунок 4.33), что свидетельствует о потенциале разработанных наноносителей для дальнейших экспериментов *in vivo* [357, 358, 359].

DOX является гидрофобной молекулой, способной к образованию электростатических взаимодействий и водородных связей. Предполагается, что молекулы лекарства выталкивают воду, взаимодействуя с нейлоном-6 и/или поверхностью диоксида кремния. В первом случае (нейлон-6) DOX может взаимодействовать с полярными амидными группами посредством водородных связей и под действием ван-дер-ваальсовых сил с гидрофобной углеводородной основой. Немодифицированные SiНЧ связываются с DOX преимущественно за счёт электростатических взаимодействий [360].

Таким образом, различные механизмы взаимодействия и обеспечивают различную эффективность высвобождения DOX, в том числе при повышении температуры. Но, в то же время, ёмкость и рН-зависимый профиль высвобождения препарата из состава нанокомпозитов делают эти материалы перспективными для дальнейших испытаний [361, 362].

4.3.2.1.2.2 Исследование терапевтической эффективности комплекса лекарства с наночастицами на основе диоксида кремния на клеточных линиях

Цитотоксичность SiHЧ, SiHЧ-нейлон, SiHЧ/DOX, SiHЧ-нейлон/DOX также оценивали стандартным МТТ-тестом. Для определения жизнеспособности клеток использовали широко распространенную клеточную линию карциномы легких человека (A549), а также клетки эмбриональных почек человека, трансформированные большим Т-антигеном SV40 (HEK293FT). Для проведения МТТ-теста различные количества наноконструкций и DOX инкубировали с клетками в течение 48 ч (рисунки 4.34 – 35). SiHЧ, SiHЧ-нейлон не показали выраженной токсичности до 50 мкг/мл (рисунок 4.34), что указывает на перспективность использования исследуемых наноконструкций *in vivo*.

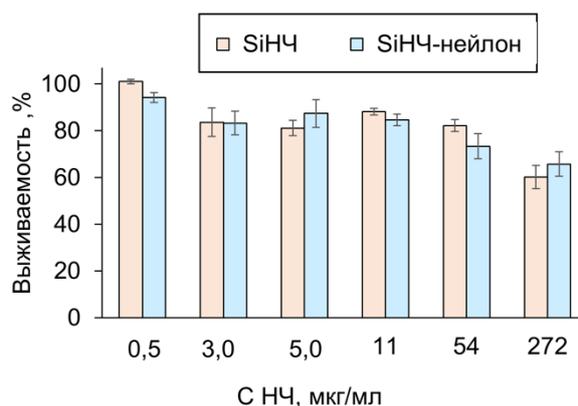


Рисунок 4.34 – Анализ жизнеспособности клеток A549 после инкубации с SiHЧ и SiHЧ-нейлон в течение 48 ч

В то время, как лекарства содержащие наноконструкцию (SiHЧ/DOX, SiHЧ-нейлон/DOX), в сравнении с индивидуальным DOX, эффективно подавляют пролиферацию клеток (рисунок 4.35).

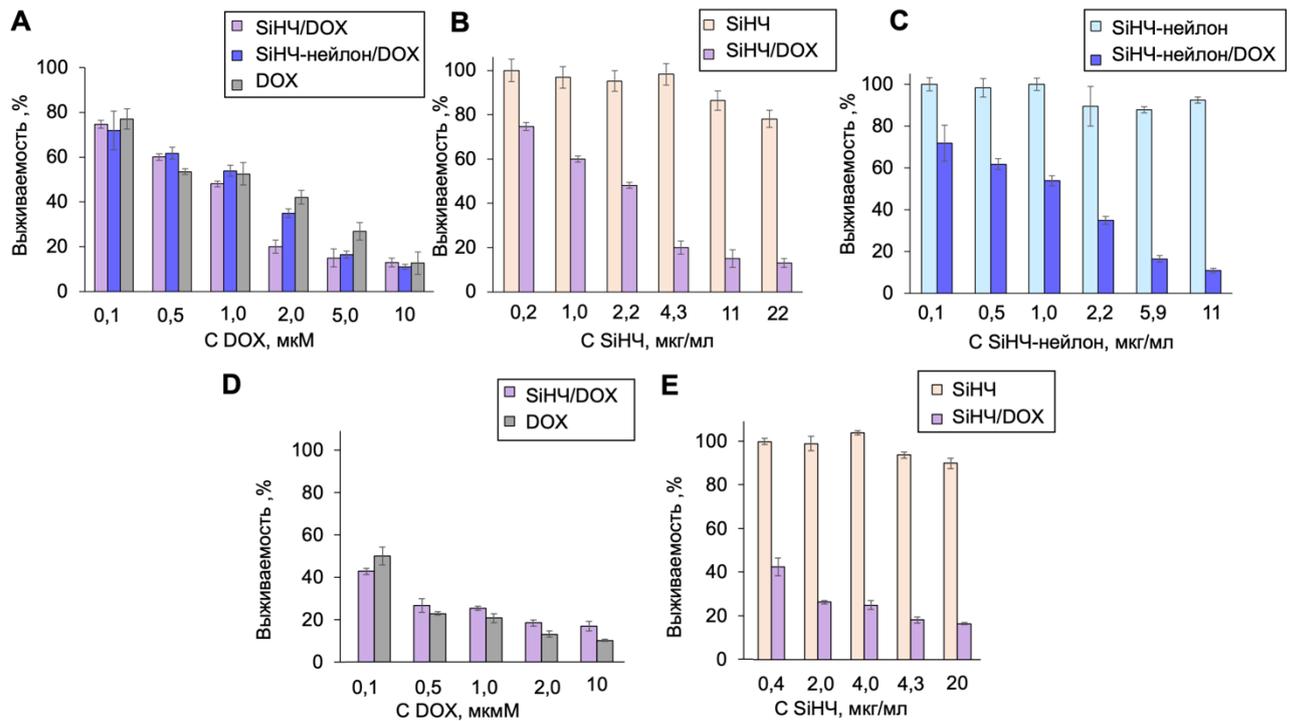


Рисунок 4.35 – Анализ жизнеспособности клеток A549 (сверху) и HEK293 (снизу) после их обработки SiHЧ, SiHЧ-нейлон, SiHЧ/DOX, SiHЧ-нейлон/DOX и DOX в течение 48 ч в зависимости от количества DOX (A, D), или концентрации SiHЧ (B, E), или концентрации SiHЧ-нейлон (C) в образце

SiHЧ/DOX, SiHЧ-нейлон/DOX и DOX обладают практически одинаковым токсическим эффектом в расчёте на концентрацию препарата (рисунок 4.35 A). Однако, жизнеспособность клеток после обработки SiHЧ/DOX, SiHЧ-нейлон/DOX, в пересчёте на массу нанокompозита, не одинакова (рисунок 4.35 B,C). SiHЧ-нейлон/DOX демонстрирует более высокий токсический эффект (рисунок 4.35 C), что может быть объяснено более высокой лекарственной ёмкостью в сравнении с SiHЧ. По сравнению с клеточной линией A549, HEK293FT в большей степени подвержена воздействию препаратов SiNPs/DOX, DOX (SiHЧ-нейлон/DOX не исследовали) (рисунок 4.35 D,E), что объясняется различной восприимчивостью клеток к внешним воздействиям.

Расчитанные значения IC 50 для SiHЧ/DOX, SiHЧ-нейлон/DOX и DOX представлены в таблице 4.12.

Таблица 4.12. Значения IC 50 SiHЧ/DOX, SiHЧ-нейлон/DOX и DOX для клеточной линии A549 и HEK 293FT в зависимости от концентрации DOX или наночастиц

Нанокompозит	IC 50 A549		IC 50 HEK293FT	
	мкМ (по содержанию DOX)	мкг/мл (по содержанию НЧ)	мкМ (по содержанию DOX)	мкг/мл (по содержанию НЧ)
SiHЧ/DOX	0,98 ± 0,09	3,8 ± 0,3	0,013 ± 0,002	0,050 ± 0,008
SiHЧ-нейлон/DOX	1,12 ± 0,08	2,3 ± 0,2	—	—
DOX	1,47 ± 0,09	—	0,017 ± 0,005	—

Значение IC 50 для SiHЧ/DOX составило $0,98 \pm 0,05$ мкМ по концентрации DOX и было пересчитано на $3,8 \pm 0,3$ мкг/мл по количеству наночастиц для клеточной линии A549. Значение IC 50 для SiHЧ/DOX в экспериментах с клетками HEK293FT значительно ниже и составляет $0,08 \pm 0,01$ мкМ по количеству DOX и пересчитано, как $0,31 \pm 0,04$ мкг/мл по концентрации наночастиц. Для SiHЧ-нейлон/DOX значение IC 50 в зависимости от концентрации DOX сопоставимы с SiHЧ/DOX. Однако, для SiHЧ-нейлон/DOX значение IC 50 в пересчёте на количество нанокompозита ниже и составляет $2,3 \pm 0,2$ мкг/мл. Полученные результаты свидетельствуют о более высокой терапевтической эффективности SiHЧ-нейлон/DOX. Полученные данные заслуживают дальнейших исследований *in vivo*, в том числе с рассмотрением преимущественных областей накопления и путей метаболизма частиц, а также учетом отложенной токсичности [363].

Таким образом, в данной главе полученные наноносители (CaHЧ, SiHЧ) и их модифицированные аналоги (Fe@CaHЧ, SiHЧ-нейлон) были протестированы в качестве носителей противоопухолевого агента – доксорубина (DOX). Сводная таблица характеристик полученных композитов приведена ниже. (таблица 4.13).

Таблица 4.13. IC 50 CaHЧ/DOX, Fe@CaHЧ/DOX, SiHЧ/DOX, SiHЧ-нейлон/DOX и DOX для клеточной линии раковых клеток в зависимости от концентрации DOX или наночастиц

Нанокompозит	мкМ (по содержанию DOX)	мкг/мл (по содержанию НЧ)
CaHЧ/DOX ₆₅₉	0,97 ± 0,04	0,79 ± 0,03
Fe@CaHЧ/DOX ₁₆₀	1,2 ± 0,1	7,0 ± 0,6
SiHЧ/DOX ₂₅₈	0,98 ± 0,09	3,8 ± 0,3
SiHЧ-нейлон/DOX ₄₉₃	1,12 ± 0,08	2,3 ± 0,2
DOX	2,3 ± 0,3	—

В таблице 4.13 обобщены значения концентрации нанокompозитов по содержанию частиц или содержанию DOX, необходимые для 50 % ингибирования активности линии раковых клеток. Ёмкость нанокompозитов превзошла литературные аналоги: CaHЧ (659 ± 5 мкг/мг) [327, 364],

Fe@CaНЧ (1900 ± 27 мкг/мг) [365], SiНЧ (258 ± 6 мкг/мг) [351, 352], SiНЧ-нейлон (493 ± 38 мкг/мг) [363]. Для всех наноносителей показан рН-зависимый профиль высвобождения лекарства из состава наноматериалов: в области опухолевого рН (5 и ниже) реализуется более 60 % DOX. Однако, индивидуальные CaНЧ перспективны полной деградацией матрицы носителя в этой области, что сопровождается 100 % высвобождением препарата. Более того, исследования на клеточных линиях доказали отсутствие токсичности всех полученных частиц в рабочем диапазоне концентраций и сопоставимую эффективность НЧ/DOX в ингибировании активности клеточного деления (таблица 4.13). Интересно, что немодифицированные наночастицы (CaНЧ/DOX и SiНЧ/DOX) по эффективности близки, также как и их модифицированные аналоги (Fe@CaНЧ/DOX и SiНЧ-нейлон/DOX). Превосходство CaНЧ/DOX и SiНЧ/DOX над Fe@CaНЧ/DOX и SiНЧ-нейлон/DOX может быть связано с отсутствием возможности применения их свойств таких, как направленность или пролонгированность (МТТ стандартно проводится 48 ч, возможно, для пролонгированного высвобождения из нейлонового покрытия следует исследовать другие методы). Отсутствие зависимости эффективности от концентрации DOX в композите, вероятно, связано с различным оптимальным содержанием лекарства для разного типа частиц (для всех частиц ранее была экспериментально установлен оптимум). Кроме того, хотя клеточные исследования не позволят увидеть эффект рН-зависимости, в работе показана большая токсичность наноматериалов, несущих доксорубицин, в сравнении с индивидуальным препаратом, благодаря пролонгированности высвобождения агента.

Таким образом, каждая из наночастиц обладают своими преимуществами: CaНЧ (полная деградация матрицы наноматериала в области опухоли); Fe@CaНЧ (возможность магнитного нацеливания на таргетную область); SiНЧ (универсальность дальнейшей функционализации поверхности для увеличения эффективности системы); SiНЧ-нейлон (увеличенная ёмкость и пролонгированность высвобождения и наличие сайтов присоединения терапевтических и/или адресующих олигонуклеотидов). Данные, полученные в исследовании, заслуживают продолжения исследований на модельных животных.

4.3.2.2 Синтез нековалентного комплекса олигонуклеотидов с наночастицами

За последние десятилетия были изучены многие опасные угрозы человеческому здоровью с точки зрения молекулярных механизмов и найдены пути исправления ошибок, приводящих к их развитию. Эффективным инструментом в борьбе с широким спектром онкологических заболеваний, вирусных, сердечно-сосудистых, аутоиммунных и генетических нарушений являются терапевтические нуклеиновые кислоты. Генная терапия заняла особое место на рубеже

медицинских наук 21 века, доказав возможность эффективного направленного редактирования заданных нуклеиновых последовательностей [366]. Помимо терапевтического применения, не менее перспективны и диагностические конструкции *in vivo* [367]. Однако, несмотря на доказанную эффективность направления, при попадании в организм такие конструкции теряют свои терапевтические свойства из-за отсутствия стабильности немодифицированных олигонуклеотидов, а также возмущения внутренних защитных систем организма (ферментативная деградация в кровотоке, фагоцитоз, почечная экскреция, и т. д.) [187].

Одним из возможных путей решения этой проблемы является создание системы доставки. Такой носитель, помимо того, что должен преодолевать внеклеточные и клеточные барьеры, а также эффективно высвобождать нуклеиновую кислоту, должен ещё и не наносить вред организму. Распространены два типа конструкций: вирусные и не вирусные. Первые показали многообещающие результаты, однако недостатки, связанные с трудностями производства, и проблемы иммуногенности вирусных векторов, передвинули в приоритет не вирусные частицы [368]. К таким материалам относят как органические, так и неорганические микро- и наноносители, среди которых наибольшую популярность получили липосомы, полимерные и белковые частицы, соединения из металлов и их оксидов, а также сферы диоксида кремния [367]. Большая часть исследований демонстрирует результаты касательно систем доставки терапевтических нуклеиновых кислот на основе липосом, что согласуется с данными о допущенных к клиническим применениям липосомальных лекарствах (Doxil, Myocet, Onivyde, DepoCyt и т. д.) [12]. Но использование липосом для упаковки биологически активных соединений, в том числе нуклеиновых кислот, имеет ряд недостатков, заметно осложняющих их дальнейшее применение. К основным относят низкую коллоидную стабильность, как в водных растворах, так и в условиях, близких к физиологическим, склонность к агрегации, ограниченный срок хранения, а также взаимодействие транспортера с белками крови и другими биомолекулами из биологических растворов, что приводит к образованию "белковой короны". Формирование такого комплекса значительно искажает изначальные фармакокинетические свойства липосомальной композиции (размер, поверхностный заряд, свойства и т. д.) [184].

Перспективной альтернативой из ряда биодegradуемых частиц могут выступать материалы на основе карбоната кальция, благодаря отсутствию токсичности и pH-лабильности [17, 369], и диоксида кремния – за счёт их химической устойчивости, разрешающей пути дальнейшей функционализации [370].

Таким образом, для решения проблемы низкой стабильности нуклеиновых кислот в условиях *in vivo*, далее в работе будут рассмотрены пути их включения в состав наноматериалов SiНЧ и СаНЧ, как методом сорбции, так и инкапсуляции.

4.3.2.2.1 Создание композита нуклеиновой кислоты с наночастицами карбоната кальция и диоксида кремния

Связывание ОН с наночастицей посредством электростатических взаимодействий с высокой эффективностью, при сохранении свойств нуклеиновой кислоты, является нетривиальной задачей. В случае получения низких ёмкостных показателей, для достижения терапевтической дозы препарата потребуется значительное увеличение концентрации наночастицы, что может привести к нежелательному накоплению частиц или выявлению отложенной токсичности [371, 372].

В данной части работы будут рассмотрены нековалентные пути присоединения нуклеиновых кислот к полученным ранее наночастицам. В качестве грузовых молекул использовали олигонуклеотиды (g_3 -Tamra, g_3 -Cy, g_3), способные подавлять ген GFP (green fluorescent protein, ОН) для обеспечения возможности дальнейшей регистрации биологической активности методом проточной цитометрии. Кроме того, ОН были модифицированы красителем, если не отмечено обратного.

Можно выделить два пути создания нековалентного комплекса «НЧ-ОН»: постсинтетический (связывание компонентов происходит непосредственно после формирования наночастиц – Вариант А (А)) и синтетический (формирование «НЧ-ОН» в период фаз зарождения и роста ядра – Вариант Б (Б)). Предполагается, что, в первом случае, ОН преимущественно сорбируется на поверхность наноматериала, в то время как во втором – инкапсулируется. Варианты могут отличаться как эффективностью связывания, так и долей высвобождения ОН из состава нанокompозита. Полученные частицы CaНЧ, Fe@CaНЧ и SiНЧ были протестированы в качестве носителей ОН двумя путями присоединения. Условия связывания, с учётом природы компонентов, были выбраны слабощелочными. Кроме того, для обеспечения возможности дальнейшей регистрации материалов *in vivo*, проводили инкубацию наночастиц с ОН, модифицированными красителями. Были выбраны два варианта для учёта влияния формирования нековалентных взаимодействий между НЧ и функциональными группами красителя: ксантеновый (тетраметилродамин – Tamra, Tmr) и полиметиновый (Cyanine5, Cy5) красители, а также индивидуальные метки в отсутствие ОН (Родамин Б, RDB и Cy5).

Известно, что наличие в биомолекулах флуорофора может значительно влиять на эффективность формирования нековалентных взаимодействий. На примере взаимодействия олигонуклеотидов с наночастицами золота (НЧЗ), выявлены ключевые факторы, определяющие сродство нативных или меченных красителями ОН к НЧЗ: поверхностная плотность ассоциатов,

гидрофобность, площадь поверхности и заряд красителя, суммарный заряд ОН с меткой (где гидрофобность вносит основополагающий вклад) [373].

Мы ожидали, что, как и для НЧЗ, для разработанных нами материалов наличие у ОН красителя повлияет на эффективность создания комплексов НЧ-ОН (поэтому в работе рассмотрен вклад в эффективность присоединения от индивидуальных красителей). В связи с тем, что поверхностный заряд исследуемых наноконпозитов отрицательный (СаНЧ: $-17,3 \pm 0,4$ мВ; Fe@СаНЧ: $-13,8 \pm 0,3$ мВ; SiНЧ $-28,6 \pm 0,2$ мВ), ожидается, что основной вклад в образование связи будут вносить именно гидрофобные взаимодействия (таблица 4.14).

