

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

На правах рукописи

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

ПОПОВА ВИКТОРИЯ КОНСТАНТИНОВНА

1.4.9. Биоорганическая химия

**Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата химических наук**

**Научный руководитель:
кандидат химических наук
Дмитриенко Елена Владимировна**

Новосибирск – 2025

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ.....	5
2. НАНОЧАСТИЦЫ КАРБОНАТА КАЛЬЦИЯ Как носители для терапевтических препаратов (обзор литературы).....	10
2.1 Синтез наночастиц карбоната кальция	15
2.1.1 Синтез наночастиц карбоната кальция методом осаждения	17
2.1.2 Синтез наночастиц карбоната кальция методом газовой диффузии	25
2.1.3 Синтез наночастиц карбоната кальция методом эмульгирования	30
2.1.4 Синтез наночастиц карбоната кальция с использованием природных источников.....	36
2.2 Применение наночастиц карбоната кальция в биомедицине	40
2.2.1 Использование наночастиц карбоната кальция для доставки низкомолекулярных химиотерапевтических препаратов при противоопухолевой терапии	41
2.2.2 Системы доставки нуклеиновых кислот / генная терапия	57
2.2.3 Терапия, комбинированная с диагностическими методами	63
2.2.3.1 Терапия под контролем ультразвука (УЗ)	63
2.2.3.2 Фотодинамическая терапия.....	65
2.2.3.3 Терапия, совмещённая с МРТ	67
2.2.4 Тканевая инженерия.....	67
2.3 Заключение	72
3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	74
3.1 Реагенты	74
3.2 Оборудование	76
3.3 Методики экспериментов	77
3.3.1 Синтез наночастиц	77
3.3.1.1 Синтез наночастиц карбоната кальция (CaHЧ).....	77
3.3.1.2 Синтез наночастиц фосфата кальция (CaP).....	77
3.3.1.3 Синтез гибридных наночастиц карбоната кальция и смешанного оксида железа (Fe@CaHЧ).....	78
3.3.1.4 Синтез наночастиц диоксида кремния (SiHЧ)	78
3.3.2 Определение устойчивости наночастиц в водных растворах и условиях близких к физиологическим	79
3.3.2.1 Исследование изменения гидродинамического размера наноматериалов при хранении. 79	
3.3.2.2 Исследование массы сухого остатка нано- и микроматериалов при хранении (установление диапазона pH-зависимости CaHЧ)	79

3.3.3 Ковалентная модификация наноматериалов	80
3.3.3.1 Ковалентное присоединение активированного эфира красителя Cyanine5	80
3.3.3.2 Ковалентное присоединение полимера (белкового / синтетического) или олигонуклеотида с NH ₂ -группой на поверхность CaНЧ и SiНЧ.....	80
3.3.3.3 УФ-иммобилизация олигонуклеотидов на поверхность наночастиц, модифицированных нейлоном-6.....	81
3.3.4 Селективное присоединение биотинилированных олигонуклеотидов на поверхность наночастиц с ковалентно присоединённым стрептавидином.....	82
3.3.4.1 Приготовление цельноклеточного экстракта	82
3.3.4.2 Взаимодействие биотинилированных НК с белками клеточного экстракта.....	82
3.3.4.3 Выделение биотинилированных НК после взаимодействия с белками из клеточного экстракта	83
3.3.5 Создание комплекса наноматериалов с доксорубицином.....	83
3.3.6 Разрушение комплекса наноматериалов с доксорубицином	84
3.4 Методы измерений и анализа.....	84
3.4.1 Исследование цитотоксичности наноматериалов и их композитов с БАС.....	84
3.4.1.1 Метод МТТ-теста	84
3.4.1.2 Исследование эффективности клеточного проникновения нанокompозитов методом конфокальной микроскопии.....	85
3.4.2 Регистрация размера и поверхностных свойств наночастиц.....	85
3.4.2.1 Метод динамического светорассеяния.....	85
3.4.2.2 Метод просвечивающей электронной микроскопии	86
3.4.3 Регистрация ёмкостных характеристик наноматериалов по оптической плотности	86
3.4.4 Введение радиоактивного фосфата на 5`-конец НК	86
3.4.5 Осаждение олигонуклеотидов 2 % раствором LiClO ₄ в ацетоне.....	86
3.4.6 Анализ методом гель-электрофореза в полиакриламидном геле.....	87
3.4.7 ИК-спектроскопия.....	87
3.4.8 Статистические методы	87
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	88
4.1 Синтез неорганических наночастиц.....	89
4.1.1 Синтез наночастиц карбоната кальция	89
4.1.1.1 Синтез гибридных наночастиц карбоната кальция и смешанного оксида железа (Fe@CaНЧ).....	96
4.1.2 Синтез наночастиц диоксида кремния	99

4.2 Исследование стабильности полученных наноматериалов в водных растворах и физиологических жидкостях.....	101
4.3 Модификация поверхности неорганических наночастиц и доказательство их биомедицинской применимости.....	104
4.3.1 Ковалентная модификация наночастиц	104
4.3.1.1 Ковалентное присоединение полимера (белкового / синтетического) на поверхность CaНЧ и SiНЧ	105
4.3.1.2 Присоединение олигонуклеотидов на поверхность наночастиц, ковалентно модифицированных полимером	109
4.3.1.2.1 УФ-иммобилизация олигонуклеотидов на поверхность наночастиц (НЧ-нейлон).....	110
4.3.1.2.2 Селективное присоединение биотинилированных олигонуклеотидов на поверхность наночастиц (НЧ-St)	111
4.3.2 Нековалентная модификация наночастиц	117
4.3.2.1 Дизайн систем доставки малых лекарственных молекул	118
4.3.2.1.1 Наночастицы карбоната кальция в качестве носителя доксорубицина.....	120
4.3.2.1.1.1 Создание композита доксорубицина с нанонесителями на основе карбоната кальция и исследование условий разрушения этого комплекса	121
4.3.2.1.1.2 Исследование терапевтической эффективности комплекса лекарства с нанонесителями на основе карбоната кальция на клеточных линиях	128
4.3.2.1.2 Системы доставки малых лекарственных молекул на основе наноматериалов диоксида кремния.....	133
4.3.2.1.2.1 Создание композита доксорубицина с нанонесителями на основе диоксида кремния и исследование условий разрушения этого комплекса	133
4.3.2.1.2.2 Исследование терапевтической эффективности комплекса доксорубицина с нанонесителями на основе диоксида кремния на клеточных линиях.....	136
4.3.2.1.2.3 Исследование эффективности внутриклеточного проникновения полученных нанонесителей	139
4.4 Заключение	143
5. ВЫВОДЫ.....	144
6. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	145
7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	146

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, так и фармакодинамических. В результате может достигаться увеличение пролонгированности, физиологической стабильности и растворимости, а также увеличение направленности воздействия. Разработка качественных носителей для доставки лекарственных препаратов позволит решить многие задачи здравоохранения, такие как повышение эффективности лечения злокачественных новообразований (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 своим размерам, обладают увеличенной удельной площадью поверхности, улучшенным проникновением в компартменты клеток, 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 хронической токсичности и накопления частиц в печени, почках и других органах. Кроме того, пористая структура, характерная для этих типов 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, например, в опухолевые ткани. Однако частицы карбоната кальция склонны к формированию микрометровых кристаллов, которые не соответствуют требованиям биомедицинского применения из-за размеров наночастиц, дисперсности и стабильности суспензий. Диоксид кремния обладает высокой стабильностью в различных растворителях, что обеспечивает возможность проведения реакций функционализации и придания системе новых 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 доставки биологически активных соединений, способных направленно доставлять транспортируемые молекулы в заданную область, возможно создание нового перспективного биodeградируемого 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 молекулам в биологических жидкостях для нужд диагностики и тераностики.

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.

Задачи, которые необходимо решить для достижения цели:

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 pH от 3,0 до 6,0 с увеличением степени деградации при уменьшении pH и полностью растворяются при pH 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 ёмкость для всех наноматериалов по

отношению к доксорубину, превышающая литературные данные. Нековалентные ассоциаты наночастиц карбоната кальция с доксорубином характеризуются 100 % высвобождением лекарства из состава нанокомпозита при pH 4,0 и ниже.

Практическая значимость исследования 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 растворением 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 ёмкость загрузки биологически активным соединением.
4. Нековалентные ассоциаты наночастиц с доксорубином характеризуются pH-зависимым профилем высвобождения лекарственного препарата, с повышением степени высвобождения при понижении pH раствора и полным высвобождением лекарственного препарата при pH 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.

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, 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 2020-2024», Международная молодежная научная конференция «Современные тенденции развития функциональных материалов 2021, 2022», Саммит разработчиков лекарственных препаратов и т. д.

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 полученные материалы синтезированы и 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. Проведён анализ полученных ассоциатов наночастиц для доставки доксорубина на моделях *in vitro*.

Благодарность

Автор выражает сердечную благодарность научному руководителю к.х.н. Елене Владимировне Дмитриенко за доброжелательное наставничество, переданный бесценный опыт и помощь в выборе направления развития работы. Автор признателен всем своим соавторам и коллективам лабораторий биомедицинской химии и структурной биологии ИХБФМ СО РАН за помощь, поддержку и обсуждение работы, а также Юлии Евгеньевне Полетаевой, проф., д.б.н., зав. ГМИ ИХБФМ СО РАН Елене Ивановне Рябчиковой за данные просвечивающей электронной микроскопии, к.м.н. Антону Владимировичу Чечушкову, д.б.н., зав. ЛММ Нине Викторовне Тикуновой за данные конфокальной микроскопии, д.б.н. Ольге Александровне Коваль, к.б.н. Майе Александровне Дымовой, Евгении Владимировне Григорьевой, Оксане Андреевне Гуляевой, Ирине Алексеевне Бауэр за помощь в клеточных исследованиях, Дмитрию Николаевичу Хмеленину (ЦКП ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН) за данные энергодисперсионного анализа с поэлементным картированием.

Поддержка

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 № р-97).

Структура и объём 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.

2. НАНОЧАСТИЦЫ КАРБОНАТА КАЛЬЦИЯ КАК НОСИТЕЛИ ДЛЯ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ (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, размеры которых, в одном и более измерений находятся в нанодиапазоне (1 – 100 нм). 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. Распространённое изменение границ размеров связано с сохранением благоприятных для применения *in vivo* свойств наночастиц, таких как: склонность к повышенной всасываемости слизистой, способность к самопроизвольному накоплению наночастиц в очагах воспаления и тканях опухолей, 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 распространённых типов наноматериалов в биомедицине и препараты на их основе, одобренные для терапии

На рисунке 2.1 схематично представлены структуры широко применимых в биомедицине невирусных наноматериалов. Наиболее распространённым 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 (AmBisome), а также вакцины (Shingrix). Кроме того, ведутся клинические испытания липосомальных препаратов для лечения бактериальных и иммуновоспалительных артритов [11, 20]. Некоторые препараты на основе полимерных наночастиц также были одобрены для применения в терапии (Eligard). Часть разработок находятся на финальных стадиях клинических испытаний (CRLX101). Третьими из распространённых органических материалов являются белковые наночастицы, применяемые в качестве компонентов препаратов для терапии злокачественных новообразований. Неорганические наноматериалы пока являются менее распространёнными в составе лекарственных средств (таблица 2.1, например, Ferahem, Vitoss), однако их свойства могут позволить в дальнейшем использовать новые подходы в терапии, такие как: лечение опухолей путём термальной абляции, уничтожение бактерий с использованием наночастиц и их свойств и т. д. [21, 22].

В таблице 2.1 приведены характеристики распространённых препаратов на основе наноматериалов, одобренных управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) для терапевтического применения или проходящих клинические испытания.

Таблица 2.1 – Применение распространённых типов наноматериалов в биомедицине и препараты на их основе [20]

Тип	Наноматериалы	Препарат	Терапевтический агент	Заболевание	Способ введения	Размер, нм	Стадия испытания
Органические	Полимерные	Eligard	Лейпрорелин, растворённый в поли-D,L-лактид-ко-гликолиде и N-метил-2-пирролидоне	Новообразования предстательной железы	Подкожная инъекция	≈ 199	Одобен FDA 2004 г.
		CRLX101	Конъюгат циклодекстрина и камптотецина	Немелкоклеточный рак легкого	Внутривенная инъекция	20 – 30	Фаза II
	Липосомальные	Doxil	Доксорубицин	Новообразования молочной железы; множественная миелома; новообразования яичников; саркома Капоши	Внутривенная инфузия	≈ 100	Одобен FDA 1995 г.
		Myocet	Доксорубицин	Новообразования молочной железы	Внутривенная инфузия	≈ 180	Одобен FDA 2000 г.
		Onivyde	Иринотекан	Метастатический рак поджелудочной железы	Внутривенная инфузия	67 ± 20	Одобен FDA 2015 г.
		AmBisome	Амфотерицин В	Противогрибковое средство	Внутривенная инфузия	≈ 60	Одобен FDA
		Marqibo	Винкристин	Острый лимфобластный лейкоз	Внутривенная инфузия	≈ 100	Одобен FDA 2009 г.
		Shingrix	Лиофилизированный рекомбинантный антиген гликопротеина Е вируса ветряной оспы	Вакцина против опоясывающего лишая	Внутримышечная инъекция	—	Одобен FDA 2023 г.

	Белковые	Абрахане	Паклитаксел, связанный с альбумином	Новообразования молочной железы	Внутривенная инфузия	≈ 130	Одобен FDA 2005 г.
Неорганические	НЧ диоксида кремния	Cornell Dots	Наночастицы с флуорофором	Визуализация меланомы и злокачественных опухолей головного мозга, простаты	Внутривенная инъекция	6 – 10	Клинические испытания
	Углеродные НЧ	КАРПЕМА	Хлоргексидин	Лечение поверхностных открытых ран	Кожное введение	—	Одобрено Минздравом РФ
	Железосодержащие НЧ	Gastromark TM	НЧ смешанного оксида железа, модифицированные диоксидом кремния (Fe ₃ O ₄ /SiO ₂)	Контраст для МРТ желудочно-кишечного тракта	Перорально	≈ 400	Одобрено FDA 1996 г. Отозвано в 2012 г.
		Ferahem	Полиглюкозосорбит карбоксиметилловый эфир ферумокситол с Fe ₃ O/SiO ₂	Антианемическое средство	Внутривенная инфузия	≈ 30	Одобен FDA 2010 г.
	НЧ благородных металлов	AuroLase	Микросферы, покрытые тонким слоем наночастиц золота (НЧЗ)	Термическая абляция опухоли предстательной железы, первичные и/или метастатические опухоли легких	Внутривенная инъекция	10 – 20	Клинические испытания
	Кальций содержащие НЧ	Vitoss	Бета-трикальцийфосфат	Кисты костей, идиопатический асептический некроз кости	Трансплантация	≈ 100	Одобен FDA 2003

В таблице 2.1 представлены наиболее часто встречающиеся препараты на основе наночастиц, большая часть из которых уже допущена до применения в терапии. Видно, что в качестве активных веществ применяются различные по химической природе соединения, вводимые стандартными для них протоколами. Помимо общих положительных свойств, связанных с малыми размерами, каждый тип наночастиц имеет преимущества и недостатки, обусловленные природой выбранного носителя. 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].

Важные критерии применимости наноматериалов в биомедицине можно сформулировать следующими пунктами: размер до 200 нм (оптимальный размер для внутривенного введения); монодисперсность; суспензионная стабильность; стабильность в физиологических условиях; функционализируемость; биосовместимость; биоразлагаемость; высокая эффективность взаимодействия с биологически активными соединениями.

Исследователи по всему миру концентрируют свои усилия для внедрения наночастиц в медицину и повышения эффективности терапии, а также создания новых подходов к лечению злокачественных новообразований, генетических, вирусных и грибковых заболеваний [24, 25].

Наряду с прочими, наноматериалы на основе карбоната кальция (СаНЧ), характеризующиеся 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 высвободить лекарство преимущественно в опухоль. Кроме того, продукты гидролиза, оставшиеся от наночастиц, не накапливаются и выводятся естественным путём, что должно способствовать значительному снижению их токсичности [26]. Однако получение наночастиц карбоната кальция, удовлетворяющих критериям применимости в биомедицине, является непростой методологической задачей в связи с их недостаточной суспензионной стабильностью и склонностью к дальнейшей агрегации в микрометровые скопления [27].

Целью данного обзора является рассмотрение современной информации о наноматериалах карбоната кальция и их нанокомпозитах 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.

2.1 Синтез наночастиц карбоната кальция

Несмотря на стабильный 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 [28]. Основная доля таких препаратов относится к липосомальным формам лекарств с выраженным профилем токсичности [29]. Однако многие проблемы, которые могли бы быть решены применением эффективного носителя, до сих пор находятся на стадии исследования. К ним относятся: повышение эффективности терапии онкологических, бактериальных и грибковых заболеваний, а также возможность применения современных методов генной терапии [30, 31].

При разработке носителей БАС, ещё на этапе сборки системы, необходимо учитывать сочетание 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 (поглощение макрофагами, неспецифическая иммуностимуляция и т. д.) [32].

Применение 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. Это свойство может решить проблемы хронической токсичности (в том числе, окислительный стресс, воспаление и повреждение клеточных структур) и препятствовать накоплению частиц в печени, почках и других органах.

Кроме того, карбонат кальция обладает пористой структурой, что приводит к увеличенным ёмкостным характеристикам по отношению к грузовым молекулам даже по сравнению с микрометровыми аналогами [3]. Но для частиц карбоната кальция характерна склонность формировать микрометровые кристаллы, не удовлетворяющие ранее сформулированным критериям применения в биомедицине из-за размеров, дисперсности и суспензионной стабильности. Несмотря на последние достижения в области стабилизации таких материалов и развитие 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 (с характеристикой компонентов и комплекса в целом на каждом этапе). Конструкция может быть применима *in vivo*, только если для неё показано отсутствие токсичности и на каждом этапе сборки были использованы биобезопасные компоненты. Этот аспект накладывает значительные ограничения на выбор реактивов и методов синтеза наноматериалов. Основные подходы к получению микро- и наночастиц карбоната кальция (СаНЧ) представлены в таблице 2.2 [33].

Таблица 2.2 – Варианты методов синтеза микро- и наночастиц карбоната кальция

Метод	Вариант
Осаждение	<ul style="list-style-type: none"> • Спонтанное осаждение • Газовая диффузия
Эмульгирование	<ul style="list-style-type: none"> • Микро-эмульсия • Нано-эмульсия
Полимеризация	<ul style="list-style-type: none"> • <i>In situ</i> полимеризация • Полимер-опосредованный синтез
Природный	Источник CaCO ₃ : <ul style="list-style-type: none"> • скорлупа яиц • раковины моллюсков • с участием микроорганизмов

Несмотря на разделение вышеперечисленных методов (таблица 2.2) по принципам формирования частиц, многие исследователи для достижения наноразмерности частиц применяют комбинацию методов. В области биомедицины наибольшую распространённость 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 своё применение в синтезе СаНЧ для биомедицины, как комбинированный способ для методик осаждения и эмульгирования, 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 структуру 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.

Поверхностный заряд частиц карбоната кальция, так же как размер и дисперсность, зависит от метода получения материала. Свежеосажденный из эквимольной концентрации Ca^{2+} и CO_3^{2-} в отсутствие дополнительных реагентов CaCO_3 обладает небольшим положительным поверхностным потенциалом, который через 30 минут меняет свой знак на отрицательный, что связано с щелочной средой типичной для синтеза ($\text{pH} \approx 10$). CaCO_3 , осажденный из раствора с избытком Ca^{2+} , обладает положительным поверхностным потенциалом (около +15 мВ), а из раствора с избытком CO_3^{2-} – отрицательным (от –10 до –25 мВ) [39]. Можно утверждать, что наиболее характерным для наноразмерных частиц карбоната кальция, применяемых в биомедицине, является отрицательный заряд [40].

Подробнее компоненты и условия получения ватерита, влияющие на характеристики получаемых частиц, будут рассмотрены далее в методах осаждения, эмульгирования 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 кальция методом осаждения

Среди прочих разработанных вариантов химического синтеза наноматериалов на основе карбоната кальция метод осаждения (или соосаждения) является широко распространённым как лабораторным, так и промышленным подходом. Суть метода заключается в перенасыщении раствора путём добавления осаждающего агента при фиксированном показателе кислотности (pH). В процессе образования частиц протекают две характеристически значимые реакции:

нуклеация (зародышеобразование) и последующий рост частиц. Эти шаги определяют размер и форму образующихся продуктов [41].

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 разнообразию параметров, которые можно варьировать для одного и того же химического 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 контролируемом осаждении нерастворимого карбоната кальция в щелочных условиях (рисунок 2.2) [33].



Рисунок 2.2 – Схема синтеза СаНЧ методом осаждения (А) и его частный пример (Б) [42]

В отсутствие дополнительных реагентов, методом осаждения получают частицы микрометровых размеров (2 – 10 мкм) [43]. 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 [44].

Отдельной методологической задачей является подбор условий для получения стабильной суспензии наноразмерных частиц карбоната кальция. Авторы [45] провели обширную поисковую работу в области получения СаНЧ в отсутствие дополнительных реагентов, 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 размер образующихся частиц карбоната кальция прямо

пропорционален температуре реакционной смеси и обратно пропорционален скорости перемешивания. Были получены частицы с минимальным размером 30 нм (эквимольное смешивание по 0,1 М; 60 мин.; 14000 об./мин.; 25 °С). Однако материал характеризовался низкой суспензионной стабильностью.

Для получения стабильной суспензии наночастиц карбоната кальция методом осаждения, необходимы стабилизирующие реагенты на этапе синтеза [46, 47]. В качестве таких добавок часто используют синтетические полимеры, поверхностно-активные вещества и биомолекулы [33].

Влияние различных типов добавок и их концентраций подробно рассмотрено в обзорах Воујоо У. и др. [33, 48]. 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 [49], додецилсульфат натрия [50–51], полисорбат 20 (Твин 20) [52, 53] 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 [54].

Интерес в области разработки доставки биологически активных соединений вызывают подходы, которые позволяют изменять фармакологические свойства материалов. Так, при внесении в реакционную смесь для синтеза карбоната кальция (методом осаждения) оптимальной концентраций таких биомолекул, как крахмал [26, 40], декстран [55] и некоторых белков (например, коллаген [56, 57], бычий сывороточный альбумин [58]) образуются нано- и микро- гибридные материалы карбоната кальция с добавленным соединением [33]. Показано, что такие модифицированные наночастицы могут обладать большей стабильностью и биодоступностью. Кроме того, благодаря мягким синтетическим условиям, в качестве инкапсулируемого вещества могут быть использованы низкомолекулярные лекарства и нуклеиновые кислоты [46, 59].

Таким образом, методом осаждения, варьируя условия синтеза и состав реакционной смеси, можно получать наноматериалы на основе карбоната кальция для различных биомедицинских целей. В таблице 2.3 рассмотрены последние достижения в области получения наноразмерных частиц методом осаждения, а также области их применения.

Таблица 2.3. Применение и условия синтеза СаНЧ, полученных методом осаждения

Размер СаНЧ, нм	Форма	Композиция реакционной смеси	T ¹	Условия смешивания Са ²⁺ и СО ₃ ²⁻	Применение	Ссылка
47 ± 7	Сферическая	СаCl ₂ : 0,2 М, Na ₂ CO ₃ : 0,2 М, Трис-ацетатный буфер: 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	Совместная загрузка муцина и доксорубицина для контролируемого высвобождения DOX	60
≈ 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	Фолат-конъюгированная наноплатформа для доставки DOX (тестировали на линии клеток HeLa ²)	61
≈ 350	Кубическая	СаCl ₂ : 0,16 мМ, Na ₂ CO ₃ : 0,16 мМ, V _{р. смеси} : 140 мл.	30 мин	S: интенсивное T: 25 °С	Наногибриды бензоата кальция-гуаровой камеди для сорбционного удаления конго красного и фосфатов из воды (антибактериальную активность тестировали на Escherichia coli, Staphylococcus aureus)	62
≈ 350	Сферическая (рН 5,5)	СаCl ₂ : 3,6 мМ, Na ₂ CO ₃ : 3,6 мМ, Карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ) (степень замещения 0,7, средний Mw ~ 250 000): 0,2 мас.%, 0,25 М NaOH до соответствующего рН, V _{р. смеси} : 2,73 мл.	90 мин	S: интенсивное T: 25 °С	Нанокapsулы для пероральной доставки куркумина в толстую кишку	47
	Кубическая (рН 9,0)					
	Цилиндрическая (рН 14,0)					

¹ T – Суммарное примерное время синтеза.

² HeLa – линия клеток раковой опухоли шейки матки.

570 ± 151 x 130 ± 35	Цилиндрическая	CaCl ₂ : 6,7 мМ, Na ₂ CO ₃ : 6,7 мМ, Фукоидан: 30 / 40 / 50 мг/мл, V _{р. смеси} : 30 мл.	90 мин	S: интенсивное T: 25 °С	pH-Чувствительные контейнеры для доставки митоксантрона (тестировали на линиях клеток MCF-7 ³ и HeLa)	63
725 ± 223 x 170 ± 42						
885 ± 349 x 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	Многослойный носитель модельного лекарства (на примере родамина) для терапии рака молочной железы (тестировали на линиях клеток MDA-MB-231 ⁴ , SK-BR-3 ⁵ и MCF10A ⁶)	43
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 (PK): 4 мас. %.	48 ч	S: не указано T: 25 °С	pH-Чувствительные НЧ для модельного лекарства (на примере зелёного флуоресцентного белка; тестировали на линии HeLa)	64
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	CaHЧ с DOX и хлорином еб для комбинированной противоопухолевой терапии (тестировали на линии клеток B16-F10 ⁷)	65

³ MCF-7 – эпителиоподобная клеточная линия, полученная из инвазивной аденокарциномы протоков молочной железы человека.

⁴ MDA-MB-231 – клеточная линия эпителиального рака молочной железы.

⁵ SK-BR-3 – клеточная линия эпителиального рака молочной железы.

⁶ MCF10A – неканцерогенная клеточная линия эпителия молочной железы.

⁷ B16-F10 – линия клеток мышинной меланомы.

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 (тестировали на линиях клеток L929 ⁸ и СТ26 ⁹)	66
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) _х ×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	67
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 ёмкость по отношению к ресвератролу (тестировали на линии GBM U87 ¹⁰)	68
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	CaНЧ с DOX для ультразвуковой визуализации и терапии злокачественных новообразований (тестировали на линии клеток СТ-26 и на ксенотрансплантированной подкожной опухоли СТ-26 мышей BALB/c)	69

⁸ L929 – линия клеток фибробластов мыши.

⁹ СТ26 – линия клеток карциномы толстой кишки.

¹⁰ GBM U87 – линия клеток человеческой глиобластомы.

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 (тестировали на линиях клеток HeLa и V79-4 ¹¹)	70
3 – 76	Трубчатая	Порошок ветвей <i>N. Officinale</i> : 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, синтезированные с использованием растительного экстракта, в качестве ингибитора роста <i>Leishmania major</i> ¹²	71
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	Управление внутриклеточным уровнем NO за счёт доставки наночастицами S-нитрозотиола для остеогенной дифференцировки эмбриональных стволовых клеток (тестировали на линиях клеток ESC, ES-E14TG2a ¹³)	72
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	Многослойные иммуно-наночастицы в качестве белкового носителя (на примере альбумина) с антителами на своей поверхности (тестировали на линии клеток EA.hy926 ¹⁴)	73

¹¹ V79-4 – линия клеток легких китайского хомячка.

¹² *Leishmania major* — вид жгутиконосных паразитических протистов рода *Leishmania*, возбудитель зоонозного кожного лейшманиоза.

¹³ ESC, ES-E14TG2a – эмбриональные стволовые клетки мыши

¹⁴ EA.hy926 – линия эндотелиальных клеток человека.

≈ 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 °C	Гидрогелевые CaНЧ для перорального приёма лекарств (на примере Диклофенака ¹⁵ ; тестировали на мышах BALB/c и крысах SD)	74
-------	-------------	---	------	----------------------------	---	----

¹⁵ Диклофенак — нестероидный противовоспалительный препарат из группы производных фенилуксусной кислоты.

Из данных, приведённых в таблице 2.3, видно, что метод осаждения позволяет получать частицы разных размеров от нанометрового до микрометрового масштаба. Форма и стабильность частиц, так же как и диаметр СаНЧ, определяются 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 [74]), так и использовать возможность инкапсулировать БАС, в том числе лекарства, на этапе синтеза наноматериалов [60, 63, 69]. Кроме того, подход не требует использования специфического оборудования. Стоит отметить, что в таблице 2.3 приведён параметр «суммарное примерное время синтеза» (без учёта приготовления стоковых растворов, считая процедуры смешивания, сепарации и сушки, если применимо) с целью примитивной оценки технологичности и экономического потенциала процесса фармацевтического получения наноматериалов. Безусловно, только регистрации времени процедуры недостаточно, необходимо контролировать качество исходного сырья, следить за выходами продукта и приборами, используемыми в работе. Применение наночастиц карбоната кальция в биомедицине будет рассмотрено подробнее в главе обзора литературы 2.2.

Таким образом, синтез СаНЧ методом осаждения является наиболее простым подходом с множеством параметров (рН, температура реакции, концентрация ионов, скорость перемешивания, виды растворителей и добавки), доступных для варьирования размера, формы и свойств частиц. Способ нашёл обширное применение в области биомедицины, в частности для разработки систем доставки лекарств, биосенсоров и компонентов тканевой инженерии [75].

Недостатком метода можно выделить низкую суспензионную стабильность получаемых частиц, что требует тщательного подбора условий их синтеза, хранения и транспортировки.

2.1.2 Синтез наночастиц карбоната кальция методом газовой диффузии

Метод газовой диффузии специфичен для получения именно частиц карбоната кальция [17]. Концептуально метод заключается в обогащении углекислым газом раствора, который содержит катионы кальция при щелочном рН (рисунок 2.3).

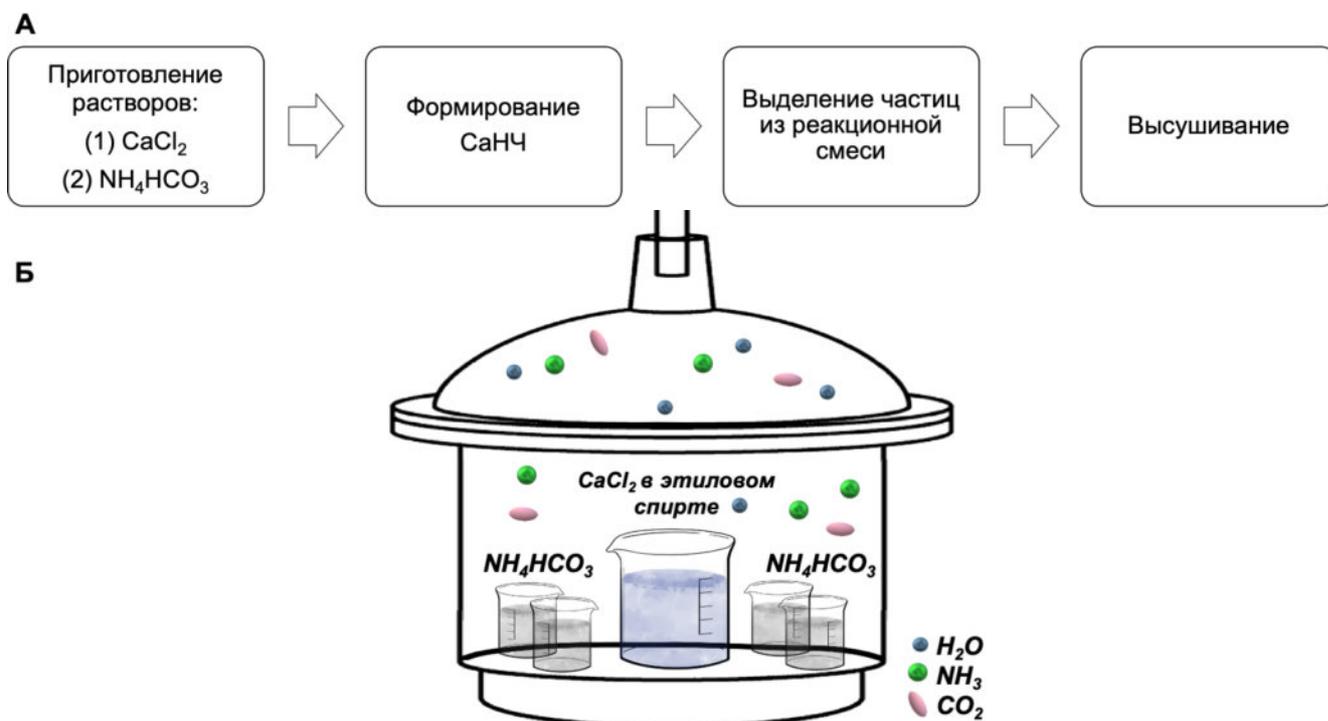


Рисунок 2.3 – Схема синтеза CaNC методом газовой диффузии с применением гидрокарбоната аммония (А) и его частный пример (Б) [76]

Обычно метод заключается в помещении в эксикатор раствора хлорида кальция в этаноле в присутствии гидрокарбоната аммония. Последний постепенно разлагается на аммиак, воду и углекислый газ (при нагревании до 38°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 варьирования температуры, концентрации реагентов (преимущественно Ca^{2+}) и внедрения добавок, аналогичных с методом осаждения [48].

Например, группа авторов детально рассмотрела влияние температуры, времени реакции, а также количества Ca^{2+} и воды на размер получаемых CaNC [77]. 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 избытка CO_2 по отношению к Ca^{2+} рост кристаллов является доминирующим процессом, что приводит к образованию более крупных частиц. Увеличение концентрации Ca^{2+} в реакционной смеси смещает равновесие в сторону преобладания стадии зародышеобразования. Быстрое формирование ядер при недостаточном количестве CO_2 в смеси приводит к получению частиц меньшего размера. Более того, показано, что содержание воды в реакционной смеси оказывает влияние на размер CaNC: 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 размеров получаемых частиц от температуры и времени реакции.

