

На правах рукописи

ПОПОВА ВИКТОРИЯ КОНСТАНТИНОВНА

**НОВЫЕ СПОСОБЫ СИНТЕЗА
НАНОМАТЕРИАЛОВ КАРБОНАТА КАЛЬЦИЯ, ДИОКСИДА
КРЕМНИЯ И ИХ КОМПОЗИТОВ КАК НОСИТЕЛЕЙ
БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

1.4.9. Биоорганическая химия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Новосибирск – 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН)

Научный руководитель:

Дмитриенко Елена Владимировна,
кандидат химических наук,
зав. лабораторией биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН

Официальные оппоненты:

Воробьева Мария Александровна,
кандидат химических наук,
зав. лабораторией химии РНК ИХБФМ СО РАН

Анненков Вадим Владимирович,
доктор химических наук, профессор,
зам. директора Лимнологического института СО РАН по
научной работе

Шестопалов Михаил Александрович,
доктор химических наук,
зав. лабораторией биоактивных неорганических соединений,
Института неорганической химии им. А. В. Николаева СО
РАН

Защита состоится «14» марта 2025 года в 12:00 на заседании диссертационного совета ИХБФМ.02.01 при ИХБФМ СО РАН по адресу: 630090, г. Новосибирск, пр. Ак. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИХБФМ СО РАН и на сайте организации по адресу: www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан «12» февраля 2025 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат химических наук



П.Е. Пестряков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Бурное развитие нанотехнологии за последние 60 лет внедрило в нашу привычную жизнь наноматериалы. Среди них следует отдельно выделить наночастицы, которые заняли свою нишу в области биомедицины, в том числе в качестве компонентов систем терапии и диагностики.

Применение в биомедицинских технологиях накладывает ряд дополнительных ограничений на качество наноматериалов. Основные критерии применимости наноматериалов в биомедицине таковы: размер до 200 нм; монодисперсность; суспензионная стабильность; стабильность в физиологических условиях; функционализируемость; биосовместимость; биоразлагаемость; высокая эффективность взаимодействия с биологически активными соединениями.

Наиболее распространенным компонентом одобренных терапевтических препаратов на основе наноматериалов на сегодняшний день являются липосомы. На их основе уже применяют препараты для лечения онкологических и грибковых заболеваний, а также вакцины, витамины и антисептики. Полимерные наночастицы также нашли применение в качестве компонентов лекарственных препаратов для противоопухолевой терапии. Следующим из распространенных органических материалов, применяемых в исследованиях в области биомедицины, являются белковые наночастицы. На их основе также созданы коммерчески доступные средства, применяемые в качестве контрастирующих веществ и компонентов терапии онкологии.

Неорганические наноматериалы пока являются менее распространенными компонентами терапевтических средств, допущенных к применению, однако на их основе на данный момент существует большой ряд препаратов, проходящих клинические испытания. Их свойства говорят о хорошем потенциале использования в широком спектре терапевтических подходов: лечение злокачественных опухолей путем термальной абляции, антибактериальная терапия и т. д.

Следует отметить, что некоторые препараты, преимущественно на основе железосодержащих частиц, были одобрены для терапевтического применения, но, спустя годы, отозваны. Это может быть связано с накоплением неорганических наночастиц (НЧ) в организме и отложенными проявлениями токсичности. В связи с этим, при создании неорганических наноматериалов следует уделить особое внимание биоразлагаемости и биосовместимости.

С учетом этого опыта в данной работе в качестве носителей биологически активных соединений были выбраны биоразлагаемые пористые наноматериалы на основе карбоната кальция и диоксида кремния. Первые обладают рН-зависимой стабильностью и биоразлагаемостью, что может быть использовано для пассивного транспорта терапевтических средств в области организма с пониженным рН. Диоксид кремния, благодаря увеличенной химической стабильности, может быть функционализован для создания многокомпонентных конструкций. Несмотря на интенсивные исследования в области создания данных наноматериалов, до настоящего времени не решены методологические проблемы получения таких частиц, удовлетворяющих сформулированным выше критериям: наноразмерность, монодисперсность, суспензионная и физиологическая стабильность. Поэтому остается актуальной необходимость разработки и исследования новых конструкций на основе наночастиц.

Целью данной работы является разработка новых способов синтеза и функционализации биосовместимых неорганических наноматериалов карбоната кальция и диоксида кремния, а также исследование их потенциала как носителей биологически активных соединений с контролируемым стимул-чувствительным высвобождением на примере доксорубина.

В ходе работы решались следующие **задачи**:

1. разработать новые подходы к получению суспензии наноматериалов на основе карбоната кальция и диоксида кремния, обеспечивающие субмикронные размеры и высокую степень монодисперсности;
2. определить стабильность полученных наноматериалов в водных растворах и условиях, близких к физиологическим;
3. предложить варианты ковалентного и нековалентного присоединения функциональных молекул к наночастицам;
4. исследовать биологический потенциал полученных ассоциатов наночастиц с доксорубином на моделях *in vitro*.

Научная новизна представляемой работы заключается в разработке новых способов синтеза, позволяющих получать стабильную суспензию наноматериалов на основе карбоната кальция (размером до 200 нм) и наночастиц диоксида кремния с высокой степенью монодисперсности (индекс полидисперсности $0,09 \pm 0,01$). Полученные наночастицы карбоната кальция деградируют в диапазоне рН от 3,0 до 6,0 с увеличением степени деградации при уменьшении рН и полностью растворяются при рН 4,0 и ниже. Впервые были получены гибридные

наноматериалы карбоната кальция со смешанным оксидом железа, стабильные в суспензии, с гидродинамическим размером, потенциально пригодным для внутривенного введения (121 ± 6 нм). Предложены универсальные методы ковалентного присоединения макромолекул (синтетических и природных полимеров) к поверхности полученных наноматериалов. В исследовании продемонстрирована емкость для всех наноматериалов по отношению к доксорубину, превышающая ранее опубликованные результаты. Нековалентные ассоциаты наночастиц карбоната кальция с доксорубином характеризуются 100 % высвобождением лекарства из состава нанокompозита при pH 4,0 и ниже.