Таблица 4.14. Гидродинамический размер (d) и ёмкость (E) CaНЧ, Fe@CaНЧ и SiНЧ по отношению к ОН, модифицированных тетраметилпродамино (Тамра, Tmr) или цианиновым (Cyanine5, Cy5) красителями

Параметр	CaНЧ (204 ± 8 нм; -17.3 ± 0.4 мВ)							
	Синтетический вариант (А)				Постсинтетический вариант (Б)			
	ОН-Tmr	ОН-Cy5	RDB	Cy	ОН-Tmr	ОН-Cy5	RodB	Cy
E , мкмоль/г	9 ± 2	$3,4 \pm 0,9$	53 ± 10	$0,3 \pm 0,1$	78 ± 11	18 ± 2	8963 ± 332	14 ± 1
d , нм	217 ± 5	257 ± 12	209 ± 5	222 ± 7	285 ± 3	325 ± 5	291 ± 4	337 ± 7
ИПД	$0,11 \pm 0,01$	$0,17 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,01$	$0,18 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,03$	$0,168 \pm 0,002$	$0,16 \pm 0,01$	$0,210 \pm 0,08$
ζ , мВ	$-23,3 \pm 0,9$	$-20,4 \pm 0,4$	$-25,0 \pm 0,2$	$-21,2 \pm 0,3$	$-31,0 \pm 0,2$	$-27,3 \pm 0,2$	$-30,0 \pm 0,2$	$-29,5 \pm 0,3$
	Fe@CaНЧ (138 ± 8 нм; $-13,8 \pm 0,3$ мВ)							
	Вариант А				Вариант Б			
	ОН-Tmr	ОН-Cy5	RDB	Cy	ОН-Tmr	ОН-Cy5	RodB	Cy
E , мкмоль/г	—	8 ± 2	—	4 ± 1	—	18 ± 4	—	10 ± 3
d , нм	—	162 ± 6	—	123 ± 6	—	170 ± 4	—	209 ± 10
ИПД	—	$0,32 \pm 0,06$	—	$0,198 \pm 0,006$	—	$0,31 \pm 0,03$	—	$0,33 \pm 0,02$
ζ , мВ	—	$-14,6 \pm 0,1$	—	$-15,9 \pm 0,1$	—	$-16,3 \pm 0,3$	—	$-17,1 \pm 0,7$
	SiНЧ (63 ± 1 нм; $-28,6 \pm 0,2$ мВ)							
	Вариант А				Вариант Б			
	ОН-Tmr	ОН-Cy5	RDB	Cy	ОН-Tmr	ОН-Cy5	RodB	Cy
E , мкмоль/г	15 ± 2	7 ± 1	11 ± 4	0	$23,4 \pm 0,9$	17 ± 5	6740 ± 298	$6,2 \pm 0,9$
d , нм	162 ± 6	142 ± 6	144 ± 6	162 ± 6	132 ± 1	133 ± 2	137 ± 2	131 ± 1
ИПД	$0,06 \pm 0,01$	$0,019 \pm 0,001$	$0,014 \pm 0,006$	$0,016 \pm 0,009$	$0,024 \pm 0,003$	$0,013 \pm 0,006$	$0,05 \pm 0,05$	$0,024 \pm 0,009$
ζ , мВ	$-31,0 \pm 0,3$	$-32,3 \pm 0,6$	$-37,7 \pm 0,7$	$-34,3 \pm 0,8$	$-39,9 \pm 0,2$	$-38,8 \pm 0,2$	-43 ± 1	$-39,1 \pm 0,8$

Немаловажным является тот факт, что, после присоединения ОН, все полученные композиты не превысили субмикронного размера, а также сохранили монодисперсность и ИПД до 0,34 (таблица 4.14). Среди всех полученных материалов сохраняются тенденции:

- комплексы, полученные синтетическим методом, обладают меньшими размерами в сравнении с постсинтетическими аналогами для композитов карбоната кальция (SiНЧ обратная тенденция);
- после присоединения ОН / метки, вне зависимости от красителя, поверхностный потенциал становится по модулю больше для всех типов НЧ;
- ёмкость по отношению к $\text{ОН}_{\text{Tamra}} / \text{Tamra}$ больше, чем для аналогов Су5 для всех типов НЧ;
- ёмкость по отношению к ОН_{Tamra} меньше, чем к красителю (RDB) в отсутствие олигонуклеотида, в то время как для вариантов с Су5 наоборот (индивидуальный краситель присоединяется с меньшей эффективностью, чем ОН, меченный Су5) для всех типов НЧ, кроме магнитного композита (для Fe@CaHЧ не исследовали);
- из всех исследованных частиц Fe@CaHЧ обладает наибольшей ёмкостью к полиметиновому красителю.

Как и следовало ожидать, введение всех красителей в ОН привело к увеличению эффективности создания ассоциатов. На примере индивидуальных СаНЧ, было показано, что, в случае использования ОН без метки (последовательность аналогична примерам в таблице 4.14, но без Су5 или Tamra), удаётся достичь ёмкости близкой к цианиновым вариантам: ёмкость наночастиц карбоната кальция без краски – 14 мкмоль/г. Исходя из этого, можно сделать вывод о том, что плоская структура молекулы Tamra (аналогичная ранее рассмотренному DOX) позволяет более эффективно создавать пары пористых НЧ с ОН. С другой стороны, в литературе показано, что более гидрофобные остатки обладают более высокой адсорбционной способностью к НЧ [373]. Например, большинство гидрофобных ОН, содержащие остатки Су-серии, демонстрируют большее сродство к НЧЗ, а нативные ОН, как и ОН, содержащие остатки ксантеновых или ароматических углеводородных типов, менее гидрофобны и демонстрируют меньшее сродство к поверхности наночастиц.

Основываясь на литературных данных, полученных ёмкостные характеристики являются соразмерными с аналогами [374, 375, 376]. Интенсивность окрашивания полученных образцов представлена на рисунке 4.36.

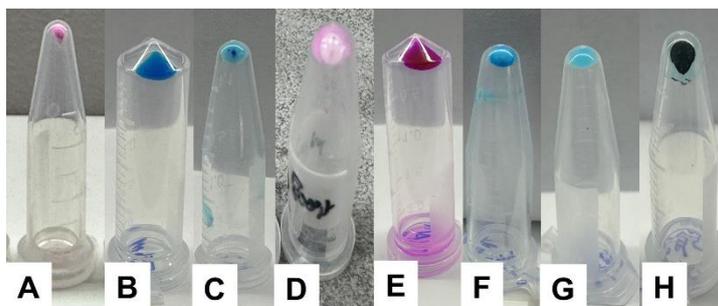


Рисунок 4.36– Фотографии частиц с присоединенным ОН:
 $\text{CaНЧ-ОН}_{\text{Tamra}}$ (A), $\text{SiНЧ-ОН}_{\text{Cy}}$ (B), $\text{CaНЧ-ОН}_{\text{Cy}}$ (C), полученные синтетическим подходом и
 $\text{CaНЧ-ОН}_{\text{Tamra}}$ (D), $\text{SiНЧ-ОН}_{\text{Tamra}}$ (E), $\text{CaНЧ-ОН}_{\text{Cy}}$ (F), SiНЧ-Cy (G), а также $\text{Fe@CaНЧ-ОН}_{\text{Cy}}$ (H),
 полученные постсинтетическим методом

Несмотря на невысокие численные показатели ёмкости, видно, что комплексы обладают интенсивным окрашиванием.

Далее, полученные комплексы $\text{НЧ-ОН}_{\text{Cy5}}$ и НЧ-Cy5 были проанализированы методом проточной цитометрии. Для исследования были выбраны клетки, экспрессирующие зеленый флуоресцентный белок (HEK293-GFP). Несмотря на большую ёмкость тетраметилродаминовых комплексов, для оптимальной детекции трансфекции по флуоресценции и расхождения спектров был выбран цианиновый вариант ассоциата НЧ-ОН (максимум возбуждения/поглощения, нм: Cy5 – 646, Tamra – 541, GFP – 498).

Ниже представлены данные, демонстрирующие влияние типа наноматериала и способ присоединения ОН на эффективность проникновения композита в клетку (рисунок 4.37).

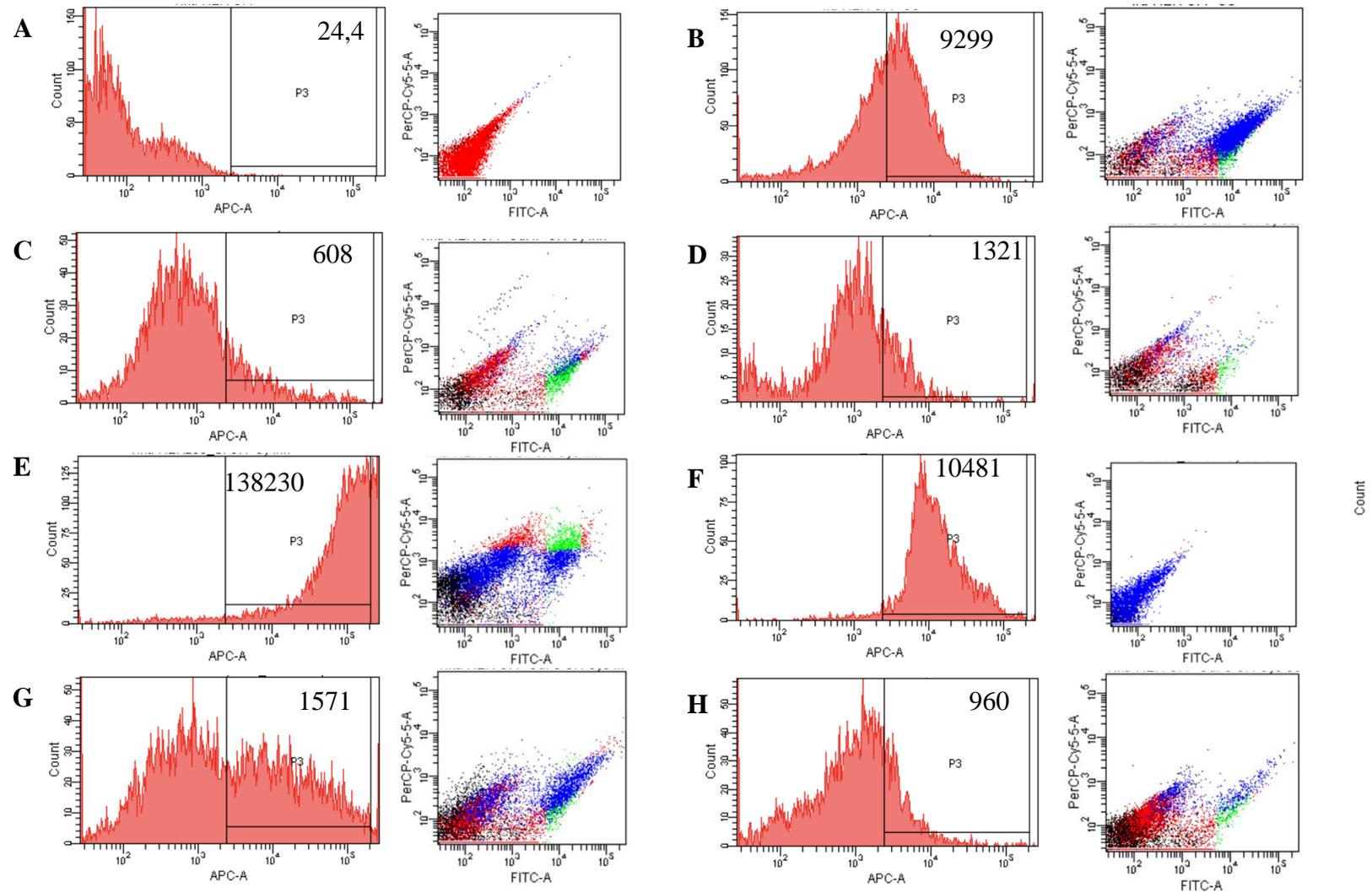


Рисунок 4.37 – Репрезентативный анализ проточной цитометрии поглощения на линии HEK293-GFP контрольных клеток (A), липофектамина с OH_{cy} (B) и препаратов: CaHЧ-OH_B (C), CaHЧ-OH_A (D), SiHЧ-OH_B (E), SiHЧ-OH_A (F), Fe@CaHЧ-OH_B (G), Fe@SiHЧ-OH_A (H), в правом верхнем углу графиков приведены медианные значения пиков поглощения материалов

Как показано на репрезентативных гистограммах на рисунке 4.37, эффективность трансфекции зависит не только от типа частиц (CaНЧ / SiНЧ / Fe@CaНЧ), а также от способа присоединения ОН (синтетический / постсинтетический). Наилучшей проникающей способностью из исследованного ряда обладают SiНЧ, что соотносится с литературой [377, 378]. Вероятно, это может быть связано с быстротекущей преждевременной деградацией карбоната кальция, завершающей процесс проникновения БАС в клетку. Наличие ОН в пробе увеличивает эффективность этого процесса для SiНЧ и понижает – для CaНЧ, Fe@CaНЧ. Однозначно выявить тенденцию влияния типа соединения НЧ с грузовой молекулой не удалось, однако для всех типов частиц эффективность проникновения для композитов, полученных синтетическим и постсинтетическими подходами, различна.

В связи с тем, что в образцах CaНЧ-ОН, анализируемых методом цитометрии был обнаружен значительный эффект ингибирования клеточной активности, несмотря на показанное ранее отсутствие токсичности CaНЧ, SiНЧ, образцы были протестированы МТТ подходом в увеличенном концентрационном диапазоне (0,002 – 0,2 мг/мл по концентрации НЧ в композите и 1 – 10 мкМ ОН).

Рассматривали образцы с присоединением постсинтетическим, как наиболее высокоёмкостные (рисунок 4.38).

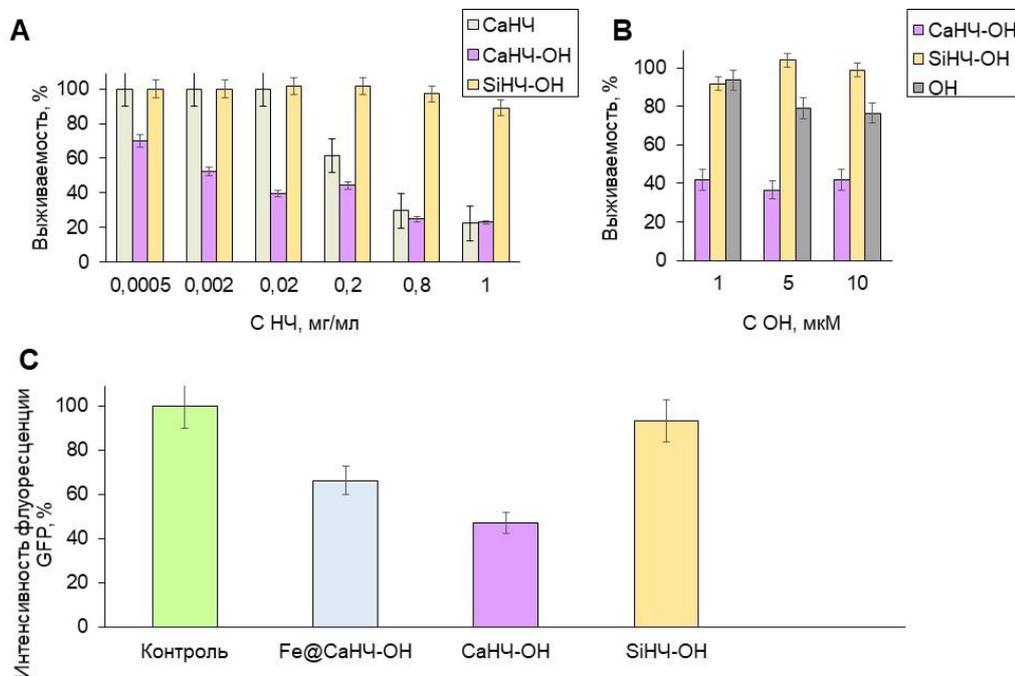


Рисунок 4.38 – Анализ жизнеспособности клеток A549 (сверху) после обработки CaНЧ, CaНЧ-ОН, SiНЧ-ОН и ОН в течение 48 часов в зависимости от концентрации частиц в образце (А), ОН (В) и интенсивности подавления экспрессии гена GFP клеток наноконструкциями на линии HEK293-GFP (С)

Данные на рисунке 4.38 отражают выживаемость клеток линии A549 после обработки композита CaНЧ-ОН, SiНЧ-ОН и ОН в течение 48 часов в зависимости от концентрации частиц в образце (слева) и ОН (справа). Аналогичные доли были получены при обработке НЕК293. Исходя из полученных данных, CaНЧ-ОН в исследованных концентрациях для метода цитометрии по олигонуклеотидам обладают токсическим эффектом, предположительно вызванным избыточной концентрацией двухвалентных ионов кальция, вызывающим нарушение кальциевой сигнализации и влияющих на апоптотический путь клетки [79, 379].

Подавление экспрессии зеленого флуоресцентного белка проводили на линии НЕК293-GFP и регистрировали флуорисценцию на канале GFP (GFP – 498) (рисунок 4.38 С). Предполагается, что низкая эффективность флуоресценции GFP клеток, обработанных CaНЧ-ОН, связана не с подавлением экспрессии гена, а с токсичностью частиц (рисунок 4.38 А).

Материалы, содержащие магнитное ядро, требуют дополнительных исследований из-за перекрывания спектров флуоресценции частиц и формаза, образующегося из 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромида в методе МТТ.

Несмотря на негативный результат по карбонату кальция, стоит обратить внимание, что токсичная концентрация частиц весьма высока (0,2 – 1,0 мг/мл). CaНЧ остается перспективным носителем ОН либо при терапевтической концентрации ОН, вплоть до 1мкМ, либо при оптимизации путей присоединения нуклеиновой кислоты. В то же время, на данном этапе исследования, SiНЧ является наиболее перспективным носителем для олигонуклеотидов, характеризующийся ёмкостью, соизмеримой с CaНЧ, и отсутствием токсичности. В то же время, исследование далее будет продолжено по оптимизации методов и протоколов работы с нанокompозитами карбоната кальция и их магнитными аналогами.

Многообещающие результаты получены для композитов диоксида кремния. Дополнительно к лучшему проникновению, материал не проявляет токсичность в исследованном диапазоне концентраций, что потенциально применимо для больших концентрационных режимов в генной терапии [380]. Однако, низкая эффективность подавления флуоресценции GFP клеток в случае SiНЧ, может быть вызвана преждевременной деградацией ОН под действием нуклеазной активности, что требует проведения исследований, направленных на повышение стабильности олигонуклеотидов к действию гидролитических ферментов.

Низкая физиологическая стабильность олигонуклеотидов является одной из основных проблем их применения в терапии [381]. Повышение стабильности олигонуклеотидов к действию гидролитических ферментов позволит повысить эффективность применяемых наноконструкций.

4.4 Исследование нуклеазной устойчивости олигонуклеотидов и пути их стабилизации

Нуклеазы – одна из самых многочисленных групп ферментов, представленных в организме и отвечающих за гидролиз фосфодиэфирных связей между субъединицами нуклеиновых кислот (НК). Отсюда важнейшие роли этого класса ферментов заключаются в переваривании НК пищи (ферменты пищеварения), удалении чужеродных НК (защитная роль), а также регуляции синтеза и распада НК в клетках [382]. По механизму разделяют экзонуклеазы и эндонуклеазы, рибонуклеазы и дезоксирибонуклеазы, рестриктазы и некоторые другие. Эндонуклеазы могут быть неспецифическими и способны гидролизовать все последовательности нуклеиновых кислот, а могут быть высокоспецифическими и воздействовать точно на межнуклеозидные связи из определенной последовательности узнавания. Экзонуклеазы способны гидролизовать нуклеотид с 3' или 5' концов нуклеиновой кислоты [383].

Несмотря на бесспорную необходимость защитной роли нуклеаз для нормального функционирования организма, ферменты в большей мере препятствуют доставке терапевтических НК (тНК), обладающих высоким потенциалом в создании эффективных высокоизбирательных средств терапии [384, 385]. Ферменты приводят к преждевременной биодegradации тНК, из-за чего происходит потеря возможного терапевтического эффекта, для решения этой проблемы необходимо разрабатывать подходы к адресной доставке тНК в обход защитных функций организма.

Одним из возможных вариантов физиологической стабилизации НК является создание комплекса олигонуклеотида с наноматериалом, который будет выполнять защитную функцию [386]. В работе исследовали влияние присоединения ОН к наноносителю на устойчивость последовательности к действию высокоэффективной эндонуклеазы ДНКазы I. Проводили инкубацию фермента с комплексом НЧ-ОН (рассматривали СаНЧ с модельным олигонуклеотидом – G3) и дальнейший анализ продуктов ферментативной реакции методом гель-электрофореза (рисунке 4.39).