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, содержащий гидроксид кальция (рисунок 2.4)

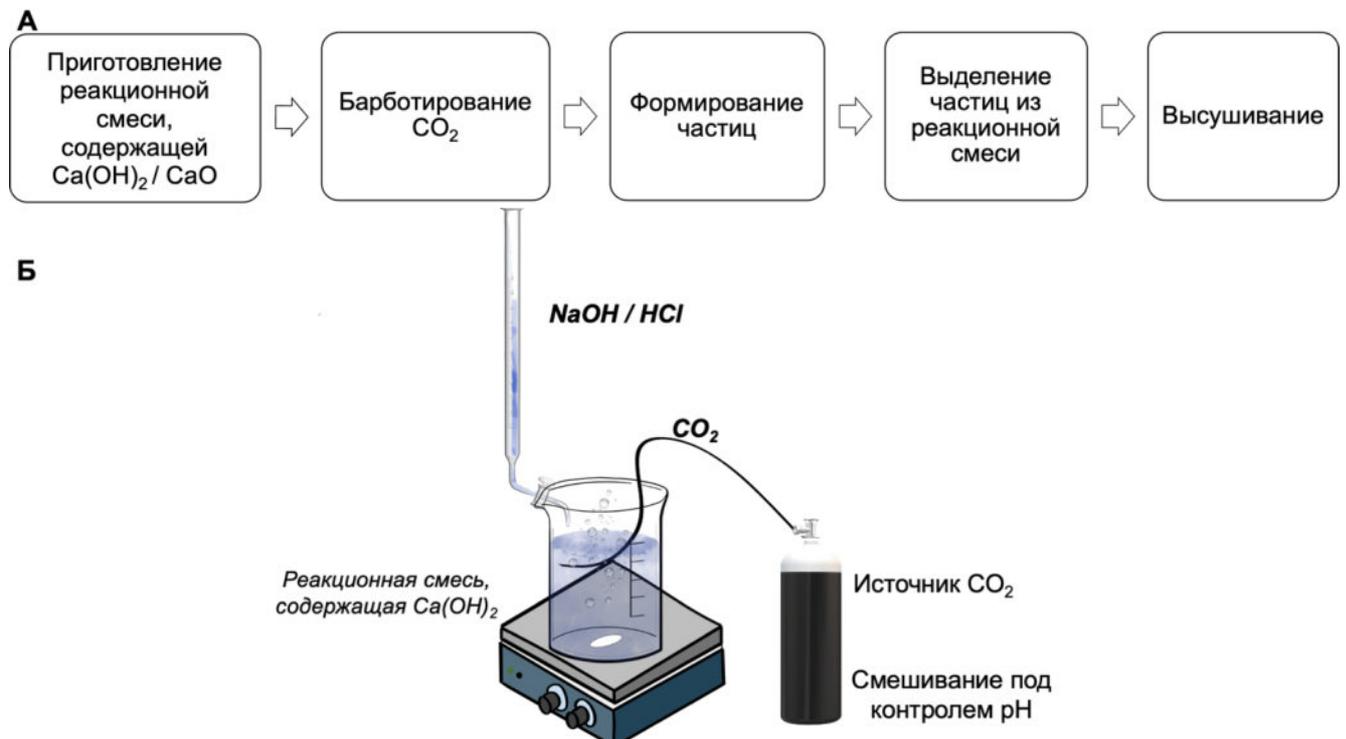


Рисунок 2.4 – Схема синтеза СаНЧ методом газовой диффузии с применением барботирования углекислым газом (CO_2) (А) и его частный пример (Б) [78]

Частицы, синтезированные способом барботирования (рисунок 2.4), обычно представляют собой сферические наночастицы или структуры сложной формы микронного размера.

Ниже в таблице 2.4 рассмотрены последние достижения в получении частиц карбоната кальция методом газовой диффузии.

Таблица 2.4. Применение и условия синтеза СаНЧ, полученных методом газовой диффузии

Размер СаНЧ, нм	Форма	Композиция реакционной смеси	T ¹⁶	Условия смешивания Са ²⁺ и СО ₃ ²⁻	Применение	Ссылка
< 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 носителя для инкапсуляции алендроната и регенерации костей (тестировали на линии клеток МС3Т3 Е1 Субклон 14 ¹⁷)	79
≈ 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	Совместная инкубация раковых клеток и фибробластов с последующей обработкой СаНЧ для селективного ингибирования роста клеток MDA-MB-231 ¹⁸ и снижения их клеточной миграции за счёт устойчивого снижения внутриклеточного рН раковых клеток	80
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	81
13,4	Цилиндрическая (Высокая степень агрегации в микрочастицы)			0,1 М MGDA-Na ₃		
6,4				0,2 М MGDA-Na ₃		
13,4				0,1 М GLDA-Na ₄		

¹⁶ T – Суммарное примерное время синтеза.

¹⁷ МС3Т3 Е1 Субклон 14 – один из серии клонов, выделенных из клеточной линии преостеобластов из новорожденной мыши.

¹⁸ МВ-231 – Клеточная линия рака молочной железы.

≈ 100	Сферическая	CaCl ₂ 0,15 г (0,0013 моль) и Кемпферол-3-О-рутинозид ¹⁹ 20 мг (0,4 мг/мл) в 50 мл этанола, NH ₄ HCO ₃ : 5 г (0,063 моль)	4 д	В вакуумной сушильной камере	СаНЧ, несущие кемпферол-3-О-рутинозид для терапии злокачественных новообразований с помощью перегрузки кальцием (тестировали на клеточных линиях A549 ²⁰ , 3Т3-L1 ²¹ , RAW 264.7 ²² и мышах BALB/c nude)	82
≈ 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 (тестировали на линиях клеток HeLa, A549, NIH3T3 ²³ , новозеландских кроликах и мышах BALB/c nude)	83
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	СаНЧ, модифицированные тетрациклином и симвастатином для стимуляции остеобластов и терапии остеопороза (тестировали на линиях клеток MC3T3-E1 ²⁴ , MC3T3-E1 и крысах Sprague Dawley)	84
≈ 100	Сферическая	CaCl ₂ 0,2 г (0,0018 моль) и DOX 4 мг (6,9 × 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 для его контролируемого высвобождения и улучшенного проникновения в злокачественную опухоль (тестировали на линии клеток HeLa)	85

¹⁹ Кемпферол-3-О-рутинозид – флавоноид с противораковой способностью, эффективно нарушающий регуляцию гомеостаза кальция.

²⁰ A549 – клеточная линия аденокарциномы легких человека.

²¹ 3Т3-L1 – клеточная линия эмбриональных фибробластов.

²² RAW 264.7 – клеточная линия лейкемии макрофагов мыши.

²³ NIH3T3 – клеточная линия фибробластов эмбриона мыши.

²⁴ MC3T3-E1 – линия клонированных клеток свода черепа новорожденной мыши.

Согласно данным, приведённым в таблице 2.4, 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 методом газовой диффузии кальций содержащих растворов нашёл применение не только в лабораторных, но и промышленных условиях из-за простоты масштабирования. Однако в сравнении с осаждением (таблица 2.3), формирование частиц методом барботирования CO_2 – более длительный процесс (не учитывая время на высушивание частиц). Кроме того, для частиц, полученных методом газовой диффузии, характерная высокая степень агрегации.

2.1.3 Синтез наночастиц карбоната кальция методом эмульгирования

Микроэмульсии представляют собой высокодисперсные термодинамически стабильные системы, характеризующиеся способностью формировать самоорганизующиеся структуры – нано- и микрогазмерные 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 (таблица 2.5) [86].

Таблица 2.5. Компоненты реакционной смеси для метода эмульгирования

Фаза	Распространённые компоненты
со-Растворитель	<ul style="list-style-type: none"> • Пропиленгликоль • Полиэтиденгликоль
ПАВ	<ul style="list-style-type: none"> • Твин-20 • Тритон X-100 • Токоферсонал • Кремофор • Solutol HS
Водная фаза	Вода
со-ПАВ	<ul style="list-style-type: none"> • Этанол • Бутанол • Амины • Гликоли • Кислоты
Органическая фаза	<ul style="list-style-type: none"> • Лауриновая / Каприновая кислоты • Этиловый / Метилловый эфиры • Линолевая / Линоленовая кислоты

В таблице 2.5 представлены компоненты эмульсионного раствора и их распространённые 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, очерёдность смешения фаз, техника эмульгирования и т.д. Считается, что ключевое влияние на характеристики частиц оказывает выбор ПАВ [86].

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 моодисперсных капель в диапазоне 1 – 100 мкм [87]. 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 [88].

Благодаря возможности контролировать размер частиц и широкий спектр варьируемых параметров, микроэмульсионные методы также нашли применение в области получения СаНЧ [89, 90]. 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 2.5). 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.

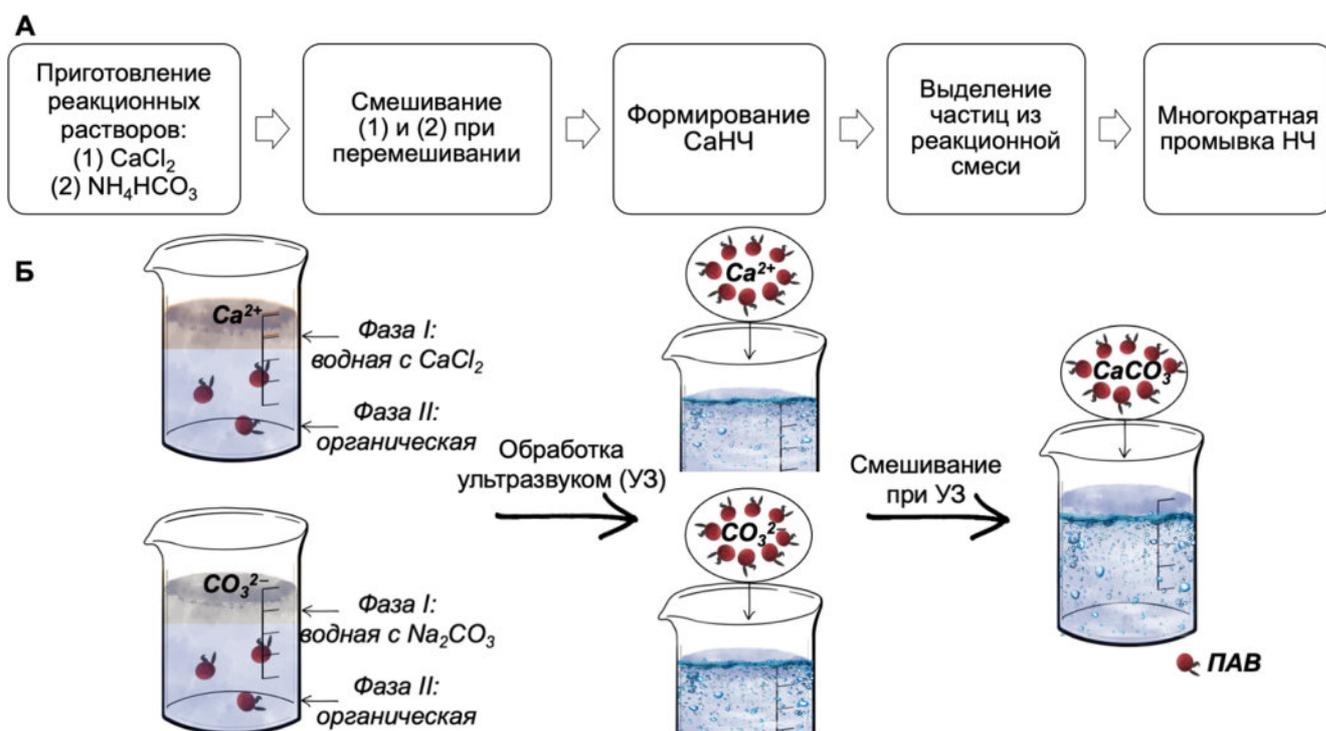


Рисунок 2.5 – Схема синтеза CaNC методом эмульгирования (А) и его частный пример (Б) [91]

Последние достижения в области получения наночастиц карбоната кальция микроэмульсионными подходами рассмотрены в таблице 2.6.

Таблица 2.6. Применение и условия синтеза CaНЧ, полученных микроэмульсионным методом

Размер CaНЧ, нм	Форма	Композиция реакционной смеси	T ²⁵	Условия смешивания Ca ²⁺ и CO ₃ ²⁻	Применение	Ссылка
≈ 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-диолеил-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 (на примере супероксиддисмутазы) и лекарства (на примере паклитаксела) к опухоли толстой кишки <i>in vivo</i> (показано на линии клеток colon26 ²⁶ , а также мышах породы ddY и BALB/c с ксенотрансплантатом опухоли толстой кишки)	92
≈ 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 ²⁷ : 10 ⁻⁶ М, V _{р. смеси} : 10,71 мл	1 ч	В/М S: УЗ T: 25 °С	Нацеленный на фолатные рецепторы и активируемый катепсином В нано зонд для визуализации опухолевых клеток с помощью светодиодного источника света 450 нм <i>in vivo</i> (показано на мышинной модели ²⁸)	93

²⁵ T – Суммарное примерное время синтеза.

²⁶ Colon26 – Клеточная линия колоректальной карциномы мышей.

²⁷ Флуоресцентный зонд ((Z)- 2-(6-(((2-(((4-(6-амино-2-(2-(((бензилокси)карбонил)амино)-3-фенилпропанамидо)гексанамидо)бензил)окси)карбонил)(метил)амино)этил)(метил)карбамоил)окси)-2,7-дифтор-3-гидразинеилиден-3Н-ксантен-9-ил)бензойная кислота) был синтезирован путём конъюгации субстрата катепсина В с использованием саморасщепляющегося линкера.

²⁸ Линии опухолевых клеток MCF-7 были введены подкожно самкам мышей BALB/c.

≈ 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 DOX, направленные на pH-зависимое индуцирование свертывания крови и лечения злокачественных новообразований (тестировали на линиях MCF-7, MDA-MB-231, NIH3T3 и мышью модели опухоли молочной железы ²⁹)	94
≈ 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	Наночастицы карбоната кальция, нагруженные мРНК IL-12 для активации иммунного ответа, вызванного некроптозом, и трансфекцией мРНК IL-12 под действием ультразвукового облучения (показано на линиях клеток GL261 ³⁰ , HepG2 ³¹ , 4T1, CT26 ³² и модели мышей с внутричерепной ортотопической глиобластомой GL261-Luc)	95
≈ 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 (синтезированы из Zn ²⁺ и диметилимидазола, содержат перфорин и гранзим В): 4,3 мг/мл, V _{р. смеси} : 11,75 мл	18 ч	В/М S: непрерывное T: 25 °С	Композит CaНЧ и белковых наночастиц, соединенный с аптамером, нацеленным на лизосомы (CD63-аптамер) для усиления противоопухолевого эффекта Т-клеток солидных опухолей (тестировали на линиях клеток 4T1 ³³ , DC2.4 ³⁴ и мышцах мышах BALB/c)	96

²⁹ Линии опухолевых клеток 4T1 (карцинома молочной железы мыши) были введены подкожно самкам мышей BALB/c.

³⁰ GL261 – линия клеток опухоли мозга.

³¹ HepG2 – линия клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека, полученная из тканей печени.

³² CT26 – линия клеток, полученная от мыши с карциномой толстой кишки.

³³ 4T1 – линия клеток рака молочной железы, полученная из ткани молочной железы мыши штамма BALB/c.

³⁴ DC2.4 – линия дендритных клеток мыши.

≈ 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 Т: 25 °С	Липидные наноконпозиты цисплатина/олеаноловой кислоты и карбоната кальция для терапии гепатоцеллюлярной карциномы (показаго на линии клеток HepG2 и мышях Kunming)	97
≈ 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 Т: 25 °С	Липосомальная система замедленного высвобождения доксорубина для противоопухолевоы терапии (показано на линии клеток HeLa и модели мышей ³⁵)	98
≈ 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, (3-аминопропил) триэтоксисилан: 2 мг/мл, V _{р. смеси} : 22,6 мл	18 ч	М/В S: непрерывное Т: 25 °С	Смешанная система из липопротеинов высокой плотности и наночастиц карбоната кальция для доставки DOX при химиотерапии рака молочной железы (показано на линиях клеток MCF-7, а также мышях Balb/c nudec, которым подкожно ввели MCF-7)	99

³⁵ Модель мышей BALB/c с подкожной опухолью 4T1 (линия клеток рака молочной железы).

Как показано в таблице 2.6, микроэмульсионным методом получают преимущественно сферические наночастицы от 100 до 200 нм. Наиболее распространённым 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) [100].

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. Интерес к таким методам 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) [101].

Методы получения частиц карбоната кальция из скорлупы делят на прямые и косвенные подходы. Первые также называют необработанными способами 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 [101].

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 обработаны кислотой и преобразованы в строго контролируемых условиях методом осаждения (рисунок 2.6).



Рисунок 2.6 – Схема синтеза CaNC биогенным методом (А) и его частный пример (Б) [102]

Характеристики частиц карбоната кальция, полученных механохимическим методом, можно контролировать вариацией концентрации ионов кальция, добавлением полиэлектролитов (неионные или ионные) с различной молекулярной массой и концентрации [103].

Ряд последних достижений обсуждаемого подхода представлены в таблице 2.7.

Таблица 2.7. Применение и условия синтеза СаНЧ, полученные с использованием скорлупы

Размер СаНЧ, нм	Форма	Композиция реакционной смеси	T	Условия обработки очищенных раковин	Применение	Ссылка
≈ 30	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 °C	Носитель доксорубицина для ингибирования клеточной активности линии MCF-7	102
					Носитель лектинов, выделенных из съедобного гриба <i>Agaricus bisporus</i> , к (проявили антипролиферативный эффект на опухолевые клетки) для ингибирования клеточной активности линии MCF-7	104
					Носитель доксорубицина/тимохинона для ингибирования клеточной активности MDA-MB-231 ³⁶)	105
					Носитель доксорубицина для лечения остеосаркомы (показано на модели животны: крысы SD ³⁷)	106
≈ 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 °C	Разработка промышленного метода производства наночастиц для дальнейшего промышленного применения	107
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 °C	Система доставки лекарств (гефитиниб и паклитаксел) для терапии рака молочной железы (исследования на клетках и животных не проводились)	108

³⁶ MDA-MB-231 – клеточная линия трижды отрицательного низкодифференцированного рака молочной железы.

³⁷ Модельные животные были привиты линией клеток крысиной остеосаркомы (UMR-106 –эпителиоподобная линия клеток, которая была выделена из кости крысы с остеосаркомой).

В таблице 2.7 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 [109].

В этом же разделе хотелось бы упомянуть про способность денитрифицирующих микроорганизмов образовывать карбонат кальция [110]. 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 приложение в биомедицине на данном этапе рассмотрена намного меньше [111]. 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, 112].

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 2.8.

Таблица 2.8. Преимущества и недостатки основных методов получения наночастиц CaCO₃

Метод	Преимущества	Недостатки	Ссылка
Осаждения	Широкий диапазон размера получаемых частиц (10 – 20000 нм)	Требуется тщательный подбор условия синтеза и композиции раствора для получения стабильной суспензии монодисперсных CaHЧ; неравномерный размер и морфология)	113
Эмульгирования	Высокая степень монодисперсности	Необходима качественная стадия удаления органических добавок, в том числе ПАВ; удаление стабилизирующих веществ может привести к дальнейшей агломерации частиц	114
Газовой диффузии	Низкая стоимость	Длительный синтез с низким выходом	115
Биогенный (механохимический)	Экологичность, масштабируемость	Наличие примесей из биогенных отходов	101

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 научно-исследовательских работах, в том числе в сферах доставки биологически активных соединений, тканевой инженерии, биосенсоров, стоматологии и других [33] (рисунок 2.7).

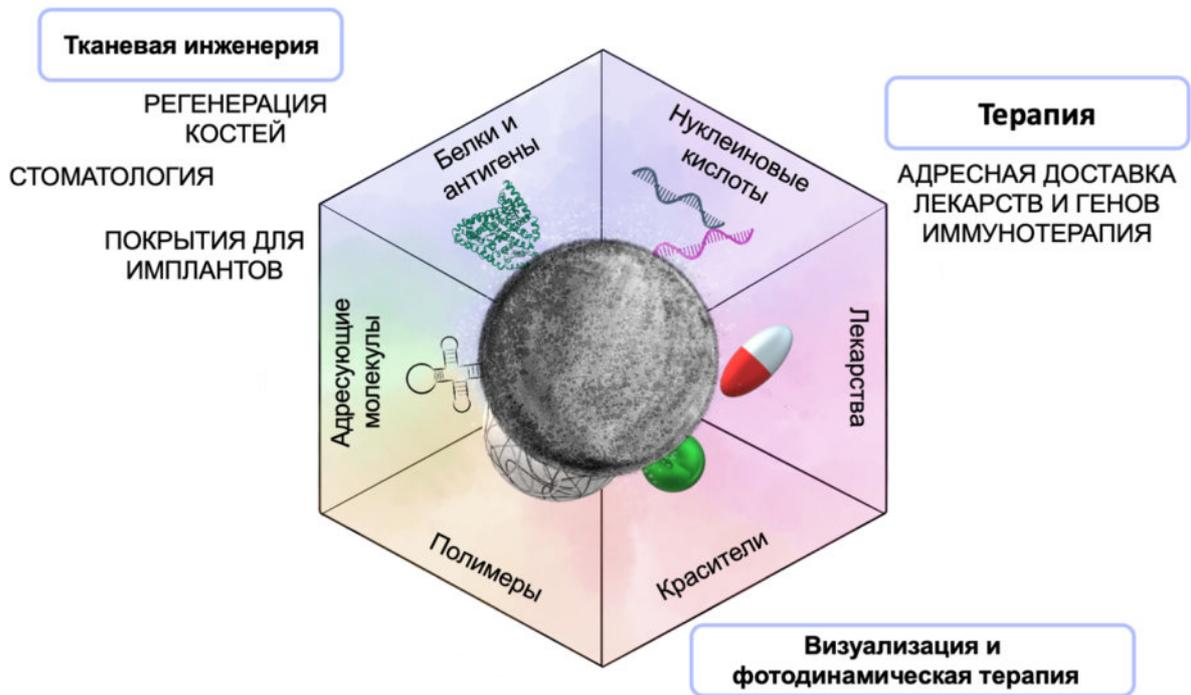


Рисунок 2.7 – Варианты присоединяемых к СаНЧ молекул и их применения в биомедицине

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 Использование наночастиц карбоната кальция для доставки низкомолекулярных химиотерапевтических препаратов при противоопухолевой терапии

Разработка новых методов лечения злокачественных новообразований с применением СаНЧ преимущественно связана с модернизацией форм уже существующих используемых в клинике лекарственных препаратов, путём создания «умного» носителя, способного улучшить фармакокинетику 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. [116].

Направленная доставка противораковых лекарств преимущественно заключается в использовании характерных аномалий и стимулов вблизи солидной опухоли, способствующих концентрированию терапевтического лекарства в область-мишень. К распространённым 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 2.8).

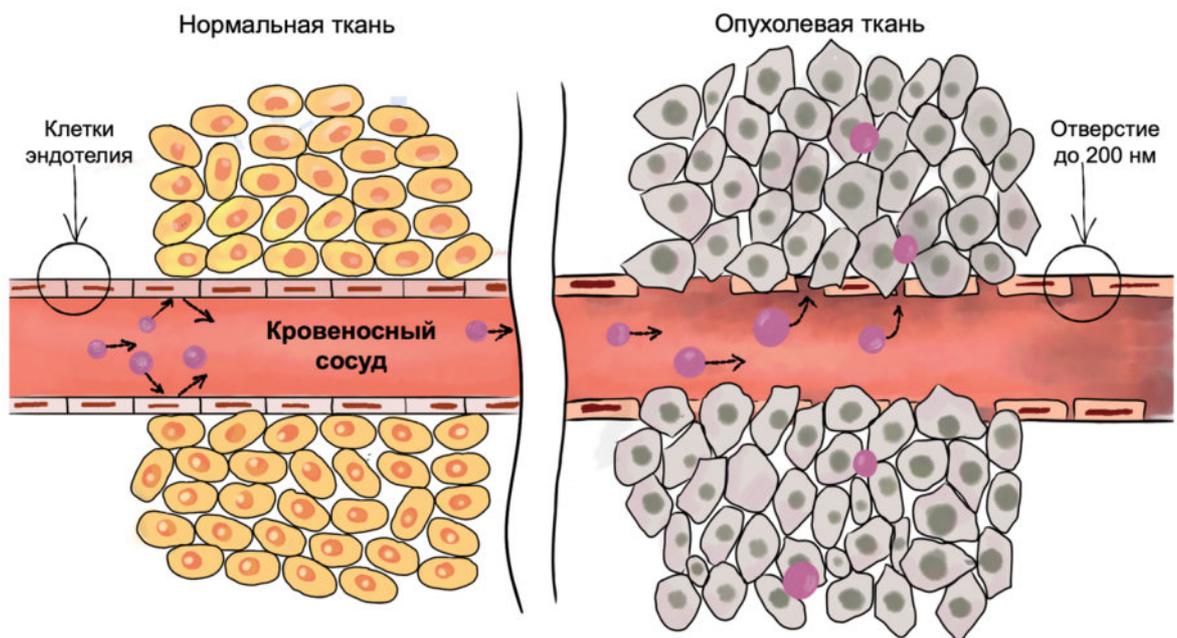


Рисунок 2.8 – Схематическое изображение эффекта EPR

Предпочтительно через такие отверстия между клеток эндотелия проходят наночастицы размером 100 – 200 нм (рисунок 2.8) [117]. 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 [118]. Показано, с помощью стратегии перфузии *ex vivo*, что EPR в солидных опухолях почек человека положительно коррелировал с таковым на моделях животных [119]. В работе была разработана модель перфузии для исследования в реальном времени эффекта EPR с помощью рентгеновской компьютерной томографии. В данных продемонстрирован эффект EPR в более чем 87% опухолей почек человека, которые показали значительное разнообразие и гетерогенность.

Образующаяся деформированная сосудистая сеть часто обладает сниженной способностью доставлять питательные вещества и удалять метаболические отходы из быстро

пролиферирующих клеток. Из-за этого формируются гипоксические участки вблизи опухоли протяженностью более чем 100 мкм [120]. Быстрорастущие трансформированные клетки нуждаются в большем количестве энергетических ресурсов, а низкая эффективность транспортировки провоцирует ещё более активный гликолиз (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 в HCO_3^- и H^+). CAIX обеспечивает ускоренную гидратацию образующегося CO_2 из пути окисления пирувата до кислоты угольной кислоты (рКа 6,35) [121, 122]. [123].

Таким образом, ускоренный метаболизм и потребность в АТФ приводят к изменению внеклеточного рН с физиологического (кровоток 7,36 – 7,42) на опухолевый (6,0 – 7,0) [124].

Получение новых носителей противораковых средств – актуальная область исследований [125]. 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 [126]. Важно учитывать при выборе рН-лабильных носителей, что в норме рН ниже 7,0 в коже (4,7 – 5,7), слюне (6,5 – 7,5), желудке (желудочная секреция 1,5 – 3,5), толстом кишечнике (5,5 – 7,0) и слёзных железах (6,5 до 7,8) [127].

Скорость деградации карбоната кальция увеличивается при уменьшении рН [128]. В литературе представлены детальные исследования растворимости карбоната кальция, 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 учётом давления углекислого газа (pCO_2) в условиях, моделирующих среду кишечника (рисунок 2.9) [129].

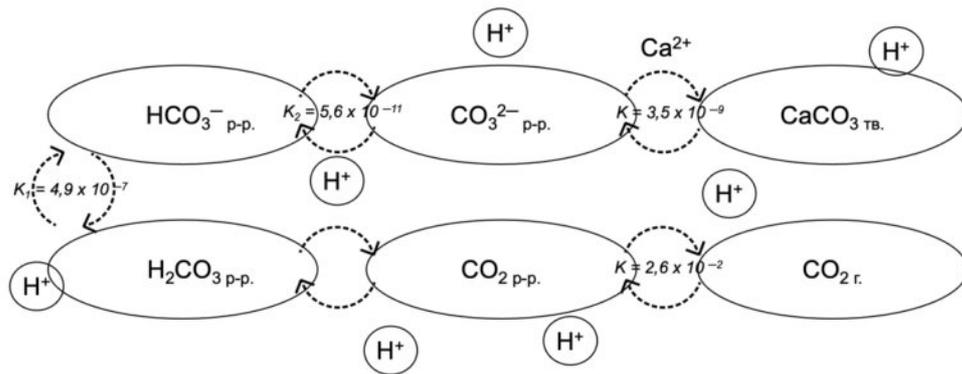


Рисунок 2.9 – Схема равновесных форм карбоната кальция

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

Моделируя различные условия кишечной флоры и варьируя количество CaCO_3 , авторы [53] установили, что доля нерастворившегося карбоната кальция увеличивается по мере увеличения исходной массы. В частности, плато процесса достигается при введении 100 мг. 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).

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 СаНЧ. 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 рН (рисунок 2.10).

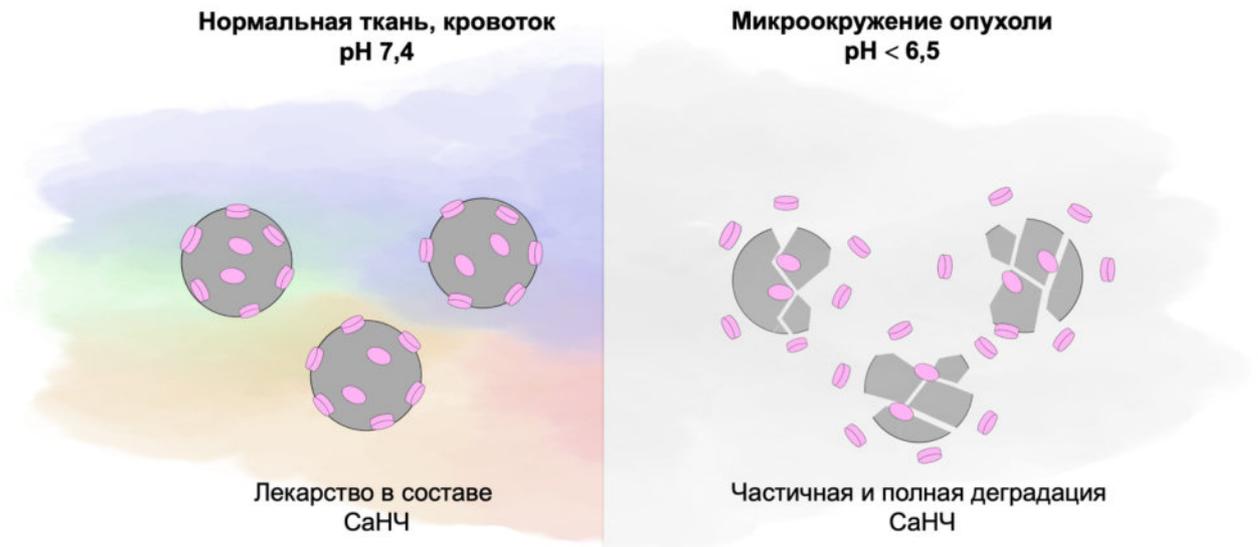


Рисунок 2.10 – Схема разрушения CaNC с присоединённым лекарством при понижении pH

Разрушение наноматериала в области-мишени может значительно увеличить эффективность извлечения ($E_{f_{rel}}$, %) терапевтического агента вплоть до 100 % (рисунок 2.10) [130, 131]. 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 [53]. Такие значения $E_{f_{rel}}$ являются не всегда достижимыми для наноносителей другой природы. Например, при $pH \approx 5$, наноматериалы диоксида кремния [132], смешанного оксида железа [133, 134] и их гибриды [135, 136, 137] 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 [138]. В большинстве исследований для стабилизации материала используют модифицированные аналоги наноносителей, часто для этих целей применяют полимерные молекулы [139]. 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 2.11).

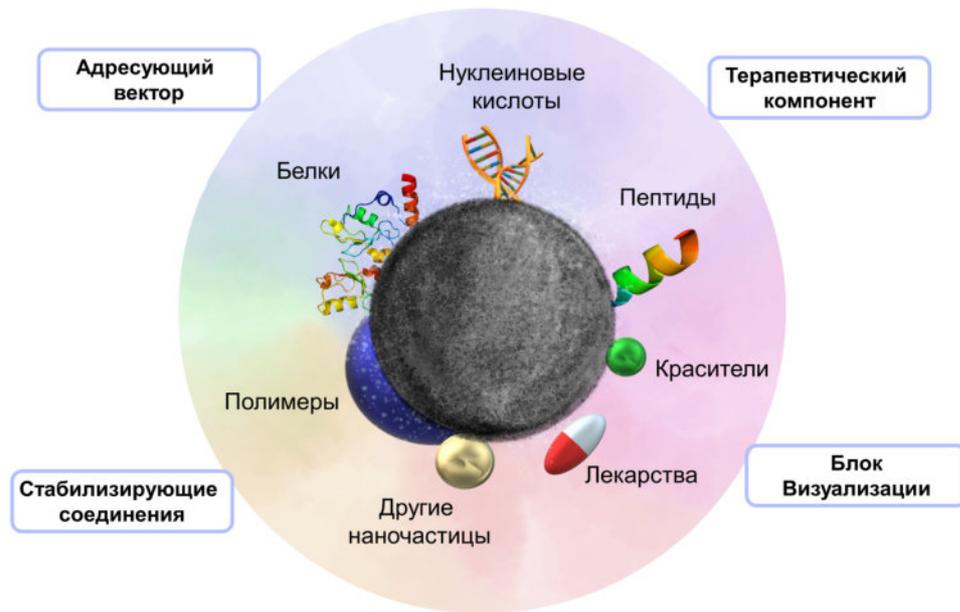


Рисунок 2.11 – Компоненты систем доставки БАС

Примеры вариантов из каждого функционального блока (рисунок 2.11) приведены в таблицы 2.9.