Практическая значимость работы заключается в разработке технологически доступных, 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 лекарственным средством – доксорубином. Данные, полученные в работе, могут ускорить дальнейший процесс создания систем доставки лекарств на основе неорганических наноматериалов.

Методология и методы исследования

Основные результаты работы получены методами динамического светорассеяния, жидкостной сцинтилляции, флуориметрии, просвечивающей электронной и конфокальной микроскопии, гель-электрофореза, оптической и ИК-Фурье-спектроскопии, а также методами химического синтеза наноматериалов.

Положения, выносимые на защиту

1. Предложены новые подходы к синтезу суспензионно стабильных монодисперсных частиц на основе карбоната кальция и диоксида кремния размером до 200 нм, в том числе обладающих магнитными свойствами.
2. Полученные наночастицы стабильны при хранении в суспендированной форме до полугода и при инкубации в биологических жидкостях не менее недели. Наночастицы карбоната кальция деградируют при понижении pH раствора в диапазоне от 6,0 до 3,0 с полным разрушением ядра при pH 4,0 и ниже.
3. Ковалентная и нековалентная модификация синтезированных наночастиц позволяет получить носители с новыми свойствами, а в случае

присоединения доксорубина обеспечить высокую емкость загрузки биологически активным соединением.

4. Нековалентные ассоциаты наночастиц с доксорубином характеризуются рН-зависимым профилем высвобождения лекарственного препарата, с повышением степени высвобождения при понижении рН раствора и полным высвобождением лекарственного препарата при рН 4,0 и ниже в случае наночастиц карбоната кальция.

5. Эффективность подавления жизнеспособности онкотрансформированных клеток для всех типов нанокомпозитов с доксорубином сопоставима или превышает эффективность свободного доксорубина в той же концентрации.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в планировании и дизайне экспериментов, а также в подготовке материала к публикациям. Разработаны подходы к получению наноматериалов на основе карбоната кальция и диоксида кремния, в том числе методами осаждения, газовой диффузии и эмульгирования. Все синтезированные материалы охарактеризованы методом динамического светорассеяния (ДСР). Разработаны варианты ковалентного и нековалентного присоединения функциональных молекул к наночастицам. Оценена эффективность взаимодействия наночастиц, модифицированных стрептавидином, с биотинилированными молекулами методом жидкостной сцинтилляции. Проведен анализ полученных ассоциатов наночастиц для доставки доксорубина на моделях *in vitro*.

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, апробированы более чем на 10 научных конференциях всероссийского и международного уровня в виде устных и стендовых докладов.

Часть исследования, касающаяся синтеза наночастиц на основе карбоната кальция и их взаимодействия с олигонуклеотидами, выполнена при поддержке совместного гранта Российского научного фонда (№ 24-24-20105, <https://rscf.ru/project/24-24-20105/>) и Правительства Новосибирской области (соглашение № p-97).

Структура и объем диссертации

Работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 173 страницах, содержит 56 рисунков и 26 таблиц. Библиография включает 377 литературных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** обоснованы актуальность темы исследования, выбор объектов исследования, сформулированы цели работы, приведены основные положения, выносимые на защиту.

В **первой главе** представлен обзор литературы, в котором систематически рассмотрены способы получения наноразмерных частиц карбоната кальция, в том числе с учетом влияния состава реакционной смеси на размер и форму получаемых материалов, а также варианты их использования в качестве носителей биологически активных соединений в таких областях, как системы доставки химиотерапевтических препаратов, нуклеиновых кислот, комбинированная терапия и тканевая инженерия. В этом разделе сформулированы также ключевые требования к характеристикам наноматериалов, определяющие возможность их дальнейшего биомедицинского применения.

Во **второй главе** описаны методики синтеза и функционализации всех представленных в работе наноматериалов и протоколы их исследования методами динамического светорассеяния, просвечивающей электронной и конфокальной микроскопии, оптической и ИК-спектроскопии, условия определения цитотоксичности наноматериалов и их тестирования в качестве носителей таких соединений, как доксорубицин, и инструментов для селективного выделения биотинилированных молекул из раствора.

В **третьей главе** приведены и проанализированы полученные результаты; глава состоит из трех частей, описывающих получение, характеристику и исследование возможностей применения наноматериалов. Первая часть посвящена разработке способов синтеза наночастиц диоксида кремния, карбоната кальция и их композитов, удовлетворяющих критериям: размер до 200 нм и монодисперсность. Во второй части работы исследована стабильность частиц в суспензии и в условиях, приближенных к физиологическим. В третьей части показана возможность ковалентной и нековалентной функционализации наночастиц, а также высокая эффективность взаимодействия с биологически активными соединениями на примере доксорубицина и биотинилированных олигонуклеотидов.

В завершение работы представлены краткое заключение, основные результаты и выводы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез наноматериалов на основе карбоната кальция и диоксида кремния

Несмотря на развитие методологических подходов, получение стабильной суспензии наноматериалов карбоната кальция (CaHЧ) с размером, пригодным для внутривенного введения, остается актуальной задачей. Для получения монодисперсных частиц размером до 200 нм было изучено влияние композиции реакционной смеси на размер и дисперсность получаемых частиц. Варьировали концентрационные параметры, исследовали влияние различных поверхностно активных веществ, конкурентных катионов, а также специфических добавок.

Установлено, что использование метода осаждения в отсутствие дополнительных реагентов приводит к формированию микрометровых частиц. Совместное добавление детергентов, таких как полиэтиленгликоль и Твин 20, позволяет уменьшить размеры частиц до 300 нм. Их сочетание с хлоридом магния и культуральной средой в оптимальных концентрациях позволяет уменьшить размер частиц до 200 нм и увеличить их суспензионную стабильность (рис. 1 А).

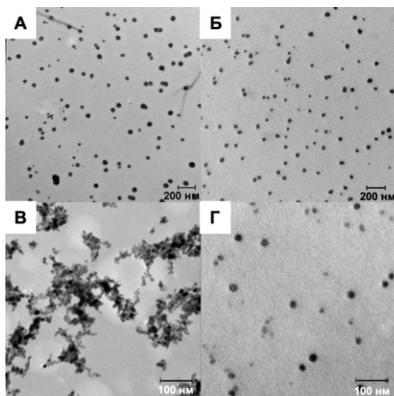


Рисунок 1. ПЭМ изображения CaHЧ (А), CaP (Б), FeHЧ (В), Fe@CaHЧ (Г) (В), полученное методом ДСР

Разработанная методика была также адаптирована для получения монодисперсных частиц фосфата кальция (CaP , рис. 1 Б).