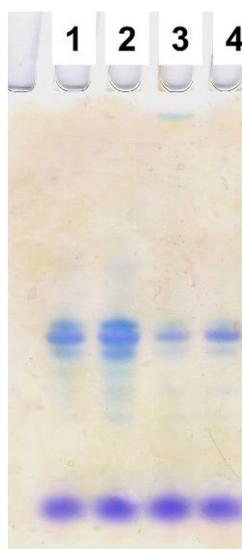


Рисунок 4.39 – Фотография геле-электрофореза исходного ОН (1), а также продуктов ферментативной реакции ДНКазы I с индивидуальным ОН (2), комплексом СаНЧ-ОН, полученным синтетическим (3) и постсинтетическим (4) подходами

На рисунке 4.39 приведён скан геле-электрофореза с продуктами ферментативной реакции комплекса СаНЧ-ОН и ДНКазы I (дорожки 3 – 4) в сравнении с контрольными индивидуальными ОН без обработки (дорожка 1) и обработанным нуклеазой (дорожка 2). Несмотря на то, что используемый ОН (g3-Cy5: Cy5-T*C*G*CCCTTGCTCAC*C*A*T*) имеет фосфорилгуанидиновые модификации по краям, он подвергается ферментативному гидролизу. Видно, что для двух вариантов комплексов, полученных как синтетическим, так и постсинтетическим вариантами, наблюдается уменьшение степени деградации исходного продукта, однако, нельзя говорить о полноценной стабильности олигонуклеотида, необходима дополнительная стабилизация НК к действию нуклеаз.

Распространённым способом уменьшения восприимчивости НК к ферментам является введение химических модификаций в нуклеотидной последовательности тНК, приводящих к сохранению как терапевтических свойств, так и устойчивости к воздействию гидролитических ферментов. Одним из вариантов таких модификаций НК является введение N,N,N',N'-замещенного гуанидинового фрагмента (в частности, 1,3-диметил-2-имидазолидинон-2 имин) по межнуклеотидному атому фосфора замещением кислорода [387]. Преимущество данного подхода заключается в том, что модификация может быть введена в желаемое положение олигонуклеотида во время автоматического синтеза с использованием стандартного фосфорамидитного протокола [388, 389]. После модификации, фосфодиэфирная группа обладает электронейтральным зарядом и может сочетаться с различными функционализированными группами в НК, например в остатке сахара с 2'-О-метилрибонуклеотидом, 2'-F-

фторрибонуклеотидом, замкнутыми олигонуклеотидами LNA (locked nucleic acids), фосфотиоатными и др.

Ранее была показана увеличенная устойчивость ФГО к действию нуклеаз при инкубации в сыворотке (DMEM с добавлением 50% FBS). Продемонстрировано, что введение ФГ-модификации на все нуклеотиды 17-звенного ОН способствует увеличению нуклеазной устойчивости до 21 дня (немодифицированный вариант гидролизует менее, чем за 10 мин) [390]. Кроме того, было показано, что введение по два ФГ-звена на концы олигонуклеотида, также повышает его стабильность к воздействию 3' или 5'-специфичных экзонуклеаз. Однако, тотальная модификация всех межнуклеотидных фосфатов олигонуклеотида приводит к существенному изменению их физико-химических свойств олигонуклеотидов, в частности к значительному повышению гидрофобности, что может препятствовать проникновению ФГО в клетку и реализации терапевтического эффекта. А только концевые модификации, вероятно, не способны предотвратить гидролиз олигонуклеотидов под действием эндонуклеаз.

В данной части работы исследовали влияние введения множественных модификаций, их количества и положения на повышение стабильности олигонуклеотидов к воздействию эндонуклеаз: ДНКазы I, Нуклеазы S1 (S1) (таблица 4.15).

Таблица 4.15. Активность и функции эндонуклеаз

Нуклеаза	Активность	Применение	Функции <i>in vivo</i>
ДНКазы I	Эндонуклеаза гидролизует оц- или дц-ДНК с образованием 3'-ОН и 5'-Р.	Удаления ДНК из белковых препаратов; ник-трансляции ДНК и создание случайных фрагментов, например, для дидезокси-секвенирования.	Удаление чужеродной ДНК, в том числе в процессе апоптоза; регуляция синтеза и распада нуклеиновых кислот в клетках
S1	Эндонуклеаза гидролизует оц- или дц- ДНК или РНК.	Удаление одноцепочечных выступов фрагментов ДНК; расщепление шпилек; создание однонаправленных делеций в фрагментах ДНК в сочетании с Exonuclease III.	

В работе была выбрана модель: 30-звенная нативная последовательность (M) и комплементарный к ней олигонуклеотид (G), содержащий модификации. В таблице 4.16 представлены использованные последовательности ОН и места введения ФГ (* – позиция введения фосфорилгуанидиновой модификации). Олигонуклеотиды для исследования любезно предоставлены сотрудниками ЛБМХ ИХБФМ СО РАН Бушуевой Т.Ю. и к.х.н. Дюдеевой Е.С.

Таблица 4.16. Используемые в работе олигонуклеотиды

Шифр	Последовательность
М	5'-CTG-TTG-TTT-AGC-TAC-GTC-CAG-GAG-CGC-ACC-3'
G ₀	5'-GGT-GCG-CTC-CTG-GAC-GTA-GC-3'
G _{1,2}	5'-GGT-GCG-CTC-CTG-GAC-GTA-G*C*-3'
G ₃	5'-GGT-GCG-CTC-CTG-GAC-GTA*-GC-3'
G ₈	5'-GGT-GCG-CTC-CTG-G*AC-GTA-GC-3'
G _{8,9}	5'-GGT-GCG-CTC-CTG*-G*AC-GTA-GC-3'
Gh ₂₋₁	5'-G*GT*-GC*G-C*TC*-CT*G-GAC-GTA-GC-3'
Gh	5'-G*G*T*-G*C*G*-C*T*C*-C*T*G-GAC-GTA-GC-3'
Ghf	5'-G*GT*-GC*G-C*TC*-CT*G-G*AC*-GT*A-G*C-3'
G _{2/1}	5'-G*GT-G*CG-C*TC-C*TG-G*AC-G*TA-G*C-3'
G _{3/1}	5'-G*GT-GC*G-CTC*-CTG-G*AC-GT*A-GC-3'
G _{4/1}	5'-G*GT-GCC*-CTC-CT*G-GAC-G*TA-GC-3'
G _{5/1}	5'-G*GT-GCG-C*TC-CTG-G*AC-GTA-G*C-3'
G _{8/1}	5'-G*GT-GCG-CTC-C*TG-GAC-GTA-G*C-3'

Схема эксперимента, направленного на изучение восприимчивости ОН к действию нуклеаз, состояла из двух этапов: инкубации ОН с ферментами в стандартных условиях и анализ продуктов реакции методом денатурирующего гель-электрофореза в 20% полиакриламидном геле. На рисунке 4.40 представлены результаты исследования стабильности олигонуклеотидов под действием эндонуклеазы ДНКазы I.

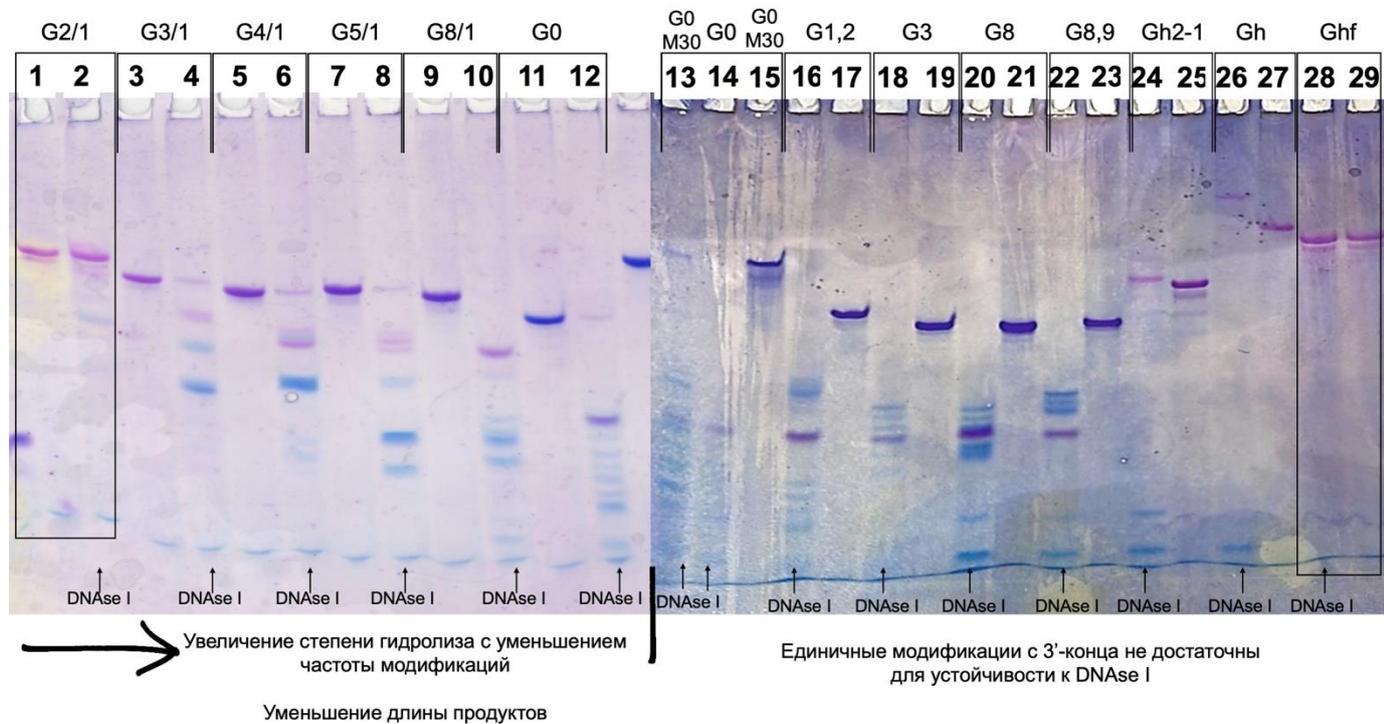


Рисунок 4.40 – Фотография гель-электрофореза нативного G₀ (№ 11) и его комплекса с матрицей M30 (№ 15), а также их ФГО-аналогов до и после (G₀ № 12, 14; G₀/M30 – 13) обработки ДНКазы I

ДНКаза I – нуклеаза, расщепляющая фосфодиэфирные связи в НК вблизи пиримидиновых нуклеотидов, образуя при этом полинуклеотиды с концевым-5'-фосфатом и свободной гидроксильной группой на 3'-конце. Обычно расщепление идет до тетра-нуклеотидов.

Видно, что нативная последовательность, в отсутствие модификации (рисунок 4.40. №12), расщепляется ДНКазой I на короткие продукты различной длины со следовыми сохранениями исходного продукта. При этом, образование дуплекса с комплементарной матрицей (рисунок 4.40. №13) не способствует защите от ферментативной активности ДНКазы I. В случае введения фосфорилгуанидиновой группы (ФГГ) через три нуклеотида (G3/1, рисунок 4.40 № 4), при обработке ДНКазой I образуется дискретный набор продуктов гидролиза с сохранением исходного олигонуклеотида. Можно предположить, что гидролиз проходит по нативному участку между двумя соседними модифицированными звеньями. Также видна тенденция, что, чем реже расположены ФГГ, тем меньше остаётся исходного продукта после взаимодействия ФГО с ДНКазой I. При введении ФГГ через два нуклеотида (G2/1, рисунок 4.40 № 2), исходный продукт остаётся практически неизменным после обработки ДНКазой I, так же, как и в случае введения ФГГ через один нуклеотид (Ghf, рисунок 4.40 № 28).

Ожидаемо, в случае точечного введения ФГГ (ФГГ встречаются в 1-2 позициях, а не закономерно по последовательности), наличие модификации не препятствует фрагментации ФГО, вне зависимости от позиции ФГГ.

Таким образом, в исследованном ряду только Ghf (позиция введения фосфорилгуанидиновой модификации через один нуклеотид) и G2/1 (позиция введения фосфорилгуанидиновой модификации через два нуклеотида) абсолютно стабильны к воздействию фермента, в случае G3/1, G4/1, G5/1 и Gh2-1 наблюдается частичная деградация.

S1 – специфическая эндонуклеаза, расщепляющая одноцепочечную ДНК (оцДНК) и РНК на олиго- или мононуклеотиды. Активность S1 также была исследована на выбранных ФГО (рисунок 4.41).

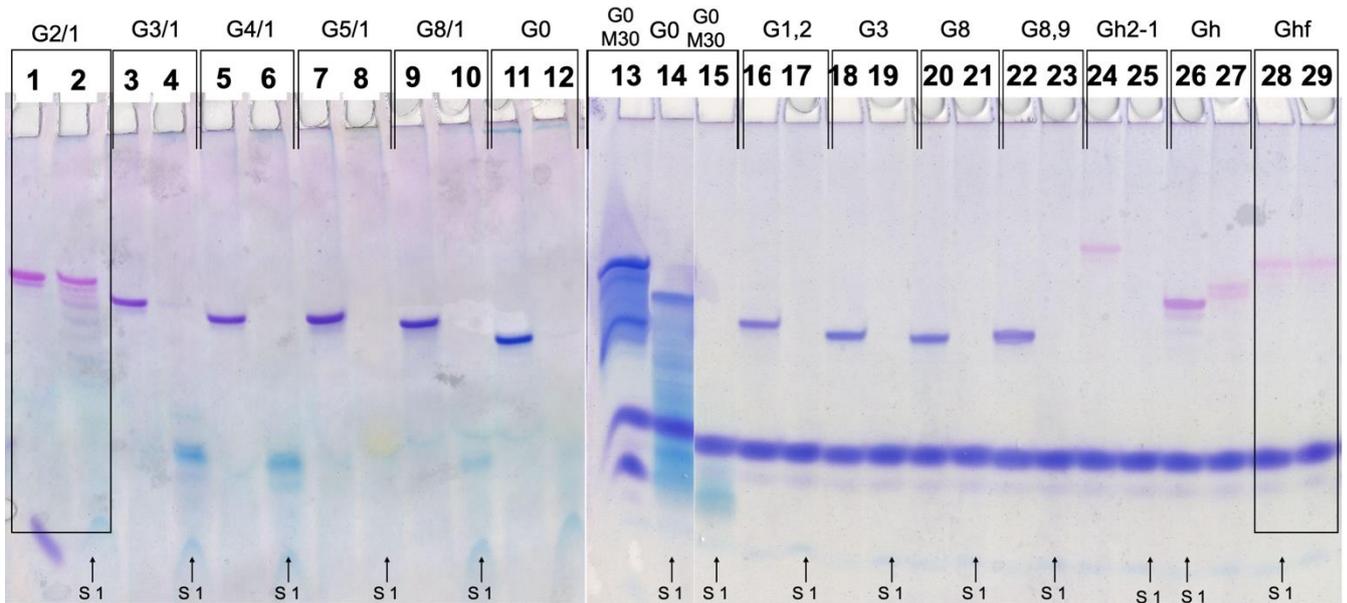


Рисунок 4.41 – Фотография гель-электрофореза нативного G0 (№ 11) и его комплекса с матрицей M30 (№ 15), а также их ФГО-аналогов до и после (G0 № 12, 14; G0/M30 – 13) обработки нуклеазой S1

В этом случае, как нативная последовательность (G0, рисунок 4.41 № 12), так и ФГО, содержащие единичные модификации (G1,2, G3, G8 G8,9, Gh2-1, рисунок 4.41 № 17, 19, 21, 23, 25), а также ФГГ через 5 / 8 нуклеотидов по всей длине НК (G5/1 и G8/1, рисунок 4.41 № 8, 10), при обработке S1 полностью гидролизуются на короткие фрагменты, о чём свидетельствует отсутствие окрашенных бендов. Для ФГО, содержащих ФГГ через 3 / 4 нуклеотида (G3/1 и G4/1) (рисунок 4.41 № 4, 6), наблюдается полный гидролиз исходной последовательности с образованием укороченных продуктов, детектируемых в геле. Важно отметить, что, так же, как и в случае с устойчивостью к активности ДНКазы I, при обработке S1, G2/1 (позиция введения фосфорилгуанидиновой модификации через два нуклеотида) устойчив к действию фермента, однако с малой степенью гидролиза исходного ФГО. Полностью стабильным к действию, как ДНКазы I, так и S1 ДНКазы оказался только ФГО с модификациями через один межнуклеотидный фосфат по всей последовательности.

Таким образом, полученные результаты были обобщены (рисунок 4.42) и представлены в графическом виде: «ярко-зелёное окрашивание ячейки» – олигонуклеотид устойчив к действию фермента, «белое окрашивание ячейки» – олигонуклеотид подвержен активности фермента, интенсивность цвета зависит от степени стабильности ОН.

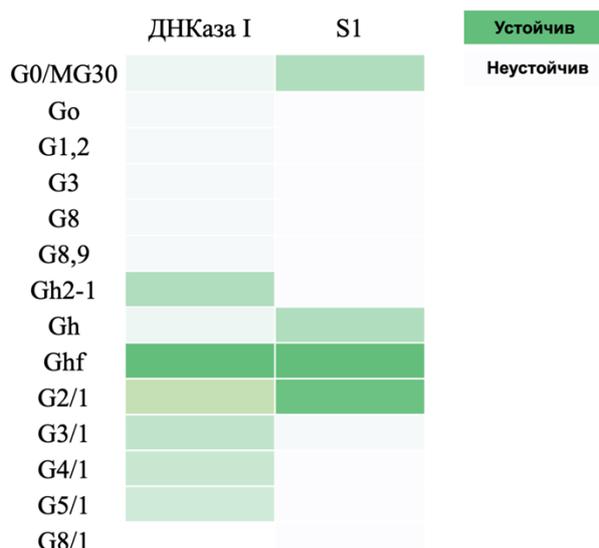


Рисунок 4.42 – Восприимчивость нативного G0 и его комплекса с матрицей M30, а также их ФГ-аналогов к ферментам ДНКазы I и S1

Таким образом, полученные результаты по стабильности модифицированных олигонуклеотидов и нативных, в составе ассоциатов с наноматериалами, перспективны для преодоления ограничений применения генной терапии. В случае применения синергетического подхода использования наноносителей совместно с модификацией нативной последовательности ФГГ, может быть выбрана оптимальная стратегия сохранности тНК без снижения функциональности, как в случае полностью модифицированных ФГО.

4.5 Заключение

Таким образом, в ходе данной работы разработаны методы получения наноматериалов на основе карбоната кальция, обладающих уникальными свойствами: суспензионной стабильностью частиц и их магнитных аналогов размером до 200 нм. Предложены пути присоединения биологически активных веществ на поверхность наноносителей за счёт ковалентных и нековалентных взаимодействий. Показана оправданность дальнейших биологических испытаний терапевтического потенциала конструкций наноматериалов, несущих лекарственные препараты и/или терапевтические олигонуклеотиды.

Решение актуальных задач в области создания транспортных систем нуклеиновых кислот позволит получить новые фундаментальные знания о механизмах формирования биodeградируемых неорганических наноматериалов, их свойствах, свойствах нуклеиновых кислот на поверхности таких композитов, что позволит расширить область их применения для решения важнейших задач биомедицины. Разработка подходов по созданию нанокompозитов с функционализированной поверхностью, исследование их взаимодействия с НК, получение экспериментальных данных о синтезе и их устойчивости в водно-солевых системах и биологических жидкостях, являются необходимым этапом для разработки новых систем для доставки терапевтических НК и их реализации. Полученные результаты позволят разработать алгоритмы направленного конструирования гетерофазных наносистем для доставки нуклеиновых кислот и малых лекарственных молекул, позволяющих решать сложные наукоёмкие прикладные задачи в области направленного воздействия и генной терапии.

5. ВЫВОДЫ

1. Предложен новый подход синтеза суспензии монодисперсных частиц на основе карбоната кальция и диоксида кремния, в том числе обладающих магнитными свойствами, размером до 200 нм.

2. Продемонстрирована высокая стабильность полученных наночастиц при хранении в суспензионном виде и инкубации в биологических жидкостях, а также деградация наночастиц карбоната кальция при понижении pH растворителя:

- показано сохранение суспензионной стабильности для наноматериалов карбоната кальция и их гибрида со смешанным оксидом железа, а также наночастиц диоксида кремния при хранении в дистиллированной воде не менее 6 месяцев;
- показано изменение гидродинамических размеров всех наноматериалов не более, чем на 10 % от исходных спустя 7 дней инкубации в фосфатно-солевом буфере, клеточной среде и фетальной бычьей сыворотке;
- показан pH-зависимый профиль деградации матрицы наночастиц карбоната кальция при pH ниже 6,0.