Таблица 2.9. Распространённые варианты компонент систем доставки БАС

Функция	Класс	Молекулы	Направленность	Ссылка
Адресующий вектор	Белки и полисахариды	Антитела	Направлен на рецепторы антиэпидермального фактора роста (EGFR) (цетуксимаб)	140
		Аффитела – высокоаффинные белки (меньше обычных антител)	Направлен на рецепторы человеческого эпидермального фактора роста 2 (HER2) в линии клеток рака молочной железы SK-BR-3	141
		Трансферрин (Tf)	Направлен на рецепторы Tf на кровяной стороне гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) для доставки терапевтических препаратов через ГЭБ	142
		Гиалуроновая кислота (ГК)	Направлен на CD44, который сверхэкспрессируется на поверхности раковых клеток стволовых клеток	143

	Пептиды	Пептид-1, связывающийся IL- 4R (IL4RPeP-1)	Направлен на рецептор интерлейкина-4 (IL-4R), экспрессируемого в клетках опухоли легких и в эндотелиальных клетках опухоли	144	
		Пептид аргинилглициласпа рагиновой кислоты	Связывает интегрины, которые сверхэкспрессируются в эндотелиальных клетках сосудов, присутствующих в опухолевой ткани	145	
	Аптамеры	AS-1411	Распознает нуклеолин (белок, экспрессия которого повышена во многих линиях раковых клеток)	146	
		GBI-10	Взаимодействует с тенаксином-С (белок, сверхэкспрессирующийся во внеклеточном матриксе аденокарциномы протоков поджелудочной железы)	147	
	Малые молекулы	Фолиевая кислота	Направлен на рецепторы фолата, сверхэкспрессирующегося в клетках солидных опухолей и макрофагах	148	
		Анисамид	Направлен на рецепторы sigma-1, сверхэкспрессирующегося в раковых клетках	149	
		Фенилбороновая кислота	Прочно связывает N- ацетилнейраминовые кислоты, которые являются основными компонентами сиаловой кислоты на поверхности опухолевых клеток	150	
	Терапевтическ ий агент	Малые молекулы	Доксорубицин	Интеркалирует нуклеотидные основания и связывается с липидами клеточной мембраны	99
			Оксалиплатин	Формирует связи внутри одной нити или между нитями двойной спирали ДНК и нарушающих её синтез	151

		Тимохинон	Вызывает окислительный стресс и стимулирует апоптотические пути с ингибированием аутофагии, ангиогенеза	100
	НК	miRNA-204-5p	миРНК-супрессор опухоли	151
		Патисиран	Подавляет синтез белка транстиретина путём РНК-интерференции	152
		GIVLAARI (siRNA)	Лечение острой печеночной порфирии	153
Блок визуализации	Красители	Родамин 6G, кумарин 6 флуорисцин, бодипай, цианиновые красители	Для визуализации НЧ <i>in vivo</i>	154
Стабилизирующие соединения	Полимеры	Полиэтиленгликоль	Увеличивает время циркуляции НЧ <i>in vivo</i>	155
		Твин 20, Triton X, СТАВ	Стабилизирует размеры частиц в суспендированной форме	156
	Белки	Альбумин	Стабилизирует состав НЧ, препятствует нецелевому высвобождению препарата	73

В таблице 2.9 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 [157]. Красители обеспечивают возможность детекции биораспределения в организме [158]. 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 [159]; с золотыми наночастицами – появление оптических свойств, способствующих гипертермии [160]. 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 [161].

Использование адресующих молекул для увеличения эффективности концентрирования транспортёра в заданной области – метод, основанный на узнавании транспортёром специфических свойств опухоли. Распространённо применяют нацеливание на дендритные клетки, опухолеассоциированные макрофаги и фибробласты [162].

В таблице 2.10 будут просуммированы последние достижения в области доставки противоопухолевых средств системами на основе СаНЧ.

Таблица 2.10. Системы доставки лекарств на основе СаНЧ

Носитель	Присоединяемые молекулы	Характеристики	Основные результаты	Ссылка
СаНЧ-Гепарин (СаНЧ-Нер); СаНЧ-Этиленгликоль (СаНЧ-Ег)	Изотиоцианат родамина В (Rho)	СаНЧ: 3580 нм; СаНЧ-Нер: 835 нм; СаНЧ-Ег: 564 нм; Ёмкость (E) _{СаНЧ-Нер} : 50,4 мкг/моль; E _{СаНЧ-Ег} : 130,5 мкг/моль	$E_{f_{rel}}$ СаНЧ-Ег: при pH 6 – 65%; при pH 7 \leq 10% (плато за 3 дня). После инкубации с СаНЧ-Ег метаболическая активность клеток MDA-MB-231 составила 70,4 %, SK-BR-3 – 81,2 % и MCF10A – 88,7 %.	43
СаНЧ	DOX	СаНЧ: 204 \pm 8 нм; СаНЧ@DOX: 204 \pm 8 нм; E : 659 \pm 5 мкг/мг	$E_{f_{rel}}$: при pH 5 – 80%; pH 7 – 20% (плато за 2 ч). IC 50 (A549): СаНЧ/DOX 0,97 \pm 0,04 мкМ; DOX 2,41 \pm 0,02 мкМ.	53
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 В16-F10 у мышей сократился на 94% при внутриопухолевом введении и на 71% – при внутривенном.	65
СаНЧ, полученные в присутствии ПВП и DOX	DOX	СаНЧ/DOX: 213 \pm 10 нм; Доля DOX: 4.6%.	$E_{f_{rel}}$: 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 (на модели ксенотрансплантированной подкожной опухоли CT-26 у мышей BALB/c)	69

CaHЧ	Гемцитабин (GEM)/Триапин (ингибитором нуклеотидредуктазы)	CaHЧ: 106 ± 5 нм; CaHЧ@GEM/Триапин: 129 ± 7 нм; E к GEM: ≈ 400 мкг/мг; E к Триапин: ≈ 1 мг/мг.	При pH 5,7 GEM в течение 24 часов высвободилось $\approx 80\%$ 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.	163
CaHЧ, полученные из раковин <i>Anadara granosa</i>	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%).	105
CaHЧ, полученные из раковин <i>Anadara granosa</i> 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; E : < 200 мкг/мг	$E_{f_{rel}}$ для GEF и PTXL при различных значениях pH 7,4, 6,5 и 5,6 не превышали 30% за 100 ч.	108; 164

СаНЧ	DOX/Thym	СаНЧ: 54 ± 10 нм; СаНЧ@DOX/Thym: 60 ± 11 нм	<p>При pH 4,8 достигнуто 100% высвобождения лекарственного средства, pH 6 – 70%, pH 7,4 – 50%. Жизнеспособность клеток составляла 80% при концентрации СаНЧ 1000 мкг/мл. Данные получены на клеточной линии MDA-MB-23. Показано снижение клеточной миграции.</p> <p>IC 50 DOX через 24, 48 и 72 ч: 1,8; 0,32; 0,14 мкг/мл.</p> <p>IC 50 СаНЧ@DOX через 24, 48 и 72 ч: 2,6; 0,97; 1,33 мкг/мл.</p> <p>IC 50 Thym через 24, 48 и 72 ч: 1,0; 0,56; 0,37 мкг/мл.</p> <p>IC 50 СаНЧ@Thym через 24, 48 и 72 ч: 0,81; 1,5; 1,44 мкг/мл.</p> <p>IC 50 DOX/Thym через 24, 48 и 72 ч: 1,6; 0,55; 0,32 мкг/мл.</p> <p>IC 50 СаНЧ@ DOX/Thym через 24, 48 и 72 ч: 2,0; 0,47; 0,095 мкг/мл.</p> <p>Усиление апоптоза – процент поздних апоптотических клеток для свободного DOX через 24 / 48 / 72 часа составил 24,4, 10,9 и 8,44% соответственно, тогда как для СаНЧ@ DOX он составил 8,47, 23 и 5,1% соответственно. Процент некротических клеток для свободного DOX через 24 / 48 / 72 часа составил 1,7, 0,88 и 0,34% соответственно, тогда как для СаНЧ@ DOX он составил 1,04, 4,08 и 4,1% соответственно.</p>	131, 165
СаНЧ, модифицированные индоцианиновым зелёным (ICG), совместно с DOX, инкапсулировали в хондроитинсульфате (PSC)	DOX	СаНЧ: 123 ± 10 нм; СаНЧ-ICG: 221 ± 12 нм; СаНЧ-ICG-PSC: 335 ± 30 нм; СаНЧ-ICG-PSC@DOX: 407 ± 30 нм; Доля DOX: 6.79%.	<p>$E_{f_{rel}}$: при pH 5 – 43,8 %; 29,6% – при pH 7 (плато за 96 ч).</p> <p>IC 50 (4T1): СаНЧ-ICG-PSC@DOX 5 мкг/мл; DOX 7 мкг/мл.</p> <p>Снижение объёма опухоли (4T1 у мышей Balb/c) в 2 раза сильнее при обработке СаНЧ-ICG-PSC@DOX по сравнению с индивидуальным DOX.</p>	166

Наногибрид CaHЧ и фосфата кальция (CaP), модифицированный липидным слоем и нацеленный на рецептор фолиевой кислоты (FA),	α -токоферилсукцинат (α -TOS)/CD siPHK	CaHЧ-CaP@ α -TOS: 40 нм; Доля α -TOS: 15%; CaHЧ-CaP@ α -TOS/siPHK: 50 нм; Доля siPHK: 40 мкг/мг.	Клеточное поглощение CaHЧ-CaP-FA усиливается за счёт FA-опосредованного пути до 55% проникновения при 10% мас. FA. Совместная доставка α -TOS/siPHK усиливает апоптотический эффект за счёт взаимодействия между выделением активных форм кислорода. Доля клеток, обработанных CaHЧ-CaP@ α -TOS/siPHK, находившееся в позднем апоптозе составила 35 ± 2 %, а некротических – 17 ± 3 %	167, 168
CaHЧ, модифицированы аптамерами к димерной форме муцина MUC1	Эпирубицина (Epi), Мелиттин (Mel)	CaHЧ: 300 нм; E_{Epi} : 22,7 нмоль/мг; E_{Mel} : 6,4 нмоль/мг	E _{rel} (Epi): при pH 5 – 80%; при pH 7 – 30% (плато за 48 ч). Жизнеспособность клеток (MCF-7) после обработки CaHЧ, Mel, Epi, CaHЧ-MUC1@Epi, CaHЧ-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 ± 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 карцином толстой кишки у мышей (C26) мышей BALB/c в группах PBS, Epi и комплекс CaHЧ-MUC1@Epi, CaHЧ-MUC1@Mel после 22 дней лечения составили $6832,26 \pm 218$ мм ³ , $3743,38 \pm 285$ мм ³ и 2162 ± 223 мм ³ соответственно.	169
CaHЧ, модифицированные циклодекстрином и глицерином	Ацетат токоферола (AT)	CaHЧ: 200 нм; E : 550 мкг/мг	E_{rel} : при pH 5 > 90%; при pH 7 – высвобождения не наблюдается.	170
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; E : 160 -1900 мкг/мг	E_{rel} : при pH 5 > 90%; 20% – при pH 7. IC 50 (HeLa): CaHЧ-Fe ₃ O ₄ @DOX $1,2 \pm 0,1$ мкМ; DOX $2,8 \pm 0,1$ мкМ; IC 50 (MCF-7): CaHЧ-Fe ₃ O ₄ @DOX $2,0 \pm 0,1$ мкМ; DOX $3,1 \pm 0,3$ мкМ.	171

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, подчёркивают потенциал применения СаНЧ в качестве компонента систем доставки лекарств (таблица 2.10).

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+}). Внутриклеточные ионы кальция (Ca^{2+}) влияют на баланс пролиферации и апоптоза [172]. Аномальная частота передачи сигналов Ca^{2+} в раковых клетках, из-за ускоренного деления, делает их более уязвимыми к модуляции Ca^{2+} , чем нормальные клетки, что обеспечивает избирательность подхода. Авторы работы [173] показали, что композит из карбоната кальция с фосфолипидом и куркумином может специфически повышать внутриклеточную концентрацию Ca^{2+} , вызывая перегрузку Ca^{2+} и запуская митохондриальный апоптоз в клетках MCF-7, при этом не затрагивая нормальные гепатоциты (L02), что может быть перспективным подходом для эффективной терапии рака.

Авторы [174] показали эффективность применения СаНЧ для устранения физико-химических нарушений опухолевого микроокружения для стимуляции противоопухолевого иммунитета организма. Иммуносупрессивность микроокружения опухоли (повышенная кислотность и уровень активных форм кислорода (АФК), гипоксия) оказывает пагубное воздействие на противоопухолевые иммунные клетки, в результате чего происходит значительное снижение иммунитета. Иммунотерапевтические СаНЧ, нагруженные каталазой (СаНЧ@CAT), были исследованы в качестве универсального мультимодулятора для нормализации микроокружения опухоли и активации противоопухолевых иммунных реакций (рисунок 2.12).

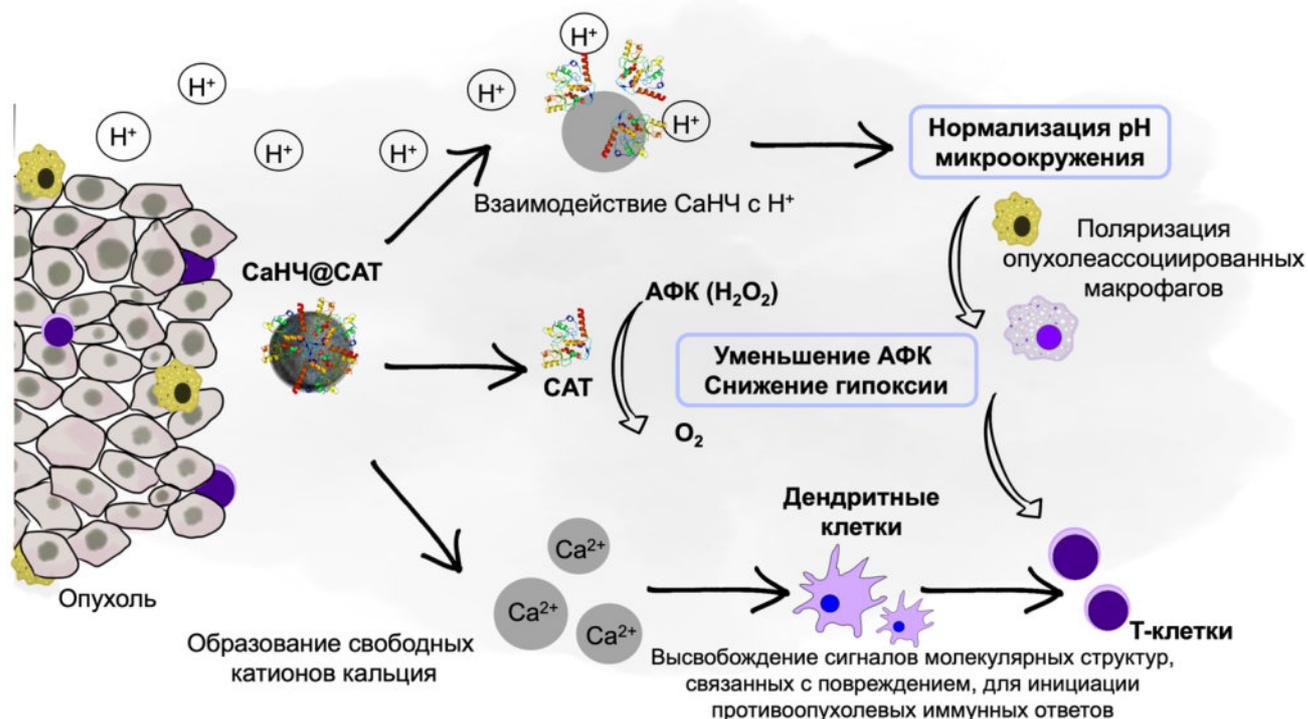


Рисунок 2.12 – Схема совместного действия каталазы и СаНЧ [174]

СаНЧ могут реагировать с избыточными протонами опухолевого микроокружения для нормализации pH. Каталаза ускоряет разложение АФК, генерируя O_2 . Высвобождение Ca^{2+} 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 СаНЧ, 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 $\alpha PD-1$ (антитело, которое специфически связывается с белком программируемой клеточной гибели PD-1) и ингибирование роста опухоли (как леченных, так и первичных случаев) [174].

Аналогично, в исследовании использовали совместное влияние избытка Ca^{2+} и противоопухолевого препарата куркумина. СаНЧ (≈ 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 Ca^{2+} (до 82 % за 6 ч), вызывая перегрузку катионов кальция и запуск апоптоза на клетках MCF-7, сохраняя при этом нормальные гепатоциты (L02) [173].

Понимание состояния испытаний СаНЧ в качестве носителей БАС на лабораторных животных является важным для прогнозирования дальнейшего применения материала в

биомедицине. Эффективность конструкции зависит от выбора стратегии введения носителя, которая определяется областью-мишенью, а также физико-химическими и фармакологическими свойствами БАС [65, 175]. Для СаНЧ в исследованиях *in vivo* применяют внутривенные [65, 130, 176, 177, 178, 179] и внутримышечные инъекции [180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187]. Кроме того, опубликованы результаты исследований на модельных животных применения перорального пути введения наночастиц карбоната кальция [47, 188, 189, 190, 191], интраназального [192, 193, 194], лёгочного [195, 196, 197, 198] и трансдермального [199, 200, 201, 202, 203, 204, 205] введений.

Затруднительно однозначно выбрать наилучший вариант введения СаНЧ в организм. В исследованиях на животных, наноразмерный карбонат кальция при доставке противоопухолевых препаратов предпочтительно вводят местно или внутривенно, в зависимости от модели опухоли. В случае перорального введения, сравнительное исследование нано- (СаНЧ) и микрочастиц карбоната кальция показало, что СаНЧ быстрее всасываются в системный кровоток, но общая пероральная абсорбция не зависит от размера частиц. Вероятно, быстрое растворение СаНЧ после приёма влияет на скорость абсорбции, но не на её эффективность. СаНЧ могут более активно функционировать с биологическими матрицами *in vitro* и *ex vivo* (за счёт большей ёмкости), но что *in vivo* их биологические взаимодействия и биокинетика не зависят от размера частиц [189]. Интраназальный, лёгочный и трансдермальный варианты специфичны для конкретных мишеней и зачастую не могут быть универсальны.

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 нанокомпозитов.

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.

2.2.2 Системы доставки нуклеиновых кислот / генная терапия

Проблема низкой физиологической стабильности нуклеиновых кислот (НК, например, плазмидные ДНК, антисмысловые олигонуклеотиды, siРНК) внутри организма значительно ограничивает применение современных успехов генной терапии, в частности для разработки эффективных вакцин и терапевтических средств нового поколения [206]. Решением этой проблемы могут быть конструкции, препятствующие деградации БАС внутренними защитными системами организма, которые приводят к утрате терапевтических свойств НК (ферментативная деградация в кровотоке, фагоцитоз и т. д.) [207]. Один из вариантов возможности эффективного применения такого метода – использование носителя, способного к транспорту терапевтических молекул внутрь клетки-мишени [208].

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, 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 [209]. 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 транспортёр 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 физико-химические свойства липосомальной композиции (размер, поверхностный заряд, свойства и т. д.) [210].

Другой перспективной альтернативой из ряда биodeградируемых частиц могут выступать материалы на основе карбоната кальция, благодаря отсутствию токсичности и рН-лабильности [17, 211]. Перспективность этого подхода заключается в том, что при попадании таких частиц в клетку, они будут склонны к деградации и, как следствие, высвобождению нуклеиновой кислоты

внутри клетки. Однако получение стабильной суспензии монодисперсных частиц карбоната кальция, содержащих терапевтическое количество НК, является отдельной материаловедческой задачей, что связано с природой материала, одноимённостью поверхностных зарядов носителя и транспортируемой молекулы, а также склонностью частиц к агрегации [126].

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 [212] 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 2.13).

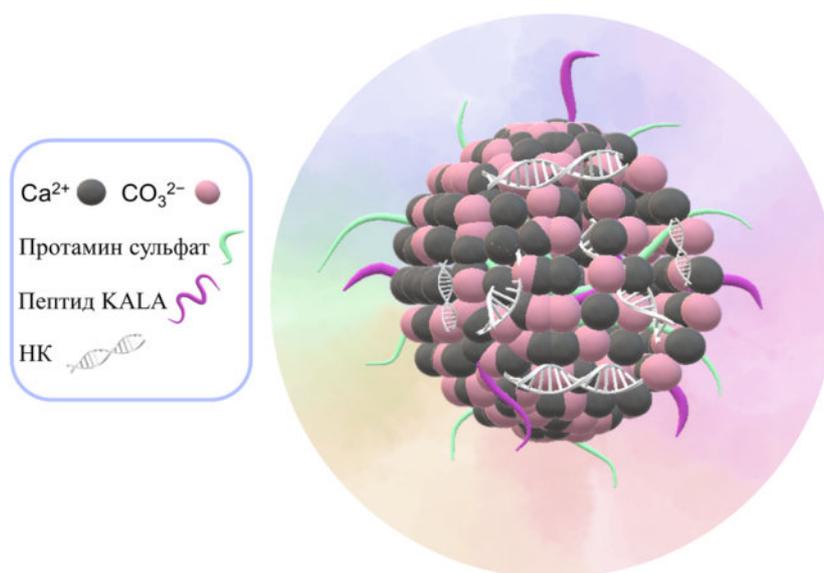


Рисунок 2.13 – Схематичное изображение состава системы доставки НК: KALA/PS/CaCO₃/НК [212]

Функционализированные наночастицы были приготовлены методом осаждения при смешивании растворов растворимых солей карбоната, хлорида кальция 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 2.11.

Таблица 2.11. Сравнительные характеристики (гидродинамический размер (d), дзета-потенциал (ζ), Эффективность присоединения НК,) образцов CaCO₃/НК, PS/CaCO₃/НК, KALA/CaCO₃/НК, KALA/PS/CaCO₃/НК [212]

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 липофектаминам (разница более 25 %). В обсуждаемой работе авторы [212] повысили эффективность присоединения НК к наноносителю более, чем на 30 % за счёт применения протамин сульфата в композиции с карбонатом кальция. Вероятно, компонент способствовал изменению поверхностного отрицательного заряда транспортёра на положительный, и как следствие, участию не только гидрофобных, но и электростатических взаимодействий в образовании комплекса НК-НЧ. Также в работе показано эффективное клеточное проникновение наносистемы через клеточную мембрану.

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. Стабилизация наночастиц цитратом натрия, позволила получить нетипичный для СаНЧ положительный поверхностный заряд, увеличивающий эффективность взаимодействия карбоната кальция 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 (соотношение СаНЧ:ДНК = 2:30 мкг) в сравнении с липосомальным аналогом (10:2 мкг). Этот эффект авторы [213] объясняют субмикронным размером комплекса, а также тем, что

двухвалентный катион металла Ca^{2+} 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.

Авторы [214] в своём исследовании синтезировали CaCO_3 (900 нм) и модифицировали материал полиэтиленгликолем (PEI), получив композит PEI- CaCO_3 для адсорбции гена p53. После трансфекции p53 нагруженные PEI- CaCO_3 значительно снижали пролиферацию опухолевых клеток. Несмотря на крупные размеры композита, авторами показано *in vitro* отсутствие токсичности частиц до 5 мг/мл.

Несмотря на потенциал систем доставки НК наночастицами карбоната кальция, количество статей демонстрирующих результаты исследований за последние годы невелико, с чем связано отсутствие обзоров, полностью посвящённых этой теме. Вероятно, это обусловлено проблемами, связанными с отрицательным зарядом СаНЧ и нуклеиновой кислоты, а также методическими сложностями получения частиц карбоната кальция нанометрового размера [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 злокачественных новообразований, бактериальных и грибковых заболеваний. В случае успешной доставки НК и сохранения её 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 [30, 215].

Поскольку нуклеиновые кислоты способны модулировать экспрессию генов, ответственных за множественную лекарственную устойчивость (МЛУ), связывание химиотерапевтических средств с нуклеиновыми кислотами было предложено в качестве подходящей стратегии для повышения эффективности терапии рака [216].

Этот метод применим в исследованиях, направленных на повышение эффективности лечения злокачественных новообразований использованием сочетания методов совместной доставки химиотерапевтических препаратов и нуклеиновых кислот [217].

В следующей работе двуцепочечную 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 2.14).

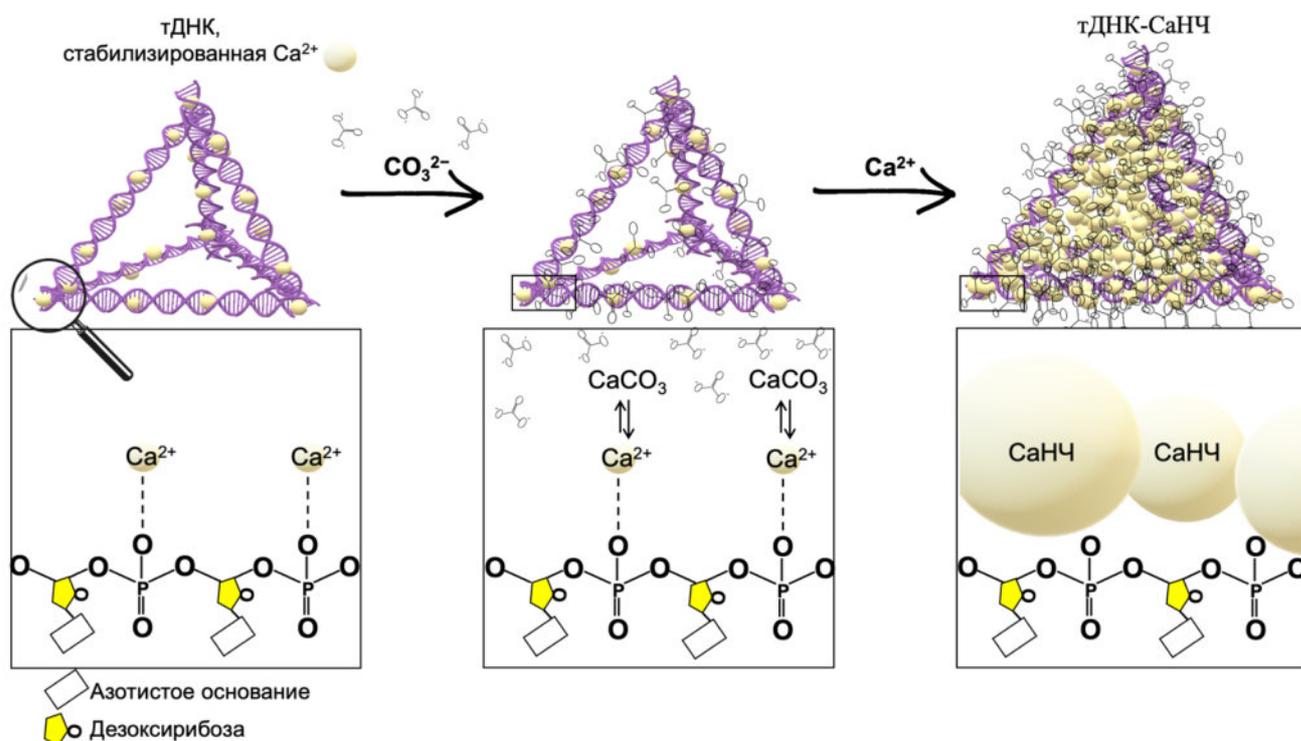


Рисунок 2.14 – Дизайн комплекса тДНК-СаНЧ [46]

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/тДНК-СаНЧ вплоть до 100 нМ [46]. 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 (противоопухолевое средство – низкомолекулярный мультикиназный ингибитор, представляет собой тозилатную соль сорафениба) и микроРНК miR-375 (супрессор опухолей) (рисунок 2.15) [218].

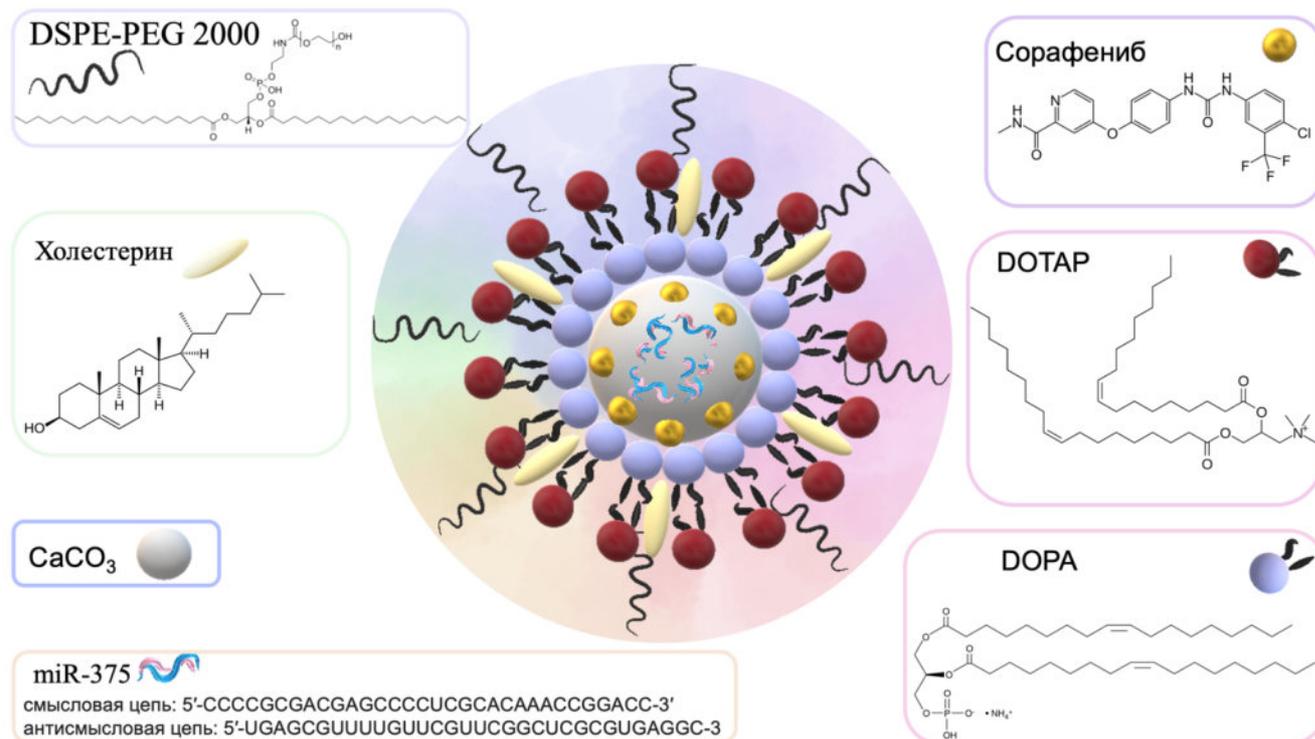


Рисунок 2.15 – Дизайн системы доставки сорафениба и miR-375 на основе CaНЧ [218]

Композит ($d: 101 \pm 12$ нм; $\zeta: 40 \pm 3$ мВ) характеризуется сферической формой с тёмным ядром из карбоната кальция и светлой липидной оболочкой по данным ПЭМ. Эффективность связывания частиц с сорафенибом и miR-375 составила 35 ± 9 % и 55 ± 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 гепатоцеллюлярной карциномы человека на модели голых мышей. *In vivo* показано подавление роста опухоли, за счёт увеличения концентрации сорафениба в опухоли в 2 – 5 раз и времени полувыведения препаратов. Полученные в исследовании результаты, демонстрируют что модуляция аутофагии в раковых клетках с помощью комбинации miR-375 и сорафениба может быть перспективным путём лечения прогрессирующей гепатоцеллюлярной карциномы [218].

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, хроническая токсичность, приобретенная устойчивость трансформированных клеток к терапевтическим препаратам 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. Разработка подходов к доставке НК может увеличить терапевтическую эффективность лекарственных препаратов на их основе [32].

2.2.3 Терапия, комбинированная с диагностическими методами

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 [219].

Для материалов на основе CaCO_3 показана возможность использования в диагностике, что делает их перспективными кандидатами применения в области тераностики [220]. Такие платформы на основе CaCO_3 можно разделить на три типа в зависимости от режима визуализации:

- терапия под контролем ультразвука (УЗ);
- фотостимулированная терапия;
- терапия под действием направленного магнитного поля (метод магнитно-резонансной томографии, МРТ) [17].

2.2.3.1 Терапия под контролем ультразвука (УЗ)

Ультразвуковое исследование (УЗИ) — один из самых информативных неинвазивных диагностических инструментов визуализации. Не все варианты новообразований возможно детектировать методом УЗИ из-за схожести макроструктуры нормальных и трансформированных тканей. 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. Min K. H. и коллеги [221] следили за генерацией CO_2 ультразвуковой визуализацией при постепенном разложении карбоната кальция, связанного с DOX. В работе продемонстрирован

сильный устойчивый экзогенный сигнал, а также направленное высвобождение DOX, усиливающееся под действием УЗ (рисунок 2.16).

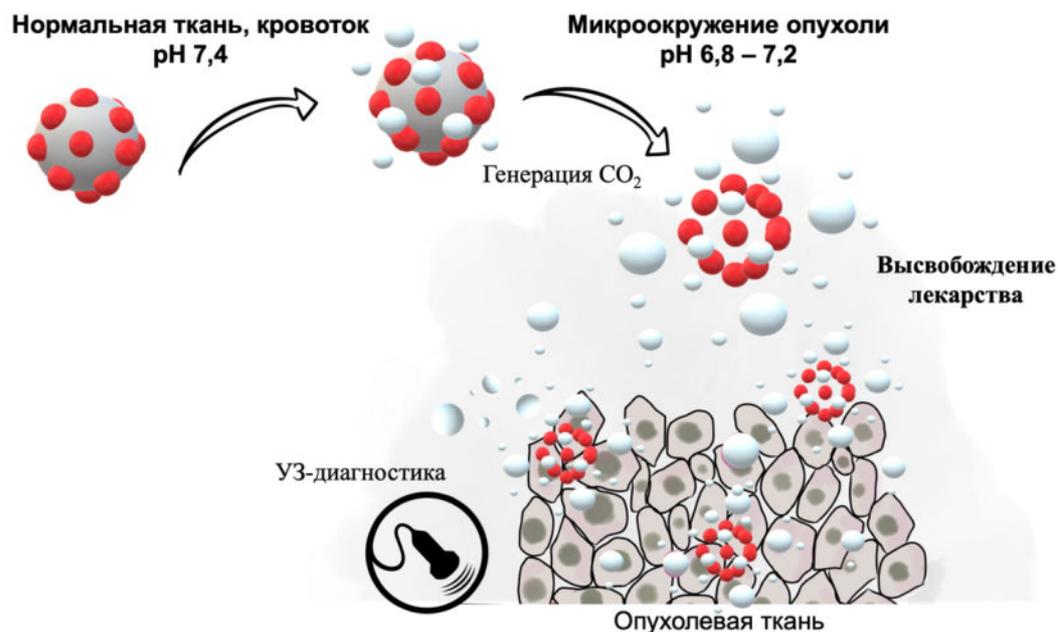


Рисунок 2.16 – Схематичное представление модели реализации УЗ диагностики при генерации CO₂ в процессе деградации CaCO₃

Chiang P. H. и др. сконструировали многокомпонентный гибридный материал CaHЧ и фосфата кальция (CaP), модифицированный диоксидом кремния, со фторированной поверхностью [222]. 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 [223] продемонстрировали возможности CaHЧ, связанных с монометилловым эфиром гематопорфирина (HMME, соносенсибилизатор). 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 злокачественных новообразований.