Для уточнения состава частиц, полученных из многокомпонентной реакционной смеси, был проведен энергодисперсионный анализ с поэлементным картированием. Установлено, что полученные наночастицы представлены фазой ватерита, и элементы (кальций, углерод, кислород) равномерно распределены по поверхности наноматериала.

В продолжение работы, с использованием ранее разработанной методики был получен наноккомпозит карбоната кальция с материалом, обладающим магнитными свойствами – смешанным оксидом железа (FeHЧ , рис. 1 В). До настоящего времени описаны лишь немногочисленные примеры таких композитов (Fe@CaHЧ), преимущественно представленные

микроразмерными аналогами, вследствие трудности контролируемого получения наноразмерного карбоната кальция.

В работе получены несколько вариантов Fe@CaНЧ размером до 150 нм. В результате сравнения магнитных свойств, дисперсности и суспензионной стабильности частиц был выбран оптимальный композит (рис. 1 Г).

В литературе описано несколько вариантов получения частиц диоксида кремния (SiНЧ) размером до 200 нм, однако большая часть из них не обладает изолированностью ядер (например, рис. 2 А). В работе исследовали три разных подхода, основанных на гидролизе тетраэтоксисилана: в присутствии детергентов, микроэмульсионный вариант и щелочной гидролиз с добавлением аммиака. В последнем случае оптимизация концентрационных параметров позволила получить высокодисперсные частицы размером около 65 нм (рис. 2 Б, В). Данные динамического светорассеяния (ДСР) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) полученных наночастиц (НЧ) приведены в таблице 1.

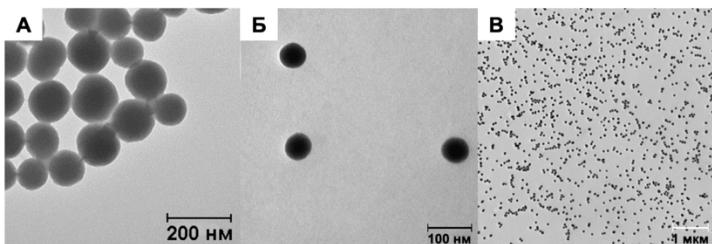


Рисунок 2. ПЭМ изображения SiНЧ, полученных с добавлением 0,2 М ТЭОС (А), изолированных SiНЧ – с добавлением 0,018 М ТЭОС (Б, В)

Таблица 1. Гидродинамический размер (d), размер, определенный методом ПЭМ (D), индекс полидисперсности (ИПД) и поверхностный заряд (ζ -Потенциал) частиц, полученных в работе и выбранных для дальнейшего исследования НЧ

НЧ	d, нм	D, нм	ИПД	ζ -Потенциал, мВ	ПЭМ
CaНЧ	200 ± 10	45 ± 7	$0,10 \pm 0,01$	$-17,3 \pm 0,4$	рис. 1 А
FeНЧ	88 ± 5	11 ± 4	$0,14 \pm 0,02$	$21,6 \pm 0,7$	рис. 1 В
Fe@CaНЧ	121 ± 6	22 ± 1	$0,22 \pm 0,01$	$-15,6 \pm 0,5$	рис. 1 Г
SiНЧ	65 ± 5	62 ± 5	$0,09 \pm 0,01$	$-28,6 \pm 0,2$	рис. 2 Б, В

Состав полученных наноматериалов был подтвержден методом ИК-спектроскопии. Для разработанных методик получения материалов на основе карбоната и диоксида кремния продемонстрирована масштабируемость и воспроизводимость.

Таким образом, предложены новые подходы к синтезу суспензионно стабильных монодисперсных частиц на основе карбоната кальция и диоксида кремния размером до 200 нм, в том числе обладающих магнитными свойствами.

Стабильность полученных наноматериалов в водных растворах и условиях, близких к физиологическим

Стабильность частиц при хранении и в условиях, приближенных к физиологическим, исследовали с помощью ДСР путем регистрации изменения гидродинамического размера частиц в течение времени. Частицы инкубировали в растворах хранения: натрий ацетатный буфер (AcBuf: pH 4,0 – 6,0) – для моделирования условий опухолевого микроокружения, фосфатно-солевой буфер (PBS: pH 7,4) – используется для внутривенных инъекций, DMEM и 10% фетальная бычья сыворотка (FBS) – имитация условий *in vitro* и *in vivo*.

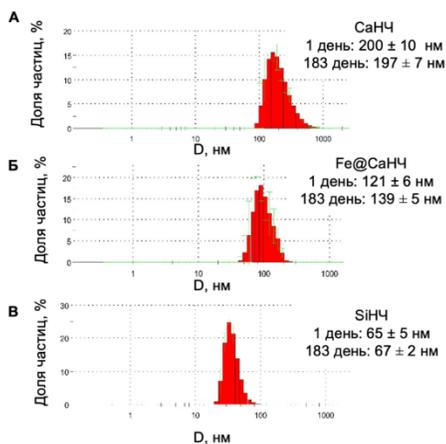


Рисунок 3. Распределение по размеру частиц CaHЧ (А), Fe@CaHЧ (Б), SiHЧ (В), полученное методом ДСР

Продемонстрирована (рис. 3) стабильность полученных наночастиц при хранении в суспензионном виде до полугода, а также до 7 дней в случае инкубации в растворах, приближенных к биологическим.

Кроме того, показано, что CaHЧ деградируют при понижении pH раствора в диапазоне от 6,0 до 3,0 с увеличением степени деградации при уменьшении pH. Установлено 100 % растворение ядра при pH 4,0 и ниже (регистрировали изменение массы образца после 24 ч инкубации в ацетатных буферах с различным pH).