3. Предложены варианты присоединения функциональных молекул к наночастицам карбоната кальция и диоксида кремния за счёт формирования ковалентных и нековалентных взаимодействий с поверхностью наноматериалов:

- получены многофункциональные композиты с развитой трёхмерной поверхностью на основе наночастиц диоксида кремния и карбоната кальция с ковалентно-присоединённым полимером – нейлоном-6 / стрептавидином / олигокулеотидом;
- получены нековалентные ассоциаты наночастиц с доксорубицином, характеризующиеся высокими ёмкостными показателями, превосходящими опубликованные на сегодняшний день аналоги, а также pH-зависимым профилем высвобождения препарата, эффективность которого зависит от pH раствора и типа частиц (в частности, для наночастиц карбоната кальция достигается 100 % высвобождение лекарства при pH ниже 4);
- получены нековалентные ассоциаты НЧ с олигонуклеотидами с высокой ёмкостью по олигонуклеотиду для всех типов наночастиц.

4. Предложен новый паттерн применения ассоциатов НЧ с олигонуклеотидами, совместно с введением фосфорилгуанидиновой группы через пять нуклеотидов и чаще, и проверена эффективность предложенной модификации в увеличении устойчивости олигонуклеотидов к воздействию эндонуклеаз.

5. Проведен анализ нековалентных ассоциатов наночастиц на клеточных линиях:

- для всех типов нанокомпозитов с доксорубицином продемонстрирована эффективность в подавлении клеточной активности, сопоставимая или выше в сравнении с индивидуальным препаратом;
- для нанокомпозитов на основе карбоната кальция и диоксида кремния с олигонуклеотидом продемонстрированы эффективность клеточного проникновения и ингибирование экспрессии белка.

6. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CaCO₃ – карбонат кальция

CaP – наночастицы фосфата кальция

CaНЧ – наночастицы карбоната кальция

d – гидродинамический размер частиц, определенный методом динамического светорассеяния

D – диаметр частиц, определенный методом просвечивающей электронной микроскопии

DOX – доксорубицин

E_{f_{rel}} – эффективность извлечения

Fe@CaНЧ – гибридные наночастицы смешанного оксида железа и карбоната кальция

IC 50 – показатель концентрации полумаксимального ингибирования клеточной активности

SiO₂ – диоксид кремния

SiНЧ – наночастицы диоксида кремния

St – стрептавидин

ζ – Дзета-потенциал

B7 – биотин

БАС – биологически активные соединения

БСА – бычий сывороточный альбумин

DMEM – Модифицированная среда по методу Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

ДСР – динамическое светорассеяние

ИПД – индекс полидисперсности

МНЧ – магнитные наночастицы

НК – нуклеиновые кислоты

НЧ – наночастицы

ОН – олигонуклеотид

ПАВ – поверхностно-активные вещества

ПВП – поливинилпирролидон

ОН-В₇ – олигонуклеотид, содержащий биотин

MPP – коммерческий препарат Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles

E – Ёмкость

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Huang Y. et al. Repurposing ferumoxytol: Diagnostic and therapeutic applications of an FDA-approved nanoparticle //Theranostics. – 2022. – Т. 12. – №. 2. – С. 796.
- 2 Al Mahmud M. Z. et al. Advances and Significances of Nanoparticles as Concrete Additives: A Comprehensive Review //Nano LIFE. – 2024. – Т. 14. – №. 04. – С. 2440004.
- 3 Zhang R. et al. How to design nanoporous silica nanoparticles in regulating drug delivery: Surface modification and porous control //Materials Science and Engineering: B. – 2021. – Т. 263. – С. 114835.
- 4 Fu J., Leo C. P., Show P. L. Recent advances in the synthesis and applications of pH-responsive CaCO₃ //Biochemical Engineering Journal. – 2022. – Т. 187. – С. 108446.
- 5 Yang X. et al. CaCO₃ nanoplatform for cancer treatment: drug delivery and combination therapy //Nanoscale. – 2024.
- 6 Wang S. et al. Nanoparticle-based medicines in clinical cancer therapy //Nano Today. – 2022. – Т. 45. – С. 101512.
- 7 ГОСТ ISO/TS 27687-2014 «Термины и определения нанообъектов. Наночастица, нановолокно и нанопластина»
- 8 Campora S., Ghersi G. Recent developments and applications of smart nanoparticles in biomedicine //Nanotechnology Reviews. – 2022. – Т. 11. – №. 1. – С. 2595-2631.
- 9 Starsich F. H. L., Herrmann I. K., Pratsinis S. E. Nanoparticles for biomedicine: coagulation during synthesis and applications //Annual review of chemical and biomolecular engineering. – 2019. – Т. 10. – С. 155-174.
- 10 Sanchis-Gual R. et al. Hybrid nanostructures based on gold nanoparticles and functional coordination polymers: Chemistry, physics and applications in biomedicine, catalysis and magnetism //Coordination Chemistry Reviews. – 2023. – Т. 480. – С. 215025.
- 11 Karaz S., Senses E. Liposomes Under Shear: Structure, Dynamics, and Drug Delivery Applications //Advanced NanoBiomed Research. – 2023. – С. 2200101.
- 12 Gao Y. et al. Recent Advance of Liposome Nanoparticles for Nucleic Acid Therapy //Pharmaceutics. – 2023. – Т. 15. – №. 1. – С. 178.
- 13 Mittal A., Roy I., Gandhi S. Magnetic nanoparticles: An overview for biomedical applications //Magnetochemistry. – 2022. – Т. 8. – №. 9. – С. 107.
- 14 Caraway C. A. et al. Polymeric nanoparticles in brain cancer therapy: A review of current approaches //Polymers. – 2022. – Т. 14. – №. 14. – С. 2963.

- 15 Zenze M., Daniels A., Singh M. Dendrimers as Modifiers of Inorganic Nanoparticles for Therapeutic Delivery in Cancer //Pharmaceutics. – 2023. – T. 15. – №. 2. – C. 398.
- 16 Ye L. et al. Noble metal-based nanomaterials as antibacterial agents //Journal of Alloys and Compounds. – 2022. – T. 904. – C. 164091.
- 17 Zhao P. et al. Recent advances of calcium carbonate nanoparticles for biomedical applications //Bioengineering. – 2022. – T. 9. – №. 11. – C. 691.
- 18 Huang Y. et al. Silica nanoparticles: Biomedical applications and toxicity //Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2022. – T. 151. – C. 113053.
- 19 Liu W., Speranza G. Functionalization of carbon nanomaterials for biomedical applications //C. – 2019. – T. 5. – №. 4. – C. 72.
- 20 Thi T. T. H. et al. Lipid-based nanoparticles in the clinic and clinical trials: from cancer nanomedicine to COVID-19 vaccines //Vaccines. – 2021. – T. 9. – №. 4. – C. 359.
- 21 Yan L. et al. Nanoparticle-based drug delivery system: a patient-friendly chemotherapy for oncology //Dose-Response. – 2020. – T. 18. – №. 3. – C. 1559325820936161.
- 22 Anselmo A. C., Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic //Bioengineering & translational medicine. – 2016. – T. 1. – №. 1. – C. 10-29.
- 23 Kashapov R. et al. Nanocarriers for biomedicine: From lipid formulations to inorganic and hybrid nanoparticles //International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – T. 22. – №. 13. – C. 7055.
- 24 Diez-Pascual A. M., Rahdar A. Functional Nanomaterials in Biomedicine: Current Uses and Potential Applications //ChemMedChem. – 2022. – T. 17. – №. 16. – C. e202200142.
- 25 Zhang Y. et al. Preparation and usage of nanomaterials in biomedicine //Biotechnology and Bioengineering.
- 26 Lin Q. I. U. et al. Application of calcium carbonate based nano drug delivery system in cancer therapy //Journal of Changzhou University (Natural Science Edition)/Changzhou Daxue Xuebao (Ziran Kexue Ban). – 2023. – T. 35. – №. 1.
- 27 Trushina D. B. et al. Calcium carbonate vaterite particles for drug delivery: Advances and challenges //Materials Today Advances. – 2022. – T. 14. – C. 100214.
- 28 Zhao Y. et al. A preloaded amorphous calcium carbonate/doxorubicin@ silica nanoreactor for pH-responsive delivery of an anticancer drug //Angewandte Chemie International Edition. – 2015. – T. 54. – №. 3. – C. 919-922.
- 29 Nunes D., Loureiro J. A., Pereira M. C. Drug Delivery Systems as a Strategy to Improve the Efficacy of FDA-Approved Alzheimer's Drugs //Pharmaceutics. – 2022. – T. 14. – №. 11. – C. 2296.

- 30 Liu P., Chen G., Zhang J. A review of liposomes as a drug delivery system: current status of approved products, regulatory environments, and future perspectives //Molecules. – 2022. – T. 27. – №. 4. – C. 1372.
- 31 Zhang C. et al. Modification of lipid-based nanoparticles: An efficient delivery system for nucleic acid-based immunotherapy //Molecules. – 2022. – T. 27. – №. 6. – C. 1943.
- 32 Li Z. et al. Biosafety assessment of delivery systems for clinical nucleic acid therapeutics //Biosafety and Health. – 2022. – T. 4. – №. 2. – C. 105-117.
- 33 Fadia P. et al. Calcium carbonate nano-and microparticles: synthesis methods and biological applications //3 Biotech. – 2021. – T. 11. – C. 1-30.
- 34 Chacon W. D. C. et al. The mechanism, biopolymers and active compounds for the production of nanoparticles by anti-solvent precipitation: a review //Food Research International. – 2023. – C. 112728.
- 35 Namsaraev Z. B. et al. Processes of Nanosized Calcium Carbonate Formation by Microorganisms //Nanotechnologies in Russia. – 2020. – T. 15. – C. 20-27.
- 36 Zafar B. et al. Modification of surfaces with vaterite CaCO₃ particles //Micromachines. – 2022. – T. 13. – №. 3. – C. 473.
- 37 Svenskaya Y. I. et al. Key parameters for size-and shape-controlled synthesis of vaterite particles //Crystal Growth & Design. – 2018. – T. 18. – №. 1. – C. 331-337.
- 38 Trushina D. B. et al. CaCO₃ vaterite microparticles for biomedical and personal care applications //Materials Science and Engineering: C. – 2014. – T. 45. – C. 644-658.
- 39 Sudarsanam P., Reddy B. M. Production Techniques of Nanoparticles on a Laboratory Scale. – 2013.
- 40 Bastos F. R. et al. Layer-by-layer coated calcium carbonate nanoparticles for targeting breast cancer cells //Biomaterials Advances. – 2023. – T. 153. – C. 213563.
- 41 Volodkin D. V. et al. Matrix polyelectrolyte microcapsules: new system for macromolecule encapsulation //Langmuir. – 2004. – T. 20. – №. 8. – C. 3398-3406.
- 42 Babou-Kammoe R. et al. Synthesis of CaCO₃ nanoparticles by controlled precipitation of saturated carbonate and calcium nitrate aqueous solutions //The Canadian journal of chemical engineering. – 2012. – T. 90. – №. 1. – C. 26-33.
- 43 Cheng J. et al. Tetrahedral DNA-mediated biomineralization of calcium carbonate nanoparticles for pH-responsive drug delivery //Journal of Nanoparticle Research. – 2023. – T. 25. – №. 10. – C. 211.
- 44 Elbaz N. M. et al. Controlled synthesis of calcium carbonate nanoparticles and stimuli-responsive multi-layered nanocapsules for oral drug delivery //International Journal of Pharmaceutics. – 2020. – T. 574. – C. 118866.

- 45 Boyjoo Y., Pareek V. K., Liu J. Synthesis of micro and nano-sized calcium carbonate particles and their applications //Journal of Materials Chemistry A. – 2014. – T. 2. – №. 35. – C. 14270-14288.
- 46 Mydin R. B. S. M. N. et al. Potential of Calcium Carbonate Nanoparticles for Therapeutic Applications //Malaysian Journal of Medicine & Health Sciences. – 2018. – T. 14.
- 47 Ghaedamini H., Amiri M. C. Effects of temperature and surfactant concentration on the structure and morphology of calcium carbonate nanoparticles synthesized in a colloidal gas aphrons system //Journal of Molecular Liquids. – 2019. – T. 282. – C. 213-220.
- 48 Zheng T. et al. Preparation and formation mechanism of calcium carbonate hollow microspheres //Journal of Crystal Growth. – 2020. – T. 549. – C. 125870.
- 49 Liendo F. et al. Factors controlling and influencing polymorphism, morphology and size of calcium carbonate synthesized through the carbonation route: A review //Powder Technology. – 2022. – T. 398. – C. 117050.
- 50 Popova V. et al. Designing pH-dependent systems based on nanoscale calcium carbonate for the delivery of an antitumor drug //Nanomaterials. – 2021. – T. 11. – №. 11. – C. 2794.
- 51 Shafiu Kamba, A., Ismail, M., Ibrahim, T., Azmi, T., Zakaria, Z.A.B. A pH-sensitive, biobased calcium carbonate aragonite nanocrystal as a novel anticancer delivery system // BioMed Res. Int.– 2013. – V. 2013. – 587451
- 52 Mailafiya M. M. et al. Evaluation of in-vitro release kinetic and mechanisms of curcumin loaded-cockle shell-derived calcium carbonate nanoparticles. – 2019.
- 53 Amerhaider Nuar N. N. et al. Synthesis of Controlled-Release Calcium Peroxide Nanoparticles Coated with Dextran for Removal of Doxycycline from Aqueous System //Polymers. – 2022. – T. 14. – №. 18. – C. 3866. Amerhaider Nuar N. N. et al. Synthesis of Controlled-Release Calcium Peroxide Nanoparticles Coated with Dextran for Removal of Doxycycline from Aqueous System //Polymers. – 2022. – T. 14. – №. 18. – C. 3866.
- 54 Arpornmaeklong P. et al. Effects of Calcium Carbonate Microcapsules and Nanohydroxyapatite on Properties of Thermosensitive Chitosan/Collagen Hydrogels //Polymers. – 2023. – T. 15. – №. 2. – C. 416.
- 55 Akram S. et al. Stabilization of zirconia nanoparticles by collagen protein and calcium carbonate extracted from eggshell and its biodegradation, radical scavenging and mineralization activity //Arabian Journal of Chemistry. – 2023. – T. 16. – №. 10. – C. 105135.
- 56 Roth R. et al. Functionalized calcium carbonate microparticles for the delivery of proteins //European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2018. – T. 122. – C. 96-103.

- 57 Sudareva N. et al. Doxorubicin delivery systems based on doped CaCO₃ cores and polyanion drug conjugates //Journal of Microencapsulation. – 2021. – T. 38. – №. 3. – C. 164-176.
- 58 Balabushevich N. G. et al. Hybrid CaCO₃-mucin crystals: Effective approach for loading and controlled release of cationic drugs //Materials & Design. – 2019. – T. 182. – C. 108020.
- 59 Xing J. et al. Synthesis of polymer assembled mesoporous CaCO₃ nanoparticles for molecular targeting and pH-responsive controlled drug release //Advances in polymer technology. – 2020. – T. 2020.
- 60 Das A. et al. Synthesis of porous calcium-guar gum benzoate nano-biohybrids for sorptive removal of congo red and phosphates from water //International Journal of Biological Macromolecules. – 2023. – T. 253. – C. 126662.
- 61 Wang P. et al. Fucoidan-Mediated Anisotropic Calcium Carbonate Nanorods of pH-Responsive Drug Release for Antitumor Therapy //Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2022. – T. 10. – C. 845821.
- 62 Munyemana J. C. et al. Recombinant Collagen-Templated Biomineralized Synthesis of Biocompatible pH-Responsive Porous Calcium Carbonate Nanospheres //ACS omega. – 2023. – T. 8. – №. 34. – C. 30879-30887.
- 63 Yakubova A. A. et al. Calcium carbonate nanoparticles tumor delivery for combined chemophotodynamic therapy: Comparison of local and systemic administration //Journal of Controlled Release. – 2023. – T. 359. – C. 400-414.
- 64 Ghadiri Soltan Meydan T. et al. Green synthesis of CaCO₃ nanoparticles for photocatalysis and cytotoxicity //Bioprocess and Biosystems Engineering. – 2023. – T. 46. – №. 5. – C. 727-734.
- 65 Minkowicz L. et al. Controlling calcium carbonate particle morphology, size, and molecular order using silicate //Materials. – 2021. – T. 14. – №. 13. – C. 3525.
- 66 Persano F. et al. Monodisperse and nanometric-sized calcium carbonate particles synthesis optimization //Nanomaterials. – 2022. – T. 12. – №. 9. – C. 1494.
- 67 Huang H. et al. Smart responsive-calcium carbonate nanoparticles for dual-model cancer imaging and treatment //Ultrasonics. – 2020. – T. 108. – C. 106198.
- 68 Chang Y. et al. Cell-tailored calcium carbonate particles with different crystal forms from nanoparticle to nano/microsphere //RSC advances. – 2020. – T. 10. – №. 70. – C. 43233-43241.
- 69 Khatami M. et al. Calcium carbonate nanowires: greener biosynthesis and their leishmanicidal activity //RSC advances. – 2020. – T. 10. – №. 62. – C. 38063-38068.
- 70 An S. Y. et al. Supplement of nitric oxide through calcium carbonate-based nanoparticles contributes osteogenic differentiation of mouse embryonic stem cells //Tissue and Cell. – 2020. – T. 66. – C. 101390.

- 71 Ferrari P. F. et al. Dextran/poly-L-arginine multi-layered CaCO₃-based nanosystem for vascular drug delivery //International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – T. 177. – C. 548-558.
- 72 Xu X. et al. Intra-gastric amorphous calcium carbonate consumption triggered generation of in situ hydrogel piece for sustained drug release //International Journal of Pharmaceutics. – 2020. – T. 590. – C. 119880.
- 73 Kiranda H. K. et al. Fabrication, characterization and cytotoxicity of spherical-shaped conjugated gold-cockle shell derived calcium carbonate nanoparticles for biomedical applications //Nanoscale research letters. – 2018. – T. 13. – C. 1-10.
- 74 Wang C. et al. Size-controlled preparation and behavior study of phospholipid–calcium carbonate hybrid nanoparticles //International Journal of Nanomedicine. – 2020. – C. 4049-4062.
- 75 Rautaray D., Ahmad A., Sastry M. Biosynthesis of CaCO₃ crystals of complex morphology using a fungus and an actinomycete //Journal of the American Chemical Society. – 2003. – T. 125. – №. 48. – C. 14656-14657.
- 76 Sun R. et al. Highly porous amorphous calcium phosphate for drug delivery and bio-medical applications //Nanomaterials. – 2019. – T. 10. – №. 1. – C. 20.
- 77 Lam S. F. et al. Calcium carbonate nanoparticles stimulate cancer cell reprogramming to suppress tumor growth and invasion in an organ-on-a-chip system //Scientific reports. – 2021. – T. 11. – №. 1. – C. 9246.
- 78 Moulay I., Park J., Yoo Y. Synthesis of nano-sized calcium carbonates employing molecular effect on CO₂ conversion via biodegradable chelating-system //Chemical Engineering Journal. – 2023. – T. 474. – C. 145281.
- 79 Li Y. et al. CaCO₃ nanoparticles incorporated with KAE to enable amplified calcium overload cancer therapy //Biomaterials. – 2021. – T. 277. – C. 121080.
- 80 Wang C. et al. Mitoxantrone-preloaded water-responsive phospholipid-amorphous calcium carbonate hybrid nanoparticles for targeted and effective cancer therapy //International Journal of Nanomedicine. – 2019. – C. 1503-1517.
- 81 Wang J. et al. Calcium supplement by tetracycline guided amorphous calcium carbonate potentiates osteoblast promotion for synergetic osteoporosis therapy //Theranostics. – 2020. – T. 10. – №. 19. – C. 8591.
- 82 Wang C. et al. Correction: Facile preparation of phospholipid–amorphous calcium carbonate hybrid nanoparticles: toward controllable burst drug release and enhanced tumor penetration //Chemical Communications. – 2020. – T. 56. – №. 73. – C. 10768-10769.