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

2.2.3.2 Фотодинамическая терапия

Фотодинамическая терапия — это метод лечения, основанный на использовании облучения светом на определённой 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 [224].

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 CaНЧ, DOX и флуоресцентного контрастного препарата – индоцианинового зелёного (ICG) для химиотерапии и флуоресцентной/УЗ-визуализации в двух режимах. Распределение CaНЧ/DOX/ICG в модели подкожной опухоли оценивалось с помощью визуализации в ближнем инфракрасном диапазоне. Через 6 часов после введения НЧ наблюдали флуоресценцию ICG по всему объёму тела мыши, а через 24 ч продемонстрировано значительное накопление препарата в области опухоли. Более того, в работе показано улучшение контраста УЗ-изображений после инъекции композита [69].

В другом исследовании разработали гибридный материал на основе наночастиц карбоната кальция и наностержней золота (AuНЧ), покрытый декстраном (DX) и фосфолипидом (POPS) для включения терапевтических агентов, включая DOX, 17-(аллиламино)-17-деметоксигелданамицин (17-AAG), афатиниб и амилазу (AuНЧ@CaНЧ@POPC-AcDX) (рисунок 2.17) [225].

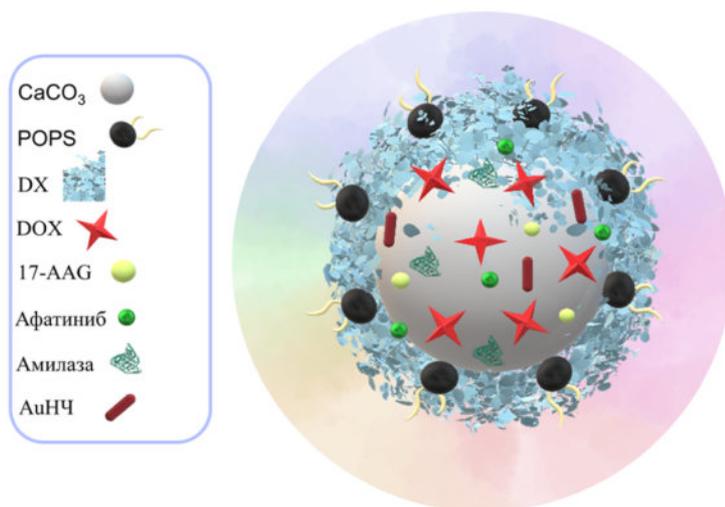


Рисунок 2.17 – Дизайн системы AuНЧ@CaНЧ@POPC-DX [225]

В работе разработаны перспективные биоразлагаемые фототермические и рН-чувствительные гибридные частицы AuНЧ@СаНЧ@РОРС-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 AuНЧ@СаНЧ@РОРС-DX способен к рН-зависимому и термолабильному высвобождению AuНЧ из состава нанокомпозита. Показана высокая эффективность одновременной инкапсуляции в состав системы DOX, 17-ААГ и амилазы (до 86 %) и также рН 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 [225].

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. % СаНЧ (≈ 180 нм). Гликозаминогликан является нацеливающим агентом на рецепторы CD44 (опухолевые клетки пищеварительного тракта). В исследовании на мышах показано, что при облучении опухолей НСТ116 и MCF-7 зелёным светом 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 [226].

Yakubova A. A. и коллеги [65] разработали систему для комбинированной химиофотодинамической терапии фотосенсибилизатором (Хлорин е6, Се6) и химиотерапевтическим агентом (доксорубин, DOX) на основе СаНЧ ($d: СаНЧ: 60 - 80$ нм; $E: 96$ мг DOX и 0,16 мг Се6 на 9,45 мг СаНЧ). 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. Гистологический анализ органов после применения индивидуальных наночастиц показал незначительную токсичность *in vivo* по отношению к жизненно важным органам, таким как сердце, лёгкие, печень, почки и селезёнка. Таким образом, эта работа демонстрирует успешный подход к повышению эффективности противоопухолевой терапии.

Группа исследователей под руководством Jin Ren получили гибридные частицы (407 нм), содержащие доксорубин, карбонат кальция и индоцианиновый зелёный для химиофототермической терапии рака. Благодаря карбонату кальция и связанному с ним дисульфидной связью сополимеру, наночастицы продемонстрировали чувствительное к рН 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 [166].

2.2.3.3 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 композитов $\text{Fe}_3\text{O}_4@/\text{CaCO}_3$ ($\text{Fe}@/\text{CaHЧ}$), однако в большей части исследований получены микрочастицы [227,159].

Эффективность наноматериалов была продемонстрирована на моделях солидных опухолей, рак груди и печени. Исследования на клеточных культурах показали их высокую биосовместимость и низкую цитотоксичность [171, 228]. Эти нанокompозиты обладают способностью к направленной доставке лекарственных веществ, а также возможностью визуализации опухолевых тканей с помощью МРТ, что делает их перспективными для персонализированной медицины. Такие препараты демонстрируют высокую эффективность адсорбции красителей и лекарств, что делает их перспективными для исследований в области тераностики [229, 230].

2.2.4 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), являются 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 [231].

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 определённого 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 [232].

Среди биodeградируемых материалов, карбонат кальция, как сообщается, является биорезорбируемым, биodeградируемым и остеокондуктивным [232, 233].

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 распространённого типа биокерамики (гидроксилапатит/трикальцийфосфат). Кроме того, продукты деградации карбоната кальция способны метаболизироваться в компоненты костной ткани, ускоряя терапию [234].

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 хемокину 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 [235].

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. [236].

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 [237].

Н. Shaked и коллеги [238] 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 быстрый. 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 2.18).



Рисунок 2.18 – Схема получения чернил на основе карбоната кальция [239]

В работе показано, 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 [239].

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

Авторы [240] представили метод покрытия каркасов из полимолочной кислоты частицами карбоната кальция с помощью давления и нагрева. Модифицированные каркасы были равномерно поверхностно функционализированы CaH_2 (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 pH 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.

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 [241].

Chernozem R. V. и соавторы [242] в работе для реконструкции костей разработали многофункциональную биоактивную платформу на основе биоразлагаемых волокнистых каркасов из полигидроксибутирата. 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.

В другой работе, авторы [243], 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 биodeградации каркаса для реконструкции костей с улучшенной функциональностью доставки лекарств.

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 [244].

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 [239–241]. 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 [245]. 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. [246]. Наиболее широким применением наночастиц карбоната кальция является доставка лекарственных препаратов в кислую опухолевую среду. Их эффективность обеспечивается уникальными свойствами: рН-зависимой растворимостью, биосовместимостью, пористостью и возможностью модификации поверхности. Эти характеристики делают СаСО₃ одним из самых перспективных носителей в области онкотерапии и целенаправленной доставки лекарств.

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 нерешёнными вопросами. В первую очередь, недостаточно информации о хронической токсичности, связанной 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 [247, 248]. В исследованиях рассматриваются только острая токсичность и биораспределение путём регистрации повреждений органов после инъекции. Отсюда следует дополнительная проблема, связанная с методами детекции, основанными на применении красителей, искажающих исходные свойства СаНЧ (преимущественно размер, поверхностный заряд). Представление о безопасности применения СаНЧ основано 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, а также применения дополнительных путей введения наночастиц в организм. Иначе говоря, для каждой новой методики синтеза необходима систематическая оценка кратковременной и хронической токсичности для дальнейшего внедрения в клинику полученных материалов [220].

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. Кроме того, проблема устойчивой нагрузки СаНЧ целевыми молекулами остается не до конца решённой [17, 249].

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, 250]. Однако продемонстрированный высокий потенциал применения наноматериалов на основе карбоната кальция в биомедицине, несомненно, приведёт к решению вышеперечисленных вопросов в ближайшее время и СаНЧ займёт свою нишу в области терапии, тераностики и тканевой инженерии.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 Реагенты

В работе были использованы следующие реактивы: гидрокарбонат натрия, хлорид кальция, раствор хлорида магния, нейлон-6, (3-аминопропил) триэтоксисилан (АПТЭС), ацетат натрия (NaOAc), гидроортофосфат натрия (Na_2HPO_4), дигидроортофосфат натрия (NaH_2PO_4), тетраборат натрия ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$), тетраэтоксисилан (ТЭОС), Твин 20, Triton X-100, меркаптоэтанол-2, БСА (все Sigma-Aldrich, США), кальций хлористый (Химпром, Россия), гидрофосфат натрия (Альфахим плюс, Россия), Твин 20 (BioFroxx, Германия), формамид, натрий углекислый кислый, магниевый хлористый 6-водный (все PanReac AppliChem, Испания), доксорубин (TEVA, Израиль), L-аргинин гидрохлорид (Reanal, Будапешт), соляная кислота, уксусная кислота (AcOH), борная кислота (H_3BO_3) хлорид калия (KCl), хлорид натрия (NaCl) (все Реахим, Россия), мочевины, акриламид (АА), бромистый этидий (все AppliChem, Германия), трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), трис гидрохлорид (Tris-HCl), N,N-метилена(бис)акриламид (БАА), бромфеноловый синий, ксиленицианол FF, этилендиаминтетраацетат натрия (ЭДТА), додецилсульфат натрия (SDS) (все Amresco, США), цетилтриметиламмоний бромид (СТАВ), гексадецилтриметиламмоний бромид (НТАВ) (Хеликон, Россия), полиэтиленгликоль (ПЭГ) 1000/2000/6000 (Carl Roth, США), полиэтиленгликоль 2000 (Aladdin Scientific, США), стрептавидин-щелочная фосфатаза, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED), перхлорат лития, цитрат натрия $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (все Acros Organics, Бельгия), хромогенные субстраты BCIP (5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат динатриевая соль) и NBT (нитротетразолиевый синий) (Molecular Probes, США), аммиак водный (ОАО «Аурат», Россия), Кумасси R-250, 4-нонилфенилполиэтиленгликоль (NP-40), дитиотреитол (ДТТ), Coomassie protein assay reagent (все Thermo Scientific™, США), γ [^{32}P]-АТФ, полинуклеотидкиназа фага Т4 (Биосан, Россия), Stains All, персульфат аммония (APS) (все Acros, США), фосфат натрия двузамещенный додекагидрат (АльфаХимПлюс, Россия), фосфат натрия однозамещенный дигидрат (Реатэкс, Россия), Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles (MPP) (Promega, США), активированный эфир Cyanine5 (ООО Люмипроб РУС, Россия).

В работе были использованы следующие растворители: (2,2,2-трифторэтанол (ТФЭ) (PanReac AppliChem, Испания), н-гексан, ацетон (о.с.ч.), диметилсульфоксид (ДМСО), этанол, (все Реахим, Россия), физиологический раствор (МОСФАРМ, Россия), натрий-фосфатный буфер (PBS) (Amresco, США), ацетонитрил (AcN) (Компонент-реактив, Россия). Все растворы

приготовлены с использованием деионизованной воды, очищенной с использованием установки Millipore Simplicity 185 («Millipore», США).

В работе были использованы следующие материалы для клеточных работ: среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) с высоким содержанием глюкозы и добавкой GlutaMAX™, раствор антибиотиков-антимикотиков (все GIBCO, Life Technologies, США), DMEM (Servicebio, Китай), 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид (МТТ) (AppliChem, Германия), питательная среда для клеток RPMI-1640, фетальная бычья сыворотка (FBS) (все GIBCO, Invitrogen, США).

Клеточные линии НЕК293, А549, HeLa, MCF, НЕК293-GFP 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).

Все буферные растворы, использованные в работе представлены в таблице 3.1.

Таблица 3.1 – Буферные растворы, использованные в работе

Буфер	Сокращение	Состав	pH
Натрий-боратный	SBB	50 мМ Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O, 100 мМ HCl	8,5
Натрий-ацетатный	AcBuf	200 мМ NaOAc·10H ₂ O, 200 мМ AcOH	3,0 – 7,0
Трис-боратный	TBE	89 мМ Трис, 89 мМ H ₃ BO ₃ , 2 мМ ЭДТА	8,3
Фосфатно-солевой	PBS	2,3 мМ NaH ₂ PO ₄ , 7,7 мМ Na ₂ HPO ₄ , 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl	7,4
Для разведения нуклеиновых кислот	TEx1	50 мМ Tris-HCl, 1 мМ ЭДТА	8,0
Цитратно-солевой	0,5-SSC	75 мМ Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ ·2H ₂ O, 75 мМ NaCl	7,5
Для работы с МРР	Буфер-1	50 мМ Tris-HCl, 2 мМ NaCl	9,4
	Буфер-2	75 мМ Tris-HCl, 50 мМ NaCl	7,5
Для приготовления проб	Буфер 4х	200 мМ Tris-HCl, 400 мМ меркаптоэтанол-2, 4 % SDS, ~ 0,01 % Кумасси R 250, 40 % глицерин	6,8
Для цельноклеточных экстрактов	Буфер-3	10 мМ Tris-HCl, 200 мМ NaCl	8,0
	Буфер-4	10 мМ Tris-HCl, 200 мМ NaCl, 2 мМ ЭДТА, 40 % глицерин, 0,2 % NP-40, 2 мМ ДДТ	8,0

В работе использовали следующие олигонуклеотиды (таблица 3.2). 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.

Таблица 3.2 – Олигонуклеотиды, использованные при выполнении работы

Шифр	Последовательность
T10-bio	5'– bio– TTT TTT TTT T–3'
ON-bio	5'– TTT TT CAC TCT GTC ACC AGG CTG GAG TGC AGT GGTG TTT TT – bio– 3'
J ₁	5'– ATC GTT TAT GGT CGG AAC TA-[NH ₂] – 3'

3.2 Оборудование

Измерения размера частиц и дзета-потенциала (ζ -потенциала) проводили методом динамического светорассеяния (ДСР) 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 спектрофотометре Clariostar (BMG, Германия). Спектры ИК-Фурье регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре 640 ИК (Varian, США) в диапазоне от 4000 до 400 см⁻¹ при комнатной температуре после формирования таблетки исследуемого образца с KBr. Наночастицы концентрировали и / или отделяли от супернатанта методом центрифугирования в центрифуге MiniSpin (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 [³²P]-меченных олигонуклеотидов измеряли счётчиком сцинтилляции Tri-Carb 2800TR (Perkin-Elmer, США). Активность γ [³²P]-меченных НК, нанесённых на гель, детектировали с помощью фоточувствительного экрана (K-screen, Kodak) после экспонирования с гелем с использованием сканера Molecular Imager Phoros FX Plus (BioRad, США). Ультразвуковую (УЗ) обработку растворов проводили в УЗ-мойке Elmasonic S10H (Elma, Германия) или на ультразвуковом гомогенизаторе (Bandelin, Германия). Изображения просвечивающей конфокальной микроскопии были получены на LSM 710 (Zeiss, Германия) с использованием объектива Plan-Apochromat 100x/1,4, увеличение 1000x.

3.3 Методики экспериментов

3.3.1 Синтез наночастиц

3.3.1.1 Синтез наночастиц карбоната кальция (СаНЧ)

Частицы карбоната кальция получали методом осаждения, путём смешивания двух растворов солей с ультразвуковой обработкой на мойке (рабочая частота: 35 кГц, 5 мин) или гомогенизаторе (рабочая частота: 20 кГц, 5 мин): 100 мкл раствора CaCl_2 (0,007 – 0,100 М) по каплям добавляли к 1 мл водного раствора NaHCO_3 (0,1 М) в отсутствие 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 MgCl_2 (0,005 – 0,010 М) [251]. Добавки вводили как по отдельности, так и в виде смеси. Реакцию формирования СаНЧ в спиртовой смеси Твин 20 и ПЭГ 2000 проводили аналогично реакции в воде, путём замены растворителя на изопропанол [252]. После формирования, СаНЧ 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 [53, 253].

3.3.1.2 Синтез наночастиц фосфата кальция (СаР)

Частицы на основе фосфата кальция получали методом осаждения, путём смешивания двух растворов с ультразвуковой обработкой на мойке (рабочая частота: 35 кГц, 5 мин) или гомогенизаторе (рабочая частота: 20 кГц, 5 мин): 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, СаР центрифугировали в течение 10 мин при 13200 об./мин и редиспергировали в деионизированной воде, хранили при комнатной температуре.

3.3.1.3 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 Ковригиной и др. [254] и Ван и др. [255]. Навеску 0,28 г FeCl₃·xH₂O (1 ммоль) и 0,1 г FeCl₂·xH₂O (0,5 ммоль) растворяли в 10 мл HCl (1 М), раствор нагревали в течение 20 мин при 85 °С. Далее по каплям добавляли 95 мкл олеиновой кислоты (0,3 ммоль) в ацетоне и перемешивали в течение 5 минут при 85 °С (750 об./мин). После инкубации добавляли 2 мл NaOH (8 М) до pH 11,0, перемешивали (750 об./мин) в течение 30 мин при 85 °С. 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 воды (трижды). Наночастицы редиспергировали в деионизированной воде и хранили при комнатной температуре.

Наноконпозиты Fe@CaНЧ получали путём адаптации методики синтеза CaНЧ. Навеску 0,45 – 4,5 мг FeНЧ и 0,1 г полиэтиленгликоля 2000 растворяли в 0,8 мл 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 хлорида кальция (0,1 М), 0,010 мл хлорида магния (0,1 М) и 0,010 мл DMEM, медленно добавляли с ультразвуковой обработкой на мойке (рабочая частота: 35 кГц, 5 мин). Смесь перемешивали в течение 20 минут при 25 °С (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 [171].

3.3.1.4 Синтез наночастиц диоксида кремния (SiНЧ)

Способы получения SiНЧ были адаптированы из публикаций Rao K. S. и др. (спиртовой гидролиз ТЭОС в присутствии NH₃) [256], Masalov V. M. и др. (микроэмульсионный вариант с гидрохлоридом L-аргинина) [257] и Vazquez N. I. и др. (синтез в присутствии детергентов – СТАВ/НТАВ) [258].

Спиртовой 0,01 – 0,2 М раствор ТЭОС, содержащий 0,5 М аммиак, инкубировали в течение 20 ч при 25 °С (750 об./мин). SiНЧ отделяли от реакционного раствора

центрифугированием в течение 10 мин при 13400 об./мин, осадок промывали трижды 98 % этанолом [256].

Смешивали 3,5 мл 6 мМ водного раствора гидрохлорида L-аргинина, нагретого до 60 °С, с 0,5 мл смеси ТЭОС/н-гексан в объёмном соотношении $V(\text{гексан}):V(\text{ТЭОС}) = 6:5$. 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 [257].

Смешивали водный раствор 25 мг/мл СТАВ или НТАВ с триэтаноламином в соотношении по объёму 25 мкл на 1 мл. Раствор инкубировали в течение 1 ч при 95 °С (1400 об./мин). Далее по каплям к смеси добавили ТЭОС до концентрации 0,33 М 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 [258].

3.3.2 Определение устойчивости наночастиц в водных растворах и условиях близких к физиологическим

3.3.2.1 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). Инкубировали до полугода с периодическим контролем гидродинамических параметров методом динамического светорассеяния (ДСР). Регистрацию размера проводили как в растворах хранения, так и в воде.

3.3.2.2 Исследование массы сухого остатка нано- и микроматериалов при хранении (установление диапазона рН-зависимости CaНЧ)

Изменение массы сухого остатка регистрировали после инкубации 95 мкг CaНЧ (195 ± 5 нм) и 95 мкг микрочастиц CaCO_3 (1470 ± 180 нм) в течении 24 ч в 1 мл 100 мМ ацетатного буфера (рН от 3,0 до 7,0) при 25 °С и перемешивании (750 об./мин), далее 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.

3.3.3 Ковалентная модификация наноматериалов

К 1 мг СаНЧ или SiНЧ в 0,95 мл этанола 98 % добавляли 0,050 мл раствора (3-аминопропил)-триэтоксисилана (АПТЭС), 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). 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 отделяли центрифугированием и промывали AcN (3 × 3 мл).

3.3.3.1 Ковалентное присоединение активированного эфира красителя Cyanine5

Модифицированные наночастицы отделяли центрифугированием и промывали водой (1 × 3 мл). 10 мг поверхностно-активированных НЧ суспендировали в 100 мкл 50 мМ натрий-боратного буфера рН 8,5, затем добавляли 10 мкл раствора активированного эфира красителя Cyanine5 (Cy5) 10 мг/мл в ДМСО. Инкубацию проводили в течение 4 ч при 25 °С и перемешивании (1400 об./мин). Полученные наноконпозиты центрифугировали в течение 5 мин (13400 об./мин) и промывали ДМСО (3 × 1 мл) и водой (3 × 1 мл).

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

Модифицированные наночастицы (п. 3.3) отделяли центрифугированием и промывали 2,2,2-трифторэтанолом (ТФЭ) (1 × 3 мл). К 10 мг/мл поверхностно-активированных 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 50 мМ карбонат-бикарбонатном буфере (рН 9,0). Инкубацию проводили в течение 12 – 18 ч при 25 °С и перемешивании (1400 об./мин). Полученные наноконпозиты 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.

3.3.3.3 УФ-иммобилизация олигонуклеотидов на поверхность наночастиц, модифицированных нейлоном-6

УФ-иммобилизацию олигонуклеотида (ON) проводили путём добавления к суспензии частиц (НЧ-нейлон) (0,5 – 1 мг/мл) в 5 М водном растворе NaCl биотинилированного олигодезоксирибонуклеотида (bio-ТТТТТТТТТТ: T10-bio) до концентрации 10^{-6} М. Полученную смесь в чашке Петри («Corning», США, 35 мм×10мм) 10 мин обрабатывали ультрафиолетовым светом (2 ртутные лампы низкого давления ДБ-15, $\lambda = 253,7$ нм) на расстоянии 12 см. Далее собирали частицы центрифугированием, промывали водой (3 раза \times 5 мл), 98 % EtOH (2 раза \times 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, pH 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 1 М NaCl, 20 мМ MgCl₂, 200 мМ Tris (pH 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 промывали раствором, содержащим 20 % этанол, 0,5 % Твин 20 в буферном растворе, содержащем 20 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 100 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂ (4 раза \times 0,5 мл); раствором 0,1 % Твин 20 в буфере, содержащем 20 мМ Tris-HCl, pH 9,5, 100 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂ (1 раз \times 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 мМ Tris-HCl, pH 9,5, 100 мМ NaCl, 2 мМ MgCl₂. Визуализацию результата анализа проводили в течение 60 минут, фиксируя появление синего окрашивания частиц.

3.3.4 Селективное присоединение биотинилированных олигонуклеотидов на поверхность наночастиц с ковалентно присоединённым стрептавидином

Связывание олигонуклеотидов с НЧ-St и коммерческими частицами (Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles, MPP) проводили путём инкубации в течении 60 мин (250 об./мин при 25 °С) 15 мкл водного раствора ON* (10^{-6} М с 10%-ным молярным содержанием радиоактивно меченого олигонуклеотид) и 150 мкл стрептавидиновых частиц (1 мг/мл), обработанных равным объёмом буфера 0,5-SSC (75 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 75 мМ NaCl). Далее смесь промывали 3 раза буфером-3 (50 мМ Tris-HCl (pH 9,4), 2 М NaCl) и 2 раза буфером-4 (75 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 50 мМ NaCl). Далее добавляли 45 мкл буфера для нанесения, пробы нагревали в течение 20 мин при 80 °С. Для анализа смеси использовали метод электрофореза белков в полиакриламидном геле (концентрирующий слой 5 %, разделяющий 10 %). Окрашивание геля проводили в Кумасси R-250.

3.3.4.1 Приготовление цельноклеточного экстракта

Приготовление цельноклеточного экстракта проводили на линиях НЕК293 и HeLa. Клетки собирали в пробирку в объёме 1 мл и отделяли от культуральной среды путём центрифугирования в течение 5 минут при 700 об./мин при 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 фрагментов 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.

3.3.4.2 Взаимодействие биотинилированных НК с белками клеточного экстракта

Реакцию смеси олигонуклеотидов и их радиоактивно-меченных аналогов (ON*) с клеточным лизатом проводили путём инкубации во льду 2,5 мкл лизата клеток НЕК293 / HeLa (1,3 мкг/мкл), 6,5 мкл буфера TEH1 (50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 1 мМ ЭДТА (pH 8,0) и 1 мкл ON*

(10^{-5} М, радиоактивно-меченного ON 10 %) в течение 5 мин. Далее добавляли 2,5 мкл буфера для нанесения 4х (200 мМ Tris-HCl (pH 6,8), 400 мМ меркаптоэтанол-2, 4 % SDS, ~0.01 % Кумасси R 250, 40 % глицерин). Для анализа смеси использовали метод электрофореза белков в полиакриламидном геле (концентрирующий слой 5 %, разделяющий 10 %). Окрашивание геля проводили в Кумасси R 250.

3.3.4.3 Выделение биотинилированных НК после взаимодействия с белками из клеточного экстракта

Предварительно перед реакцией НЧ-St / MPP ресуспендировали в равном объёме буфера 0,5-SSC (75 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 75 мМ 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 ON (10^{-5} М, радиоактивно меченного ON 10 %) ранее обработанного белками из клеточного экстракта в течение 60 мин при перемешивании 250 об./мин и 25 °С. Далее, для удаления неспецифической сорбции, НЧ-St-ON/ MPP-ON промывали 3 раза буфером-3 (50 мМ Tris-HCl pH 9,4, 2 М NaCl) и 2 раза буфером-4 (75 мМ Tris-HCl pH 7,5, 50 мМ NaCl). Далее добавляли 45 мкл буфера для нанесения. Для анализа смеси использовали метод электрофореза белков в полиакриламидном геле (концентрирующий слой 5 %, разделяющий 10 %). Окрашивание геля проводили в Кумасси R250. Ёмкость НЧ-St к ON рассчитывали, как количество связавшегося ON относительно добавленного. Долю присоединённого ON считали с помощью жидкостного сцинтилляционного счётчика (Pharmacia Rackbeta 1209-015, Швеция).

3.3.5 Создание комплекса наноматериалов с доксорубицином

Навеску 0,025 – 3,2 мг НЧ редиспергировали в 0,8 мл воды, добавляли 0,1 – 0,3 мл DOX (100 – 300 мкг, 1 мг/мл) и 0,1 мл натрий-боратного буфера, pH 8,0 (10 мМ). Смесь инкубировали при 25 °С в течение 12 ч при перемешивании (750 об./мин). Наноконпозиты 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). Ёмкость наноконпозита по доксорубицину, определяли, рассчитывая отношение массы загруженного доксорубицина к

массе наночастиц, по формуле: $E = (DOX_0 - DOX)/m$, где DOX_0 – общее добавленное количество лекарства (мкг), DOX – количество препарата в надосадочном растворе (мкг), m – масса НЧ в нанокompозите (НЧ–DOX) (мг).

3.3.6 Разрушение комплекса наноматериалов с доксорубицином

Высвобождение DOX исследовали при 15 – 45 °С в 1 мл 100 мМ натрий-ацетатного буфера (рН от 3,0 до 6,5) или 10 мМ фосфатно-солевого буфера (рН 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 Методы измерений и анализа

3.4.1 Исследование цитотоксичности наноматериалов и их композитов с БАС

3.4.1.1 Метод МТТ-теста

Линии опухолевых клеток аденокарциномы легкого (A549), аденокарциномы молочной железы человека (MCF-7) и рака шейки матки (HeLa) (Российское отделение ЭТКС, Санкт-Петербург, Россия) пересаживали 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 °С и 5 % CO₂.

Исследования цитотоксичности проводили с помощью колориметрического анализа, основанного на расщеплении 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромидом (МТТ) митохондриальными дегидрогеназами в жизнеспособных клетках, что приводит к образованию синего цвета формазана. К клеткам добавляли среду, содержащую наноматериалы: НЧ (0,1 – 200 мкг/мл), НЧ/DOX (0,08 – 73,4 мкг/мл), DOX (0,1 – 10,0 мкМ) и ON (1 – 10 мкМ), обработку проводили в течение 48 ч при 37 °С 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

формаза́н растворяли в 0,1 мл ДМСО. Оптическую плотность измеряли на многоканальном планшетном спектрофотометре Clariostar при длине волны 570 нм. Процент выживших клеток рассчитывали по полученной оптической плотности в процентах от контрольных значений. Полумаксимальную ингибирующую концентрацию (IC₅₀) рассчитывали, описывая экспериментальные данные соотношением в программном обеспечении Microsoft Excel.

3.4.1.2 Исследование эффективности клеточного проникновения нанокompозитов методом конфокальной микроскопии

За 24 ч до трансфекции, клетки HEK293-GFP в количестве 5×10^3 клеток высевали в чашку Петри (35 мм со стеклянным дном 15 мм) для конфокальной микроскопии, содержащую 1,5 мл среды DMEM. Клетки промывали 250 мкл/лунку PBS, далее добавляли 250 мкл/лунку DMEM, содержащий нанокompозит, ковалентно модифицированный цианиновым красителем (Cy5). Через 48 ч клетки с нанокompозитами клетки анализировали методом конфокальной микроскопии на LSM710 с объективом Plan-Apochromat 100x/1.4, увеличение 1000x.

Для детекции наночастиц в эндосомально-лизосомальном компартменте использовали краситель LysoTracker Green (ThermoFisher, США). Количественный анализ эндосомальной локализации проводили с помощью программного обеспечения CellProfiler, позволяющего в автоматическом режиме детектировать внутриклеточные структуры и сопоставлять их пространственное расположение.

3.4.2 Регистрация размера и поверхностных свойств наночастиц

3.4.2.1 Метод динамического светорассеяния

Измерения динамического рассеяния света (ДСР) и дзета-потенциала (ζ -потенциала) проводили на приборе Malvern Zetasizer Nano. Для ДСР-исследований НЧ суспендировали 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.

3.4.2.2 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 плёнками диаметром с 3 мм при ускоряющем напряжении 80кВ.

3.4.3 Регистрация ёмкостных характеристик наноматериалов по оптической плотности

Спектры поглощения в УФ и видимой областях регистрировали на спектрофотометре UV-2100 (Shimadzu, Япония) и микропланшетном спектрофотометре Clariostar (BMG, Германия). В работе детектировали пики оптического поглощения для DOX ($\lambda = 480$ 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.

3.4.4 Введение радиоактивного фосфата на 5'-конец НК

Радиоактивный фосфат вводили на 5'-конец ON (100 нмоль) в течение 2 ч при 37 °С с использованием 10 е.а. полинуклеотидкиназы фага Т4 и 0,1 mCi [$\gamma^{32}\text{P}$]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.

3.4.5 Осаждение олигонуклеотидов 2 % раствором LiClO₄ в ацетоне

К раствору ON в объёме 20 – 100 мкл добавляли 0,5 мл 2 % раствора перхлората лития (LiClO₄) в ацетоне. Осадок отделяли центрифугированием в течение 5 мин при 13400 об./мин и промывали 1 мл ацетона. Надосадочную жидкость отделяли, осадок сушили на термостате при 37 °С.

3.4.6 Анализ методом гель-электрофореза в полиакриламидном геле

Электрофоретическое разделение белковых образцов проводили в полиакриламидном геле с двумя слоями: 10 % разрешающий (2 мл 30 % АА с 0,4 % а; 1,5 мл буфера 1,5 М Tris-HCl (pH 8,8), 0,4 % SDS; 2,5 мл 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 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 мМ Tris-HCl (pH 6,8), 400 мМ 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 % воды) на орбитальном шейкере в течение 30 мин. Избыток краски удаляли многократной промывкой геля водой 80 – 90 °С.

3.4.7 ИК-спектроскопия

ИК-Фурье спектры регистрировали 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.

3.4.8 Статистические методы

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

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одним из перспективных вариантов решения проблемы *in vivo* доставки БАС, обладающих ограничениями в индивидуальной форме (токсичность, низкие физиологическая стабильность или эффективность проникновения в клетку и т. д.), может быть применение суспензии неорганических наночастиц, в первую очередь, карбоната кальция, диоксида кремния и их композитов. Пристальный интерес исследователей к этим наноматериалам связан с возможностью полной (рН-зависимой, в случае карбоната кальция) деградации частиц на биосовместимые и биоразлагаемые компоненты, что снижает проблемы хронической токсичности и накопления частиц в печени, почках и других органах. Кроме того, данные материалы обладают пористой структурой, что приводит к увеличенным ёмкостным характеристикам по отношению к грузовым молекулам [259].

Перспектива использования в биомедицинских целях накладывает ряд ограничений не только на природу материала, но ещё и на параметры наночастиц, которые могут ограничивать их применение. Например, частицы карбоната кальция склонны формировать микрометровые кристаллы, не удовлетворяющие критериям применения в биомедицине из-за размеров, дисперсности и суспензионной стабильности. Для соединений на основе диоксида кремния, в связи с природой реагентов, характерна агрегация в процессе синтеза, приводящая к потере изолированности частиц и, как следствие, укрупнению размеров наноматериалов и композитов на их основе [260].

Кроме того, несмотря на последние достижения в области стабилизации таких материалов в условиях, близких к физиологическим, и развитии методологических подходов к синтезу наноразмерного карбоната кальция и монодисперсного диоксида кремния, существует ряд проблем, касающихся эффективного присоединения БАС и исследования их дальнейшей стабильности [53]. Но, в случае эффективного связывания пары (груз/носитель) и сохранности исходных свойств комплекса в условиях *in vivo*, может быть получен новый биodeградируемый инструмент для терапии и диагностики.

В связи с обозначенными проблемами, в ходе работы, для разрабатываемых наночастиц были сформулированы критерии дальнейшей применимости в области биомедицины:

- размер до 200 нм (оптимальный размер для внутривенного введения);
- монодисперсность;
- суспензионная стабильность;
- стабильность в физиологических условиях;

- функционализируемость;
- биосовместимость;
- биоразлагаемость;
- высокая эффективность взаимодействия с биологически активными соединениями.

Основываясь на выделенных параметрах, оценивали перспективность полученных материалов для дальнейших исследований.