Таким образом, полученные НЧ стабильны при хранении в суспендированной форме до полугода и при инкубации в биологических жидкостях не менее недели. CaHЧ деградируют при понижении pH раствора в диапазоне от 6,0 до 3,0 с полным растворением ядра при pH 4,0 и ниже.

Присоединение функциональных молекул к наночастицам

Ковалентная модификация наночастиц

На следующем этапе предложена универсальная схема ковалентной функционализации наночастиц модифицированными силанами ((3-аминопропил) триэтоксисилан (АПТЭС), тетраэтоксисилан (ТЭОС)) для присоединения молекул, содержащих карбоксильные группы (на примере активированного эфира красителя: цианиновый краситель – Cy5) или содержащих концевую аминогруппу (на примере синтетических и природных полимеров: нейлон-6, стрептавидин (Str), олигонуклеотид (ON)) (рис. 4).

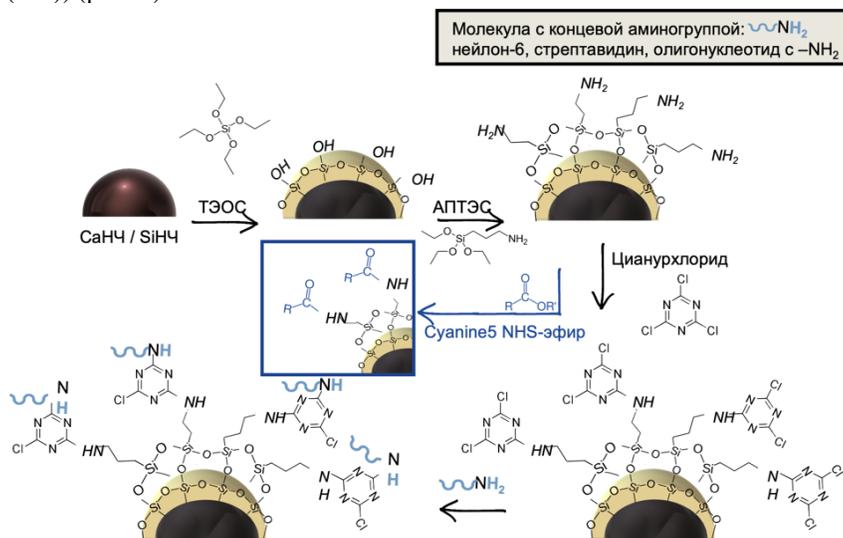


Рисунок 4. Схема ковалентной модификации поверхности НЧ

Данные ДСР и ПЭМ полученных нанокомпозитов приведены на рисунке 5 и в таблице 2. Было обнаружено (рис. 5 Б, Д), что частицы карбоната кальция, покрытые нейлоном, и все полученные капсулы утратили монодисперсность, что говорит о необходимости дальнейшей адаптации, которая выходит за рамки данной работы. Композиты диоксида кремния и нейлона будут исследованы далее в качестве носителя терапевтического агента.

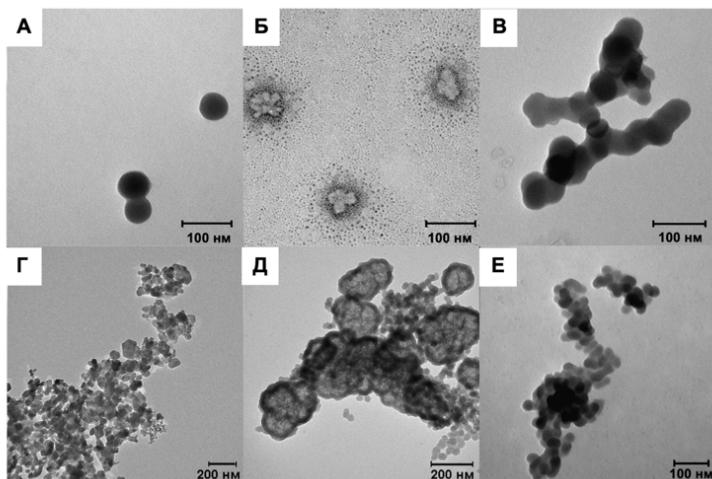


Рисунок 5. ПЭМ изображения SiNHc-нейлон (А), полых капсул после удаления SiNHc (Б), SiNHc-St (В) и CaNHc-нейлон (Г), полых капсулы после удаления CaNHc (Д), CaNHc-Str (Е)

Таблица 2. Гидродинамический размер (d), индекс полидисперсности (ИПД) и поверхностный заряд (ζ -Потенциал) ковалентно модифицированных частиц

НЧ	CaNHc			SiNHc		
	d, нм	ИПД	ζ , мВ	d, нм	ИПД	ζ , мВ
НЧ	200 ± 10	0,10 ± 0,02	-17,3 ± 0,4	63 ± 1	0,09 ± 0,01	-28,6 ± 0,2
НЧ-нейлон	421 ± 8	0,17 ± 0,02	22,5 ± 0,5	110 ± 2	0,26 ± 0,01	30,0 ± 0,4
Капсулы	456 ± 9	0,45 ± 0,03	—	293 ± 9	0,41 ± 0,02	—
НЧ-Str	301 ± 9	0,27 ± 0,02	-18,4 ± 0,2	298 ± 8	0,35 ± 0,03	-29,7 ± 0,3
НЧ-ON	222 ± 7	0,20 ± 0,02	-21,4 ± 0,3	71 ± 5	0,02 ± 0,01	-32,3 ± 0,6
НЧ-Cy5	260 ± 2	0,20 ± 0,02	-24,2 ± 0,3	81 ± 6	0,11 ± 0,01	-30,3 ± 0,8

НЧ-Str были исследованы далее в качестве инструмента для селективного выделения биотинилированных молекул из раствора. Было проведено сравнение коммерческих частиц для магнитного разделения и очистки различных биотинилированных биомолекул (Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles from Promega, MPP) с полученными в работе конструкциям (рис. 6).