- 83 Jalali-Jivan M., Garavand F., Jafari S. M. Microemulsions as nano-reactors for the solubilization, separation, purification and encapsulation of bioactive compounds //Advances in colloid and interface science. – 2020. – T. 283. – C. 102227.
- 84 Misra N. et al. Photochromism and magneto-optic response of ZnO: Mn semiconductor quantum dots fabricated by microemulsion route //Central European Journal of Physics. – 2008. – T. 6. – C. 109-115.
- 85 Ohshima H., Makino K. (ed.). Colloid and interface science in pharmaceutical research and development. – Elsevier, 2014.
- 86 Ferreira A. M., Vikulina A. S., Volodkin D. CaCO₃ crystals as versatile carriers for controlled delivery of antimicrobials //Journal of Controlled Release. – 2020. – T. 328. – C. 470-489.
- 87 Wang Y. et al. Superhydrophobic fluorescent micro-/nano-composites from carbon dots encapsulated in CaCO₃-SiO₂ //Composite Interfaces. – 2023. – C. 1-15.
- 88 Zhao Q. et al. Target reprogramming lysosomes of CD8⁺ T cells by a mineralized metal–organic framework for cancer immunotherapy //Advanced materials. – 2021. – T. 33. – №. 17. – C. 2100616.
- 89 Li H. et al. CaCO₃ nanoparticles pH-sensitively induce blood coagulation as a potential strategy for starving tumor therapy //Journal of Materials Chemistry B. – 2020. – T. 8. – №. 6. – C. 1223-1234.
- 90 Sun N. et al. pH-dependent and cathepsin B activable CaCO₃ nanoprobe for targeted in vivo tumor imaging //International Journal of Nanomedicine. – 2019. – C. 4309-4317.
- 91 Zhao P. et al. Biomimetic calcium carbonate nanoparticles delivered IL-12 mRNA for targeted glioblastoma sono-immunotherapy by ultrasound-induced necroptosis //Journal of Nanobiotechnology. – 2022. – T. 20. – №. 1. – C. 1-10.
- 92 Peng J. Q. et al. Targeted co-delivery of protein and drug to a tumor in vivo by sophisticated RGD-modified lipid-calcium carbonate nanoparticles //Journal of Controlled Release. – 2019. – T. 302. – C. 42-53.
- 93 Khan M. W. et al. Synergism of cisplatin-oleanolic acid co-loaded calcium carbonate nanoparticles on hepatocellular carcinoma cells for enhanced apoptosis and reduced hepatotoxicity //International Journal of Nanomedicine. – 2019. – C. 3753-3771.
- 94 Wang Y. et al. Construction of calcium carbonate-liposome dual-film coated mesoporous silica as a delayed drug release system for antitumor therapy //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2022. – T. 212. – C. 112357.
- 95 Wei K. et al. High density lipoprotein coated calcium carbonate nanoparticle for chemotherapy of breast cancer //Journal of Biomaterials Applications. – 2019. – T. 34. – №. 2. – C. 178-187.

- 96 Chatzidaki M. D., Papadimitriou V., Xenakis A. Encapsulation of food ingredients by microemulsions //Lipid-Based Nanostructures for Food Encapsulation Purposes. – Academic Press, 2019. – C. 129-149.
- 97 Azarian M. H., Sutapun W. Biogenic calcium carbonate derived from waste shells for advanced material applications: A review //Frontiers in Materials. – 2022. – T. 9. – C. 1024977.
- 98 Azarian, Mohammad Hossein, and Wimonlak Sutapun. Tuning polymorphs of precipitated calcium carbonate from discarded eggshells: effects of polyelectrolyte and salt concentration // RSC advances. – 2022. – T. 12. – №. 23. – C. 14729-14739.
- 99 Hamidu A. et al. Modified methods of nanoparticles synthesis in pH-sensitive nano-carriers production for doxorubicin delivery on MCF-7 breast cancer cell line //International Journal of Nanomedicine. – 2019. – C. 3615-3627.
- 100 Ahmed H. et al. LC-MS/MS proteomic study of MCF-7 cell treated with dox and dox-loaded calcium carbonate nanoparticles revealed changes in proteins related to glycolysis, actin signalling, and energy metabolism //Biology. – 2021. – T. 10. – №. 9. – C. 909.
- 101 Mahmood R. I. et al. An in vitro cytotoxicity of a novel pH-Sensitive lectin loaded-cockle shell-derived calcium carbonate nanoparticles against MCF-7 breast tumour cell //Journal of Drug Delivery Science and Technology. – 2021. – T. 61. – C. 102230.
- 102 Ibiyeye K. M., Zuki A. B. Z. Cockle shell-derived aragonite CaCO₃ nanoparticles for co-delivery of doxorubicin and thymoquinone eliminates cancer stem cells //International journal of molecular sciences. – 2020. – T. 21. – №. 5. – C. 1900.
- 103 Wenliang F. et al. In vivo evaluation of anticancer efficacy of drug loaded cockle shell-derived aragonite nanoparticles //Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. – 2019. – T. 107. – №. 6. – C. 1898-1907.
- 104 Hussein A. I. et al. Synthesis and characterization of spherical calcium carbonate nanoparticles derived from cockle shells //Applied Sciences. – 2020. – T. 10. – №. 20. – C. 7170.
- 105 Chemmalar S. et al. Synthesis and characterization of gefitinib and paclitaxel mono and dual drug-loaded blood cockle shells (Anadara granosa)-derived aragonite CaCO₃ nanoparticles //Nanomaterials. – 2021. – T. 11. – №. 8. – C. 1988.
- 106 Baláž, Matej, et al. State-of-the-art of eggshell waste in materials science: recent advances in catalysis, pharmaceutical applications, and mechanochemistry // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2021. – T.8. – C. 612567.

- 107 Drew G. H. The action of some denitrifying bacteria in tropical and temperate seas, and the bacterial precipitation of calcium carbonate in the sea //Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. – 1911. – T. 9. – №. 2. – C. 142-155.
- 108 Muhammad N. Z. et al. Tests and methods of evaluating the self-healing efficiency of concrete: A review //Construction and Building Materials. – 2016. – T. 112. – C. 1123-1132.
- 109 Enyedi N. T. et al. Cave bacteria-induced amorphous calcium carbonate formation //Scientific reports. – 2020. – T. 10. – №. 1. – C. 8696.
- 110 Febrida R. et al. Synthesis and characterization of porous CaCO_3 vaterite particles by simple solution method //Materials. – 2021. – T. 14. – №. 16. – C. 4425.
- 111 Liang T. et al. Research progress of calcium carbonate nanomaterials in cancer therapy: challenge and opportunity //Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2023. – T. 11.
- 112 Gindele M. B., Steingrube L. V., Gebauer D. Generality of liquid precursor phases in gas diffusion-based calcium carbonate synthesis //CrystEngComm. – 2021. – T. 23. – №. 45. – C. 7938-7943.
- 113 Tran P. et al. Overview of the manufacturing methods of solid dispersion technology for improving the solubility of poorly water-soluble drugs and application to anticancer drugs //Pharmaceutics. – 2019. – T. 11. – №. 3. – C. 132.
- 114 Wu J. The enhanced permeability and retention (EPR) effect: The significance of the concept and methods to enhance its application //Journal of personalized medicine. – 2021. – T. 11. – №. 8. – C. 771.
- 115 Sun R. et al. The tumor EPR effect for cancer drug delivery: Current status, limitations, and alternatives //Advanced Drug Delivery Reviews. – 2022. – C. 114614.
- 116 Ward C. et al. The impact of tumour pH on cancer progression: strategies for clinical intervention //Exploration of Targeted Anti-tumor Therapy. – 2020. – T. 1. – №. 2. – C. 71.
- 117 Lee S. H., Griffiths J. R. How and why are cancers acidic? Carbonic anhydrase IX and the homeostatic control of tumour extracellular pH //Cancers. – 2020. – T. 12. – №. 6. – C. 1616.
- 118 Mboge M. Y. et al. Carbonic anhydrases: role in pH control and cancer //Metabolites. – 2018. – T. 8. – №. 1. – C. 19.
- 119 Li X. et al. Recent development of pH-responsive theranostic nanoplateforms for magnetic resonance imaging-guided cancer therapy //Exploration. – 2023. – T. 3. – №. 3. – C. 20220002.
- 120 Thews O., Riemann A. Tumor pH and metastasis: a malignant process beyond hypoxia //Cancer and Metastasis Reviews. – 2019. – T. 38. – C. 113-129.
- 121 Chhikara B. S., Parang K. Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis //Chemical Biology Letters. – 2023. – T. 10. – №. 1. – C. 451-451.

- 122 Li S., Lian B. Application of Calcium Carbonate as a Controlled Release Carrier for Therapeutic Drugs //Minerals. – 2023. – T. 13. – №. 9. – C. 1136.
- 123 Xiao Y. et al. Recent advances in calcium-based anticancer nanomaterials exploiting calcium overload to trigger cell apoptosis //Advanced Functional Materials. – 2023. – T. 33. – №. 3. – C. 2209291.
- 124 Goss S. L. et al. Determination of calcium salt solubility with changes in pH and PCO₂, simulating varying gastrointestinal environments //Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 2007. – T. 59. – №. 11. – C. 1485-1492.
- 125 Maleki Dizaj S. et al. Calcium carbonate nanoparticles as cancer drug delivery system //Expert opinion on drug delivery. – 2015. – T. 12. – №. 10. – C. 1649-1660.
- 126 Dong Z. et al. CaCO₃ nanoparticles as an ultra-sensitive tumor-pH-responsive nanoplatform enabling real-time drug release monitoring and cancer combination therapy //Biomaterials. – 2016. – T. 110. – C. 60-70.
- 127 Ibiyeye K. M. et al. Combine drug delivery of Thymoquinone/DOXorubicin by Cockle shell-derived pH-sensitive aragonite CaCO₃ nanoparticles //Nanoscience & Nanotechnology-Asia. – 2020. – T. 10. – №. 4. – C. 518-533.
- 128 Popova V. et al. Doxorubicin-Loaded Silica Nanocomposites for Cancer Treatment //Coatings. – 2023. – T. 13. – №. 2. – C. 324.
- 129 Ji F. et al. A dual pH/magnetic responsive nanocarrier based on PEGylated Fe₃O₄ nanoparticles for doxorubicin delivery //Journal of nanoscience and nanotechnology. – 2018. – T. 18. – №. 7. – C. 4464-4470.
- 130 Semkina A. et al. Core-shell-corona doxorubicin-loaded superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles for cancer theranostics //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2015. – T. 136. – C. 1073-1080.
- 131 Cai W. et al. Modified green synthesis of Fe₃O₄@ SiO₂ nanoparticles for pH responsive drug release //Materials Science and Engineering: C. – 2020. – T. 112. – C. 110900.
- 132 Dai Z. et al. SiO₂-coated magnetic nano-Fe₃O₄ photosensitizer for synergistic tumour-targeted chemo-photothermal therapy //Colloids and surfaces B: biointerfaces. – 2020. – T. 195. – C. 111274.
- 133 Demin A. M. et al. Features of doxorubicin adsorption on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles coated with SiO₂ or SiO₂/aminopropylsilane //Mendeleev Communications. – 2023. – T. 33. – №. 2. – C. 160-163.
- 134 Tan C. et al. Advanced CaCO₃-derived delivery systems for bioactive compounds //Advances in Colloid and Interface Science. – 2022. – C. 102791.

- 135 Huang Y. et al. Hard, soft, and hard-and-soft drug delivery carriers based on CaCO₃ and alginate biomaterials: synthesis, properties, pharmaceutical applications //Pharmaceutics. – 2022. – T. 14. – №. 5. – C. 909.
- 136 Campbell J., Kastania G., Volodkin D. Encapsulation of low-molecular-weight drugs into polymer multilayer capsules templated on vaterite CaCO₃ crystals //Micromachines. – 2020. – T. 11. – №. 8. – C. 717.
- 137 Sana B., Finne-Wistrand A., Pappalardo D. Recent development in near infrared light-responsive polymeric materials for smart drug-delivery systems //Materials Today Chemistry. – 2022. – T. 25. – C. 100963.
- 138 Popova V., Dmitrienko E., Chubarov A. Magnetic Nanocomposites and Imprinted Polymers for Biomedical Applications of Nucleic Acids //Magnetochemistry. – 2022. – T. 9. – №. 1. – C. 12.
- 139 Li J. et al. Biomembrane-inspired design of medical micro/nanorobots: From cytomembrane stealth cloaks to cellularized Trojan horses //Aggregate. – 2023. – C. e359.
- 140 Li L. et al. Nucleic acid aptamers for molecular diagnostics and therapeutics: advances and perspectives //Angewandte Chemie International Edition. – 2021. – T. 60. – №. 5. – C. 2221-2231.
- 141 Yang M. et al. The application of nanoparticles in cancer immunotherapy: Targeting tumor microenvironment //Bioactive materials. – 2021. – T. 6. – №. 7. – C. 1973-1987.
- 142 Zhao Y. et al. Co-delivery of gemcitabine and Triapine by calcium carbonate nanoparticles against chemoresistant pancreatic cancer //International Journal of Pharmaceutics. – 2023. – T. 636. – C. 122844.
- 143 Chemmalar S. et al. Synthesis and characterization of Gefitinib and Paclitaxel dual drug loaded Cockle shell (*Anadara granosa*) derived Calcium carbonate nanoparticles //Materials Proceedings. – 2020. – T. 4. – №. 1. – C. 63.
- 144 Ibiyeye K. M. et al. Ultrastructural changes and antitumor effects of doxorubicin/thymoquinone-loaded CaCO₃ nanoparticles on breast cancer cell line //Frontiers in oncology. – 2019. – T. 9. – C. 599.
- 145 Yu J. et al. Multifunctional nanoparticles codelivering doxorubicin and amorphous calcium carbonate preloaded with indocyanine green for enhanced chemo-photothermal cancer therapy //International Journal of Nanomedicine. – 2023. – C. 323-337.
- 146 Chiang P. H. et al. Enhancing Doxorubicin Delivery in Solid Tumor by Superhydrophobic Amorphous Calcium Carbonate–Doxorubicin Silica Nanoparticles with Focused Ultrasound //Molecular Pharmaceutics. – 2022. – T. 19. – №. 11. – C. 3894-3905.

- 147 Wu Y. et al. Devising new lipid-coated calcium phosphate/carbonate hybrid nanoparticles for controlled release in endosomes for efficient gene delivery //Journal of Materials Chemistry B. – 2017. – T. 5. – №. 34. – C. 7194-7203.
- 148 Wu Y., Gu W., Xu Z. P. Enhanced combination cancer therapy using lipid-calcium carbonate/phosphate nanoparticles as a targeted delivery platform //Nanomedicine. – 2019. – T. 14. – №. 1. – C. 77-92.
- 149 Yazdian-Robati R. et al. Smart aptamer-modified calcium carbonate nanoparticles for controlled release and targeted delivery of epirubicin and melittin into cancer cells in vitro and in vivo //Drug development and industrial pharmacy. – 2019. – T. 45. – №. 4. – C. 603-610.
- 150 Chesneau C. et al. Cyclodextrin-calcium carbonate micro-to nano-particles: Targeting vaterite form and hydrophobic drug loading/release //Pharmaceutics. – 2023. – T. 15. – №. 2. – C. 653.
- 151 Popova V. et al. pH-Responsible Doxorubicin-Loaded Fe₃O₄@ CaCO₃ Nanocomposites for Cancer Treatment //Pharmaceutics. – 2023. – T. 15. – №. 3. – C. 771.
- 152 Wang C. et al. Cancer-specific therapy by artificial modulation of intracellular calcium concentration //Advanced Healthcare Materials. – 2019. – T. 8. – №. 18. – C. 1900501.
- 153 Fang T. et al. Bioresponsive and immunotherapeutic nanomaterials to remodel tumor microenvironment for enhanced immune checkpoint blockade //Bioactive Materials. – 2023. – T. 32. – C. 530-542.
- 154 Huang H. et al. Inorganic nanoparticles in clinical trials and translations //Nano Today. – 2020. – T. 35. – C. 100972.
- 155 Chenthamara D. et al. Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration //Biomaterials research. – 2019. – T. 23. – №. 1. – C. 1-29.
- 156 Kim M. et al. Nanosized ultrasound enhanced-contrast agent for in vivo tumor imaging via intravenous injection //ACS Applied Materials & Interfaces. – 2016. – T. 8. – №. 13. – C. 8409-8418.
- 157 Som A. et al. Monodispersed calcium carbonate nanoparticles modulate local pH and inhibit tumor growth in vivo //Nanoscale. – 2016. – T. 8. – №. 25. – C. 12639-12647.
- 158 Kim S. K., Foote M. B., Huang L. Targeted delivery of EV peptide to tumor cell cytoplasm using lipid coated calcium carbonate nanoparticles //Cancer letters. – 2013. – T. 334. – №. 2. – C. 311-318.
- 159 Zhang Y. et al. Tumor microenvironment-responsive hyaluronate-calcium carbonate hybrid nanoparticle enables effective chemotherapy for primary and advanced osT Θ O Carcomas //Nano Research. – 2018. – T. 11. – C. 4806-4822.

- 160 Mailafiya M. M. et al. Curcumin-loaded cockle shell-derived calcium carbonate nanoparticles: A novel strategy for the treatment of lead-induced hepato-renal toxicity in rats //Saudi journal of biological sciences. – 2020. – T. 27. – №. 6. – C. 1538-1552.
- 161 Svenskaya Y. I. et al. Non-invasive transcutaneous influenza immunization using vaccine-loaded vaterite particles //Journal of Materials Chemistry B. – 2023. – T. 11. – №. 17. – C. 3860-3870.
- 162 Li J. et al. Precise tumor resection under the navigation of Tumor-Microenvironment pH-activated NIR-II fluorescence imaging via calcium Carbonate/Polydopamine Co-packed Nd-doped downshifting nanoprobe //Materials & Design. – 2023. – T. 227. – C. 111703.
- 163 Canelli E. et al. Nano-adjuvanted dry powder vaccine for the mucosal immunization against airways pathogens //Frontiers in Veterinary Science. – 2023. – T. 10. – C. 1116722.
- 164 Lyu Y. et al. Nano-Calcium Carbonate Affect the Respiratory and Function Through Inducing Oxidative Stress: A Cross-sectional Study Among Occupational Exposure of Workers and a Further Research for Underlying Mechanisms //Journal of Occupational and Environmental Medicine. – 2023. – T. 65. – №. 2. – C. 184-191.
- 165 Gadallah S. M. et al. The Efficacy of Nano-Calcium Carbonate Derived from Coral Reefs and Nano-Silver to Induce new bone formation in Critical Radial Bone Defect in Rabbits: Radiological Evaluation //Journal of Current Veterinary Research. – 2022. – T. 4. – №. 2. – C. 113-123.
- 166 Sudareva N. N. et al. CaCO₃ vaterites as components of target drug delivery systems, Cell Ther. Transplant 9 (2020) 13e19.
- 167 Popryadukhin P. V. et al. Morphology of Porous CaCO₃ Vaterites as Components of Target Drug Delivery Systems in Rat Muscle Tissue //Cell and Tissue Biology. – 2021. – T. 15. – C. 208-213.
- 168 Render D. et al. Biomaterial-derived calcium carbonate nanoparticles for enteric drug delivery //Journal of nanomaterials. – 2016. – T. 2016.
- 169 Lee J. A. et al. The fate of calcium carbonate nanoparticles administered by oral route: Absorption and their interaction with biological matrices //International Journal of Nanomedicine. – 2015. – C. 2273-2293.
- 170 Kim M. K. et al. Cytotoxicity, uptake behaviors, and oral absorption of food grade calcium carbonate nanomaterials //Nanomaterials. – 2015. – T. 5. – №. 4. – C. 1938-1954.
- 171 Liu D. et al. Oral delivery of insulin using CaCO₃-based composite nanocarriers with hyaluronic acid coatings //Materials letters. – 2017. – T. 188. – C. 263-266.
- 172 Borodina T. et al. A novel formulation of zolpidem for direct nose-to-brain delivery: synthesis, encapsulation and intranasal administration to mice //Journal of pharmacy and pharmacology. – 2018. – T. 70. – №. 9. – C. 1164-1173.