4.1 Синтез неорганических наночастиц

Многие подходы к синтезу и характеристике наночастиц, например, гетерофазный синтез в эмульсии и методы динамического светорассеяния, стали доступны благодаря активному развитию методологической и приборной базы за последние несколько десятилетий [261, 262]. Получение частиц размером в интервале 20 – 200 нм критически важно, поскольку наночастицы такого размера могут быть введены внутривенно, не вызывая тромбоза. Кроме того, материалы с размерами в данном диапазоне могут накапливаться и удерживаться в опухолях из циркулирующей крови благодаря эффекту EPR (enhanced permeability and retention). 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 [263].

Таким образом, данная работа была направлена на синтез нанокомпозитов оптимального размера. Поэтому первая часть данной главы будет посвящена детальному изучению влияния состава реакционной смеси на размер, дисперсность и суспензионную стабильность частиц диоксида кремния, карбоната кальция и их композитов для разработки методик получения наноматериалов до 200 нм.

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. К

моменту начала данной работы не было способов синтезировать суспензионно стабильные СаНЧ до 200 нм, возможно, именно по этой причине нет примеров их доставки по механизму EPR эффекта, так как они склонны формировать крупные кристаллы [264].

Методом соосаждения с использованием эквимольных концентраций CaCl_2 и Na_2CO_3 в отсутствие дополнительных реагентов получают частицы CaCO_3 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 ($d = 1470 \pm 180$ 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 [265]. 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 высокомолекулярные полиэтиленгликоли (ПЭГ-1000, -2000 и -6000). По данным ДСР, только добавление детергента Твин 20 приводило к значительному уменьшению размера частиц ($d = 450 \pm 30$ 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 реакционную 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+} . В исследовании [251] показано, что добавление катионов Mg^{2+} и питательной среды DMEM, состоящей в основном из аминокислот, неорганических солей и витаминов, в реакционную смесь при синтезе карбоната кальция приводит к ограничению роста частиц и их стабилизации. Причиной этого, предположительно, являются конкурирующие процессы образования карбоната кальция и магния и различная растворимость получаемых солей (MgCO_3

имеет большую растворимость в сравнении с CaCO_3) и замедление скорости образования кристаллов. 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), размер частиц, определённый методом ПЭМ (D) и индекс полидисперсности частиц (ИПД)

Шифр	Особые условия	d , нм	D , нм	ИПД	Рис. 4.1
CaНЧ ₁	—	339 ± 4	666 ± 140 ; 57 ± 14	$0,20 \pm 0,01$	А
CaНЧ ₂	Растворитель: изопропанол	2637 ± 125	1238 ± 440	$0,33 \pm 0,05$	Б
CaНЧ ₃	MgCl_2 , 0,01 М	278 ± 4	18 ± 3	$0,15 \pm 0,01$	В
CaНЧ ₄	DMEM, 2 об.%	333 ± 2	324 ± 64 ; 34 ± 3	$0,26 \pm 0,01$	Г
CaНЧ ₅	MgCl_2 , 0,01 М; DMEM, 2 об.%	326 ± 6	16 ± 3	$0,26 \pm 0,01$	Д
CaНЧ ₆	MgCl_2 , 0,05 М; DMEM, 2 об.%	332 ± 1	575 ± 79 х 255 ± 21	$0,19 \pm 0,01$	Е
CaНЧ ₇	MgCl_2 , 0,01 М; DMEM, 10 об.%	200 ± 10	45 ± 7	$0,10 \pm 0,01$	Ж
CaНЧ ₈	MgCl_2 , 0,05 М; DMEM, 10 об.%	276 ± 4	887 ± 130 х 188 ± 40 ; 200 ± 10	$0,10 \pm 0,01$	З

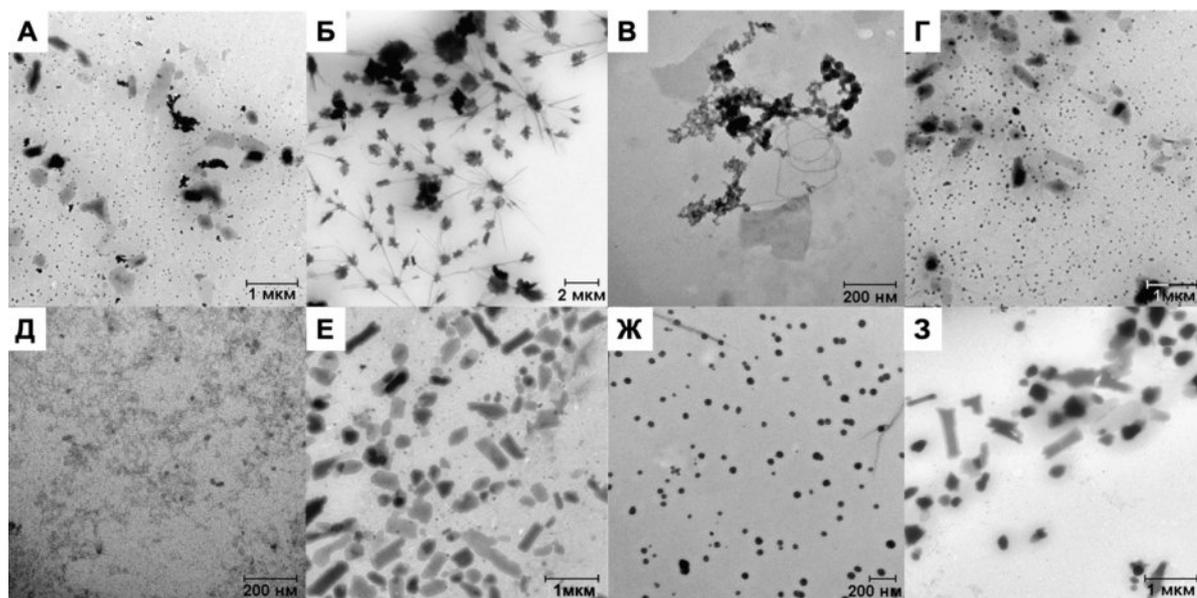


Рисунок 4.1 – ПЭМ изображения CaНЧ₁ (А), CaНЧ₂ (Б), CaНЧ₃ (В), CaНЧ₄ (Г), CaНЧ₅ (Д), CaНЧ₆ (Е), CaНЧ₇ (Ж) и CaНЧ₈ (З), шкала 1 мкм (А, Г, З); 2 мкм (Б); 0,2 мкм (В, Д, Ж).

(ПЭМ проведена и изображения предоставлены Полетаевой Ю.Е. и проф., д.б.н, г.н.с. Рябчиковой Е.И.)

Видно, что диаметр наночастиц по данным ПЭМ и ДСР различается (таблица 4.1, рисунок 4.1). В случае, когда данные ДСР превосходят ПЭМ, вероятно, этот эффект связан с взаимодействием молекул воды с отрицательно заряженной поверхностью частиц и, как

следствие, появлением сольватной оболочки, достаточной для регистрации методом ДСР. Иначе говоря, этот эффект может быть связан с различной пробоподготовкой образцов к анализу: метод ПЭМ детектирует препараты, сорбированные на медные сеточки, а ДСР – частицы в растворе с учётом вклада гидратной оболочки (или других молекул из раствора хранения) в размер частиц [130, 266]. Кроме того, скорее всего, для образцов на рисунке 4.1 Б, В методом ДСР не удалось установить размеры индивидуальных частиц и были зарегистрированы их агрегаты. Расхождение данных ДСР от ПЭМ в меньшую сторону, вероятно, связано с тем, что метод измерения в растворе предназначен для сферических частиц и не учитывает наличие трубчатых материалов в образце (рисунок 4.1 Е, З).

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, Таблица 4.1, строка 1) 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 Б). Образцы, полученные в присутствии Mg²⁺ без дополнительных компонентов, склонны к агрегации. Поскольку преодолеть эту проблему ни добавлением ПАВ, 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, Г). При сравнении изображений Д–З (рисунок 4.1) и данных в таблице 4.1 видно, что совместное добавление 10% DMEM и 0,01 М MgCl₂ (СаНЧ₇, Рисунок 4.1 Ж) оптимально: частицы однородные, сферические и размером до 200 нм (по данным ПЭМ и ДСР).

В настоящей работе для получения 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 ёмкость по лекарственным препаратам. ПЭГ-2000 и Твин 20 являются хорошо известными амфифильными поверхностно-активными веществами, распространённо применяемыми для изменения свойств системы, например, улучшения растворимости [267] или увеличения пролонгированности высвобождения БАС [268]. В работе исследовали выбранную композицию методом ПЭМ (рисунок 4.2).

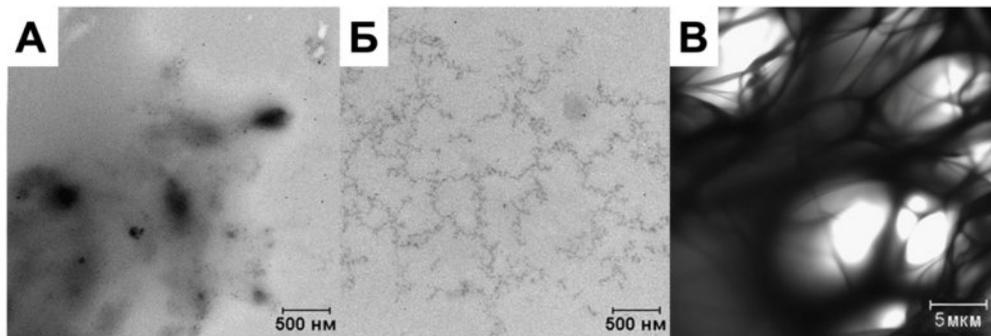


Рисунок 4.2 – ПЭМ изображения Твин 20 (А), ПЭГ-2000 (Б), композиция Твин 20 и ПЭГ-2000 (В), шкала 500 нм

Данные просвечивающей электронной микроскопии препаратов, содержащих совместно ПЭГ-2000 и Твин 20 (рисунок 4.2 В), демонстрируют формирование полимерной структуры, которая не наблюдается при исследовании образцов по отдельности (рисунок 4.2 А, Б). Вероятно, такая структура служит матрицей, ограничивающей рост частиц на стадии нуклеации, и, по всей видимости, оказывающей влияние на дальнейшую стабилизацию материала [53, 267, 268]. Более того, из литературы известно, что пегилированные материалы характеризуются уменьшенным неспецифическим взаимодействием с белками, улучшенной биосовместимостью и циркуляцией [269]. Аминокислоты, витамины и соли, содержащиеся в DMEM, предположительно стабилизируют наночастицы.

Тщательным отбором состава и концентраций компонентов реакционной смеси (0,01 М CaCl_2 , 0,1 М NaHCO_3 , 0,1 мг/мл ПЭГ-2000, 1 об.% Твин 20, 10 об.% DMEM, 0,01 М MgCl_2) получены суспензионно стабильные монодисперсные сферические CaH_7C (далее CaH_7C) размером 200 ± 10 нм. В связи с многокомпонентным составом реакционного раствора, для подтверждения кальций карбонатной природы материала, был проведён энергодисперсионный анализ с поэлементным картированием (рисунок 4.3).

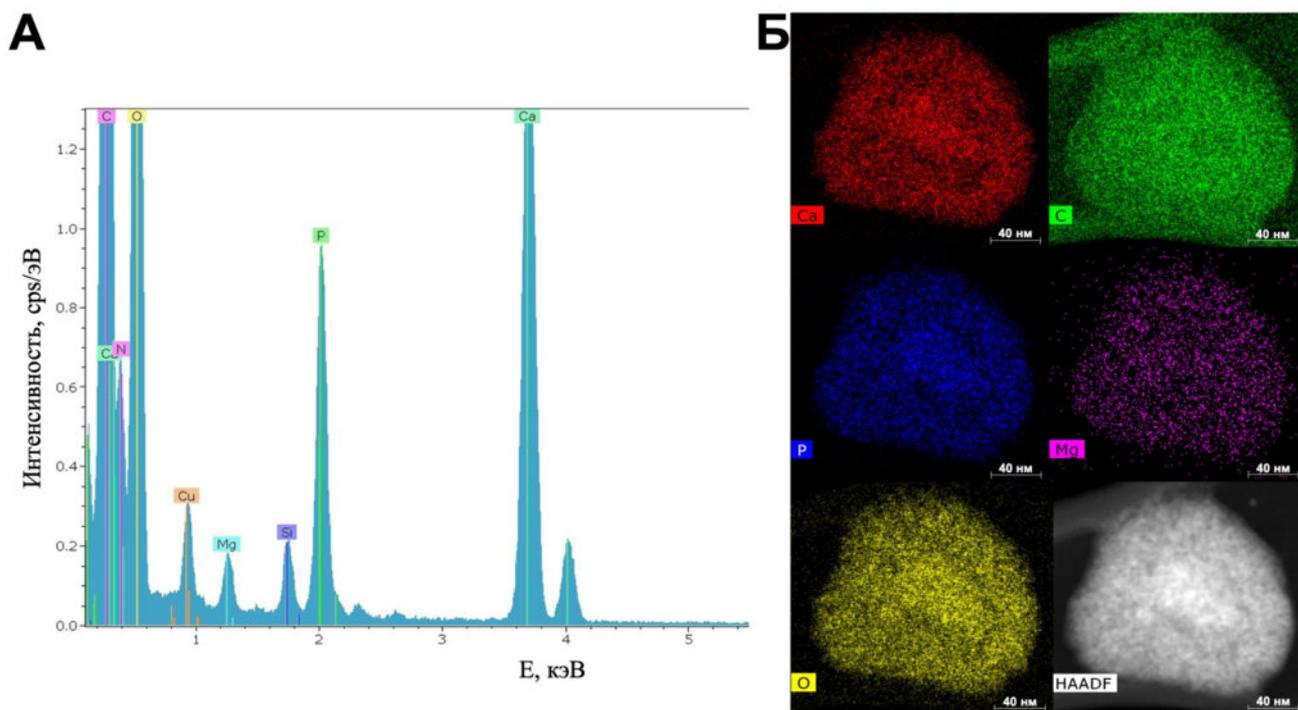


Рисунок 4.3 – Данные энергодисперсионного анализ (А) с поэлементным картированием (Б) (Данные получены в ЦКП ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН Хмелениным Д.Н)

Характеристические пики на рентгенограмме (рисунок 4.3 А) доказывают преимущественное содержание главных элементов CaCO_3 в образце, что согласуется с поэлементными снимками, показывающими равномерное распределение материалов в образце. Установлено, что полученные наночастицы представлены фазой ватерита. Наличие пика магния и фосфора связано с композицией реакционной смеси. Сигнал от меди связан с медной плёнкой, используемой в процессе анализа. Таким образом, рентгенофазовый анализ подтвердил состав наночастиц карбоната кальция.

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

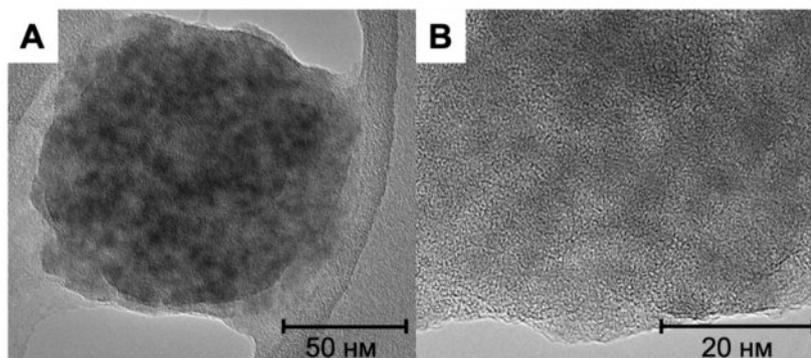


Рисунок 4.4 – ПЭМ изображения CaNC шкала 50 нм (А) и 20 нм (Б) (Данные получены ЦКП ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН Хмелениным Д.Н.)

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 других производителей. Показано, что характеристики получаемых наноматериалов не зависят от производителя исходных солей и добавок: по данным ДСР размер и дисперсность частиц не отличается более, чем на 5 % ($d = 206 \pm 5$ нм; ИПД = $0,12 \pm 0,01$).

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 с гидродинамическим размером 130 ± 4 нм и индексом полидисперсности $0,16 \pm 0,01$ (рисунок 4.5).

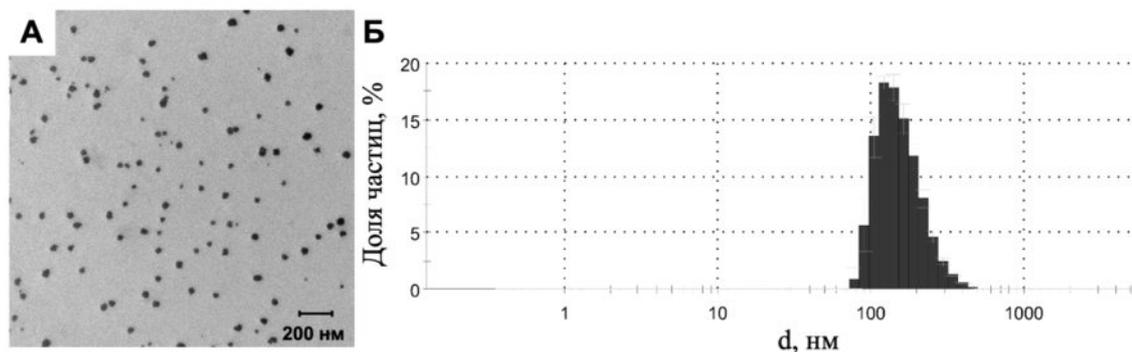


Рисунок 4.5 – Изображение ПЭМ, шкала 200 нм (А) и ДСР (Б) о размере биodeградируемого материала фосфата кальция

На рисунке 4.5 видно, что биodeградируемый материал фосфата кальция характеризуется размером от 20 до 50 нм и отсутствием агломератов микрометровых частиц. Возможность получения моодисперсных материалов фосфата кальция размером до 200 нм подчеркивает перспективность и работоспособность предложенного протокола.

Таким образом, для разработанного протокола показаны возможность увеличения реакционного объема в 50 раз и отсутствие влияния производителя реактивов на характеристики получаемых наночастиц. Способ был запатентован [253]. Синтезированные материалы характеризуются средним размером 200 нм, высокой степенью моодисперсности и пористой структурой. Размер, моодисперсность и суспензионная стабильность частиц делают их перспективными кандидатами для дальнейших исследований их применимости в качестве компонентов системы доставки БАС, в частности противоопухолевых препаратов.

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

В продолжение работы с наноматериалом карбоната кальция, 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, тераностике и магнитной сепарации [270, 271]. 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 биосовместимым материалом для достижения улучшенной стабильности, растворимости и снижения токсичности [159]. 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 [229].

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 $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ в присутствии ПАВ (олеиновая кислота) и основания [254]. Слой CaCO_3 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 на мл реакционного раствора. Поверхностный заряд, размер и морфология наночастиц являются важными факторами, влияющими на биораспределение. 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 [272]. 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, определённый 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	В
1,8	118 ± 3	16 ± 2	0,248 ± 0,004	-14,9 ± 0,3	Г
0,9	130 ± 9	18 ± 3	0,31 ± 0,01	-15,5 ± 0,4	Д
0,45	121 ± 6	22 ± 1	0,221 ± 0,004	-15,6 ± 0,5	Е
МНЧ	88 ± 5	11 ± 4	0,14 ± 0,02	21,6 ± 0,7	А
CaНЧ	204 ± 8	26 ± 3	0,26 ± 0,01	-17,3 ± 0,4	Б

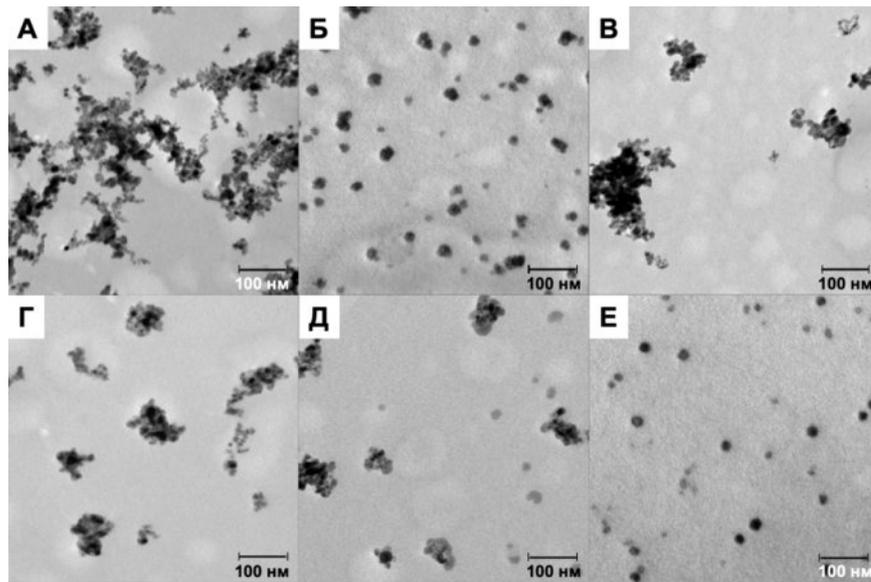


Рисунок 4.6 – ПЭМ изображения исходных МНЧ (А); контрольных CaНЧ (Б); Fe@CaНЧ, полученных с использованием 4,5 мг/мл (В); 1,8 мг/мл (Г); 0,9 мг/мл (Д); 0,45 мг/мл (Е) МНЧ, шкала 100 нм

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 ДСР сильно различаются, как и в случае индивидуальных CaНЧ. Также видно (рисунок 4.6), что, при уменьшении количества магнитного ядра в образце снижается степень агрегации исходных частиц (рисунок 4.6 В – Е), что наглядно выражено на рисунке 4.6 при сравнении панелей В и 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 Е). Высокое сходство между изображениями ПЭМ выбранного образца и индивидуальных CaНЧ (рисунок 4.6 Б) в явном виде не визуализирует магнитного сердечника. Однако образец обладает магнитными свойствами, что доказано с помощью магнитной сепарации (рисунок 4.7).

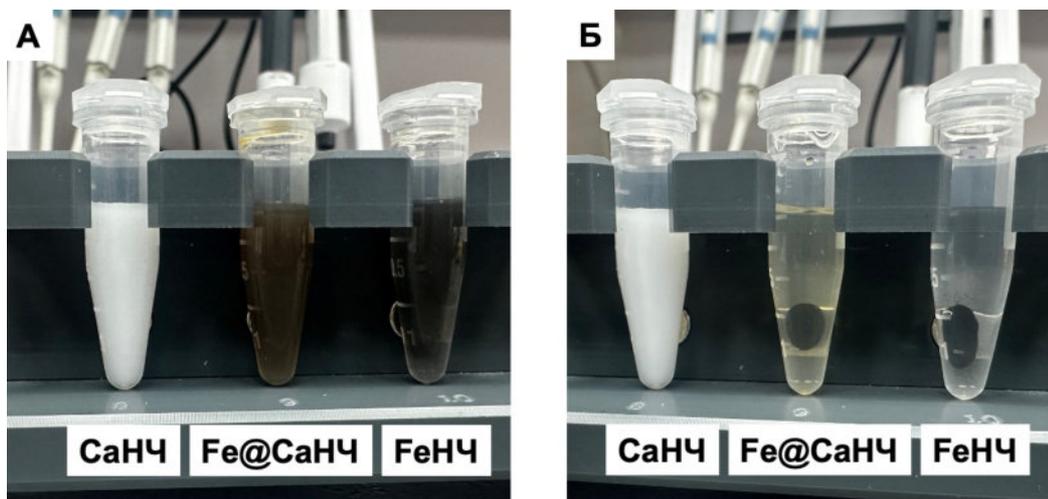


Рисунок 4.7 – Фотографии CaHCl, Fe@CaHCl и FeHCl (4 мг/мл), помещённых на магнитный штатив в начальный момент времени (А) и через 15 секунд (Б)

На рисунке 4.7 видно, что, с помощью магнита, можно сепарировать выбранный композит из раствора за 15 секунд. Для подтверждения наличия в составе гибрида карбоната кальция и оксида железа, образец анализировали методом инфракрасной спектроскопии (ИК-Фурье спектроскопия, Рисунок 4.8).

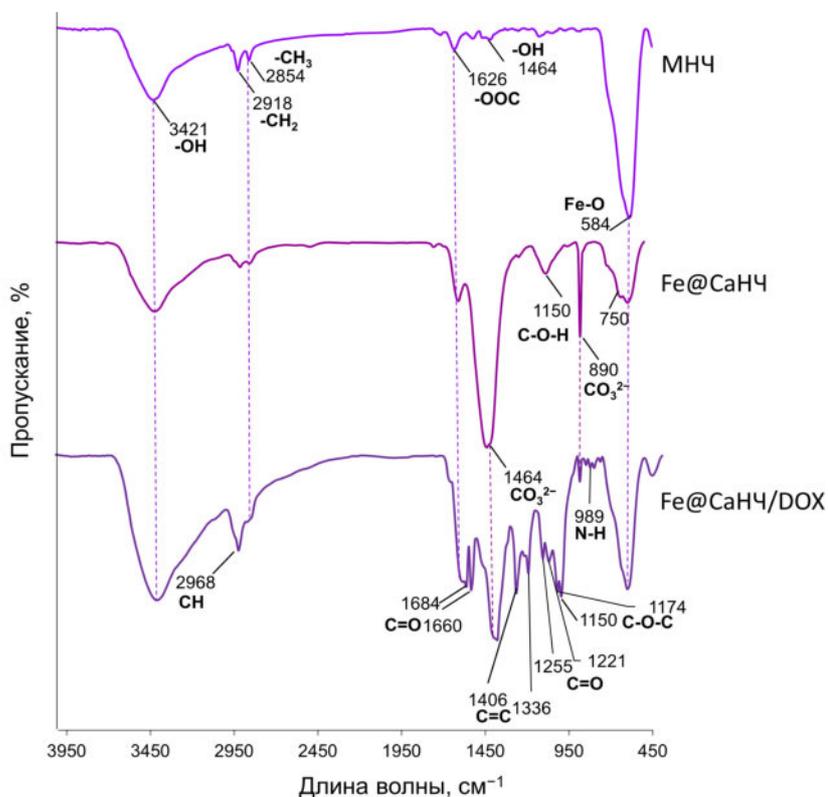


Рисунок 4.8 – ИК-спектры нанокompозитов MnCl, Fe@CaHCl и Fe@CaHCl/DOX
 На ИК-спектрах наночастиц смешанного оксида железа (II, III), покрытых олеиновой кислотой (MnCl), видны характерные пики для этого типа материалов: при 3421, 2918 (асимметричный участок -CH₂), 2854 (симметричный участок -CH₂), 1626 (-COO группа), 1464

(колебание -ОН в плоскости) и 584 см^{-1} (колебание Fe-O) [273, 274]. В спектре Fe@CaHЧ видны чёткие пики от оксидов железа 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-} [273, 275, 276].

Таким образом, в данной части работы синтезирован композитный наноматериал, получение которого в литературе описано на момент публикации преимущественно только для микрометровых аналогов [171]. 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*. Частицы такого размера могут эффективно проникать через клеточные мембраны и быть носителями лекарственных препаратов для их эффективной доставки непосредственно в клетки. Кроме того, частицы размером около 130 нм могут избегать быстрого выведения из организма и распознавания иммунной системой, что увеличивает их биодоступность и время циркуляции в крови [277]. Увеличенная площадь удельной поверхности, совместно с магнитными свойствами, являются дополнительными преимуществами таких композитов в качестве молекулярно-биологических инструментов для магнитной сепарации биомолекул из смеси [278].

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 (переходят в кремниевую кислоту, которая выводится почками) [279]. На сегодняшний день такие материалы нашли своё применение не только в лабораторных исследованиях, но и в пищевой промышленности, в качестве различных компонентов упаковок и добавок [280].

В случае разработки протокола синтеза наночастиц диоксида кремния (SiHЧ) для биомедицинских применений, основной проблемой является высокая склонность частиц к агрегации на этапе синтеза [281].

В работе были протестированы методы получения наночастиц диоксида кремния (SiHЧ) с использованием трех различных подходов, основанных на гидролизе тетраэтоксисилана (ТЭОС): микроэмульсионный вариант [257], синтез в присутствии детергентов (СТАВ, НТАВ)

[258] и щелочной гидролиз в спирте в присутствии аммиака [282]. 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), размер частиц, определённый методом ПЭМ (D), и индекс полидисперсности частиц (ИПД)

Метод	Вариации	d, нм	D, нм	ИПД	Рис. 4.9
В присутствии детергентов	СТАВ	447 ± 9	15 ± 3	$0,15 \pm 0,01$	А
	НТАВ	376 ± 28	23 ± 4	$0,18 \pm 0,01$	Б
Микроэмульсионный	Органическая фракция	558 ± 3	—	$0,19 \pm 0,02$	—
	Промежуточная фракция	107 ± 10	8 ± 3	$0,32 \pm 0,01$	В
	Водная фракция	118 ± 8	—	$0,28 \pm 0,01$	—
Щелочной гидролиз ТЭОС	0,010 М ТЭОС	$11,5 \pm 0,3$	—	$0,25 \pm 0,01$	—
	0,018 М ТЭОС	65 ± 5	62 ± 5	$0,09 \pm 0,01$	Д, Е
	0,040 М ТЭОС	23 ± 6	20 ± 3	$0,13 \pm 0,01$	Г
	0,200 М ТЭОС	166 ± 3	121 ± 17	$0,10 \pm 0,02$	Ж, З

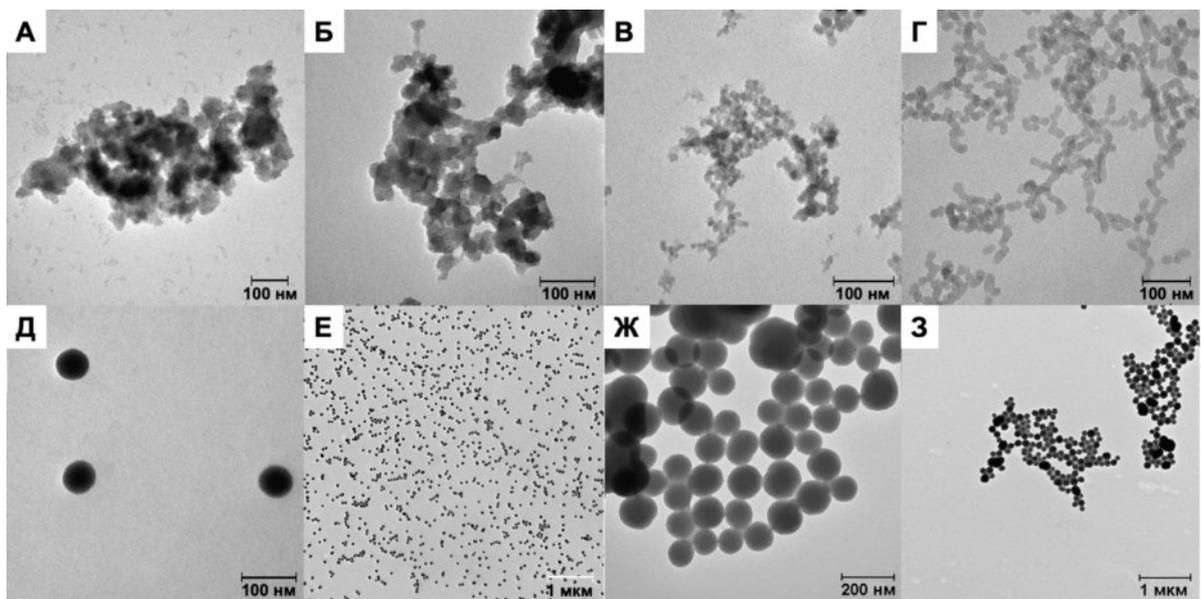


Рисунок 4.9 – ПЭМ изображения SiНЧ, полученных в присутствии СТАВ (А) и НТАВ (Б), микроэмульсионным вариантом (В) и с добавлением 0,040 М (Г), 0,018 М (Д, Е), 0,200 М ТЭОС (Ж, З), шкала 100 нм (А – Д), 1 мкм (Е, З), 200 нм (Ж)

На ПЭМ-изображениях (рисунок 4.9 А – В) видно высокую степень агрегации частиц. Кроме того, SiНЧ, полученные микроэмульсионным методом (рисунок 4.9 В), нестабильны в водных растворах при хранении. Сферические частицы небольшого размера были получены третьим способом (Таблица 4.3, Рисунок 4.9 Г – З). 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 Д), ввиду наибольшей однородности материала и отсутствия агрегации (слипания) частиц, что явно выражено у образца, представленного на Рисунке 4.9 Ж.

Таким образом, были исследованы способы получения монодисперсных биоразлагаемых биосовместимых наноматериалов на основе карбоната кальция и диоксида кремния размером до 200 нм. Предложен новый 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 и монодисперсности 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

Для полученных CaНЧ, Fe@CaНЧ и SiНЧ регистрировали зависимость изменения гидродинамических размеров от времени в разных 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* (Таблица 4.4).

Таблица 4.4 – Влияние раствора хранения на размер частиц CaНЧ, Fe@CaНЧ и SiНЧ в начальный момент времени (через 5 минут инкубации частиц в растворе) и спустя 7 дней. 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, 283]. В условиях с пониженным значением pH (ацетатный буфер с pH 4 – 6) материалы CaНЧ и Fe@CaНЧ ведут

себя по-разному, что объясняется наличием рН-лабильной компоненты карбоната кальция в образцах. Для Fe@CaНЧ в растворах буфера с рН 4,0 и 5,0 наблюдается уменьшение размера частиц, что, вероятно, связано с частичной или полной деградацией карбонатной компоненты. CaНЧ не удалось проанализировать в таких условиях из-за быстротекущего растворения сферической структуры материала. В PBS для CaНЧ и Fe@CaНЧ наблюдается увеличение размера до 350 – 330 нм, что, вероятно, связано с изменением гидратной оболочки, последовавшей за изменением солевого состава 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 [284, 285]. Снижение размера Fe@CaНЧ в 10 % FBS относительно PBS, вероятно, говорит о том, что высокая концентрация солей провоцирует агрегацию кальцийсодержащих наночастиц.

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 %.