Наноматериалы инкубировали с биотинилированными олигонуклеотидами, содержащими 10% радиоактивно меченного образца. Затем удаляли неспецифически связанные молекулы, отделяли олигонуклеотиды от НЧ нагреванием в буферном растворе с меркаптоэтанолом и анализировали полученные образцы гель-

электрофорезом. Регистрацию количественных характеристик проводили с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика. Емкость наноматериалов по биотинилированным молекулам составила $(10,8 \pm 0,7) \times 10^{-6}$, $(9,9 \pm 0,5) \times 10^{-6}$, $(0,95 \pm 0,01) \times 10^{-6}$ моль ON-bio на мг НЧ-Str для SiHЧ-Str, CaHЧ-Str и MPP соответственно.

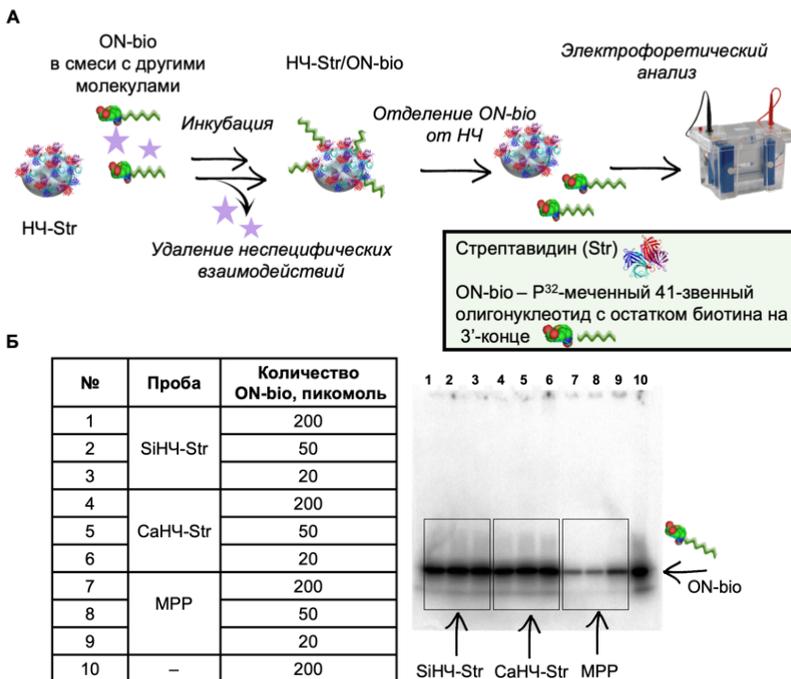


Рисунок 6. Схема связывания наночастиц, модифицированных стрептавидином (Str) с биотинилированными олигонуклеотидами (А), радиоавтограф геля после электрофоретического разделения SiHЧ-Str/ON-bio (слева направо 1 – 3), CaHЧ-Str/ON-bio (4 – 6), MPP/ON-bio (7 – 9), к которым добавляли от 20 до 200 пикомоль ON-bio, и контроль ON-bio (10) (Б)

Эффективность взаимодействия полученных конструкций (НЧ-Str) с биотинилированными молекулами сопоставима с таковой для коммерческих стрептавидин-модифицированных частиц. Созданные наночастицы были использованы для специфического выделения белков из клеточного лизата и их дальнейшей идентификации методом масс-спектроскопического анализа.

Таким образом, ковалентная модификация полученных наночастиц позволила получить носители с новыми свойствами.

Нековалентная модификация наночастиц доксорубицином

На следующем этапе исследовали нековалентные ассоциаты полученных наноматериалов размером до 200 нм с противоопухолевым антибиотиком широкого спектра действия – доксорубицином (DOX, рис. 7). В первую очередь исследовали эффективность включения доксорубицина в состав комплекса со всеми вариантами разработанных наночастиц, а именно CaНЧ, Fe@CaНЧ, SiНЧ и SiНЧ-нейлон. Варьированием отношения НЧ к DOX на этапе инкубации были получены нанокомпозиты с различным содержанием доксорубицина от 25 до 1900 мкг/мг.

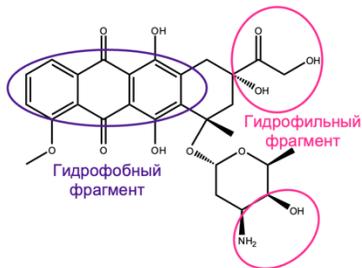


Рисунок 7. Формула DOX

Таким образом, были получены нековалентные ассоциаты наночастиц с доксорубицином, характеризующиеся высокими емкостными показателями, превосходящими известные аналоги.

На следующем этапе работы исследовали оптимальные значения емкости для нанокомпозитов.

В случае чистого карбоната кальция, максимальная емкость является наиболее эффективной, благодаря 100 % извлечению препарата при pH-зависимой деградации наночастиц (рис. 8 – образцы, протестированные в растворах с разным pH, были одинаковыми и содержали 0,2 мг CaНЧ и 132 мкг DOX).

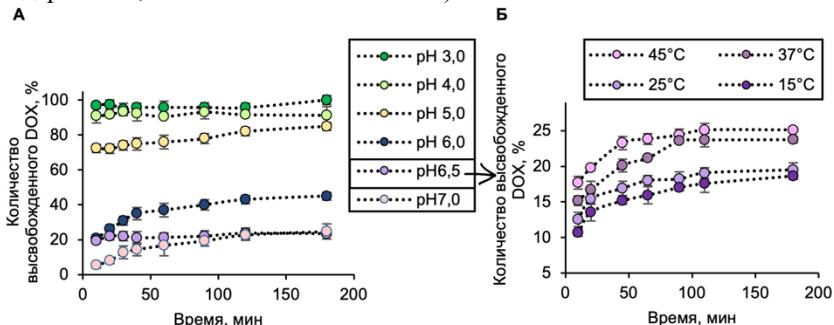


Рисунок 8. График эффективности высвобождения DOX из CaНЧ/DOX от времени при pH 3,0 – 7,0 и 25 °С (А), а также при pH 6,5 и 15 – 45 °С (Б)

Более детально зависимость эффективности извлечения от емкости для других НЧ была рассмотрена на примере Fe@CaНЧ (удельное

количество загруженного на частицы доксорубина в мкг на 1 мг наночастиц указано нижним индексом в шифре нанокompозита).