- 173 Haruta S. et al. An effective absorption behavior of insulin for diabetic treatment following intranasal delivery using porous spherical calcium carbonate in monkeys and healthy human volunteers //Diabetes technology & therapeutics. – 2003. – T. 5. – №. 1. – C. 1-9.
- 174 Ishikawa F. et al. Insoluble powder formulation as an effective nasal drug delivery system //Pharmaceutical research. – 2002. – T. 19. – C. 1097-1104.
- 175 Morçöl T. et al. Calcium phosphate particles as pulmonary delivery system for interferon- α in mice //AAPS PharmSciTech. – 2018. – T. 19. – C. 395-412.
- 176 Miranda M. S. et al. Development of inhalable superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) in microparticulate system for antituberculosis drug delivery //Advanced healthcare materials. – 2018. – T. 7. – №. 15. – C. 1800124.
- 177 Lauth V. et al. Self-assembly and shape control of hybrid nanocarriers based on calcium carbonate and carbon nanodots //Chemistry of Materials. – 2016. – T. 28. – №. 11. – C. 3796-3803.
- 178 Gusliakova O. et al. Use of submicron vaterite particles serves as an effective delivery vehicle to the respiratory portion of the lung //Frontiers in Pharmacology. – 2018. – T. 9. – C. 559.
- 179 Guan Y. et al. Selective Delivery of Tofacitinib Citrate to Hair Follicles Using Lipid-Coated Calcium Carbonate Nanocarrier Controls Chemotherapy-Induced Alopecia Areata //International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – T. 24. – №. 9. – C. 8427.
- 180 Higaki M. et al. Transdermal delivery of CaCO₃-nanoparticles containing insulin //Diabetes technology & therapeutics. – 2006. – T. 8. – №. 3. – C. 369-374.
- 181 Svenskaya Y. I. et al. A simple non-invasive approach toward efficient transdermal drug delivery based on biodegradable particulate system //ACS applied materials & interfaces. – 2019. – T. 11. – №. 19. – C. 17270-17282.
- 182 Lengert E. et al. Mesoporous carriers for transdermal delivery of antifungal drug //Materials Letters. – 2019. – T. 248. – C. 211-213.
- 183 Utz S. R. et al. Targeted photosensitizer delivery: A prospective approach to vitiligo photochemotherapy //Vestnik dermatologii i venerologii. – 2019. – T. 95. – №. 1. – C. 21-29.
- 184 Svenskaya Y. I. et al. Enhanced topical psoralen–ultraviolet A therapy via targeting to hair follicles //British Journal of Dermatology. – 2020. – T. 182. – №. 6. – C. 1479-1481.
- 185 Gusliakova O. et al. Transdermal platform for the delivery of the antifungal drug naftifine hydrochloride based on porous vaterite particles //Materials Science and Engineering: C. – 2021. – T. 119. – C. 111428.
- 186 Zhuang Y., Cui W. Biomaterial-based delivery of nucleic acids for tissue regeneration //Advanced Drug Delivery Reviews. – 2021. – T. 176. – C. 113885.

- 187 Mendonça M. C. P. et al. Design of lipid-based nanoparticles for delivery of therapeutic nucleic acids //Drug Discovery Today. – 2023. – T. 28. – №. 3. – C. 103505.
- 188 Schulz-Siegmund M., Aigner A. Nucleic acid delivery with extracellular vesicles //Advanced drug delivery reviews. – 2021. – T. 173. – C. 89-111.
- 189 Yamada Y. Nucleic acid drugs—current status, issues, and expectations for exosomes //Cancers. – 2021. – T. 13. – №. 19. – C. 5002.
- 190 Cao Y., Dong X., Chen X. Polymer-modified liposomes for drug delivery: from fundamentals to applications //Pharmaceutics. – 2022. – T. 14. – №. 4. – C. 778.
- 191 Lin M., Qi X. Advances and challenges of stimuli-responsive nucleic acids delivery system in gene therapy //Pharmaceutics. – 2023. – T. 15. – №. 5. – C. 1450.
- 192 Wang C. Q. et al. Dual-functionalized calcium carbonate based gene delivery system for efficient gene delivery //RSC advances. – 2014. – T. 4. – №. 73. – C. 38623-38629.
- 193 He X. W. et al. Calcium carbonate nanoparticle delivering vascular endothelial growth factor-C siRNA effectively inhibits lymphangiogenesis and growth of gastric cancer in vivo //Cancer gene therapy. – 2008. – T. 15. – №. 3. – C. 193-202.
- 194 Chen C. et al. Polyethyleneimine-modified calcium carbonate nanoparticles for p53 gene delivery //Regenerative biomaterials. – 2016. – T. 3. – №. 1. – C. 57-63.
- 195 Kanvinde S. et al. Non-viral vectors for delivery of nucleic acid therapies for cancer //BioTech. – 2022. – T. 11. – №. 1. – C. 6.
- 196 Zhao P. et al. MiR-375 delivered by lipid-coated doxorubicin-calcium carbonate nanoparticles overcomes chemoresistance in hepatocellular carcinoma //Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. – 2017. – T. 13. – №. 8. – C. 2507-2516.
- 197 Zhao P. et al. Enhancing anti-tumor efficiency in hepatocellular carcinoma through the autophagy inhibition by miR-375/sorafenib in lipid-coated calcium carbonate nanoparticles //Acta biomaterialia. – 2018. – T. 72. – C. 248-255.
- 198 Xu X. et al. Programming assembly of biomimetic exosomes: an emerging theranostic nanomedicine platform //Materials Today Bio. – 2023. – C. 100760.
- 199 Qi C. et al. Calcium-based biomaterials for diagnosis, treatment, and theranostics //Chemical Society Reviews. – 2018. – T. 47. – №. 2. – C. 357-403.
- 200 Min K. H. et al. pH-controlled gas-generating mineralized nanoparticles: a theranostic agent for ultrasound imaging and therapy of cancers //ACS nano. – 2015. – T. 9. – №. 1. – C. 134-145.

- 201 Feng Q. et al. pH/ultrasound dual-responsive gas generator for ultrasound imaging-guided therapeutic inertial cavitation and sonodynamic therapy //Advanced Healthcare Materials. – 2018. – T. 7. – №. 5. – C. 1700957.
- 202 Sarbadhikary P., George B. P., Abrahamse H. Recent advances in photosensitizers as multifunctional theranostic agents for imaging-guided photodynamic therapy of cancer //Theranostics. – 2021. – T. 11. – №. 18. – C. 9054.
- 203 Kong F. et al. Biodegradable photothermal and pH responsive calcium carbonate@ phospholipid@ acetalated dextran hybrid platform for advancing biomedical applications //Advanced functional materials. – 2016. – T. 26. – №. 34. – C. 6158-6169.
- 204 Guan Q. et al. A glycosylated covalent organic framework equipped with BODIPY and CaCO₃ for synergistic tumor therapy //Angewandte Chemie International Edition. – 2020. – T. 59. – №. 41. – C. 18042-18047.
- 205 Wang P. et al. Cell-Friendly Isolation and pH-Sensitive Controllable Release of Circulating Tumor Cells by Fe₃O₄@ CaCO₃ Nanoplatform //Advanced Materials Interfaces. – 2021. – T. 8. – №. 21. – C. 2101191.
- 206 Xue J. et al. Magnetic drug-loaded osteoinductive Fe₃O₄/CaCO₃ hybrid microspheres system: efficient for sustained release of antibiotics //Journal of Physics D: Applied Physics. – 2020. – T. 53. – №. 24. – C. 245401.
- 207 Lin C. et al. Recent Developments in CaCO₃ Nano-Drug Delivery Systems: Advancing Biomedicine in Tumor Diagnosis and Treatment //Pharmaceutics. – 2024. – T. 16. – №. 2. – C. 275.
- 208 Kanellakopoulou K., Giamarellos-Bourboulis E. J. Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections //Drugs. – 2000. – T. 59. – C. 1223-1232.
- 209 Maleki S. et al. Calcium carbonate nanoparticles; potential applications in bone and tooth disorders //Pharmaceutical Sciences. – 2015. – T. 20. – №. 4. – C. 175-182.
- 210 Korkusuz F. et al. In vivo response to biodegradable controlled antibiotic release systems //Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials. – 2001. – T. 55. – №. 2. – C. 217-228.
- 211 Lucas A. et al. A synthetic aragonite-based ceramic as a bone graft substitute and substrate for antibiotics //International Journal of Inorganic Materials. – 2001. – T. 3. – №. 1. – C. 87-94.
- 212 Che Y. J. et al. Lymph-Node-Targeted Drug Delivery for Effective Immunomodulation to Prolong the Long-Term Survival After Heart Transplantation //Advanced Materials. – 2023. – T. 35. – №. 16. – C. 2207227.

- 213 Su X., Wang T., Guo S. Applications of 3D printed bone tissue engineering scaffolds in the stem cell field //Regenerative therapy. – 2021. – T. 16. – C. 63-72.
- 214 Wang T. et al. Three-dimensional printing of calcium carbonate/hydroxyapatite scaffolds at low temperature for bone tissue engineering //3D Printing and Additive Manufacturing. – 2021. – T. 8. – №. 1. – C. 1-13.
- 215 Gang F. et al. 3D printing of PLLA/biomineral composite bone tissue engineering scaffolds //Materials. – 2022. – T. 15. – №. 12. – C. 4280.
- 216 Donate R. et al. Calcium carbonate coating of 3D-printed PLA scaffolds intended for biomedical applications //Polymers. – 2023. – T. 15. – №. 11. – C. 2506.
- 217 Harish V. et al. Review on nanoparticles and nanostructured materials: Bioimaging, biosensing, drug delivery, tissue engineering, antimicrobial, and agro-food applications //Nanomaterials. – 2022. – T. 12. – №. 3. – C. 457.
- 218 Chernozem R. V. et al. Piezoelectric hybrid scaffolds mineralized with calcium carbonate for tissue engineering: analysis of local enzyme and small-molecule drug delivery, cell response and antibacterial performance //Materials Science and Engineering: C. – 2021. – T. 122. – C. 111909.
- 219 Saveleva M. S. et al. Hybrid PCL/CaCO₃ scaffolds with capabilities of carrying biologically active molecules: Synthesis, loading and in vivo applications //Materials Science and Engineering: C. – 2018. – T. 85. – C. 57-67.
- 220 Ren B. et al. Injectable polysaccharide hydrogel embedded with hydroxyapatite and calcium carbonate for drug delivery and bone tissue engineering //International journal of biological macromolecules. – 2018. – T. 118. – C. 1257-1266.
- 221 Liu H. et al. Unlocking the potential of amorphous calcium carbonate: A star ascending in the realm of biomedical application //Acta Pharmaceutica Sinica B. – 2023.
- 222 Ambrogi V. A New Challenge for the Old Excipient Calcium Carbonate: To Improve the Dissolution Rate of Poorly Soluble Drugs //Pharmaceutics. – 2023. – T. 15. – №. 1. – C. 300.
- 223 Bai S. et al. Gain an advantage from both sides: Smart size-shrinkable drug delivery nanosystems for high accumulation and deep penetration //Nano Today. – 2021. – T. 36. – C. 101038.
- 224 Wang X. et al. Inorganic nanomaterials with rapid clearance for biomedical applications //Chemical Society Reviews. – 2021. – T. 50. – №. 15. – C. 8669-8742.
- 225 Sharma S. et al. An insight into functionalized calcium based inorganic nanomaterials in biomedicine: Trends and transitions //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2015. – T. 133. – C. 120-139.

- 226 Docter D. et al. No king without a crown—impact of the nanomaterial-protein corona on nanobiomedicine //Nanomedicine. – 2015. – Т. 10. – №. 3. – С. 503-519.
- 227 Martel J., Young J. D. E. Purported nanobacteria in human blood as calcium carbonate nanoparticles //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – Т. 105. – №. 14. – С. 5549-5554.
- 228 Shan D. et al. Development of amperometric biosensor for glucose based on a novel attractive enzyme immobilization matrix: calcium carbonate nanoparticles //Biosensors and Bioelectronics. – 2007. – Т. 22. – №. 8. – С. 1612-1617.
- 229 Попова В.К., и др. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук. Способ получения суспензии биodeградируемого наноматериала неорганических солей кальция. Патент № 2787956 РФ, МПК А61К 9/10. № 92022124378; Заявл.13.09.2022; Опубл. 13.01.2023.
- 230 Kovrigina E., Chubarov A., Dmitrienko E. High drug capacity doxorubicin-loaded iron oxide nanocomposites for cancer therapy //Magnetochemistry. – 2022. – Т. 8. – №. 5. – С. 54.
- 231 Wang H. T. et al. Physical and biological evaluation of low-molecular-weight hyaluronic Acid/Fe₃O₄ nanoparticle for targeting MCF7 breast cancer cells //Polymers. – 2020. – Т. 12. – №. 5. – С. 1094.
- 232 Rao K. S. et al. A novel method for synthesis of silica nanoparticles //Journal of colloid and interface science. – 2005. – Т. 289. – №. 1. – С. 125-131.
- 233 Masalov V. M., Sukhinina N. S., Emel'chenko G. A. Synthesis of monodisperse silica nanoparticles via heterogeneous tetraethoxysilane hydrolysis using l-arginine as a catalyst //Inorganic Materials. – 2018. – Т. 54. – С. 156-162.
- 234 Vazquez N. I. et al. Synthesis of mesoporous silica nanoparticles by sol–gel as nanocontainer for future drug delivery applications //Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio. – 2017. – Т. 56. – №. 3. – С. 139-145.
- 235 Dumontel B. et al. Natural biopolymers as smart coating materials of mesoporous silica nanoparticles for drug delivery //Pharmaceutics. – 2023. – Т. 15. – №. 2. – С. 447.
- 236 Attia M. S. et al. Mesoporous silica nanoparticles: Their potential as drug delivery carriers and nanoscavengers in Alzheimer's and Parkinson's diseases //Saudi Pharmaceutical Journal. – 2023. – Т. 31. – №. 3. – С. 417-432.
- 237 Sreena R., Nathanael A. J. Biodegradable biopolymeric nanoparticles for biomedical applications—challenges and future outlook //Materials. – 2023. – Т. 16. – №. 6. – С. 2364.

- 238 Ma X., Luan Z., Li J. Inorganic nanoparticles-based systems in biomedical applications of stem cells: opportunities and challenges //International Journal of Nanomedicine. – 2023. – С. 143-182.
- 239 Shinde V. R. et al. Enhanced Permeability and Retention Effect: A key facilitator for solid tumor targeting by nanoparticles // Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2022. – С. 102915.
- 240 Khouzani M. F. et al. Disordered amorphous calcium carbonate from direct precipitation // CrystEngComm. – 2015. – Т. 17. – №. 26. – С. 4842-4849.
- 241 Martel J., Young J. D. E. Purported nanobacteria in human blood as calcium carbonate nanoparticles // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2008. – Т. 105. – №. 14. – С. 5549-5554.
- 242 Vavaev E. S. et al. CaCO₃ nanoparticles coated with alternating layers of poly-l-arginine hydrochloride and Fe₃O₄ nanoparticles as navigable drug carriers and hyperthermia agents //ACS Applied Nano Materials. – 2022. – Т. 5. – №. 2. – С. 2994-3006.
- 243 Akbari J. et al. The effect of Tween 20, 60, and 80 on dissolution behavior of sprionolactone in solid dispersions prepared by PEG 6000 //Advanced Pharmaceutical Bulletin. – 2015. – Т. 5. – №. 3. – С. 435.
- 244 Koennings S. et al. Influence of wettability and surface activity on release behavior of hydrophilic substances from lipid matrices //Journal of controlled release. – 2007. – Т. 119. – №. 2. – С. 173-181.
- 245 Jiao W. et al. Design of magnetic nanoplatforms for cancer theranostics //Biosensors. – 2022. – Т. 12. – №. 1. – С. 38.
- 246 Попова В.К., и др. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук. Способ получения суспензии биodeградируемого наноматериала неорганических солей кальция. Патент № 2787956 РФ, МПК А61К 9/10. № 92022124378; Заявл.13.09.2022; Оpubл. 13.01.2023.
- 247 Lamichhane N. et al. Iron oxide-based magneto-optical nanocomposites for in vivo biomedical applications //Biomedicines. – 2021. – Т. 9. – №. 3. – С. 288.
- 248 Anderson S. D., Gwenin V. V., Gwenin C. D. Magnetic functionalized nanoparticles for biomedical, drug delivery and imaging applications //Nanoscale research letters. – 2019. – Т. 14. – №. 1. – С. 188.
- 249 Ayub A., Wettig S. An overview of nanotechnologies for drug delivery to the brain //Pharmaceutics. – 2022. – Т. 14. – №. 2. – С. 224.
- 250 Vergaro V. et al. CaCO₃ as an environmentally friendly renewable material for drug delivery systems: Uptake of HSA-CaCO₃ nanocrystals conjugates in cancer cell lines //Materials. – 2019. – Т. 12. – №. 9. – С. 1481.

- 251 Wang C. et al. Preparation and characterization of magnetic hollow PMMA nanospheres via in situ emulsion polymerization //Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2010. – T. 363. – №. 1-3. – C. 71-77.
- 252 Ibarra J. et al. Synthesis and characterization of magnetite/PLGA/chitosan nanoparticles //Materials Research Express. – 2015. – T. 2. – №. 9. – C. 095010.
- 253 Rodriguez-Blanco J. D., Shaw S., Benning L. G. The kinetics and mechanisms of amorphous calcium carbonate (ACC) crystallization to calcite, via vaterite //Nanoscale. – 2011. – T. 3. – №. 1. – C. 265-271.
- 254 Cai G. B. et al. 1, 3-Diamino-2-hydroxypropane-N, N, N', N'-tetraacetic acid stabilized amorphous calcium carbonate: Nucleation, transformation and crystal growth //CrystEngComm. – 2010. – T. 12. – №. 1. – C. 234-241.
- 255 Gisbert-Garzarán M., Manzano M., Vallet-Regí M. Mesoporous silica nanoparticles for the treatment of complex bone diseases: Bone cancer, bone infection and osteoporosis //Pharmaceutics. – 2020. – T. 12. – №. 1. – C. 83.
- 256 Zhang W. et al. Role of silica (SiO₂) nano/micro-particles in the functionality of degradable packaging films/coatings and their application in food preservation //Trends in Food Science & Technology. – 2023. – T. 133. – C. 75-86.
- 257 Abbasi M. et al. Mesoporous silica nanoparticle: heralding a brighter future in cancer nanomedicine // Microporous and Mesoporous Materials. – 2021. – T. 319. – C. 110967.
- 258 Masalov V. M., Sukhinina N. S., Emel'Chenko G. A. Synthesis of monodisperse silica nanoparticles via heterogeneous tetraethoxysilane hydrolysis using l-arginine as a catalyst // Inorganic Materials. – 2018. – T. 54. – C. 156-162.
- 259 Rao K. S. et al. A novel method for synthesis of silica nanoparticles // Journal of colloid and interface science. – 2005. – T. 289. – №. 1. – C. 125-131.
- 260 Kirla H. et al. Use of Silica Nanoparticles for Drug Delivery in Cardiovascular Disease //Clinical therapeutics. – 2023.
- 261 Wiogo H. T. R. et al. Stabilization of magnetic iron oxide nanoparticles in biological media by fetal bovine serum (FBS) //Langmuir. – 2011. – T. 27. – №. 2. – C. 843-850.
- 262 Khullar P. et al. Bovine serum albumin bioconjugated gold nanoparticles: synthesis, hemolysis, and cytotoxicity toward cancer cell lines //The Journal of Physical Chemistry C. – 2012. – T. 116. – №. 15. – C. 8834-8843.
- 263 Singh S. et al. Nanoparticle formulations: A smart era of advanced treatment with nanotoxicological imprints on the human body //Chemico-Biological Interactions. – 2023. – T. 373. – C. 110355.