Дополнительно для CaНЧ было проведено исследование стабильности частиц при различных значениях рН в сравнении с микрометровыми частицами (1470 ± 180 нм), полученными в условиях 10-кратного избытка CO_3^{2-} над Ca^{2+} без дополнительных реагентов. Для этого равную массу частиц (95 мг) инкубировали в растворах 100 мМ натрий ацетатного буфера рН 3,0 – 7,0 в течении 24 часов, 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

НЧ рН	CaНЧ (195 ± 5 нм)		Частицы CaCO_3 (1470 ± 180 нм)	
	м, мг	%	м, мг	%
3,0	$0,0 \pm 0,1$	$0,0 \pm 0,1$	$6,1 \pm 0,1$	$6,4 \pm 0,6$
4,0	$0,0 \pm 0,1$	$0,0 \pm 0,1$	47 ± 2	49 ± 2
5,0	30 ± 5	32 ± 5	85 ± 3	85 ± 3
6,0	75 ± 1	79 ± 1	95 ± 1	95 ± 1
7,0	95 ± 1	100 ± 1	99 ± 1	99 ± 1

Установлено, что карбонат кальция проявляет рН чувствительность в диапазоне рН 3 – 6: эффективность растворения увеличивается с уменьшением показателя кислотности и размера

частиц. Эти данные делают CaНЧ 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.

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

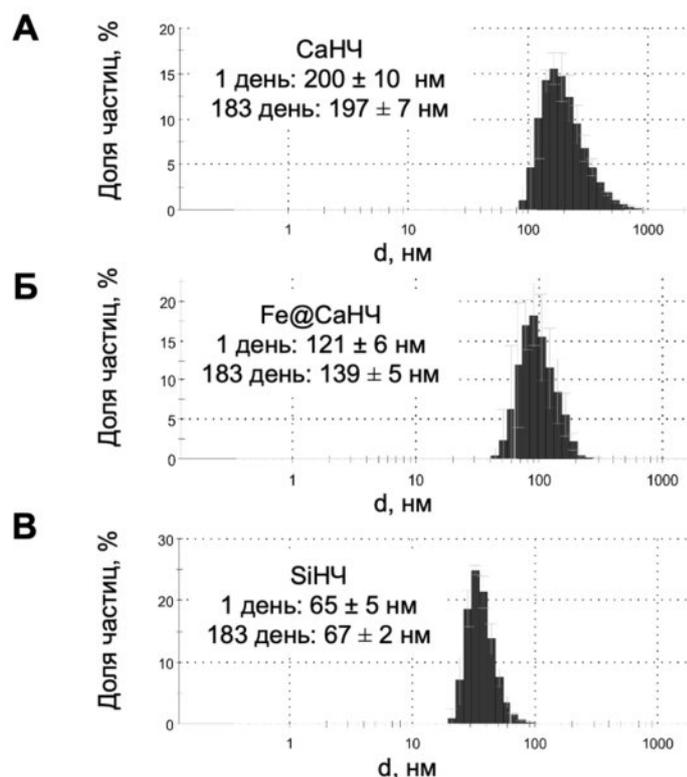


Рисунок 4.10 – Распределение по размеру частиц CaНЧ (А), Fe@CaНЧ (Б), SiНЧ (В), полученное методом ДСР спустя полгода хранения в дистиллированной воде при 7 °С. Гидродинамический размер составил 197 ± 7 нм, 139 ± 5 и 67 ± 2 нм для CaНЧ, Fe@CaНЧ, SiНЧ соответственно

Видно (рисунок 4.10), что, при хранении в воде, частицы сохраняют гидродинамический размер и узкое распределение по размерам в течение полугода без дополнительной стабилизации. Высокая стабильность при хранении облегчает манипуляции с ними в исследовательской работе и позволяет в перспективе использовать полученные наноматериалы в практических целях. Кроме того, частицы демонстрируют стабильность в условиях, близких к физиологическим, до 7 дней, что достаточно для полного естественного выведения материалов из организма [286].

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

Следующая глава будем посвящена модификации поверхности наночастиц для придания им дополнительной функциональности.

4.3 Модификация поверхности неорганических наночастиц и доказательство их биомедицинской применимости

Модификация наночастиц направлена на придание им дополнительных свойств для решения конкретной исследовательской задачи, путём присоединения функциональных групп или молекул [287, 288]. На поверхность наноматериалов могут быть нанесены синтетические полимеры (полиэтиленгликоль, полиэтиленимин, Твин 20 и т.д.) [289, 290, 291], неорганические наноматериалы (золото, диоксид кремния и др.) [292, 293, 294], в том числе оболочки солей (например, карбоната кальция) [227, 266], или БАС (белки, углеводы, нуклеиновые кислоты, дофамин) [295, 296, 297]. (таблица 2.8).

Нанесение на поверхность наноматериалов дополнительных групп может обеспечить не только придание новых свойств системе (адресность, избирательность, детектируемость, терапевтическая активность и т. д.), но и улучшить качество образцов (повышение стабильности наночастиц, монодисперсности, растворимости, биосовместимости и т. д.) [159].

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.

Применение функционализированных наночастиц интенсивно исследуют 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).

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».

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

В работе опробован метод ковалентного присоединения соединений различной химической природы, содержащих реакционно способные группы (синтетические полимеры – нейлон-6, белок стрептавидин, аминокислотный олигонуклеотид (J1), а также активированный эфир красителя (Cyanine5)), к поверхности всех полученных наноматериалов (рисунок 4.11).

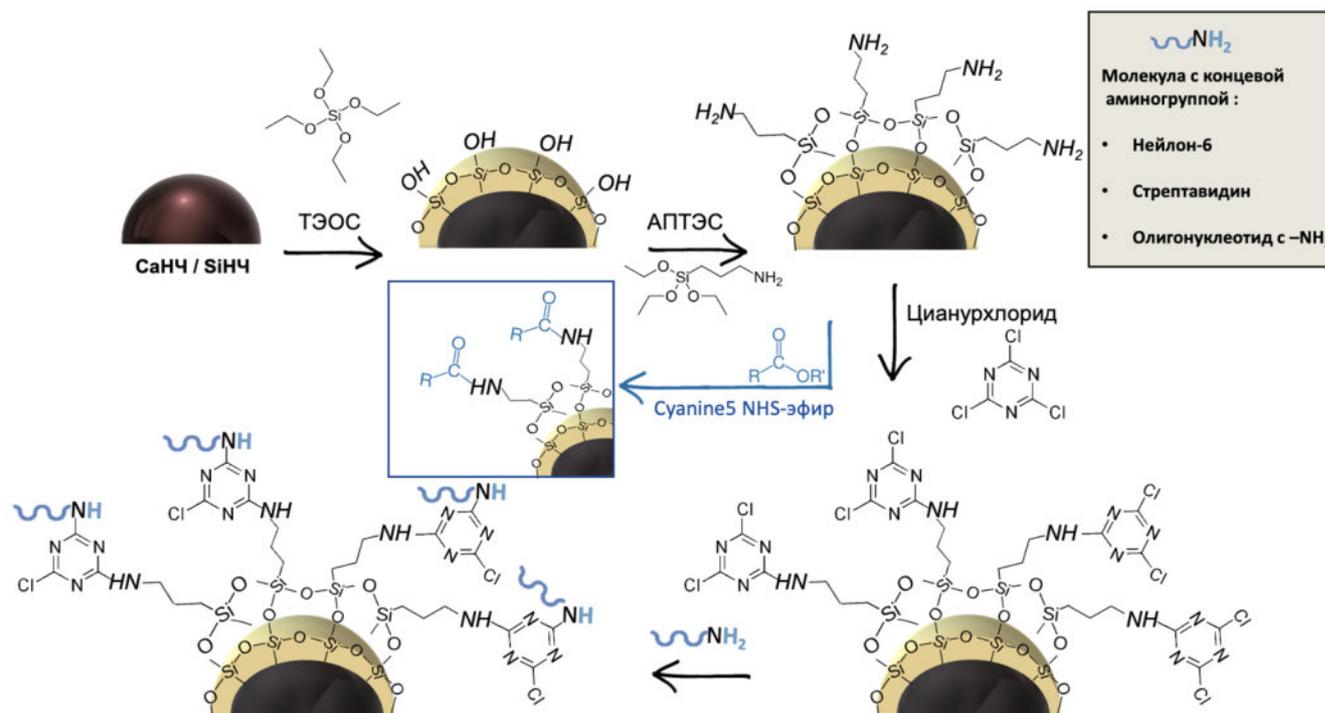


Рисунок 4.11 – Схема ковалентной модификации поверхности НЧ

Подход (рисунок 4.11) основан на ряде последовательных реакций: два этапа взаимодействия НЧ с модифицированными силанами (ТЭОС, использованный ранее для получения SiНЧ, и (3-аминопропил) триэтоксисилан — АПТЭС) с дальнейшим присоединением функциональных молекул через трифункциональный агент (цианурхлорид) или присоединением

красителя (материалы были исследованы далее методом конфокальной микроскопии). Каждая стадия реакции направлена на введение новой функциональной группы, по которой далее возможно по механизму SN2 введение новых заместителей.

В качестве примеров функциональных покрытий выбраны синтетический полимер — нейлон-6 и белок — стрептавидин, а также модельный олигонуклеотид (ёмкость по ON, 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 [298, 299]. Кроме того, твердотельная основа может быть удалена для получения полых структур (CaНЧ: pH < 4; 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 (CaНЧ удалили в 200 mM AcBuf pH 2, SiНЧ – 1 M HF). Стрептавидин – белок, образующий с биотином прочный комплекс, который может быть использован для специфичного узнавания молекул, несущих биотиновый остаток. Это явление получило прикладное приложение в качестве лабораторной системы селективного выделения биомолекул в исследовательской деятельности [300, 301].

Характеристики полученных материалов представлены в таблице 4.6 (изменение гидродинамического размера до и после модификации) и рисунке 4.12 (изменение ультраструктуры образцов).

Таблица 4.6 – Гидродинамический размер CaНЧ и SiНЧ после ковалентного присоединения красителя (Cy5), полимеров (НЧ-нейлон, НЧ-St, НЧ-ON) 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 Ж	63 ± 1	0,09 ± 0,01	-28,6 ± 0,2	4.9 Д, Е
НЧ-нейлон	421 ± 8	0,17 ± 0,02	22,5 ± 0,5	4.13 Г	110 ± 2	0,26 ± 0,01	30,0 ± 0,4	4.13 А
Капсулы	456 ± 9	0,45 ± 0,03	—	4.13 Д	293 ± 10	0,41 ± 0,02	—	4.13 Б
НЧ-St	301 ± 9	0,27 ± 0,02	-18,4 ± 0,2	4.13 Е	298 ± 8	0,35 ± 0,03	-29,7 ± 0,3	4.13 В
НЧ-ON	222 ± 7	0,20 ± 0,02	-21,4 ± 0,3	—	71 ± 5	0,024 ± 0,009	-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	—

Ожидаемо (таблица 4.6), что гидродинамический размер частиц после каждого этапа модификации увеличился при сохранении монодисперсности (ИПД). Материалы НЧ-ОН и НЧ-Су5 обладают наименьшими размерами, что вероятно связано с отсутствием разветвленной полимерной оболочки на поверхности НЧ. Нейлоновые капсулы, полученные путём удаления неорганической 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.

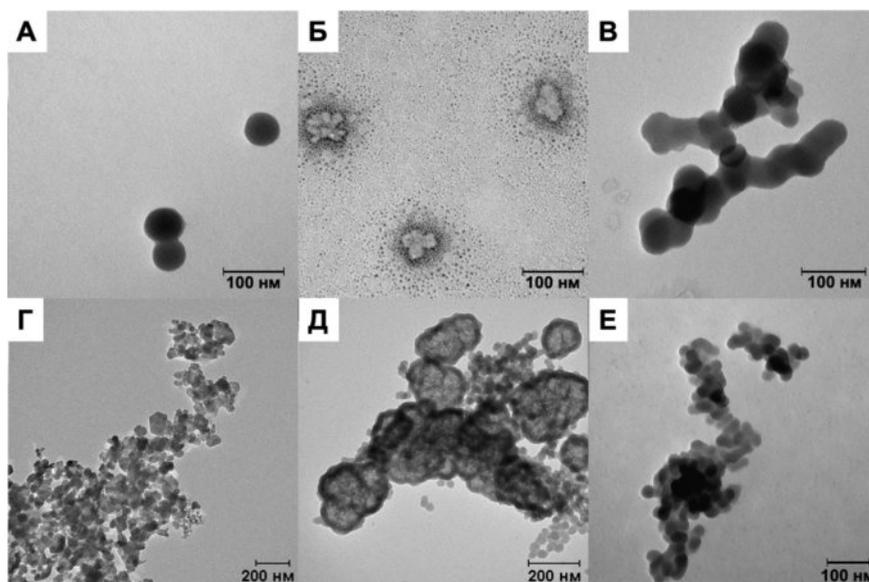


Рисунок 4.12 – ПЭМ изображения SiNC-нейлон (А), полых капсул после удаления SiNC (Б), SiNC-St (В) и CaNC-нейлон (Г), полых капсулы после удаления CaNC (Д), CaNC-St (Е), шкала 100 нм (А – В, Е), 200 нм (Г, Д)

Несмотря на то, что значение ИПД не увеличилось (ИПД, таблица 4.6), ПЭМ-изображения для модифицированных наноматериалов демонстрируют образование коллективной оболочки на несколько частиц (за исключением SiNC-нейлон) (рисунок 4.12). На рисунках, соответствующих капсулам (рисунок 4.12 Б, Д) видно, что электронная плотность в центре ядра частиц меньше, чем на периферии. Размер капсул незначительно изменился после удаления неорганической основы, однако была утеряна оформленность и сферичность частиц, что, вероятно, и повлияло на увеличение гидродинамического размера, как обсуждалось ранее. Процедура получения полых капсул, применимых в качестве транспортёров 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 SiНЧ-нейлон, которые будут испытаны далее в качестве носителя лекарственного агента в сравнении с немодифицированными SiНЧ. Однако несмотря на потерю обособленности частиц CaНЧ-нейлон и НЧ-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 4.13).

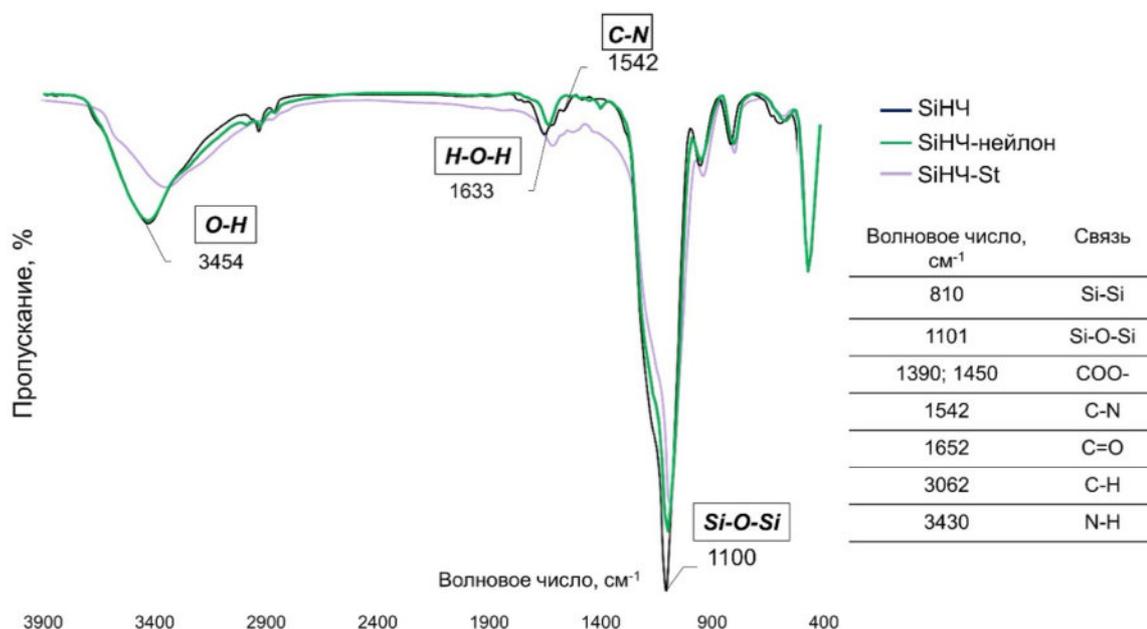


Рисунок 4.13 – ИК-спектры нанокомпозитов SiНЧ, SiНЧ-нейлон и SiНЧ-St

Вероятно, отсутствие интенсивных отличий в спектрах исходных и модифицированных частиц связано с низкой концентрацией модифицирующего агента. На всех полученных спектрах (рисунок 4.13) 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) [302, 303]. На спектрах SiНЧ-нейлон зарегистрированы дополнительные полосы, соответствующие нейлону-6, в том числе характерная полоса 1652 см⁻¹, соответствующая C=O растяжению амидной группы. Для SiНЧ-St пик поглощения, наблюдаемый при 3340 см⁻¹, отнесён к колебаниям -NH₂, поглощение при 1273 см⁻¹ вызвано амидной связью молекулы стрептавидина, которая смещается к 1633 см⁻¹ в наноматериалах, функционализированных стрептавидином [304, 305].

Также для пары SiНЧ и SiНЧ-нейлон была проведена качественная реакция с ионом N-(2-гидроксиэтил)-феназиния. В присутствии нейлона образовался окрашенный в сине-фиолетовый цвет продукт (рисунок 4.14).

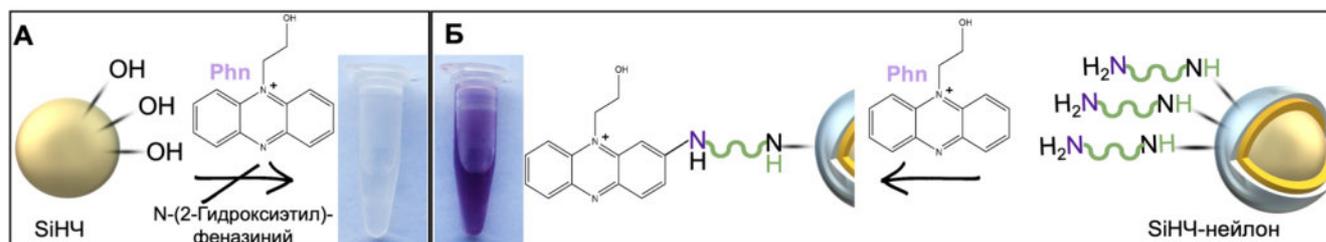


Рисунок 4.14 – Схема качественной реакции SiНЧ (А) и SiНЧ-нейлон (Б) на детекцию концевой аминогруппы

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

Эффективность полученных НЧ-St в выделении биотинилированных олигонуклеотидов и SiНЧ-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 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) [306];
2. диагностика (олигонуклеотиды могут быть спроектированы для обнаружения конкретных биомаркеров или нуклеотидных последовательностей, что позволяет проводить высокоспецифичную детекцию мишени) [307, 308];
3. генная терапия (олигонуклеотиды могут воздействовать на определённые участки ДНК или РНК в клетках для исправления генетических дефектов) [309, 310];

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.) [311, 312].

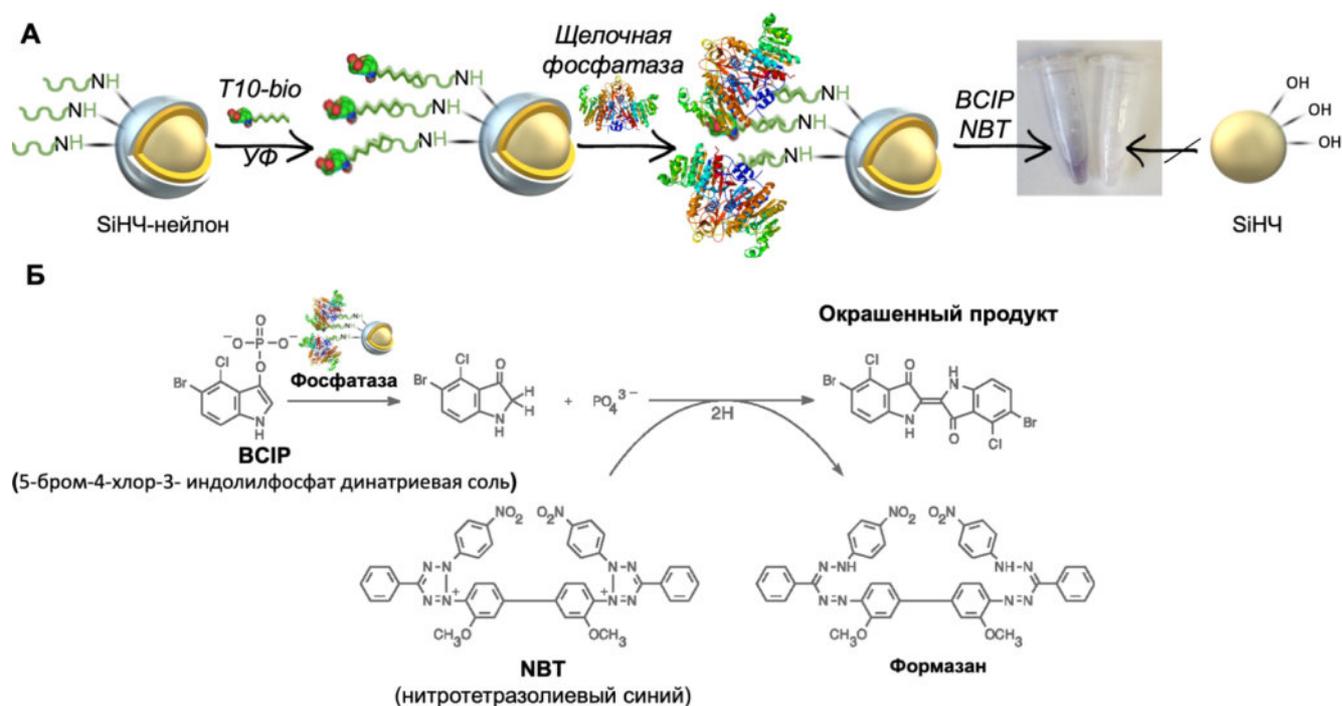
Наноматериалы в качестве носителя олигонуклеотидов применяются для увеличения стабильности ON *in vitro* и *in vivo* и создания многокомпонентной системы или оптимизации процессов сепарации [306].

Однако существуют методологические проблемы, которые на сегодняшний день не были полностью решены: низкая эффективность присоединения ON, потеря их активности, а также токсичность ON. 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 ON, так и опосредованное нековалентное присоединение путём взаимодействия с дополнительными 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 таких наноматериалов. В качестве модельного олигонуклеотида использовали декатимидилатную последовательность, содержащую биотиновую метку на 5'-конце (ON-bio). Отрицательным контролем были выбраны исходные немодифицированные НЧ (SiНЧ). Присоединение ON-bio проводили путём УФ-иммобилизации [313]. После удаления не связавшегося олигонуклеотида, НЧ обрабатывали раствором конъюгата стрептавидин-щелочная фосфатаза (SAP), в качестве субстрата для которого выступали BCIP (5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат динатриевая соль) и NBT (нитротетразолиевый синий), добавление которых приводит к выпадению синего осадка (рисунок 4.15).



Фосфатазный гидролиз BCIP при внесении NBT приводит к образованию темно-фиолетового осадка.

Рисунок 4.15 – Схема реакции с биотинилированным олигонуклеотидом: SiNC (неокрашенный раствор), и SiNC-нейлон (окрашенный раствор) (А); схема ферментативной реакции стрептавидин-щелочная фосфатаза с BCIP и NBT (Б)

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

На данном этапе работы была показана возможность УФ-иммобилизации ON на нейлоновый слой. Далее будут подробнее рассмотрены специфичность и количественные показатели связывания ON-bio с НЧ-St 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 (bio) посредством множественных водородных связей и ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Такой комплекс «стрептавидин-биотин» (St-bio) считается одним из наиболее специфичных и стабильных

нековалентных взаимодействий (константа диссоциации: $\sim 10^{-14}$ М) [314, 315]. Высокая аффинность связывания имеет прикладной аспект, например, для выделения целевых молекул из смеси, что значительно повышает способность к обнаружению очень низких концентраций аналита и одновременно уменьшает количество этапов, необходимых для измерения. Более того, комплекс St-bio характеризуется высокой химической устойчивостью, в том числе к протеолитическим ферментам, перепадам температуры и pH, агрессивным органическим реагентам, а также другим денатурирующим реагентам [316]. 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 [317]. Присоединение одного из компонентов пары к наночастицам позволило упростить сепарацию материалов, а также увеличить эффективность конструкции, благодаря добавлению свойств от наноматериалов (рисунок 4.16).

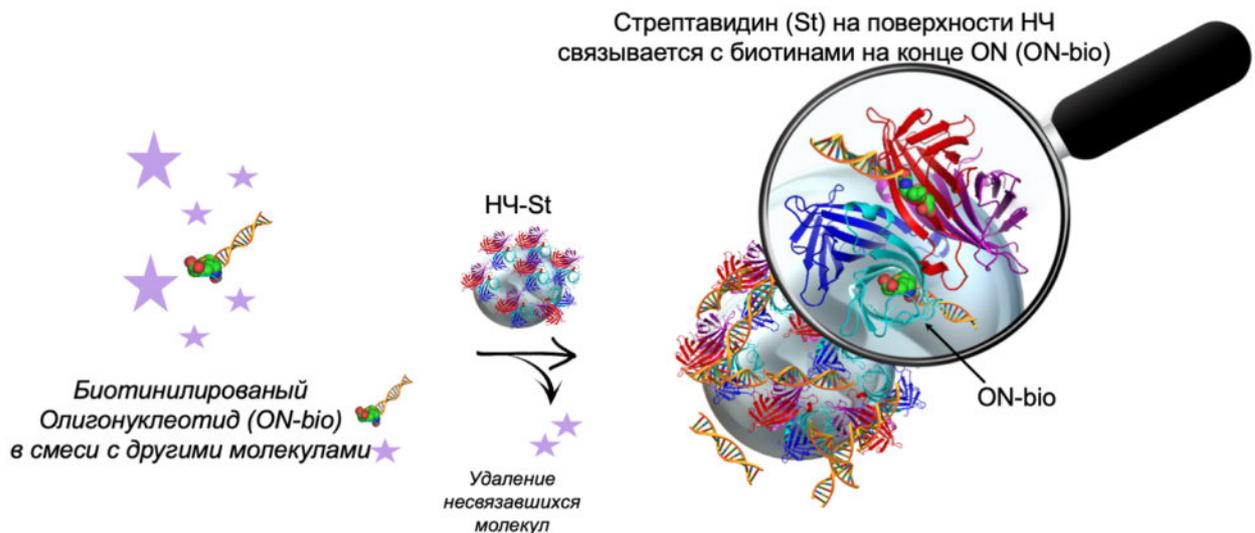


Рисунок 4.16 – Схема связывания наночастиц, модифицированных стрептавидином, с биотинилированными молекулами

Выбор типа наноматериала определяется задачей конструкции, однако чаще распространены в качестве основы наночастицы золота, магнитные и полимерные носители [300, 318, 319, 320].

Более того, магнитные материалы, покрытые стрептавидином, представлены в качестве коммерческого препарата у ряда производителей, в том числе магнитные шарики с иммобилизованным гидрофильным стрептавидином (New England Biolabs, S1421 S), магнитные частицы Dynabeads MyOne Streptavidin (Thermo FS, 65001, 65305, 21344), набор для очистки ДНК "AMPure XP" (Beckman Coulter, A63880). 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 биомолекул или их комплексов из сложных смесей. Схема эксперимента включала регистрацию результата методом электрофореза (рисунок 4.17).

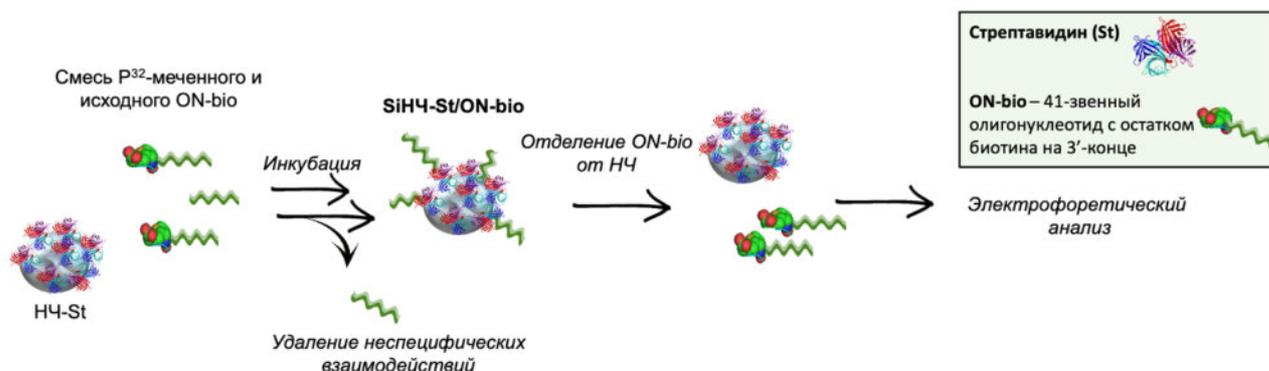


Рисунок 4.17 – Схема связывания наночастиц, модифицированных стрептавидином с биотинилированными олигонуклеотидами

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 ON-bio (5'– TTT TT CAC TCT GTC ACC AGG CTG GAG TGC AGT GGTG TTT TT – bio –3') был добавлен 5'-[³²P]-меченный аналог соответствующего олигонуклеотида (в соотношении 1:10), для возможности обнаружения радиоактивных олигонуклеотидов в осадке с наноматериалами и в супернатанте с помощью газоразрядного счётчика.

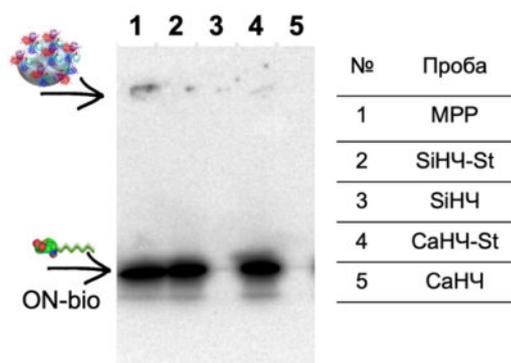


Рисунок 4.18 – Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения MPP (слева направо 1), SiHЧ-St (2), SiHЧ (3), CaHЧ-St (4), CaHЧ (5), связанных с ON-bio, несущим радиоактивную метку

Установлено, что на препаратах SiHЧ и CaHЧ, не модифицированных стрептавидином, сорбции радиоактивного олигонуклеотида не происходит (рисунок 4.18, дорожки 3, 5). Важно

сказать, что, для исключения неспецифической сорбции ON на наночастицы при отделении несвязавшегося олигонуклеотида от НЧ-St, использовали протоколы, идентичные стандартным (для удаления неспецифической сорбции композиты промывали высокосолевыми буферами, для отделения ON от НЧ наноматериалы нагревали до 90 °С в буфере, содержащем меркаптоэтанол) [321].

Видно (рисунок 4.18), что на НЧ без стрептавидина ON нет (дорожки 3, 5), а стрептавидин на поверхности SiНЧ-St и CaНЧ-St связался с биотином на конце ON-bio (дорожки 2, 4).

Далее для определения количественных характеристик связывания наночастиц с биотинилированными олигонуклеотидами и дальнейшего сравнения этих показателей с MPP, варьировали концентрацию добавляемого олигонуклеотида при постоянном количестве наночастиц (0,02 мг). Регистрацию количественных характеристик проводили с помощью жидкостного сцинтилляционного счётчика (Pharmacia Rackbeta 1209-015, Швеция) (таблица 4.7, рисунок 4.19). Важно отметить, что, для анализа эффективности связывания наноматериалов с ON-bio, во всех концентрациях ON-bio, было добавлено равное количество 5'-[³²P]-меченного аналога, соответствующего олигонуклеотидам в постоянной (10^{-7} М, не менее 250 Бк) концентрации, расчёты проводили относительно контрольной пробы, содержащей такие же количества меченного и немеченного олигонуклеотида.

Таблица 4.7 – Количественные характеристики формирования комплекса НЧ-St/ON-bio

НЧ	Добавленный ON-bio, пикомоль	Доля связавшегося ON-bio, %	<i>E</i>, 10⁶ 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	
MPP	200	4,8 ± 0,2	0,95 ± 0, 01
	50	5,4 ± 0,2	
	20	14,7 ± 0,1	

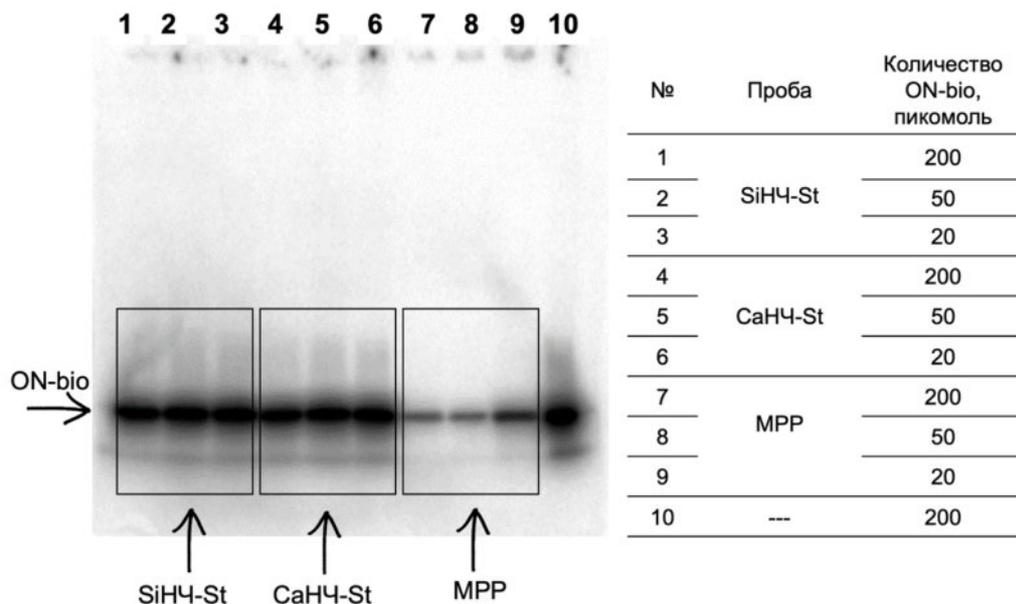


Рисунок 4.19 – Радиоавтограф геля после электрофоретического разделения SiHЧ-St/ON-bio (слева направо 1 – 3), CaHЧ-St/ON-bio (4 – 6), MPP/ON-bio (7 – 9), к которым было добавлено от 20 до 200 пикомоль ON-bio и ON-bio

Для визуализации эффективности связывания, пробы, содержащие модифицированные частицы и олигонуклеотиды анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле. При этом частицы оставались на старте, а олигонуклеотиды под действием электрического поля мигрировали в геле. В таблице 4.7 видно, что эффективность связывания SiHЧ-St и CaHЧ-St с олигонуклеотидом превосходит MPP, что согласуется с количественным показателем ёмкости материалов. Однако количественные характеристики разрушения комплекса оценить по автордиограмме и интегральной плотности полос затруднительно (рисунок 4.19).