Для всех вариантов полученных частиц с разным количеством доксорубина показан рН-зависимый профиль высвобождения. Со снижением рН возрастает доля высвобождаемого DOX (рис. 9).

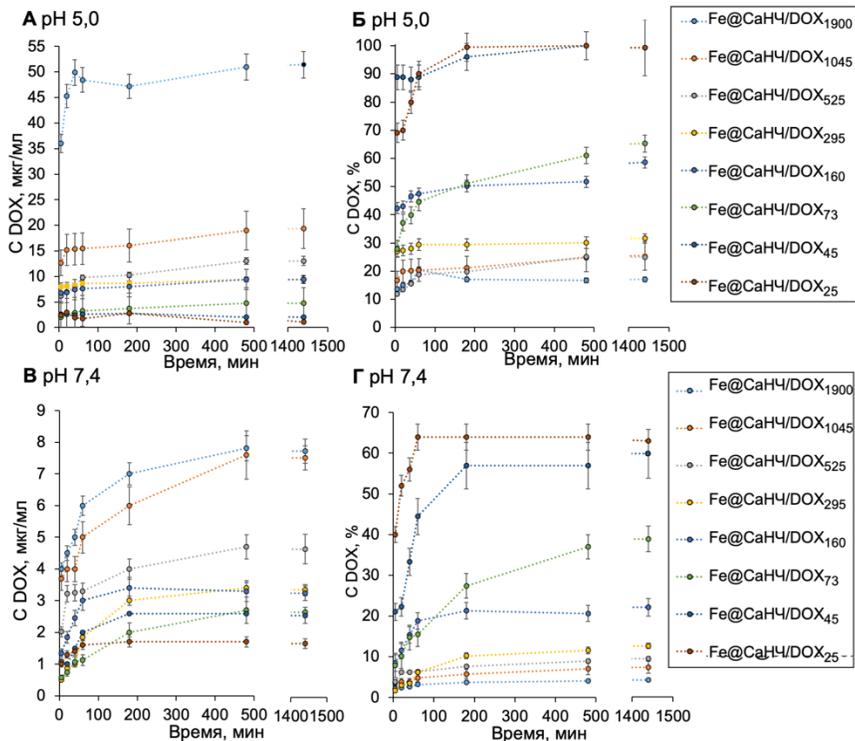


Рисунок 9. Высвобождение доксорубина из состава комплексов Fe@CaH4/DOX, содержащих DOX от 25 до 1900 мкг/мг, при рН 5,0 (А, Б) и рН 7,4 (В, Г) при 25 °С.

При этом из графиков видно (рис. 9 А, Б), что абсолютные значения концентрации высвобожденного доксорубина при рН 5 слабо зависят от его содержания в составе композита. Так, варианты Fe@CaH4/DOX₁₆₀ и Fe@CaH4/DOX₅₂₅ имеют близкие абсолютные показатели (рис. 9 А), несмотря на более чем 2-х кратное отличие содержания DOX в составе нанокompозита. Этот эффект мы связываем со значительным различием эффективности высвобождения лекарства из состава композита (рис. 9 Б, Г).

Предполагается, что при увеличении удельного содержания доксорубина увеличивается доля препарата на поверхности наночастиц, что приводит к образованию неактивного димера доксорубина и снижению эффективности высвобождения лекарства при пониженном pH. Аналогичные серии экспериментов были проведены и для других созданных наноматериалов.

Для всех частиц были выбраны оптимальные значения емкости по доксорубину (160, 258, 493, 659 мкг/мг для Fe@CaНЧ, SiНЧ, SiНЧ-нейлон и CaНЧ соответственно) и показан pH-зависимый профиль его высвобождения (рис. 10).

В исследованном ряду карбонат кальция обладает наибольшей в процентном соотношении эффективностью высвобождения DOX при pH 5,0 и наименьшей при pH 7,0. SiНЧ и SiНЧ-нейлон, как и наноконпозиты карбоната кальция, характеризуются pH-зависимым профилем высвобождения доксорубина, хотя и более слабо выраженным. Это связано с изменением физико-химических свойств доксорубина при протонировании.

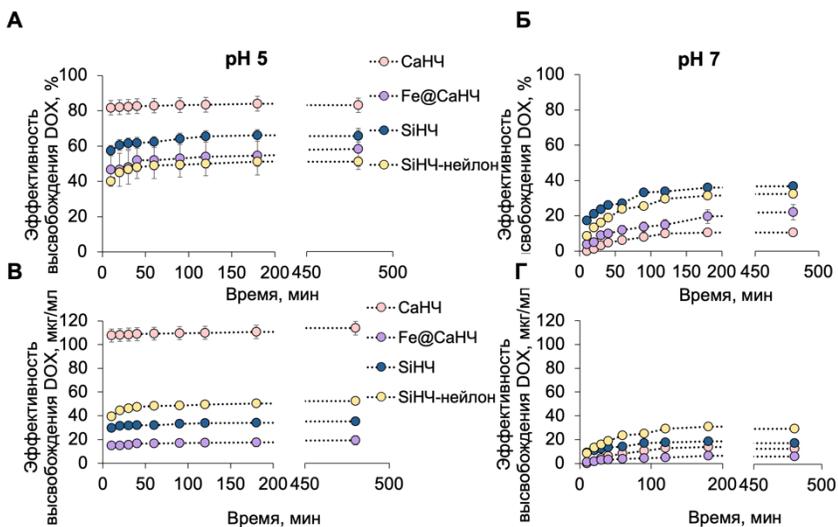


Рисунок 10. Сравнительная эффективность высвобождения DOX из состава CaHCO₃/DOX, Fe@CaHCO₃/DOX, SiHCO₃/DOX и SiHCO₃-нейлон/DOX при pH 5,0 (A, B) и pH 7,4 (B, Г) при 25 °C в % от общего содержания DOX в наноконпозитах (A, B) и в концентрации DOX (B, Г)

Таким образом, нековалентные ассоциаты наночастиц с доксорубицином характеризуются рН-зависимым профилем высвобождения лекарственного препарата с повышением степени высвобождения при понижении рН раствора. В частности, для наночастиц карбоната кальция достигается 100 % высвобождение лекарственного препарата при рН 4,0 и ниже.