- 264 Li Z. et al. Applications of surface modification technologies in nanomedicine for deep tumor penetration //Advanced Science. – 2021. – T. 8. – №. 1. – C. 2002589.
- 265 Ahangaran F., Navarchian A. H. Recent advances in chemical surface modification of metal oxide nanoparticles with silane coupling agents: A review //Advances in Colloid and Interface Science. – 2020. – T. 286. – C. 102298.
- 266 Darwish M. S. A., Mostafa M. H., Al-Harbi L. M. Polymeric nanocomposites for environmental and industrial applications //International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – T. 23. – №. 3. – C. 1023.
- 267 Huang Y. et al. Superparamagnetic Iron oxide nanoparticles modified with tween 80 pass through the intact blood–brain barrier in rats under magnetic field //ACS applied materials & interfaces. – 2016. – T. 8. – №. 18. – C. 11336-11341.
- 268 Snoderly H. T. et al. PEGylation of metal oxide nanoparticles modulates neutrophil extracellular trap formation //Biosensors. – 2022. – T. 12. – №. 2. – C. 123.
- 269 Schwaminger S. P., Bauer D., Fraga-García P. Gold-iron oxide nanohybrids: Insights into colloidal stability and surface-enhanced Raman detection //Nanoscale Advances. – 2021. – T. 3. – №. 22. – C. 6438-6445.
- 270 Turrina C. et al. Silica-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles: New insights into the influence of coating thickness on the particle properties and lasioglossin binding //MRS Communications. – 2022. – T. 12. – №. 5. – C. 632-639.
- 271 Dragos-Pinzaru O. G. et al. Synthesis and characterization of gold-shell magnetic nanowires for theranostic applications //Coatings. – 2022. – T. 12. – №. 11. – C. 1755.
- 272 Vismara E. et al. Albumin and hyaluronic acid-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles loaded with paclitaxel for biomedical applications //Molecules. – 2017. – T. 22. – №. 7. – C. 1030.
- 273 Schubert J., Chanana M. Coating matters: Review on colloidal stability of nanoparticles with biocompatible coatings in biological media, living cells and organisms //Current medicinal chemistry. – 2018. – T. 25. – №. 35. – C. 4553-4586.
- 274 Schwaminger S. P. et al. Design of interactions between nanomaterials and proteins: a highly affine peptide tag to bare iron oxide nanoparticles for magnetic protein separation //Biotechnology journal. – 2019. – T. 14. – №. 3. – C. 1800055.
- 275 Sperling R. A., Parak W. J. Surface modification, functionalization and bioconjugation of colloidal inorganic nanoparticles //Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences. – 2010. – T. 368. – №. 1915. – C. 1333-1383.

- 276 Pujari S. P. et al. Covalent surface modification of oxide surfaces //Angewandte Chemie International Edition. – 2014. – Т. 53. – №. 25. – С. 6322-6356.
- 277 Sunasee R., Narain R. Covalent and noncovalent bioconjugation strategies //Chemistry of Bioconjugates: Synthesis, Characterization, and Biomedical Applications. – 2014. – С. 1-75.
- 278 Palanikumar S. et al. Effect of streptavidin functionalised Fe₃O₄ on the sedimentation of starch //International Journal of Nano and Biomaterials. – 2014. – Т. 5. – №. 2-3. – С. 165-180.
- 279 Thomsen T. Chemistry and Analysis of Nanoparticle-Modified Living Cells. – EPFL, 2020. – №. 7384.
- 280 Doswald S. Functionalization of magnetic nanoparticles for efficient use in biomedical applications : дис. – ETH Zurich, 2021.
- 281 Dmitrienko E. V., Pyshnaya I. A., Pyshnyi D. V. Oligonucleotide derivatives in the hybridization analysis of nucleic acids. I. Covalent immobilization of oligonucleotide probes on nylon //Russian journal of bioorganic chemistry. – 2010. – Т. 36. – №. 5. – С. 645-656.
- 282 Иванова, Е.Б. Исследование биоаналитических свойств молекулярно-импринтированных полимеров на основе нейлона-6.: Дис. – Новосибирский государственный университет. диплом: 04.03.01 / Е.Б. Иванова. Новосиб. гос. Ун-т. - Новосибирск, 2015.
- 283 Long J. et al. Preparation of streptavidin-coated magnetic nanoparticles for specific immobilization of enzymes with high activity and enhanced stability //Industrial & Engineering Chemistry Research. – 2021. – Т. 60. – №. 4. – С. 1542-1552.
- 284 Norris J. L. et al. Covalent and non-covalent strategies for the immobilization of Tobacco Etch Virus protease (TEVp) on superparamagnetic nanoparticles //Journal of Biotechnology. – 2020. – Т. 322. – С. 1-9.
- 285 Hao N. et al. The shape effect of PEGylated mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake pathway in Hela cells //Microporous and mesoporous materials. – 2012. – Т. 162. – С. 14-23.
- 286 Azarshin S., Moghadasi J., Aboosadi Z. Surface functionalization of silica nanoparticles to improve the performance of water flooding in oil wet reservoirs //Energy Exploration & Exploitation. – 2017. – Т. 35. – №. 6. – С. 685-697.
- 287 Xiao Y., Li C. M., Liu Y. Electrochemical impedance characterization of antibody–antigen interaction with signal amplification based on polypyrrole–streptavidin //Biosensors and Bioelectronics. – 2007. – Т. 22. – №. 12. – С. 3161-3166.
- 288 Golshaei R., Guler Z., Sarac S. A. (Au/PANA/PVAc) nanofibers as a novel composite matrix for albumin and streptavidin immobilization //Materials Science and Engineering: C. – 2016. – Т. 60. – С. 260-275.

- 289 Gao F. et al. Recent advances in aptamer-based targeted drug delivery systems for cancer therapy //Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2022. – Т. 10. – С. 972933.
- 290 Carton-Garcia F. et al. Oligonucleotide-based therapies for renal diseases //Biomedicines. – 2021. – Т. 9. – №. 3. – С. 303.
- 291 Fan M. et al. Ultrasmall gold nanoparticles in cancer diagnosis and therapy //Theranostics. – 2020. – Т. 10. – №. 11. – С. 4944.
- 292 Roberts T. C., Langer R., Wood M. J. A. Advances in oligonucleotide drug delivery //Nature reviews Drug discovery. – 2020. – Т. 19. – №. 10. – С. 673-694.
- 293 Ramasamy T. et al. Nano drug delivery systems for antisense oligonucleotides (ASO) therapeutics //Journal of Controlled Release. – 2022. – Т. 352. – С. 861-878.
- 294 Minkner R. et al. Oligonucleotide separation techniques for purification and analysis: What can we learn for today's tasks? //Electrophoresis. – 2022. – Т. 43. – №. 23-24. – С. 2402-2427.
- 295 Bost J. P. et al. Delivery of oligonucleotide therapeutics: chemical modifications, lipid nanoparticles, and extracellular vesicles //ACS nano. – 2021. – Т. 15. – №. 9. – С. 13993-14021.
- 296 Дмитриенко, Е.В., Тронин, А.В., Попов, В.П., Пышная, И.А., Пышный, Д.В. Иммуобилизация биомолекулярных зондов на поверхность Si/SiO₂ //Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина. – 2013. – Т. 11. – №. 4. – С. 35-43.
- 297 Jain A., Cheng K. The principles and applications of avidin-based nanoparticles in drug delivery and diagnosis //Journal of controlled release. – 2017. – Т. 245. – С. 27-40.
- 298 Li D. et al. AACCC guidance document on biotin interference in laboratory tests //The Journal of Applied Laboratory Medicine. – 2020. – Т. 5. – №. 3. – С. 575-587.
- 299 Balzer A. H. A., Whitehurst C. B. An Analysis of the Biotin–(Strept) avidin System in Immunoassays: Interference and Mitigation Strategies //Current Issues in Molecular Biology. – 2023. – Т. 45. – №. 11. – С. 8733-8754.
- 300 Xu G., Poelarends G. J. Unlocking new reactivities in enzymes by iminium catalysis //Angewandte Chemie International Edition. – 2022. – Т. 61. – №. 30. – С. e202203613.
- 301 Guo Z. et al. Detection of Hg (II) in adsorption experiment by a lateral flow biosensor based on streptavidin-biotinylated DNA probes modified gold nanoparticles and smartphone reader //Environmental Pollution. – 2020. – Т. 266. – С. 115389.
- 302 Lincy S. A. et al. Streptavidin Fe₂O₃-gold nanoparticles functionalized theranostic liposome for antibiotic resistant bacteria and biotin sensing //Biosensors and Bioelectronics. – 2023. – Т. 219. – С. 114849.

- 303 Gross B. P. et al. Biotinylated streptavidin surface coating improves the efficacy of a PLGA microparticle-based cancer vaccine //Bioconjugate chemistry. – 2020. – Т. 31. – №. 9. – С. 2147-2157.
- 304 Largy E., Hamon F., Teulade-Fichou M. P. A streptavidin paramagnetic-particle based competition assay for the evaluation of the optical selectivity of quadruplex nucleic acid fluorescent probes //Methods. – 2012. – Т. 57. – №. 1. – С. 129-137.
- 305 Замосковцева А. А. и др. ПОИСК НОВОГО ТИПА ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ГЕНОМЕ ЧЕЛОВЕКА //VII МЕЖДУНАРОДНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ: БИОФИЗИКОВ, БИОТЕХНОЛОГОВ, МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОЛОГОВ И ВИРУСОЛОГОВ. – 2020. – С. 227-228.
- 306 Yusuf A. et al. Nanoparticles as Drug Delivery Systems: A Review of the implication of nanoparticles' physicochemical properties on responses in biological systems //Polymers. – 2023. – Т. 15. – №. 7. – С. 1596.
- 307 Liu R. et al. Advances of nanoparticles as drug delivery systems for disease diagnosis and treatment //Chinese chemical letters. – 2023. – Т. 34. – №. 2. – С. 107518.
- 308 Afzal O. et al. Nanoparticles in drug delivery: From history to therapeutic applications //Nanomaterials. – 2022. – Т. 12. – №. 24. – С. 4494.
- 309 Федеральный проект «Борьба с онкологическими заболеваниями» // Министерство здравоохранения Российской Федерации URL: <https://minzdrav.gov.ru/poleznye-resursy/natsproektzdravoohranenie/onko> (дата обращения: 16.02.2024)
- 310 Nikezić A. V. V., Bondžić A. M., Vasić V. M. Drug delivery systems based on nanoparticles and related nanostructures //European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2020. – Т. 151. – С. 105412.
- 311 Lérida-Viso A. et al. Biosafety of mesoporous silica nanoparticles; towards clinical translation //Advanced Drug Delivery Reviews. – 2023. – С. 115049.
- 312 Lakkakula J. R. et al. A comprehensive review on alginate-based delivery systems for the delivery of chemotherapeutic agent: Doxorubicin //Carbohydrate polymers. – 2021. – Т. 259. – С. 117696.
- 313 Jain K. K. An overview of drug delivery systems //Drug Delivery Systems. – 2020. – С. 1-54.
- 314 Ikeda-Imafuku M. et al. Strategies to improve the EPR effect: A mechanistic perspective and clinical translation //Journal of Controlled Release. – 2022. – Т. 345. – С. 512-536.
- 315 Kim J. et al. Perspectives for Improving the Tumor Targeting of Nanomedicine via the EPR Effect in Clinical Tumors //International journal of molecular sciences. – 2023. – Т. 24. – №. 12. – С. 10082.
- 316 Boedtkjer E., Pedersen S. F. The acidic tumor microenvironment as a driver of cancer //Annual review of physiology. – 2020. – Т. 82. – С. 103-126.

- 317 Karimi M. et al. pH-Sensitive stimulus-responsive nanocarriers for targeted delivery of therapeutic agents //Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. – 2016. – T. 8. – №. 5. – C. 696-716.
- 318 Subhan M. A. et al. Recent advances in tumor targeting via EPR effect for cancer treatment //Journal of personalized medicine. – 2021. – T. 11. – №. 6. – C. 571.
- 319 Liu X., Jiang J., Meng H. Transcytosis-An effective targeting strategy that is complementary to “EPR effect” for pancreatic cancer nano drug delivery //Theranostics. – 2019. – T. 9. – №. 26. – C. 8018.
- 320 Park J. et al. Alliance with EPR effect: combined strategies to improve the EPR effect in the tumor microenvironment //Theranostics. – 2019. – T. 9. – №. 26. – C. 8073.
- 321 Niu Y. et al. Magnetic Microcapsules Based on Fe₃O₄ Nanoparticles: Preparation, Properties, and Applications //Materials Today Communications. – 2024. – C. 108660.
- 322 Zyuzin M. V. et al. Comprehensive and systematic analysis of the immunocompatibility of polyelectrolyte capsules //Bioconjugate chemistry. – 2017. – T. 28. – №. 2. – C. 556-564.
- 323 Qiu N. et al. Calcium carbonate microspheres as carriers for the anticancer drug camptothecin //Materials Science and Engineering: C. – 2012. – T. 32. – №. 8. – C. 2634-2640.
- 324 Bansal R., Singh R., Kaur K. Quantitative analysis of doxorubicin hydrochloride and arterolane maleate by mid IR spectroscopy using transmission and reflectance modes //BMC chemistry. – 2021. – T. 15. – №. 1. – C. 27.
- 325 Liang J. et al. Lipid/hyaluronic acid-Coated Doxorubicin-Fe₃O₄ as a dual-targeting nanoparticle for enhanced cancer therapy //AAPS PharmSciTech. – 2020. – T. 21. – C. 1-9.
- 326 Shafei A. et al. A review on the efficacy and toxicity of different doxorubicin nanoparticles for targeted therapy in metastatic breast cancer //Biomedicine & pharmacotherapy. – 2017. – T. 95. – C. 1209-1218
- 327 Li L. et al. Porous calcite CaCO₃ microspheres: Preparation, characterization and release behavior as doxorubicin carrier //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2020. – T. 186. – C. 110720.
- 328 Wu J. L. et al. Multi-drug delivery system based on alginate/calcium carbonate hybrid nanoparticles for combination chemotherapy //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2014. – T. 123. – C. 498-505.
- 329 Swietach P. et al. The chemistry, physiology and pathology of pH in cancer //Philosophical transactions of the royal society B: biological sciences. – 2014. – T. 369. – №. 1638. – C. 20130099.
- 330 Vakili-Ghartavol R. et al. Toxicity assessment of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in different tissues //Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology. – 2020. – T. 48. – №. 1. – C. 443-451.

- 331 Malhotra N. et al. Potential toxicity of iron oxide magnetic nanoparticles: a review //Molecules. – 2020. – Т. 25. – №. 14. – С. 3159.
- 332 Dong L. et al. A review on recent advances in the applications of composite Fe₃O₄ magnetic nanoparticles in the food industry //Critical Reviews in Food Science and Nutrition. – 2024. – Т. 64. – №. 4. – С. 1110-1138.
- 333 Ganapathe L. S. et al. Magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles in biomedical application: From synthesis to surface functionalisation //Magnetochemistry. – 2020. – Т. 6. – №. 4. – С. 68.
- 334 Lu C. H., Hsiao J. K. Diagnostic and therapeutic roles of iron oxide nanoparticles in biomedicine //Tzu Chi Medical Journal. – 2023. – Т. 35. – №. 1. – С. 11-17.
- 335 Liu Y. et al. Biom mineralized calcium carbonate nanohybrids for mild photothermal heating-enhanced gene therapy //Biomaterials. – 2021. – Т. 274. – С. 120885.
- 336 Idris S. B. et al. In vitro cytotoxicity evaluation of oxytetracycline loaded cockle shell derived calcium carbonate aragonite nanoparticles //Nanoscience & Nanotechnology-Asia. – 2021. – Т. 11. – №. 2. – С. 237-242.
- 337 Доксорубицин (Doxorubicinum) описание // Энциклопедия лекарств РЛС® URL: <https://www.rlsnet.ru/> (дата обращения: 12.05.2024).
- 338 Larsson P. et al. Optimization of cell viability assays to improve replicability and reproducibility of cancer drug sensitivity screens //Scientific reports. – 2020. – Т. 10. – №. 1. – С. 5798.
- 339 Batool S. et al. Addressing artifacts of colorimetric anticancer assays for plant-based drug development //Medical Oncology. – 2022. – Т. 39. – №. 12. – С. 198.
- 340 Ibiyeye K. M., Idris S. B., Zuki A. B. Z. Cockle shell-derived aragonite calcium carbonate nanoparticle for targeting cancer and breast cancer stem cells //Cancer Nanotechnology. – 2020. – Т. 11. – С. 1-15.
- 341 Danmaigoro A. et al. Toxicity and safety evaluation of doxorubicin-loaded cockleshell-derived calcium carbonate nanoparticle in dogs //Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences. – 2018. – Т. 2018.
- 342 Ghaji M. S. et al. Novel synthesis of nanoparticles from cockle shells via mechanical method for cytarabine drug release //Journal of computational and theoretical nanoscience. – 2018. – Т. 15. – №. 4. – С. 1128-1136.
- 343 Razzaghi S. et al. Spherical PEG/SiO₂ promising agents for Lamivudine antiviral drug delivery, a molecular dynamics simulation study //Scientific Reports. – 2023. – Т. 13. – №. 1. – С. 3323.
- 344 Abu-Dief A. M. et al. Recent advances in mesoporous silica nanoparticles for targeted drug delivery applications //Current Drug Delivery. – 2022. – Т. 19. – №. 4. – С. 436-450

- 345 Mezan S. O. Silica/Polystyrene Nanocomposite (SiO₂/PsNCs) using Sol-Gel Method Drug Delivery System: A Review //Design Engineering. – 2021. – C. 10175-10181.
- 346 Ortiz-Islas E. et al. Mesoporous silica nanoparticles functionalized with folic acid for targeted release Cis-Pt to glioblastoma cells //Reviews on Advanced Materials Science. – 2021. – T. 60. – №. 1. – C. 25-37.
- 347 Miao C. et al. The size-dependent in vivo toxicity of amorphous silica nanoparticles: A systematic review //Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2024. – T. 271. – C. 115910.
- 348 Zhuang J., Yu Y., Lu R. Mesoporous silica nanoparticles as carrier to overcome bacterial drug resistant barriers //International Journal of Pharmaceutics. – 2023. – T. 631. – C. 122529.
- 349 Selvarajan V., Obuobi S., Ee P. L. R. Silica nanoparticles—a versatile tool for the treatment of bacterial infections //Frontiers in Chemistry. – 2020. – T. 8. – C. 602.
- 350 Abu-Dief A. M. et al. Recent advances in mesoporous silica nanoparticles for targeted drug delivery applications //Current Drug Delivery. – 2022. – T. 19. – №. 4. – C. 436-450.
- 351 Racles C. et al. Functionalized Mesoporous Silica as Doxorubicin Carriers and Cytotoxicity Boosters //Nanomaterials. – 2022. – T. 12. – №. 11. – C. 1823
- 352 Khatami F. et al. Targeted delivery system using silica nanoparticles coated with chitosan and AS1411 for combination therapy of doxorubicin and anti miR-21 //Carbohydrate Polymers. – 2021. – T. 266. – C. 118111.
- 353 Al-Nadaf A. H. et al. Folic acid-hydrophilic polymer coated mesoporous silica nanoparticles target doxorubicin delivery //Pharmaceutical Development and Technology. – 2021. – T. 26. – №. 5. – C. 582-591.
- 354 Hakeem A. et al. Polyaspartic acid-anchored mesoporous silica nanoparticles for pH-responsive doxorubicin release //International Journal of Nanomedicine. – 2018. – C. 1029-1040.
- 355 Moodley T., Singh M. Sterically stabilised polymeric mesoporous silica nanoparticles improve doxorubicin efficiency: Tailored cancer therapy //Molecules. – 2020. – T. 25. – №. 3. – C. 742.
- 356 Qin Y. et al. Study of pH-responsive and polyethylene glycol-modified doxorubicin-loaded mesoporous silica nanoparticles for drug delivery //Journal of Nanoscience and Nanotechnology. – 2020. – T. 20. – №. 10. – C. 5997-6006.
- 357 Ferjaoui Z. et al. Doxorubicin-loaded thermoresponsive superparamagnetic nanocarriers for controlled drug delivery and magnetic hyperthermia applications //ACS applied materials & interfaces. – 2019. – T. 11. – №. 34. – C. 30610-30620.