В ходе исследования показано, что, при сохранении равных доз (объём частиц, концентрация), HЧ-St превосходит MPP более чем в 10 раз и имеют более широкий диапазон рабочих концентраций: начиная от 10 мкл (10 мкг) HЧ-St позволяют эффективно выделять биотинилированные олигонуклеотиды из раствора в то время, как для MPP необходимо, 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. Полученные в работе конструкции HЧ-St могут быть функциональным аналогом коммерческих MPP. Несмотря на отсутствие парамагнитных свойств, они легко отделяются кратковременным центрифугированием (5 минут) и имеют высокую 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 соединённых линкерными участками попарно комплементарных блоков [322]. Выдвинута гипотеза, что такие конструкции с заданной последовательностью обладают некой биологической функциональностью, для выяснения которой необходимо выявить молекулы, взаимодействующих с TW-олигонуклеотидами в живых системах (ON-bio, таблица 3.2).

На первом этапе был получен цельноклеточный лизат линий клеток рака шейки матки (HeLa) и эмбриональных почек человека (HEK293). Биотинилированные олигонуклеотиды TW-типа (ON-bio) инкубировали с белками из клеточного экстракта как индивидуально, так и в присутствии стрептавидиновых наночастиц (MPP, CaHЧ-St, SiHЧ-St). Далее полученные комплексы анализировали методом гель-электрофореза в нативных условиях, регистрировали радиацию лазерным сканером и окрашивали гель Coomassie (рисунок 4.20).

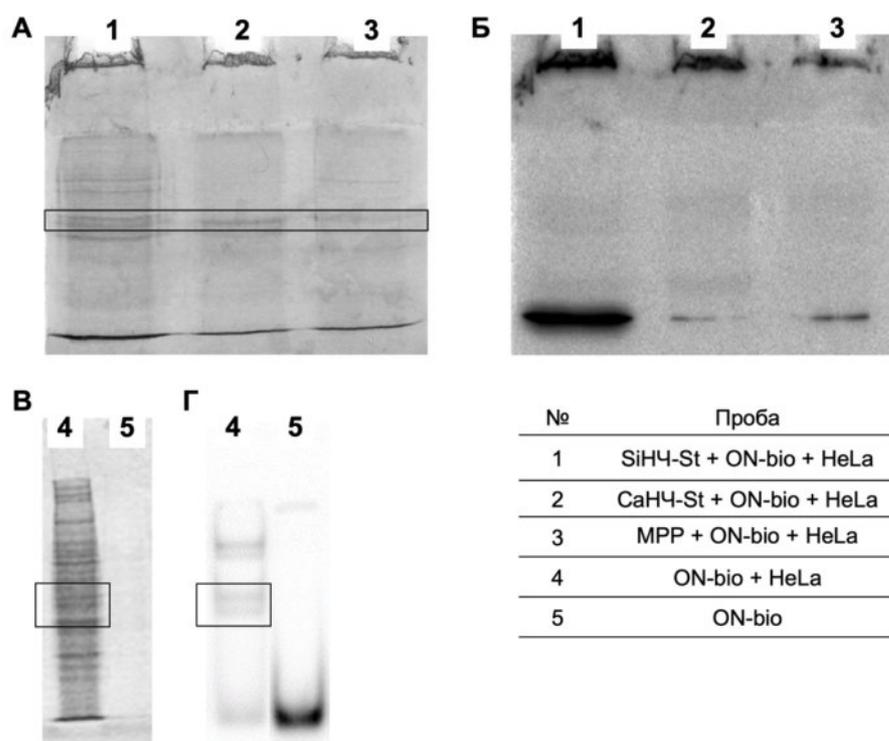


Рисунок 4.20 – Скан геля, окрашенного Coomassie (А) и радиоавтограф этого же геля (Б), демонстрирующие взаимодействие биотинилированного олигонуклеотида TW-типа с белками из клеточного лизата HeLa и SiHЧ-St (№ 1), CaHЧ-St (№ 2) и MPP (№ 3), а также скан геля, окрашенного Coomassie (В), и его радиоавтограф (Г) продуктов инкубации ON с лизатом HeLa (№ 4) в сравнении с индивидуальным ON-bio (№ 5)

Из данных на рисунке 4.20 А 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 4.20 В (дорожки №4) демонстрирует, что, без селективной сепарации белков, связанных с TW-ON 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-bio 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 4.21).

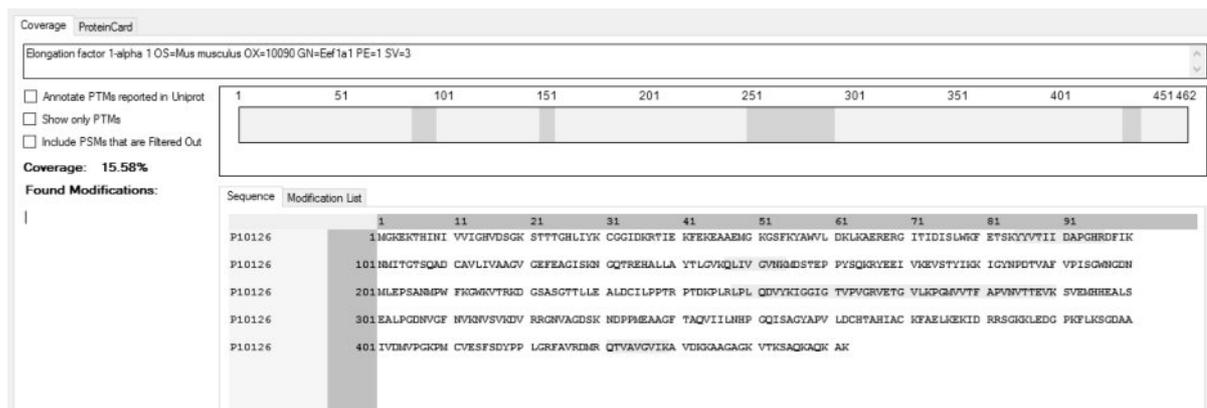


Рисунок 4.21 – Результаты масс-спектрометрического анализа (LC-MS Orbitrap) белка, связывающегося с олигонуклеотидом TW1C-bio, после трипсинолиза

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 4.20). 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 выделения из клеточного лизата белков со сродством к определённым структурированным НК. Наноразмерность частиц обеспечивает увеличенную удельную площадь поверхности даже в сравнении с микрометровыми аналогами, что, в дальнейшем, приводит к большей ёмкости по отношению к присоединяемой 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 исследованиях в области биомедицины, кроме того, некоторые из них уже используются в фармакологической промышленности. Среди прочих, перспективным направлением является применение наночастиц в качестве носителей терапевтических средств, позволяющих оптимизировать их фармакокинетические и фармакодинамические свойства. 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.) [323, 324].

Данная глава работы будет сконцентрирована на дизайне эффективных носителей для малых лекарственных молекул на примере доксорубина.

4.3.2.1 Дизайн систем доставки малых лекарственных молекул

Малые лекарственные молекулы имеют массу обычно менее 900 дальтон (Da) и могут 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 [325].

В случае создания носителей, способных к транспорту малых лекарственных молекул, станет доступно использование новых путей эффективного лечения не только онкологических, 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 полностью [326].

Среди прочих, наноматериалы на основе карбоната кальция особенно перспективны для решения обозначенной проблемы благодаря аномальному рН опухолевого микроокружения (ниже 6,5) и рН-зависимой деградации материала в этих условиях [230]. 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 накопления частиц в органах [327].

Таким образом, далее будут рассмотрены пути эффективного создания комплекса «НЧ-лекарство» и условия разрушения данного взаимодействия, в том числе с исследованием биологического эффекта высвобождаемого вещества *in vitro*.

В качестве модели малой лекарственной молекулы выбран доксорубицин (DOX) – противоопухолевый антибиотик, вплоть до настоящего времени применяемый для химиотерапии при лечении широкого спектра злокачественных опухолей (лимфобластный лейкоз, саркома мягких тканей, остеогенная саркома, рак молочной железы, рак щитовидной железы, нейробластома и т. д.) [328]. DOX – тетрациклиновый антибиотик, молекула которого состоит из тетрациклического антрахиноидного агликона, соединённого гликозидной связью с аминокислотой даунозамином (рисунок 4.22).

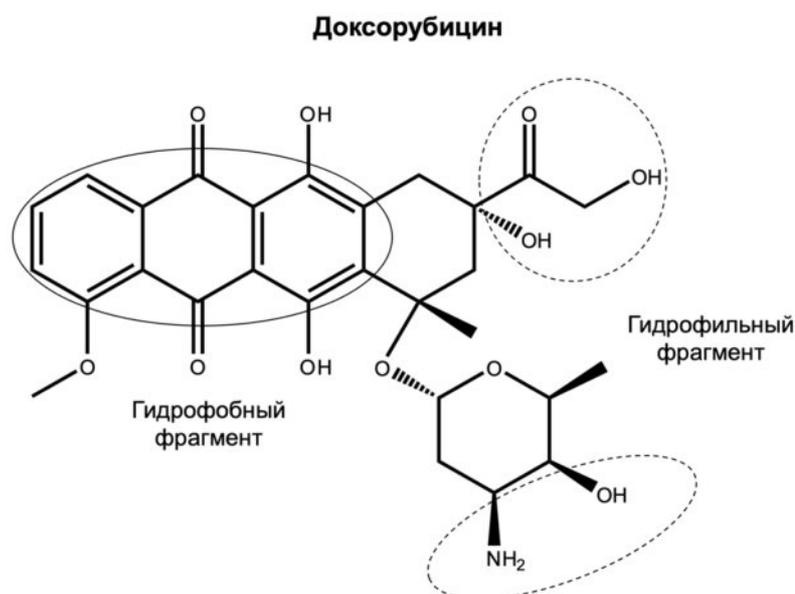


Рисунок 4.22 – Формула доксорубицина с выделением гидрофобных участков (фиолетовый цвет) и гидрофильных (желтый цвет)

DOX обладает множеством механизмов действия, основными являются интеркаляция ДНК (образование аддукта с I цепью и формирование водородных связей со II цепью ДНК), а также образование активных форм кислорода по реакции Фентона [329]. Препарат характеризуется высокой токсичностью и выраженными побочными эффектами, преимущественно связанными с его кардиотоксичностью, гепатотоксичностью и нарушением системы кроветворения [329].

Разработка вариантов увеличения направленности воздействия DOX может значительно увеличить эффективность терапии с его использованием за счёт изменения его физико-химических (например, улучшенная растворимость) и фармакологических свойств (продолгованное высвобождение, избирательность и т. д.).

В качестве наноносителей будут рассмотрены две группы материалов: CaНЧ и его гибрид с МНЧ, а также индивидуальные SiНЧ и их полимерные композиты SiНЧ-нейлон.

4.3.2.1.1 Наночастицы карбоната кальция в качестве носителя доксорубина

Система доставки БАС должна быть способна эффективно присоединять агент, избирательно его высвобождать в целевую область, а также сохранять функциональную активность препарата [330]. В этой части будут протестированы наночастицы на основе карбоната кальция с учётом данных критериев.

При злокачественной трансформации клеток происходит неконтролируемый клеточный рост, изменяющий микроокружение тканей и сосудов. Чрезмерное образование новых сосудов (ангиогенез), приводит к появлению отверстий до 200 нм вблизи опухоли в клетках эндотелия кровеносного сосуда – эффект «повышенной проницаемости и удержания» (enhanced permeability and retention, EPR) [331]. Клинические исследования на людях 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 [117, 332].

Кроме того, повышенная скорость деления клеток приводит к увеличению выделения продуктов клеточного метаболизма, в том числе молочной кислоты, что снижает pH опухолевого микроокружения на 0,5 – 1,5 относительно окружающей нормальной ткани [333, 334].

Итак, pH-зависимые наноносители на основе карбоната кальция могут локализоваться в области опухоли благодаря эффекту EPR, а аномальная кислотность опухолевых тканей будет способствовать деградации матрицы СаНЧ и, как следствие, высвобождению терапевтического агента в область-мишень.

Однако несмотря на распространённость использования эффекта EPR в разработках, метод является пассивным способом нацеливания и, без дополнительных адресующих векторов, малоэффективен: накопление частиц в области солидной опухоли достигает лишь 1% от введённой дозы [335, 336]. Комбинирование подходов нацеливания может способствовать заметному улучшению направленности терапии [337].

Ранее в работе были получены гибридные наноносители, обладающие свойствами pH-лабильности и магнитной восприимчивостью. Перспективность таких материалов 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 (например, применением импульсных градиентов магнитного поля в направлении участков опухоли) [338, 339].

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 [340]. Другой подход основан на обработке сформированных частиц раствором лекарственного средства при постоянном перемешивании [341]. 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 данном разделе 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 (длина волны 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 к DOX. Ранее для загрузки лекарственного средства были выбраны условия инкубации: натрий боратный буфер (10 мМ, pH 8,0), 25 °С, в течение 12 часов [254].

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 составе 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) [342, 343].

Однако несмотря на устойчивое формирование комплекса НЧ-лекарство, исходя из литературных данных, полученные показатели E не являются высокими (в литературе показано $E(\text{FeНЧ}) = 1757$ мкг/мг [254]; $E(\text{CaНЧ}) = 440$ мкг/мг [344]). Один из способов увеличения

ёмкостного показателя является уменьшение количества частиц, взятых на реакцию инкубирования с лекарством, при сохранении содержания DOX. При уменьшении исходной концентрации частиц в реакции инкубации до 0,4 мг СаНЧ и 0,025 мг Fe@СаНЧ были получены E равные 659 ± 5 ($d: 215 \pm 10$ нм) и 1900 ± 27 ($d: 105 \pm 3$ нм) мкг/мг соответственно. Отличающееся 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 превосходят большинство аналогов по эффективности присоединения DOX [345, 346].

Далее в работе исследовали эффективность высвобождения доксорубина из наноконпозитов в течение времени в зависимости от рН (рисунок 4.23). В случае индивидуального карбоната кальция полученная эффективность связывания является оптимальной, благодаря возможности полного растворения НЧ и 100% извлечения DOX из состава композита (рисунок 4.23 А). Для Fe@СаНЧ/DOX зависимость эффективности извлечения DOX от количества лекарства в композите будет рассмотрена подробнее (рисунки 4.24 – 27).

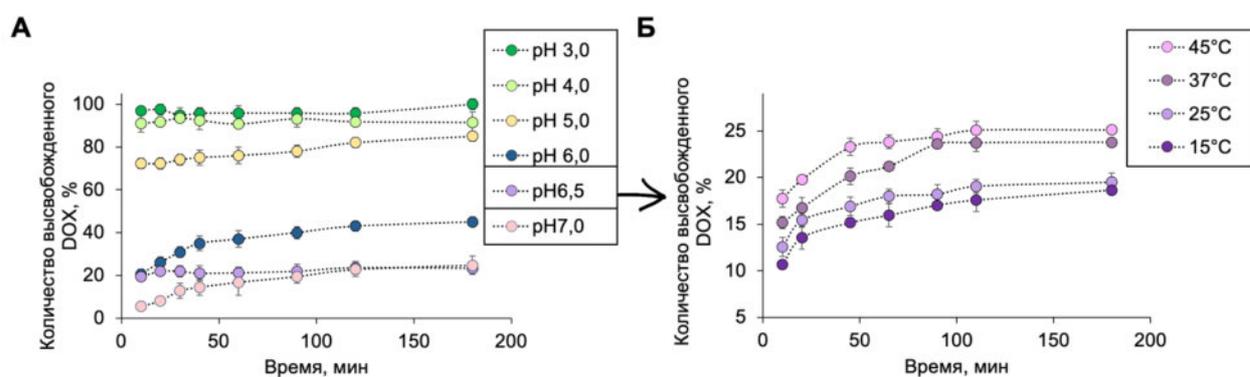


Рисунок 4.23 – График эффективности высвобождения DOX из СаНЧ/DOX от времени при рН 3,0 – 7,0 и 25 °С (А), а также при рН 6,5 и 15 – 45 °С (Б); образцы, протестированные при различных рН, содержали 0,2 мг СаНЧ и 132 мкг DOX

Перспективно, что СаНЧ при физиологических значениях рН сохраняет более 75% загруженного лекарственного средства (рисунок 4.23 А) 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 рН до значений, характерных для опухолевых тканей, эффективность высвобождения >80%. Этот эффект может способствовать увеличению эффективности пассивного нацеливания препарата на опухолевые ткани и снижению токсического действия на нормальные [347]. В будущих приложениях чувствительность к слабому рН микроокружения опухоли может способствовать

эффективной высокоспецифичной доставке и замедленному высвобождению противораковых препаратов в экспериментах *in vivo*.

Для учёта влияния температуры на эффективность высвобождения DOX при значениях pH, близких к физиологическим (pH 6,5), где наблюдалась только низкая эффективность высвобождения лекарственного средства (рисунок 4.23 А), повторили аналогичный эксперимент при температурах 15, 25, 37 и 45 °С (рисунок 4.23 Б).

Эффективность высвобождения DOX увеличивалась с повышением температуры: разница между 45 и 15 °С составляла ~ 7 % в каждой точке эксперимента (рисунок 4.23 Б). Диапазон температур содержал краевые точки, отсутствующие в живом организме. В исследованном диапазоне температур степень высвобождения изменялась незначительно, 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 влиять на эффективность высвобождения лекарства из состава нанокompозита для носителей с разным содержанием лекарства.

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 4.24).

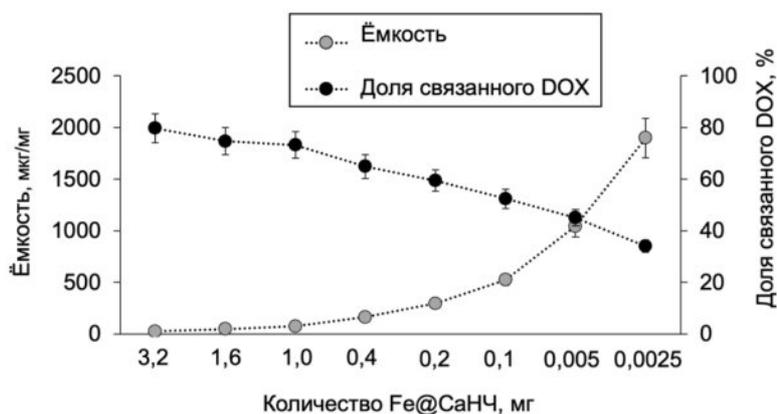


Рисунок 4.24 – Зависимость ёмкости Fe@CaHЧ (мкг/мг) и эффективности связывания DOX (%) от количества наночастиц

Таблица 4.8 – Диаметр Fe@CaHЧ/DOX по данным ДСР (d) и ПЭМ (D), ИПД, ζ-потенциал, ёмкость (E) нанокompозитов, содержащих 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	А
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	Б
0,050	113 ± 5	9 ± 5	201 ± 35	158 ± 46	0,28 ± 0,03	-12,4 ± 0,2	1045 ± 10	45 ± 2	В
0,025	105 ± 3	—			0,29 ± 0,01	-19,0 ± 0,5	1900 ± 27	34 ± 4	Г
Fe@Ca HЧ	121 ± 6	—			0,31 ± 0,01	-15,6 ± 0,5	—	—	—

*Эф. DOX – эффективность связывания нанокompозита с DOX, рассчитывали, как долю связавшегося препарата от добавленного, %.

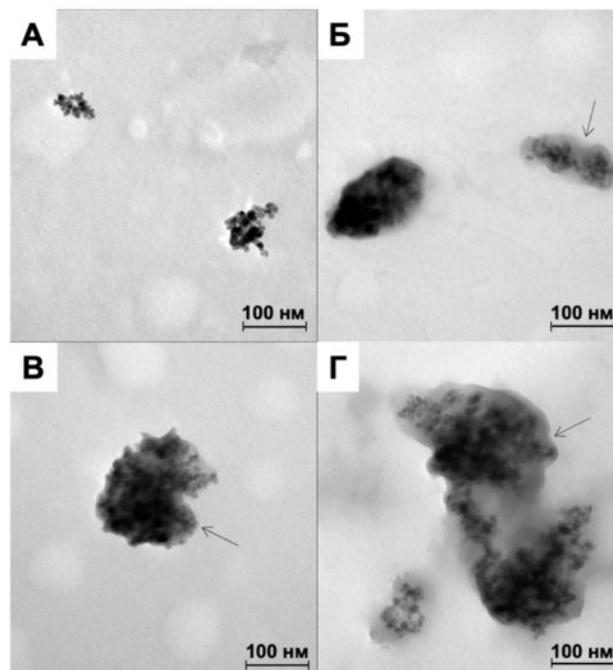


Рисунок 4.25 – ПЭМ-изображения Fe@CaHЧ/DOX₇₃ (А); Fe@CaHЧ/DOX₂₉₅ (Б); Fe@CaHЧ/DOX₅₂₅ (В); Fe@CaHЧ/DOX₁₀₄₅ (Г), где нижним индексом указана ёмкость нанокompозитов в соответствии с таблицей 4.8, шкала 100 нм

В таблице 4.8 показана зависимость ёмкости Fe@CaHЧ (мкг/мг) и эффективности связывания DOX (%) от количества наночастиц. На графике видно, что высокая концентрация

частиц приводит к снижению ёмкости при высокой эффективности загрузки препарата. Для численно высокой загрузки лекарства требуется низкая концентрация частиц. Однако использование столь низкой концентрации (0,025 мг/мл) Fe@CaНЧ для получения Fe@CaНЧ/DOX методически затруднительно (низкая эффективность извлечения из раствора), немасштабируемо, а также приводит к большому перерасходу антибиотика.

Сравнение физико-химических и морфологических параметров Fe@CaНЧ с разным содержанием DOX (25 до 1045 мкг/мг) представлено 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 4.25). Изменения ζ -потенциала и размера частиц в Fe@CaНЧ/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 4.26).

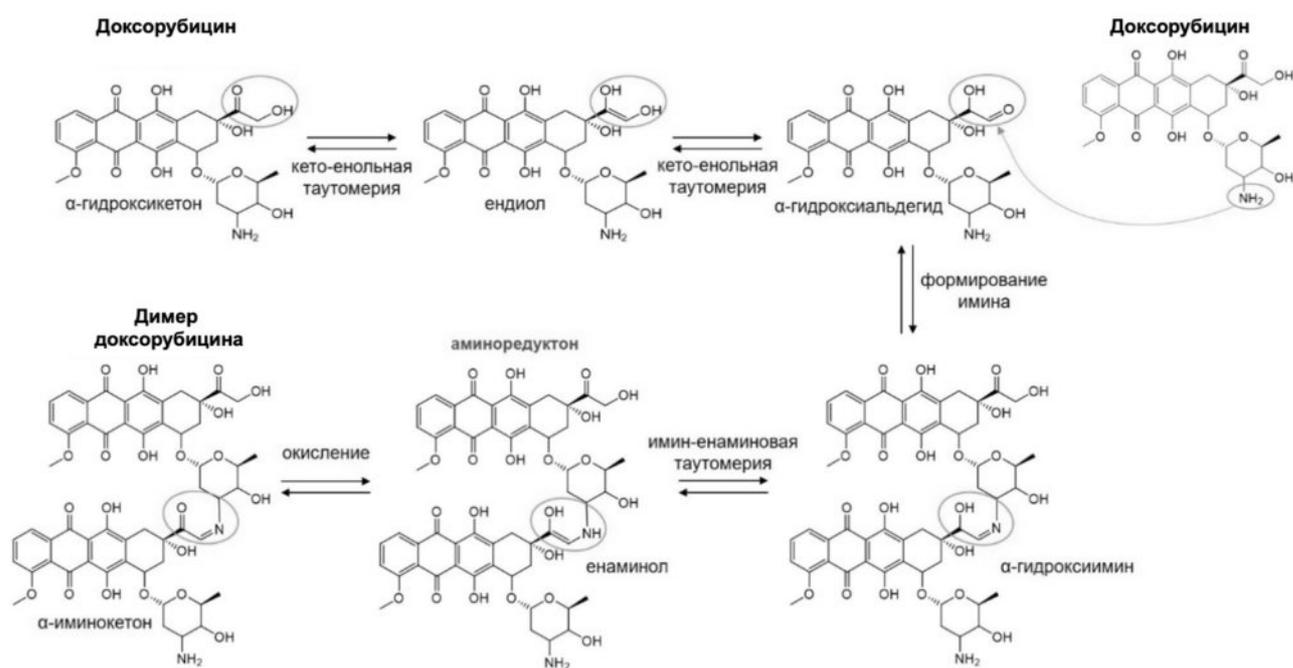


Рисунок 4.26– Схема связывания малых и избыточных концентраций DOX [329]

Предполагается (рисунок 4.26), что, при увеличении концентрации доксорубина, возрастает доля препарата, сорбированного самого на себя, а не на поверхность наночастиц. Это приводит к образованию неактивного димера и снижению эффективности высвобождения лекарства при пониженном pH. Вероятно, наличие «плотной упаковки препарата» может изменять дальнейшие кинетику и эффективность направленного и нецелевого воздействия.

Таким образом, согласно рисунку 4.24, 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 из чувствительных к рН НЧ, что будет исследовано ниже.

Так как ранее на примере наночастиц, состоящих только из карбоната кальция, был исследован широкий диапазон рН (рисунок 4.23), для дальнейших тестов рН был выбран диапазон от показателя кислотности плазмы крови (7,4) до имитирующего микроокружение опухоли и эндосомы клеток (рН~5) (Таблица 4.9, Рисунок 4.27).

Таблица 4.9. Эффективность высвобождения DOX из Fe@CaHЧ/DOX при рН 4,0–7,4 при 25 °С в течение 24 ч

Нанокompозит	рН 4,0		рН 5,0		рН 6,0		рН 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

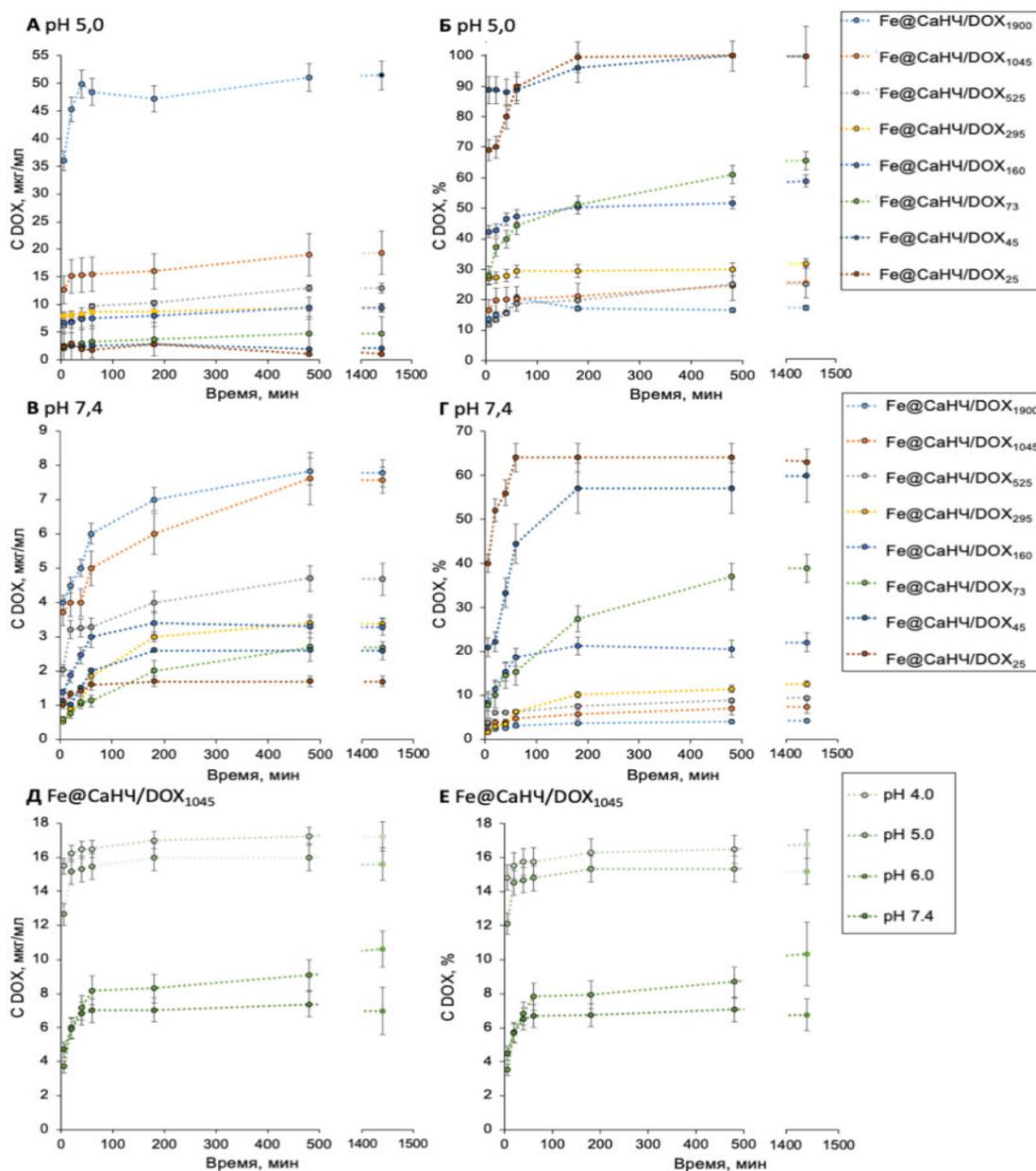


Рисунок 4.27 – Концентрация (А, В, Д) и доля (Б, Г, Е) высвободившегося доксорубина из состава комплексов Fe@CaH₄/DOX, содержащих DOX от 25 до 1900 мкг/мл, при pH 5,0 (А, Б) и pH 7,4 (В, Г) при 25 °С. Высвобождение DOX из Fe@CaH₄/DOX с ёмкостью 1045 мкг/мл при pH 4,0 – 7,4 при 25 °С (Д, Е)

Все наноконпозиты продемонстрировали pH-зависимое высвобождение препарата вне зависимости от загрузки, что хорошо согласуется с ранее полученными результатами. Сравнение образцов 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 4.26 Б и в таблице 4.9 подтверждают 100% высвобождение препарата при pH 5,0 из Fe@CaH₄/DOX₂₅ – 45. Дальнейшее увеличение содержания DOX в составе наноконпозита приводит к снижению эффективности высвобождения лекарства до 44 – 70 % (Fe@CaH₄/DOX₇₃ – 295) и 21 – 23 % (Fe@CaH₄/DOX₅₂₅ – 1900).

Наблюдается тенденция к снижению степени высвобождения DOX с увеличением ёмкости нанокompозита во всем изученном диапазоне pH (рисунок 4.27, Таблица 4.9). Нанокompозиты 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 pH 5,0 несмотря на более, чем десятикратное отличие по содержанию DOX в составе нанокompозита (1900/160). Более того, Fe@CaHЧ/DOX₁₆₀ при pH 7,4 высвобождает в 2,5 раза меньше лекарства, чем Fe@CaHЧ/DOX₁₉₀₀.

На данном этапе из полученных нанокompозитов 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 нанокompозиты, содержащие терапевтический агент (CaHЧ/DOX и Fe@CaHЧ/DOX). Благодаря полной деградации матрицы CaHЧ при pH 5,0, с этим материалом не возникает проблема снижения эффективности высвобождения препарата, что позволяет достигать высоких ёмкостных характеристик вплоть до 659 ± 5 мкг/мг, 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.

Далее исследовали нанокompозиты на клеточных линиях для определения наилучшего кандидата среди Fe@CaHЧ и сравнения его с CaHЧ.

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

В первую очередь, перед доказательством эффективности комплекса лекарства с наноносителями стояла задача подтвердить биобезопасность разработанных частиц (CaHЧ и Fe@CaHЧ). Для возможности использования полученных магнитных нанокompозитов далее в биомедицине, необходимо было убедиться в их низкой токсичности. Существуют данные, прогнозирующие опасное влияние МНЧ на живые системы [348, 349], в то же время другие исследователи доказывают их безопасность [350, 351]. 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) [352].

Цитотоксичность полученных CaHЧ и Fe@CaHЧ, а также их комплексов с доксорубицином (CaHЧ/DOX и Fe@CaHЧ/DOX) оценивали стандартным МТТ-тестом, позволяющим колориметрически оценить долю выживших клеток после воздействия на них препаратом. Для оценки цитотоксичности были выбраны нормальные и онкотрансформированные линии клеток: карциномы легких – А549, эмбриональной почки человека – НЕК293 (рисунок 4.28 А) и аденокарциномы молочной железы человека – MCF-7, линий клеток рака шейки матки – HeLa (рисунок 4.28 Б).

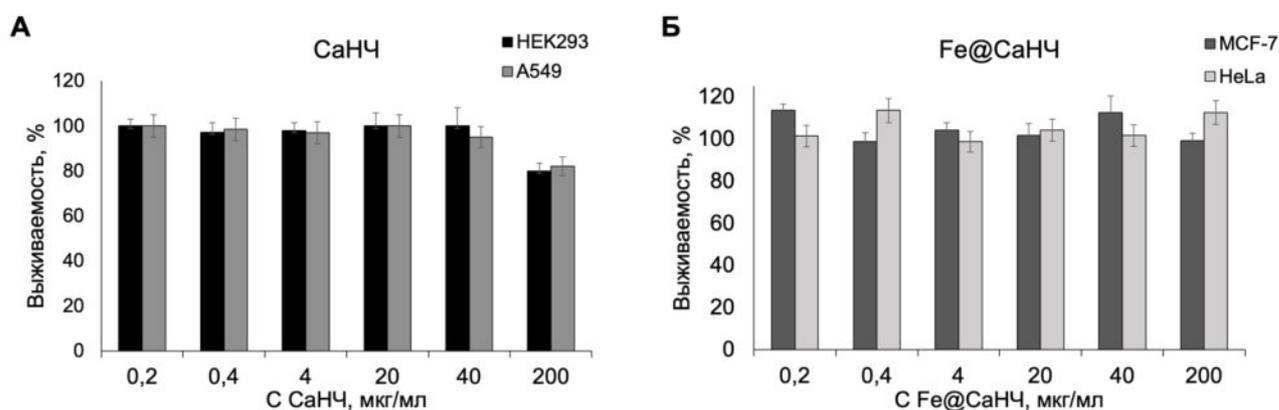


Рисунок 4.28 – Анализ жизнеспособности клеток НЕК293 и А549 после инкубации с CaHЧ (А), а также клеток HeLa и MCF-7 после инкубации с Fe@CaHЧ (Б) в течение 48 ч

Ожидаемо показано отсутствие токсичности индивидуальных наночастиц карбоната кальция: до 0,2 мг/мл жизнеспособность обработанных клеток не снижалась ниже 85% (клеточные линии карциномы легких – А549, эмбриональной почки человека 293 – НЕК293), что согласуется с литературными данными [353, 354].