Биологический потенциал полученных ассоциатов наночастиц для доставки доксорубицина на моделях *in vitro*

В первую очередь методом МТТ-теста показали отсутствие токсичности НЧ в концентрации до 200 мкг/мл на онкотрансформированных клеточных линиях А549 (линия клеток карциномы легких человека), МСF-7 (линия клеток аденокарциномы молочной железы человека), HeLa (линия клеток раковой опухоли шейки матки) и клетках НЕК 293 (линия клеток эмбриональных почек человека) (рис. 11).

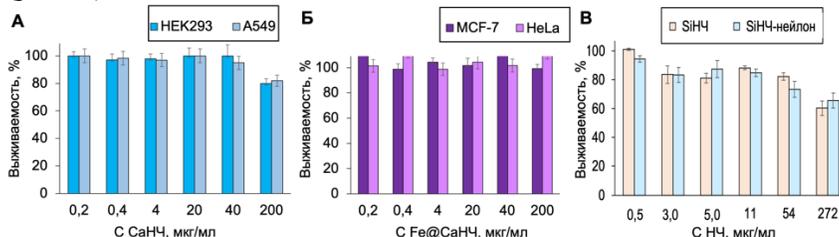


Рисунок 11. Анализ жизнеспособности клеток А549 методом МТТ (А, В), НЕК293 (А) или МСF-7 и HeLa (Б) после их обработки СаНЧ (А), Fe@СаНЧ (Б) и SiНЧ, SiНЧ-нейлон(В) в течение 48 ч

С целью подтверждения предложенной нами гипотезы об образовании неактивного димера доксорубицина и снижении терапевтической эффективности DOX, была исследована цитотоксичность всех полученных ранее комплексов Fe@CaHCO₃/DOX₂₅₋₁₉₀₀ на линиях клеток HeLa и MCF-7. Сравнение эффективности ингибирования клеточной активности проводили в двух вариантах: в зависимости от содержания частиц в образце (рис. 12 Б) и количества доксорубицина (рис. 12 А). Из полученных данных были рассчитаны концентрации полумаксимального ингибирования (IC50, табл. 3).

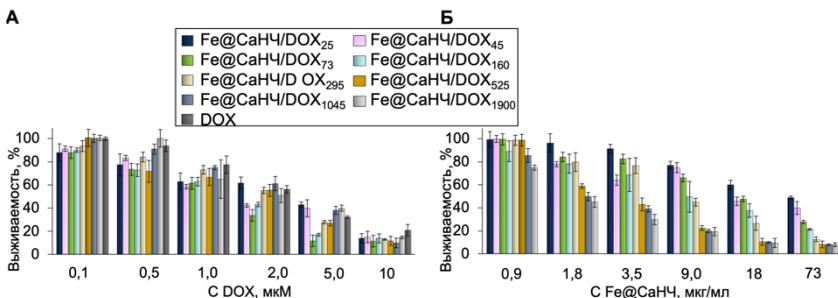


Рисунок 12. Анализ жизнеспособности клеток HeLa в зависимости от количества DOX в образце (А) или концентрации наночастиц (Б), обработанных Fe@CaH₄/DOX в течение 48 ч методом МТТ

Таблица 3. IC50 различных типов Fe@CaH₄/DOX и DOX

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

Из значений IC50 можно заключить, что наиболее эффективным является композит, содержащий 160 мкг доксорубина на 1 мг частиц. Результаты клеточных экспериментов подтверждают гипотезу о различной эффективности высвобождения доксорубина и согласуются с ранее полученными данными о высвобождении DOX в растворе.

В аналогичных *in vitro* экспериментах были исследованы другие полученные нанокompозиты с ранее выбранным содержанием DOX: CaH₄/DOX₆₅₉, SiH₄/DOX₂₅₈, SiH₄-нейлон/DOX₄₉₃ (рис. 13).

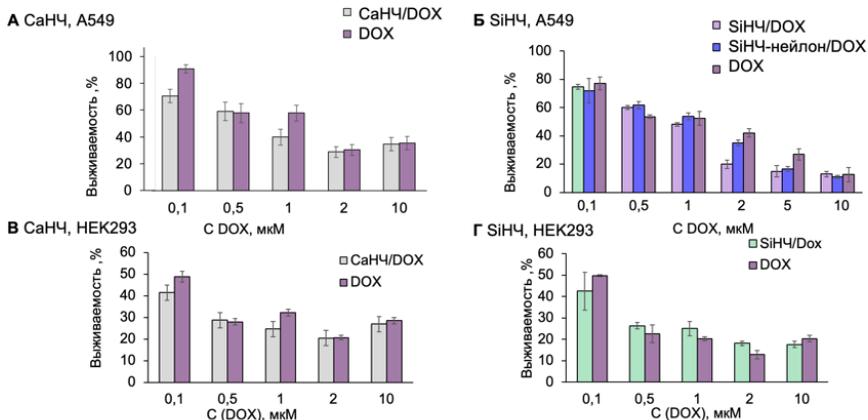


Рисунок 13. Выживаемость клеток A549 (А, Б) и HEK293 (В, Г) в зависимости от количества DOX в образце (А, В) или концентрации частиц (Б, Г), обработанных HЧ/DOX и DOX в течение 48 ч методом МТТ

Результаты экспериментов *in vitro* показывают, что эффективность наноматериалов сопоставима или выше в сравнении с индивидуальным доксорубицином, и клеточные эксперименты согласуются с данными о высвобождении доксорубицина в растворе.

Полученные наносистемы (CaHЧ, SiHЧ) и их модифицированные аналоги (Fe@CaHЧ, SiHЧ-нейлон) были протестированы в качестве носителей противоопухолевого агента – доксорубицина (DOX). Сводная таблица характеристик полученных композитов приведена ниже (таб. 4).

Таблица 4. IC 50 CaHЧ/DOX, Fe@CaHЧ/DOX, SiHЧ/DOX, SiHЧ-нейлон/DOX и DOX для онкотрансформированных клеток

Нанокompозит	мкМ (по содержанию DOX)	мкг/мл (по содержанию HЧ)
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 суммированы значения концентрации нанокompозитов по содержанию частиц или содержанию DOX, необходимые для 50 % ингибирования активности линии раковых клеток (A549 / HeLa).