- 358 Heggannavar G. B. et al. Development of doxorubicin-loaded magnetic silica-pluronic F-127 nanocarriers conjugated with transferrin for treating glioblastoma across the blood-brain barrier using an in vitro model //ACS omega. – 2018. – T. 3. – №. 7. – C. 8017-8026.
- 359 Hervault A. et al. Doxorubicin loaded dual pH-and thermo-responsive magnetic nanocarrier for combined magnetic hyperthermia and targeted controlled drug delivery applications //Nanoscale. – 2016. – T. 8. – №. 24. – C. 12152-12161.
- 360 Nguyen T. N. et al. Optical properties of doxorubicin hydrochloride load and release on silica nanoparticle platform //Molecules. – 2021. – T. 26. – №. 13. – C. 3968.
- 361 Ahmed H. et al. Biomedical applications of mesoporous silica nanoparticles as a drug delivery carrier //Journal of Drug Delivery Science and Technology. – 2022. – T. 76. – C. 103729.
- 362 Zhao H. et al. Environmental stimulus-responsive mesoporous silica nanoparticles as anticancer drug delivery platforms //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2024. – C. 113758.
- 363 Mdlovu N. V. et al. Green synthesis and characterization of silicate nanostructures coated with Pluronic F127/gelatin for triggered drug delivery in tumor microenvironments //International Journal of Biological Macromolecules. – 2023. – T. 251. – C. 126337.
- 364 Luo W. et al. Polyethylenimine-CO₂ adduct templated CaCO₃ nanoparticles as anticancer drug carrier //Cancer Nanotechnology. – 2023. – T. 14. – №. 1. – C. 7.
- 365 Zhu H. et al. Preparation of pH-Responsive Hydroxyapatite-Encapsulated Magnetic Fe₃O₄ Composite Materials with Sandwich Construction for Drug Delivery of Doxorubicin //Science of Advanced Materials. – 2019. – T. 11. – №. 10. – C. 1353-1361.
- 366 Zhang Z. et al. Nucleic acid-based therapy for brain cancer: Challenges and strategies //Journal of Controlled Release. – 2022. – T. 350. – C. 80-92.
- 367 Mendes B. B. et al. Nanodelivery of nucleic acids //Nature reviews Methods primers. – 2022. – T. 2. – №. 1. – C. 24.
- 368 Nsairat H. et al. Recent advances in using liposomes for delivery of nucleic acid-based therapeutics //OpenNano. – 2023. – T. 11. – C. 100132.
- 369 Lin M., Qi X. Advances and challenges of stimuli-responsive nucleic acids delivery system in gene therapy //Pharmaceutics. – 2023. – T. 15. – №. 5. – C. 1450.
- 370 Kamegawa R., Naito M., Miyata K. Functionalization of silica nanoparticles for nucleic acid delivery //Nano Research. – 2018. – T. 11. – C. 5219-5239.
- 371 Male D., Gromnicova R. Nanocarriers for Delivery of Oligonucleotides to the CNS //International journal of molecular sciences. – 2022. – T. 23. – №. 2. – C. 760.

- 372 Wu L. et al. Delivery of therapeutic oligonucleotides in nanoscale //Bioactive materials. – 2022. – T. 7. – C. 292-323.
- 373 Epanchintseva A. V. et al. Effect of fluorescent labels on DNA affinity for gold nanoparticles //Nanomaterials. – 2021. – T. 11. – №. 5. – C. 1178.
- 374 Chavany C. et al. Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as polymeric carriers for antisense oligonucleotides //Pharmaceutical research. – 1992. – T. 9. – C. 441-449.
- 375 Bulgakova A., Chubarov A., Dmitrienko E. Magnetic nylon 6 nanocomposites for the microextraction of nucleic acids from biological samples //Magnetochemistry. – 2022. – T. 8. – №. 8. – C. 85.
- 376 Bobrikova E., Chubarov A., Dmitrienko E. The Effect of pH and Buffer on Oligonucleotide Affinity for Iron Oxide Nanoparticles //Magnetochemistry. – 2021. – T. 7. – №. 9. – C. 128.
- 377 Sousa de Almeida M. et al. Cellular uptake of silica particles influences EGFR signaling pathway and is affected in response to EGF //International Journal of Nanomedicine. – 2023. – C. 1047-1061.
- 378 Susnik E. et al. Increased uptake of silica nanoparticles in inflamed macrophages but not upon co-exposure to micron-sized particles //Cells. – 2020. – T. 9. – №. 9. – C. 2099.
- 379 Horie M. et al. Evaluation of cellular influences caused by calcium carbonate nanoparticles //Chemico-biological interactions. – 2014. – T. 210. – C. 64-76.
- 380 Zhang Y. et al. Engineered Silica Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery //Small Methods. – 2024. – T. 8. – №. 3. – C. 2300812.
- 381 Ochoa S., Milam V. T. Modified nucleic acids: Expanding the capabilities of functional oligonucleotides //Molecules. – 2020. – T. 25. – №. 20. – C. 4659.
- 382 Santa P. et al. The role of nucleases and nucleic acid editing enzymes in the regulation of self-nucleic acid sensing //Frontiers in immunology. – 2021. – T. 12. – C. 629922.
- 383 Clavé G. et al. Modified internucleoside linkages for nuclease-resistant oligonucleotides //RSC Chemical Biology. – 2021. – T. 2. – №. 1. – C. 94-150.
- 384 Sridharan K. et al. Evaluation of CYP2C19, P2Y12, and ABCB1 polymorphisms and phenotypic response to clopidogrel in healthy Indian adults //Indian Journal of Pharmacology. – 2016. – T. 48. – №. 4. – C. 350-354.
- 385 Sallam M. A. et al. Formulation-based approaches for dermal delivery of vaccines and therapeutic nucleic acids: Recent advances and future perspectives //Bioengineering & Translational Medicine. – 2021. – T. 6. – №. 3. – C. e10215.
- 386 Juliano R. L. The delivery of therapeutic oligonucleotides //Nucleic acids research. – 2016. – T. 44. – №. 14. – C. 6518-6548.

387 Патент № 2708237 Российская Федерация, МПК С 2. МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДЫ И СПОСОБ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ : № 2014134380 : заявл. 22.08.2014 : опубл. 05.12.2019 / Стеценко Д. А., Купрюшкин М. С., Пышный Д. В. – 75 с.

388 Kupryushkin M. S. et al. Efficient functionalization of oligonucleotides by new achiral nonnucleosidic monomers //Organic letters. – 2014. – Т. 16. – №. 11. – С. 2842-2845.

389 Golyshev V. M., Pyshnyi D. V., Lomzov A. A. Effects of phosphoryl guanidine modification of phosphate residues on the structure and hybridization of oligodeoxyribonucleotides //The Journal of Physical Chemistry B. – 2021. – Т. 125. – №. 11. – С. 2841-2855.

390 Kupryushkin M. S. et al. Antisense oligonucleotide gapmers containing phosphoryl guanidine groups reverse MDR1-mediated multiple drug resistance of tumor cells //Molecular Therapy-Nucleic Acids. – 2022. – Т. 27. – С. 211-226.



Отчет о проверке

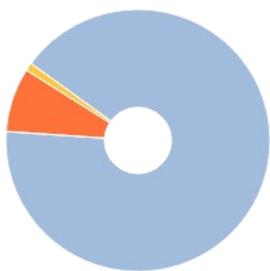
Автор: Попова Виктория Константиновна

Проверяющий: Мирошниченко Светлана Константиновна

Название документа: Диссер 11.9.24_wr

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ

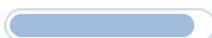
Тариф: FULL



Совпадения:
7,8%



Оригинальность:
91,94%



Цитирования:
0%



Самоцитирования:
0,26%



«Совпадения», «Цитирования», «Самоцитирования», «Оригинальность» являются отдельными показателями, отображаются в процентах и в сумме дают 100%, что соответствует проверенному тексту документа.

- **Совпадения** — фрагменты проверяемого текста, полностью или частично сходные с найденными источниками, за исключением фрагментов, которые система отнесла к цитированию или самоцитированию. Показатель «Совпадения» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к совпадениям, в общем объеме текста.
- **Самоцитирования** — фрагменты проверяемого текста, совпадающие или почти совпадающие с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа. Показатель «Самоцитирования» — это доля фрагментов текста, отнесенных к самоцитированию, в общем объеме текста.
- **Цитирования** — фрагменты проверяемого текста, которые не являются авторскими, но которые система отнесла к корректно оформленным. К цитированиям относятся также шаблонные фразы; библиография; фрагменты текста, найденные модулем поиска «СПС Гарант: нормативно-правовая документация». Показатель «Цитирования» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к цитированию, в общем объеме текста.
- **Текстовое пересечение** — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
- **Источник** — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
- **Оригинальный текст** — фрагменты проверяемого текста, не обнаруженные ни в одном источнике и не отмеченные ни одним из модулей поиска. Показатель «Оригинальность» — это доля фрагментов проверяемого текста, отнесенных к оригинальному тексту, в общем объеме текста.

Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые совпадения проверяемого документа с проиндексированными в системе источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности совпадений или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

Номер документа: 26

Тип документа: Не указано

Дата проверки: 11.09.2024 12:40:53

Дата корректировки: 11.09.2024 12:48:52

Количество страниц: 150

Символов в тексте: 272151

Слов в тексте: 35145

Число предложений: 3076

Комментарий: не указано

ПАРАМЕТРЫ ПРОВЕРКИ

Выполнена проверка с учетом редактирования: Да

Выполнено распознавание текста (OCR): Да

Выполнена проверка с учетом структуры: Нет

Модули поиска: Шаблонные фразы, Публикации РГБ (переводы и перефразирования), Цитирование, Переводные заимствования (KyEn), Библиография, Публикации eLIBRARY, Публикации РГБ, Перефразирования по коллекции IEEE, Переводные заимствования по Интернету (KyRu), Сводная коллекция ЭБС, Диссертации НББ, Переводные заимствования (RuEn), Переводные заимствования*, СПС ГАРАНТ: аналитика, Переводные заимствования по Интернету (KkRu), ИПС Адилет, Перефразирования по Интернету (EN), Медицина, Патенты СССР, РФ, СНГ, СМИ России и СНГ, Переводные заимствования (KkEn), Переводные заимствования по Интернету (EnRu), Перефразирования по Интернету, Переводные заимствования IEEE, Переводные заимствования по коллекции Гарант: аналитика, Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Коллекция НБУ, IEEE, СПС ГАРАНТ: нормативно-правовая документация, Кольцо вузов, Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте, Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования), Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика, Кольцо вузов (переводы и перефразирования), Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте, Интернет Плюс*

🚫 **Модули, недоступные в рамках тарифа:** Интернет Free

ИСТОЧНИКИ

№	Доля в тексте	Доля в отчете	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Комментарий
[01]	5,78%	0%	Фоменко, В.К. дипломная работа	07 Июн 2020	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[02]	4,96%	0%	Диплом_Фоменко_ВК	11 Июн 2020	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[03]	3,01%	0%	Епанчинцева, Анна Валерьевна ... http://dlib.rsl.ru	12 Янв 2021	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[04]	2,63%	0%	Диплом_Фоменко_ВК	11 Июн 2020	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[05]	2,51%	2,41%	Фоменко, В.К. дипломная работа	07 Июн 2020	Кольцо вузов	
[06]	1,47%	0%	Дипломная работа Горбуновой Е...	26 Мая 2022	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[07]	1,44%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/... http://niboch.nsc.ru	11 Июл 2020	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[08]	1,16%	1%	Исследование взаимодействия н... http://elibrary.ru	24 Июн 2017	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[09]	0,84%	0%	Епанчинцева, Анна Валерьевна ... http://dlib.rsl.ru	12 Янв 2021	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[10]	0,81%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/... http://niboch.nsc.ru	08 Июн 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[11]	0,76%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/... http://niboch.nsc.ru	11 Июл 2020	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[12]	0,73%	0%	Власова, Ксения Юрьевна Магн... http://dlib.rsl.ru	27 Дек 2019	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[13]	0,65%	0,65%	Электростатическая стабилизац... http://elibrary.ru	04 Фев 2020	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[14]	0,58%	0,46%	Повышение способности липопр...	25 Ноя 2023	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[15]	0,52%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/... http://niboch.nsc.ru	19 Июн 2022	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[16]	0,52%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/... http://niboch.nsc.ru	11 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[17]	0,5%	0%	Ковшова, Татьяна Сергеевна Би... http://dlib.rsl.ru	21 Сен 2021	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[18]	0,48%	0,38%	Дмитриенко, Елена Владимиров... http://dlib.rsl.ru	28 Фев 2015	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	

[19]	0,48%	0,48%	Полный текст диссертации (4/5) http://chem.msu.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	
[20]	0,41%	0%	не указано	13 Янв 2022	Шаблонные фразы	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[21]	0,39%	0,39%	ПРОЦЕССЫ ОБРАЗОВАНИЯ НАНО... http://elibrary.ru	26 Окт 2020	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[22]	0,39%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/... http://niboch.nsc.ru	14 Июн 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[23]	0,38%	0,38%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/... http://niboch.nsc.ru	11 Июл 2020	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	
[24]	0,33%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/... http://niboch.nsc.ru	26 Янв 2021	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[25]	0,29%	0,29%	Генетическая информация как о... http://ivo.garant.ru	18 Июл 2020	Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика	
[26]	0,29%	0%	Diplom_Petrov	10 Июн 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[27]	0,28%	0%	NYmnik_78288. Попова Виктория...	22 Окт 2021	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[28]	0,28%	0%	NYmnik_81629. Попова Виктория...	29 Окт 2021	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[29]	0,27%	0%	Previous seminars at the Landau I... http://itp.ac.ru	23 Фев 2018	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[30]	0,26%	0%	Диссертация на тему «Взаимоде...» https://dissercat.com	23 Июн 2022	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[31]	0,26%	0,26%	ДИЗАЙН МНОГОПАРАМЕТРИЧЕС...	21 Дек 2022	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[32]	0,25%	0%	Епанчинцева, Анна Валерьевна ... http://dlib.rsl.ru	12 Янв 2021	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[33]	0,23%	0,23%	ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ... http://elibrary.ru	30 Авг 2014	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	
[34]	0,23%	0%	openbio_tezis_2023.pdf https://openbio.ru	09 Авг 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[35]	0,22%	0%	Тимошенко, Валентина Викторов... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2020	Публикации РГБ	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[36]	0,22%	0,22%	https://www.jbc.org/article/S0021-... https://jbc.org	27 Янв 2023	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	
[37]	0,2%	0%	[Агравал А. и др.] ; под ред. Кенн... http://dlib.rsl.ru	01 Дек 2014	Публикации РГБ (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[38]	0,19%	0%	https://disser.spbu.ru/files/2022/... https://disser.spbu.ru	31 Дек 2023	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[39]	0,17%	0%	Дипломная работа Горбуновой Е...	26 Мая 2022	Кольцо вузов	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[40]	0,17%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/... http://niboch.nsc.ru	16 Фев 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[41]	0,16%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/... http://niboch.nsc.ru	11 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[42]	0,16%	0%	https://www.ibl-america.com/cont... https://ibl-america.com	05 Июл 2023	Переводные заимствования по коллекции Интернет в английском сегменте	
[43]	0,15%	0,15%	не указано http://ronc.ru	29 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	
[44]	0,15%	0%	Сравнительный анализ ГОСТ 23... http://ivo.garant.ru	22 Янв 2022	Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[45]	0,15%	0%	2019 жылға арналған есепті көші... https://ncste.kz	21 Ноя 2022	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[46]	0,15%	0%	МАТЕРИАЛЫ С УЛУЧШЕННЫМИ ... https://elibrary.ru	31 Дек 2021	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[47]	0,14%	0%	Женя_диплом_ИТОГ_АГ	25 Мая 2022	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[48]	0,14%	0%	Разработка протоколов получен...	21 Дек 2022	Публикации eLIBRARY (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[49]	0,14%	0%	Разработка метода доставки в кл... http://fizmathim.com	29 Авг 2016	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[50]	0,13%	0,13%	Стеценко С.Г., Гончаров Н.Г., Сте... http://ivo.garant.ru	17 Ноя 2012	Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика	
[51]	0,12%	0%	. http://niboch.nsc.ru	30 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[52]	0,12%	0%	tezisi_xi_konferntcii_2021.pdf http://gic.ras.ru	10 Сен 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[53]	0,12%	0,12%	Инновационная активность в ме... http://ivo.garant.ru	12 Фев 2011	Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика	
[54]	0,12%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/... http://niboch.nsc.ru	21 Мая 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[55]	0,11%	0,11%	Нанотехнологии в медицине и ф...	02 Авг 2022	Перефразирования по СПС ГАРАНТ: аналитика	
[56]	0,11%	0,11%	Диплом_Седельникова	04 Июн 2024	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	
[57]	0,11%	0%	Отчёт Лагунов (1)	14 Дек 2023	Кольцо вузов (переводы и перефразирования)	Источник исключен. Причина: Документ не является парафразом источника.
[58]	0,1%	0%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/... http://niboch.nsc.ru	23 Мая 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[59]	0,1%	0,1%	Gas diffusion synthesis of calcium... https://ieeexplore.ieee.org	30 Июн 2023	Переводные заимствования IEEE	
[60]	0,1%	0%	http://www.vector.nsc.ru/userfiles... http://vector.nsc.ru	22 Мар 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[61]	0,09%	0,09%	16.02.16 Диссертация https://altstu.ru	08 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	
[62]	0,08%	0,08%	Synthesis and Characterization of ... https://hindawi.com	05 Янв 2018	Переводные заимствования (RuEn)	
[63]	0,08%	0%	Планы на бутылку - RCC.ru http://rcc.ru	05 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[64]	0,07%	0%	tezisi_xi_konferntcii_2021.pdf http://gic.ras.ru	10 Сен 2024	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[65]	0,07%	0%	bul1.pdf http://niigrafit.ru	10 Сен 2024	Переводные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[66]	0,06%	0%	Вестник РГМУ № 4, 2015 (8/8) http://rsmu.ru	30 Янв 2017	Перефразирования по Интернету	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[67]	0,06%	0%	http://www.genebiology.ru/site/as... http://genebiology.ru	17 Июн 2022	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[68]	0,06%	0%	%D0%9B%D0%B0%D0%9F%D0%B... https://conf.laplas.mephi.ru	09 Сен 2024	Перефразированные заимствования по коллекции Интернет в русском сегменте	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[69]	0,05%	0%	Окислительное расщепление ну... https://fizmathim.com	11 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[70]	0,04%	0%	https://macro.ru/OLD_DOC/counci... https://macro.ru	08 Мая 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[71]	0,04%	0%	https://macro.ru/OLD_DOC/counci... https://macro.ru	11 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[72]	0,03%	0%	Российские нанотехнологии. Т. 1... https://sciencejournals.ru	11 Сен 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[73]	0,03%	0%	https://www.sechenov.ru/upload/i... https://sechenov.ru	30 Мая 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[74]	0,03%	0%	https://biosystemsconf.unn.ru/wp... https://biosystemsconf.unn.ru	23 Мая 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[75]	0,03%	0%	https://rsmu.ru/fileadmin/templat... https://rsmu.ru	24 Апр 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[76]	0,02%	0%	http://www.economdevelopment.r... http://economdevelopment.ru	23 Апр 2024	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[77]	0,02%	0%	https://charityhospital.ru/wp-cont... https://charityhospital.ru	01 Июн 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[78]	0,02%	0%	https://hht.tpu.ru/upload/constru... https://hht.tpu.ru	12 Мар 2023	Интернет Плюс*	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[79]	0,01%	0%	не указано	13 Янв 2022	Цитирование	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
НАУКИ ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И
ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

Отчёт о проверке текста научно-квалификационной работы на
объём заимствования

Попова Виктория Константиновна

«Конструирование биосовместимых нанокompозитных систем инкапсуляции
биологически активных соединений на основе неорганических матриц»

Оригинальность работы составляет 91.94%, что соответствует требованиям
порядка и условиям допуска научно-квалификационных работ к защите на
заседании Итоговой аттестации в аспирантуре ИХБФМ СО РАН.

Проверку выполнила секретарь АК – к.б.н. С.К. Мирошниченко