Таким образом, эффективность подавления жизнеспособности онкотрансформированных клеток для всех типов нанокompозитов с

доксорубицином сопоставима или превышает эффективность свободного доксорубицина.

В заключение работы для CaНЧ и SiНЧ, ковалентно модифицированных красителем Cy5, методом конфокальной микроскопии продемонстрировано проникновение в клетки линии HEK293 (рис. 14).

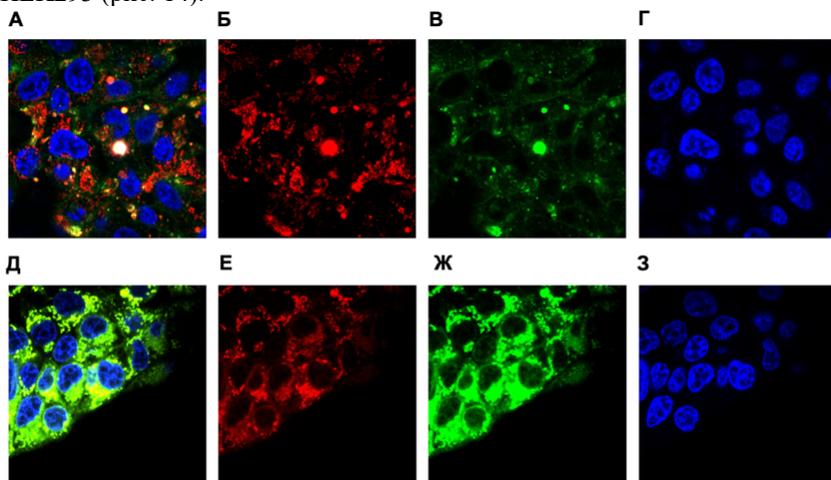


Рисунок 14. Локализация SiНЧ-Cy5 (А-Г) и CaНЧ-Cy5 (Д-З) в клетках HEK293: оптические сканы клеток с визуализацией SiНЧ-Cy5 (Б) и CaНЧ-Cy5 (Е), меченых лизосенсором эндосом (В, Ж), окрашенных красителем Hoechst ядер (Г, З) и их колоколизации (А, Д).

На рисунке 14 представлены оптические сканы клеток с визуализацией наночастиц (SiНЧ-Cy5 – Б, CaНЧ-Cy5 – Е), меченых лизосенсором эндосом (В, Ж), клеточных ядер, окрашенных интеркалирующим красителем (Hoechst), который проникает через мембраны живых клеток (Г, З), и их колоколизация (А, Д). Видно, что часть сигнала от наночастиц локализована в эндосомах.

Методом конфокальной микроскопии была подтверждена способность SiНЧ и CaНЧ преодолевать клеточную мембрану.

ВЫВОДЫ

1. Предложены новые подходы к синтезу суспензионно стабильных 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 рН раствора:

- 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;

- показана стабильность наноматериалов (изменение гидродинамических размеров не более 10 %) в течение 7 дней инкубации в фосфатно-солевом буфере, клеточной среде и фетальной бычьей сыворотке;

- показан рН-зависимый профиль деградации наночастиц карбоната кальция в диапазоне от 3,0 до 6,0 с увеличением степени деградации при уменьшении рН и полным растворением ядра при рН 4,0 и ниже.

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

- получены многофункциональные композиты с развитой поверхностью на основе наночастиц диоксида кремния и карбоната кальция с ковалентно-присоединенным полимером: нейлоном-6, стрептавидином, олигонуклеотидом;

- получены нековалентные ассоциаты наночастиц с доксорубицином, характеризующиеся высокими емкостными показателями, превосходящими известные аналоги, а также рН-зависимым профилем высвобождения препарата (для наночастиц карбоната кальция достигается 100 % высвобождение лекарства при рН 4);

4. Показана способность полученных наночастиц выступать в качестве эффективных средств доставки терапевтических агентов *in vitro*:

- продемонстрировано внутриклеточное накопление наночастиц диоксида кремния и карбоната кальция;

- для всех типов нанокompозитов с доксорубицином продемонстрирована эффективность в подавлении жизнеспособности онкотрансформированных клеток, сопоставимая или выше, в сравнении с индивидуальным препаратом.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ ИЗЛОЖЕНО В СЛЕДУЮЩИХ ПУБЛИКАЦИЯХ

1. Popova V., Poletaeva Y., Pyshnaya I., Pyshnyi D., Dmitrienko E. Designing pH-dependent systems based on nanoscale calcium carbonate for the delivery of an antitumor drug // *Nanomaterials*. — 2021. — Vol. 11. — N 11. — P. 2794.
2. Popova V., Poletaeva Y., Chubarov A., Dmitrienko E. pH-Responsible Doxorubicin-Loaded $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{CaCO}_3$ Nanocomposites for Cancer Treatment // *Pharmaceutics*. — 2023. — Vol. 15. — N 3. — P. 771.
3. Popova V., Dmitrienko E., Chubarov A. Magnetic Nanocomposites and Imprinted Polymers for Biomedical Applications of Nucleic Acids // *Magnetochemistry*. — 2022. — Vol. 9. — N 1. — P. 12.
4. Popova V., Poletaeva Y., Chubarov A., Pyshnyi D., Dmitrienko E. Doxorubicin-Loaded Silica Nanocomposites for Cancer Treatment // *Coatings*. — 2023. — Vol. 13. — N 2. — P. 324.
5. Паллаева Т.Н., Михеев А.В., Хмеленин Д.Н., Еуров Д.А., Курдюков Д.А., Попова В.К., Дмитриенко Е.В., Трушина Д.Б. Высокоемкие частицы карбоната кальция как основа для pH-чувствительных контейнеров для доксорубина // *Кристаллография*. — 2023. — Т. 68. — № 2. — Т. 298-305.
6. Попова В.К., Полетаева Ю.Е., Пышный Д.В., Дмитриенко Е.В. Способ получения суспензии биodeградируемого наноматериала неорганических солей кальция. Патент РФ № 2787956 РФ, приоритет от 13.09.2023.