Композит без антибиотика (Fe@CaHЧ) также показал крайне низкую цитотоксичность в исследованном диапазоне концентраций до 0,2 мг/мл (рисунок 4.28 Б). В литературе показана безопасность наноразмерного Fe@CaHЧ до 0,8 мг/мл [227].

Оценку эффективности ингибирования роста клеток наноконструктами, содержащими доксорубицин, проводили в сравнении со свободным доксорубицином (рисунок 4.29 – 30).

Для выбора оптимального состава Fe@CaHЧ/DOX по количеству DOX, далее данные будут скомпонованы по типу частиц и ниже резюмированы для оценочного сравнения их эффективности.

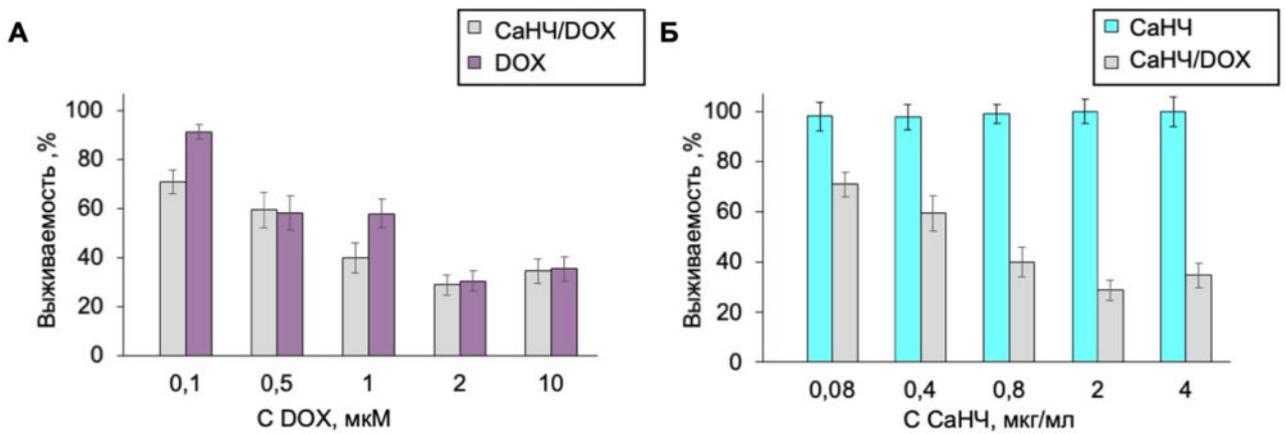


Рисунок 4.29 – Анализ жизнеспособности клеток A549 в зависимости от количества DOX в образце (А) или концентрации наночастиц (Б) после инкубации с CaHЧ/DOX и DOX в течение 48 ч

На рисунке 4.29 показано эффективное ингибирование роста клеток линии A549 наноккомпозитом на основе карбоната кальция и доксорубицина, сравнимое со свободным доксорубицином. Значения концентрации полумаксимального ингибирования (IC 50) составили: $0,97 \pm 0,04$, $2,41 \pm 0,02$ мкМ для CaHЧ/DOX и DOX соответственно.

С помощью этого испытания не было возможности показать избирательность или адресность воздействия препарата, а только подтвердить сохранность терапевтических свойств доксорубицина после включения в состав наноккомпозита и дальнейшего высвобождения. Поэтому ожидалось, что IC 50 будут сопоставимы. Вероятно, большая эффективность наноккомпозитного доксорубицина связана с пролонгированным высвобождением препарата из состава комплекса, в сравнении с одномоментным добавлением.

Для уточнения оптимального состава Fe@CaHЧ/DOX и подтверждения предположений о влиянии на выживаемость клеток различной эффективности высвобождения DOX из состава композита, все полученные композиты с ёмкостью 25 – 1900 были протестированы на двух линиях клеток.

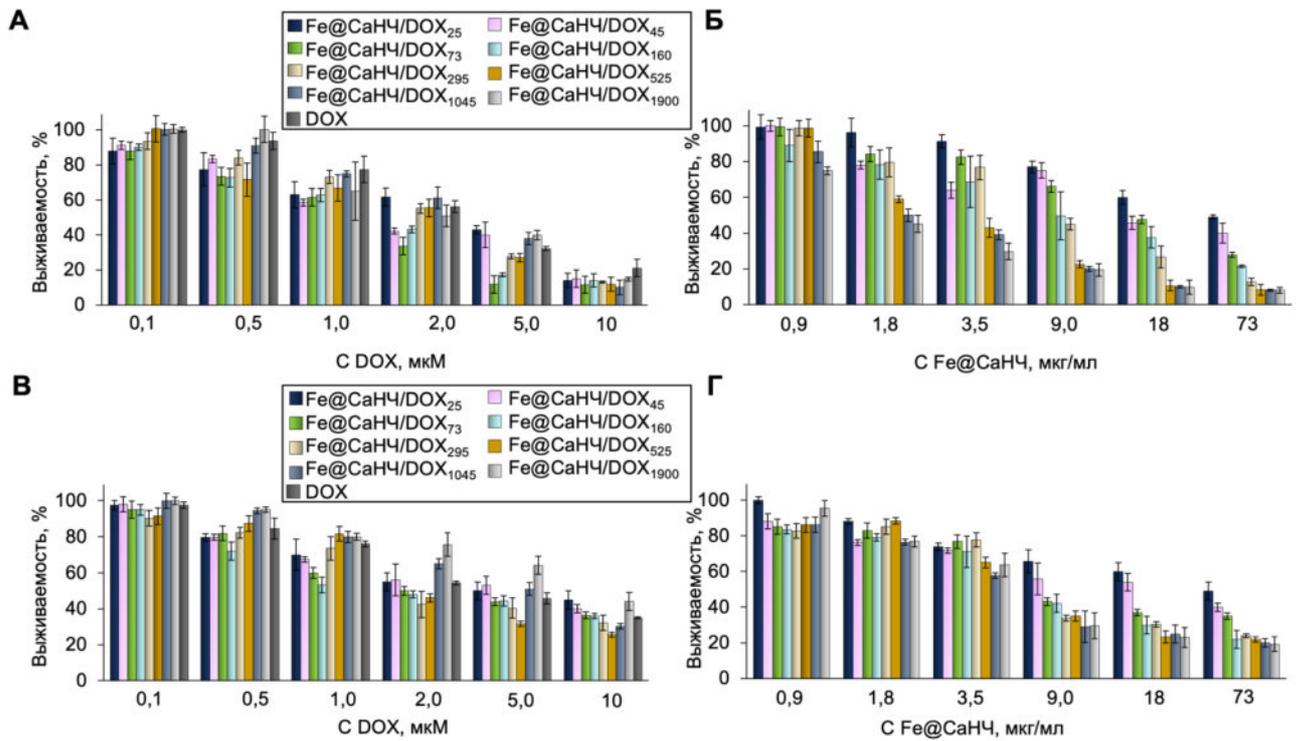


Рисунок 4.30 – Выживаемость клеток HeLa и MCF-7 в зависимости от количества DOX в образце (А – HeLa, В – MCF-7) или концентрации наночастиц (Б – HeLa, Г – MCF-7), обработанных Fe@CaH4/DOX и DOX в течение 48 ч

Содержание образцов в пробе рассчитывали двумя вариантами: на концентрацию частиц (рисунок 4.30 А, В, в каждом ряду разное количество частиц с учётом ёмкости) и на количество лекарства (рисунок 4.30 Б, Г), в каждой точке равное количество наночастиц, 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 4.30 А, В). Этот факт подтверждают данные по эффективности высвобождения DOX при физиологическом pH (таблица 4.9, столбцы %). Диаграмма на рисунке 4.30 Б, Г коррелирует с данными по высвобождению в абсолютных значениях (таблица 4.9, столбцы мкг/мл). Из полученных данных были рассчитаны значения IC₅₀ (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) подтверждают полученные ранее результаты эффективности высвобождения DOX из комплексов Fe@CaHЧ/DOX₁₆₀₋₁₉₀₀, а также сохранение токсичности DOX в нанокompозите. При нормировании результатов МТТ-теста на концентрацию DOX, минимальные значения IC 50 характерны для частиц с более высокой эффективностью высвобождения в процентах (Fe@CaHЧ/DOX₁₆₀), а при нормировании на концентрацию наночастиц – у частиц с максимальной ёмкостью по (Fe@CaHЧ/DOX₁₉₀₀). Эти данные позволяют рассчитывать на высокую эффективность Fe@CaHЧ/DOX с ёмкостью 160 мкг/мг.

Таким образом, в этой части работы внимание было сконцентрировано на оценке целесообразности применения высоких загрузок 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 доксорубина. 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 лекарственного агента. CaHЧ и Fe@CaHЧ являются перспективными транспортёрами лекарственных молекул, а полученные данные свидетельствуют о целесообразности 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 [355, 356]. Применением SiНЧ в качестве транспортёра БАС можно обеспечить положительное изменение фармакодинамики и фармакокинетики препарата, путём обеспечения следующих функций:

- адресность (химическая устойчивость SiНЧ разрешает пути функционализации его поверхности для нацеливания на специфические рецепторы, экспрессируемые в целевых областях [357, 358]);
- контролируемое высвобождение (пористая морфология SiНЧ обеспечивает пролонгированный процесс выхода БАС из состава композита) [3];
- увеличенная физиологическая стабильность (стабильность SiНЧ в условиях *in vivo* предотвращает БАС от преждевременной деградации, а также увеличивает время полувыведения препаратов) [359];
- сниженная резистентность при терапии антибиотиками (достигается благодаря улучшенному проникновению SiНЧ непосредственно в цитоплазму клеток) [360, 361];
- улучшенная биосовместимость [362].

Кроме того, ранее в работе был получен нанокомпозит SiНЧ с полимером – нейлоном-6 (SiНЧ-нейлон). Предполагалось, что, благодаря более развитой объёмной 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 основе диоксида кремния и исследование условий разрушения этого комплекса

Процедуры связывания SiНЧ и SiНЧ-нейлон с доксорубицином, а также регистрации количественных показателей были аналогичны описанным выше для композитов карбоната кальция: инкубацию частиц с доксорубицином проводили в 100 мМ натрий-боратном буфере (рН

8,0), 25 °С, в течение 12 часов, далее регистрировали оптическую плотность надосадочных растворов при 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	E, 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 составила 258 мкг/мг (DOX/SiNPs). Для этого типа материала эти показатели являются превосходящими литературные данные [363, 364, 365, 366, 367, 368]. Для SiНЧ-нейлон наибольшая полученная ёмкость была рассчитана как 493 мкг/мг, что в 2 раза выше, чем для SiНЧ. В химической структуре нейлона-6 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 от 63 ± 1 до 147 ± 5 нм (ИПД от $0,09 \pm 0,01$ до $0,232 \pm 0,002$) и от 110 ± 2 до 137 ± 2 нм (ИПД от $0,26 \pm 0,01$ до $0,209 \pm 0,002$), соответственно. ζ -потенциал изменяется от $-28,6 \pm 0,2$ до $0,01 \pm 0,08$ (SiНЧ/DOX) и от $30,0 \pm 0,4$ до $1,71 \pm 0,07$ (SiНЧ-нейлон/DOX) мВ.

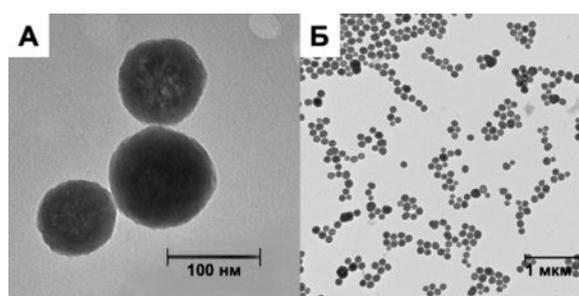


Рисунок 4.31 – ПЭМ изображения SiНЧ/DOX, шкала 200 нм (А) и 1 мкм (Б)

Ожидалось, что значения ёмкости будут ниже, чем для описанного выше случая многослойного связывания доксорубина с поверхностью. Это предположение подтвердили эксперименты по эффективности высвобождения DOX из SiНЧ/DOX и SiНЧ-нейлон/DOX (рисунок 4.32), содержащих наибольшее количество лекарства из полученных (258 мкг/мг и 493 мкг/мг соответственно).

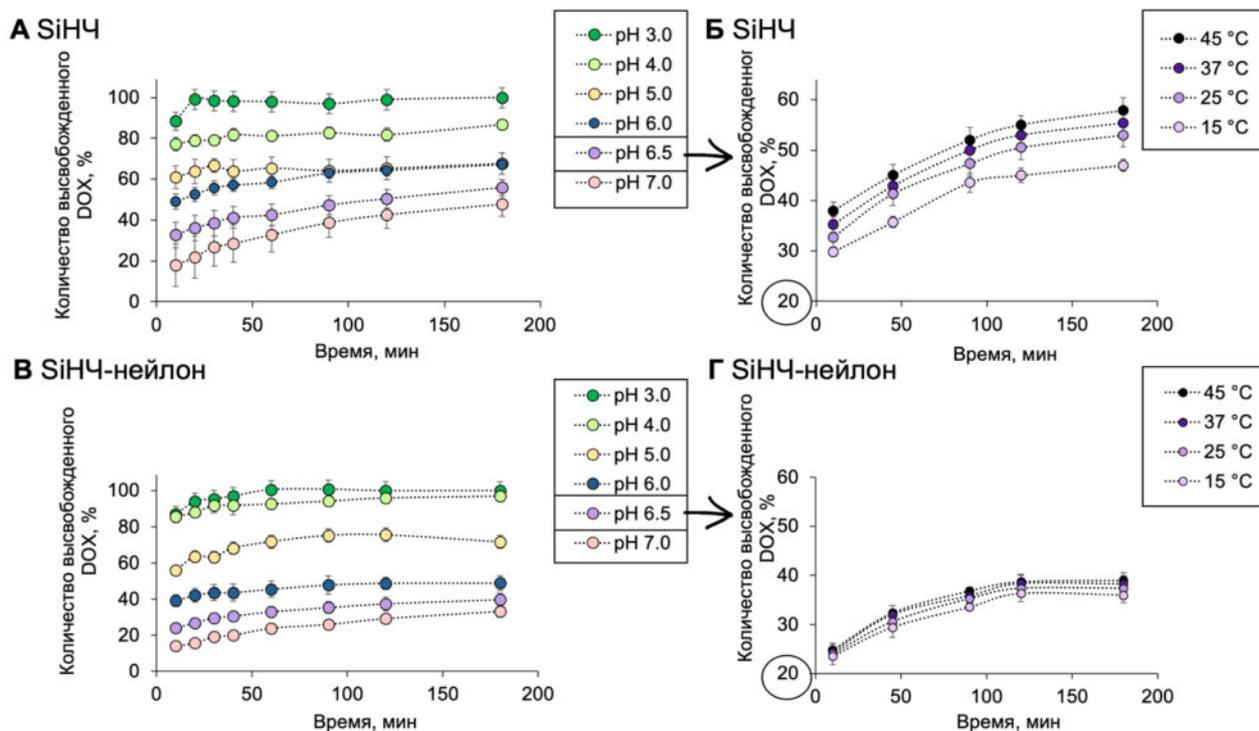


Рисунок 4.32 – Высвобождение DOX из SiНЧ/DOX (А, Б) и SiНЧ-нейлон/DOX (В, Г) при pH 3,0 – 7,0 при 25 °С (А, Б) и pH 6,5 при 15 – 45 °С (В, Г)

В связи с большей химической устойчивостью материалов диоксида кремния по сравнению с СаНЧ были рассмотрены экстремально закисленные условия (pH 3 – 4) для более наглядного проявления pH-зависимого высвобождения лекарства из состава композитов (рисунок 4.32 А, В), а также влияние температуры на кинетические профили высвобождения (рисунок 4.32 Б, Г).

Материалы SiНЧ/DOX и SiНЧ-нейлон/DOX характеризуются pH-зависимым высвобождением препарата, что связано не с растворением матрицы носителя (Таблица 4.4), как в случае с СаНЧ, а с ослаблением электростатических взаимодействий из-за повышения кислотности раствора. Однако несмотря на меньшую выраженность pH-зависимости (в сравнении с СаНЧ), избирательность высвобождения при опухолевом pH сохраняется: при нейтральном pH высвобождается не более 40% (SiНЧ/DOX) и 25% (SiНЧ-нейлон/DOX) DOX, а при pH 5 высвобождение составляет более 60% для обоих типов НЧ. Следует отметить, что эффективность высвобождения DOX для SiНЧ при pH 5 и 6 практически одинакова. В то время,

как для SiHЧ-нейлон эффективность при pH 5 значительно выше, чем при pH 6, что лучше для селективного высвобождения DOX в микроокружении опухоли.

Несмотря на то, что SiHЧ/DOX и SiHЧ-нейлон/DOX имеют схожие кинетические профили высвобождения препарата, модифицированный полимером нанокомпозит обладает большей ёмкостью загрузки доксорубицином и, соответственно, при количественном высвобождении достигается более высокая концентрация доксорубицина в растворе. Эффективность высвобождения DOX увеличивается с повышением температуры не более, чем на 5% (рисунок 4.32 Б, Г). Результаты, полученные в работе, подтверждают необходимость дальнейшего исследования наноносителей *in vivo* [369, 370, 371].

DOX является амфифильной молекулой, способной к образованию гидрофобных, электростатических взаимодействий и водородных связей (рисунок 4.22). 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 SiHЧ связываются с DOX преимущественно за счёт электростатических взаимодействий [372].

Таким образом, различные механизмы взаимодействия и обеспечивают различную эффективность высвобождения DOX. Но, в то же время, ёмкость и pH-зависимый профиль высвобождения препарата из состава нанокомпозитов делают эти материалы перспективными для дальнейших испытаний [373, 374].

4.3.2.1.2.2 Исследование терапевтической эффективности комплекса доксорубицина с наноносителями 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 распространённую клеточную линию карциномы легких человека (A549), а также клетки эмбриональных почек человека (HEK293). Для проведения МТТ-теста различные количества нанокомпозитов и DOX инкубировали с клетками в течение 48 ч (рисунки 4.33 – 34). SiHЧ, SiHЧ-нейлон не показали выраженной токсичности до 50 мкг/мл (рисунок 4.33), что указывает на перспективность использования исследуемых нанокомпозитов *in vivo*.

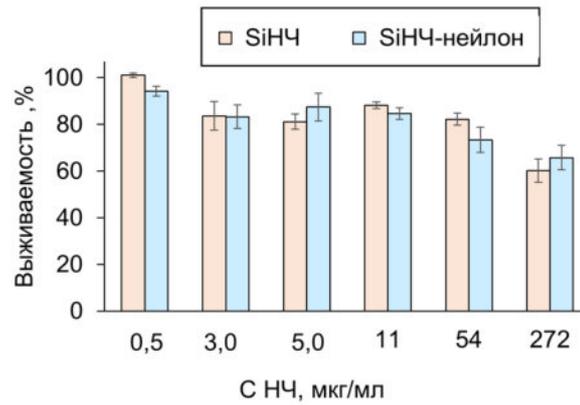


Рисунок 4.33 – Анализ жизнеспособности клеток A549 после инкубации с SiHЧ и SiHЧ-нейлон в течение 48 ч

В то время, как нагруженные доксорубицином наноконпозиты (SiHЧ/DOX, SiHЧ-нейлон/DOX), в сравнении со свободным DOX, эффективно подавляют пролиферацию клеток (рисунок 4.34).

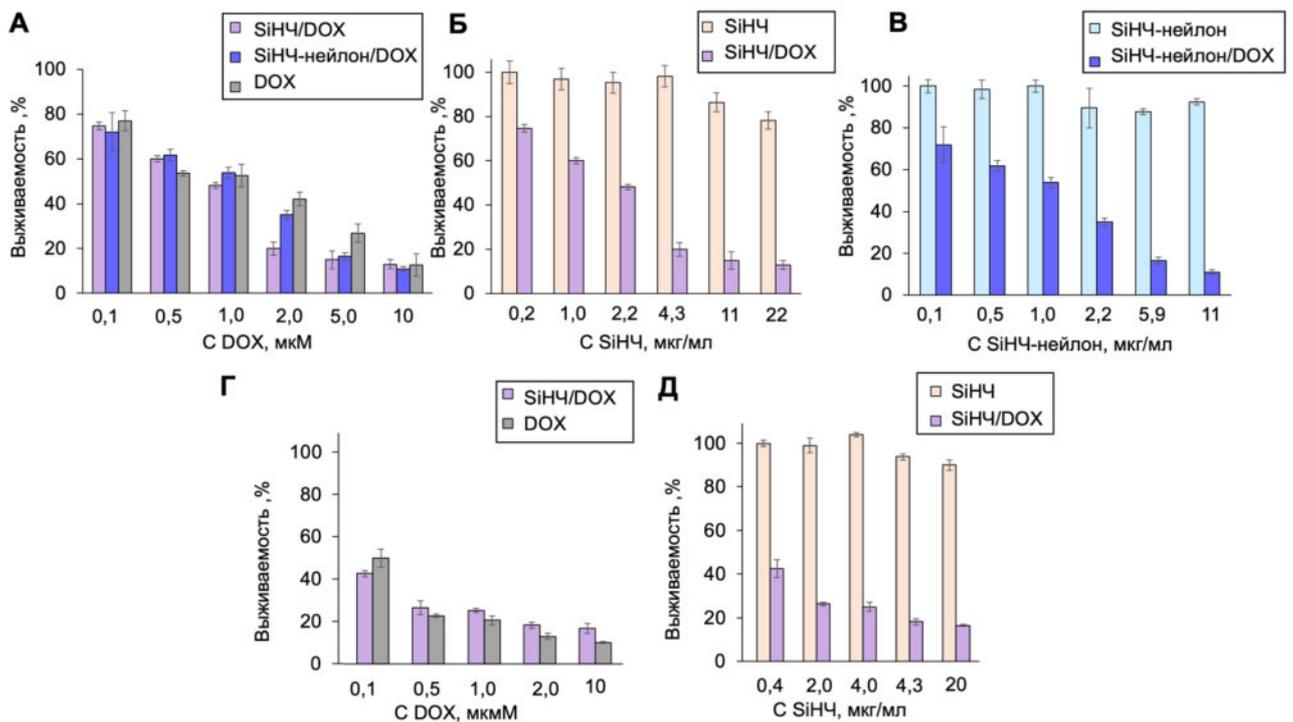


Рисунок 4.34 – Анализ жизнеспособности клеток A549 (А – В) и HEK293 (Г, Д) после их обработки SiHЧ, SiHЧ-нейлон, SiHЧ/DOX, SiHЧ-нейлон/DOX и DOX в течение 48 ч в зависимости от количества DOX (А, Г), или концентрации SiHЧ (Б, Д), или концентрации SiHЧ-нейлон (В) в образце

SiHЧ/DOX, SiHЧ-нейлон/DOX и DOX обладают практически одинаковым токсическим эффектом в расчёте на концентрацию препарата (рисунок 4.34 А). Однако жизнеспособность клеток после обработки SiHЧ/DOX, SiHЧ-нейлон/DOX, в пересчёте на массу наноконпозита не

одинакова (рисунок 4.34 Б, В). SiНЧ-нейлон/DOX демонстрирует более высокий токсический эффект (рисунок 4.34 В), что может быть объяснено более высокой лекарственной ёмкостью в сравнении с SiНЧ. По сравнению с клеточной линией A549, HEK293 в большей степени подвержена воздействию препаратов SiNPs/DOX, DOX (SiНЧ-нейлон/DOX не исследовали) (рисунок 4.34 Г, Д).

Рассчитанные значения IC 50 для SiНЧ/DOX, SiНЧ-нейлон/DOX и DOX представлены в таблице 4.12.

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

Нанокompозит	IC 50 A549		IC 50 HEK293	
	мкМ (по содержанию DOX)	мкг/мл (по содержанию НЧ)	мкМ (по содержанию DOX)	мкг/мл (по содержанию НЧ)
SiНЧ/DOX	0,98 ± 0,09	3,8 ± 0,3	0,013 ± 0,002	0,050 ± 0,008
SiНЧ-нейлон/DOX	1,12 ± 0,08	2,3 ± 0,2	—	—
DOX	1,47 ± 0,09	—	0,017 ± 0,005	—

Значение IC 50 для SiНЧ/DOX составило $0,98 \pm 0,09$ 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 SiНЧ/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 SiНЧ-нейлон/DOX значение IC 50 в зависимости от концентрации DOX сопоставимы с SiНЧ/DOX. Однако для SiНЧ-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 цитотоксичности SiНЧ-нейлон/DOX. Полученные данные заслуживают дальнейших исследований *in vivo*, в том числе с рассмотрением преимущественных областей накопления и путей метаболизма частиц, а также учётом хронической токсичности [375].

Дополнительно для демонстрации перспективности использования разработанных НЧ для терапевтических целей исследовали возможность их проникновения в клетки методом конфокальной микроскопии.

4.3.2.1.2.3 Исследование эффективности внутриклеточного проникновения полученных наночастиц

Для SiНЧ и СаНЧ с ковалентно присоединённым красителем Cy5 исследовали клеточное проникновение методом конфокальной микроскопии на линии НЕК293, и клетках, продуцирующих зелёный флуоресцентный белок (НЕК293-GFP) (рисунок 4.35).

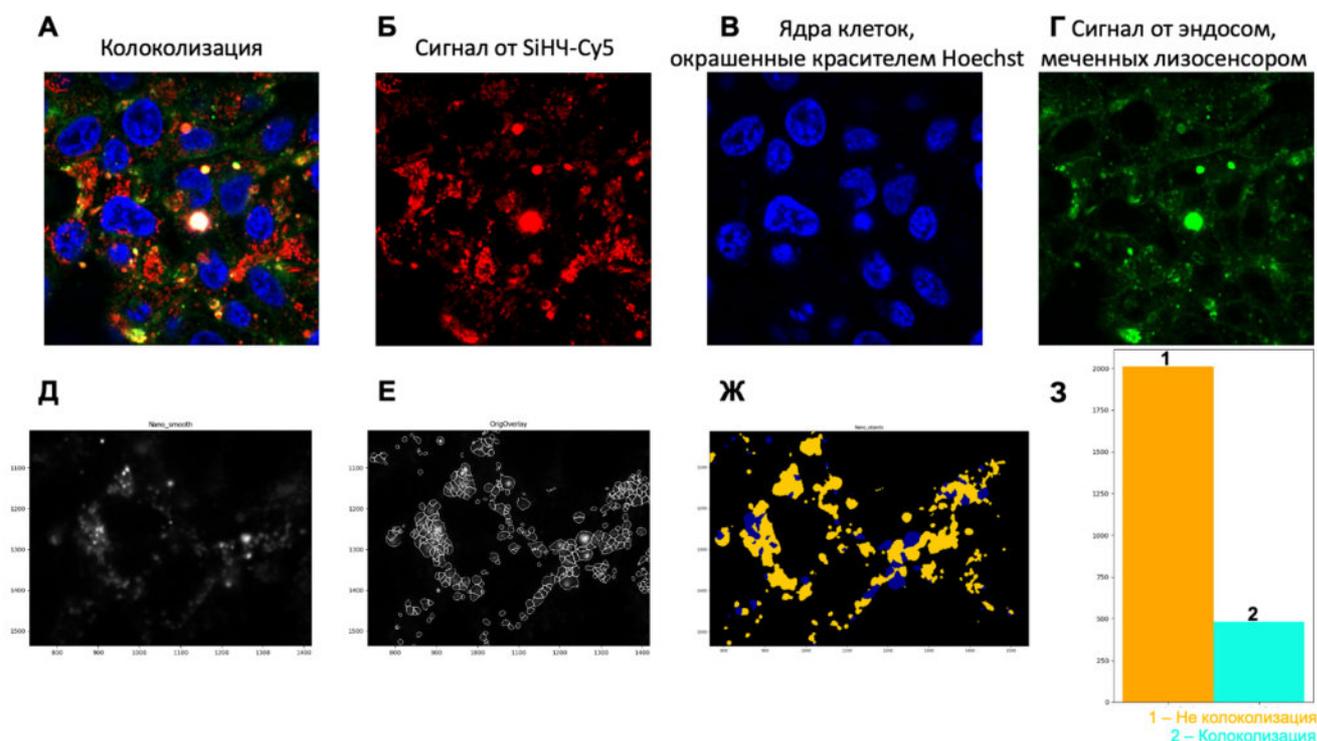


Рисунок 4.35 – Изображения, полученные на конфокальном микроскопе, клеточного проникновения SiНЧ-Cy5 на линии клеток НЕК293, демонстрирующие колоколизацию SiНЧ-Cy5 (А), сигнал от SiНЧ-Cy5 (Б), GFP клеток НЕК293-GFP (В), меченых лизосенсором эндосом (Г), а также фрагмент, по которому проводили расчёт колоколизации (Д) с заданными координатами (Е), области совпадения координат от сигналов частиц и меченых лизосенсором Green эндосом (Ж) и их соотношение (З)

На рисунке 4.35 представлены оптические сканы клеток с визуализацией наночастиц (Б), клеточных ядер, окрашенных интеркалирующим красителем (Hoechst), который проникает через мембраны живых клеток (В), меченых лизосенсором эндосом (Г) и их колоколизация (А). Видно, что часть сигнала от наночастиц локализована в эндосомах. По выбранному фрагменту (рисунок 4.35 Д) был проведён количественный расчёт колоколизации частиц и эндосом. Для этого, сигналам от частиц и эндосом были назначены координаты (рисунок 4.35 Е) и установлено их наложение (рисунок 4.35 Ж). Графически соотношение приведено на рисунке 4.35 З, видно, что 20% сигналов совпадают, что доказывает локализацию частиц в эндосомах.

Максимальный сигнал лизосенсора достигается в поздних эндосомах и лизосомах. Поэтому можно предположить, что наночастицы, не колокализованные с сигналом лизосенсора могут находиться в раннем эндосомальном компартменте. Если бы они проникали иным путём (например, диффузией через плазматическую мембрану клеток) на микрофотографиях наблюдался бы диффузный цитоплазматический сигнал от наночастиц, в то время как на представленных фотографиях он точечный и четко компартиментализованный.

Таким образом, можно утверждать, что частицы диоксида кремния способны проникать сквозь клеточные мембраны, скорее всего эндосомальным путём, характерным для наночастиц.

Наглядной визуализацией прохождения наночастиц сквозь мембрану клетки является 3D-реконструкция оптических сканов, позволяющая оценить объёмную структуру клетки и локализацию в ней частиц (рисунок 4.36).

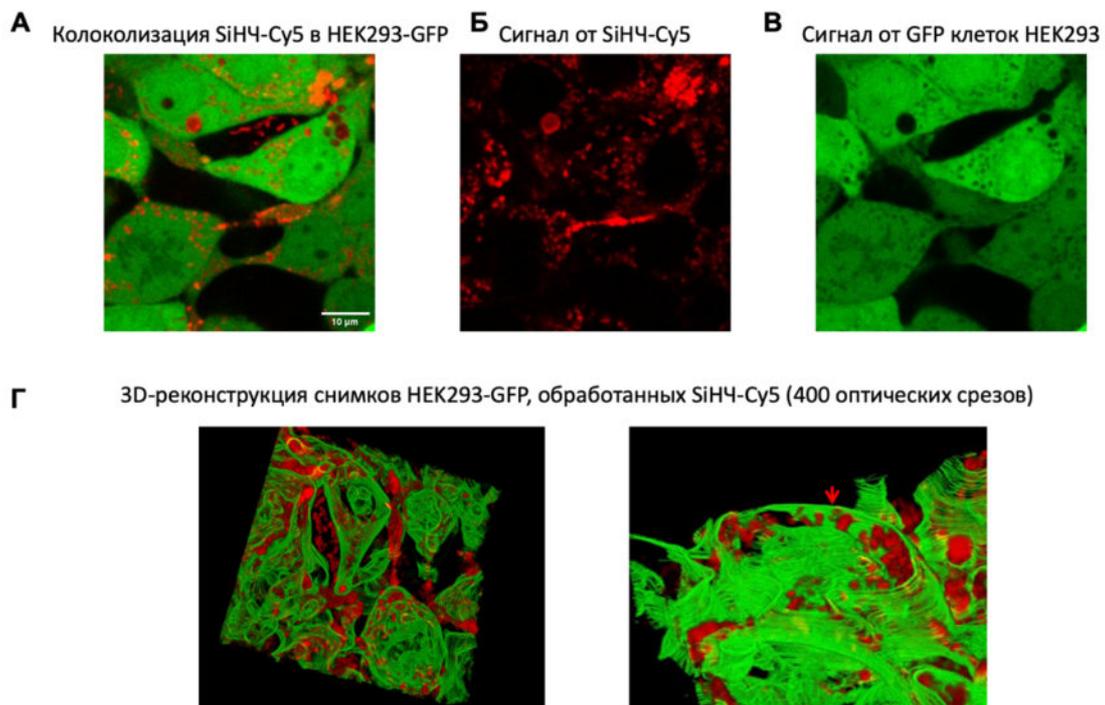


Рисунок 4.36 – Изображения, полученные на конфокальном микроскопе, клеточного проникновения SiNC-Cy5 на линии клеток HEK293-GFP, демонстрирующие колокализацию SiNC-Cy5 (А), сигнал от SiNC-Cy5 (Б), GFP клеток HEK293-GFP (В) и их 3D-реконструкция (Г)

На рисунке 4.36 А приведён один из оптических срезов, по которым далее проводили 3D-реконструкцию. Отдельно детектировали сигналы от наночастиц и клеток. На объёмной реконструкции (рисунок 4.36 Г) отчётливо видно поверхность плазматических мембран клетки и расположенные в них наночастицы.

Аналогично исследовали способность внутриклеточного проникновения наночастиц карбоната кальция (рисунок 4.37).

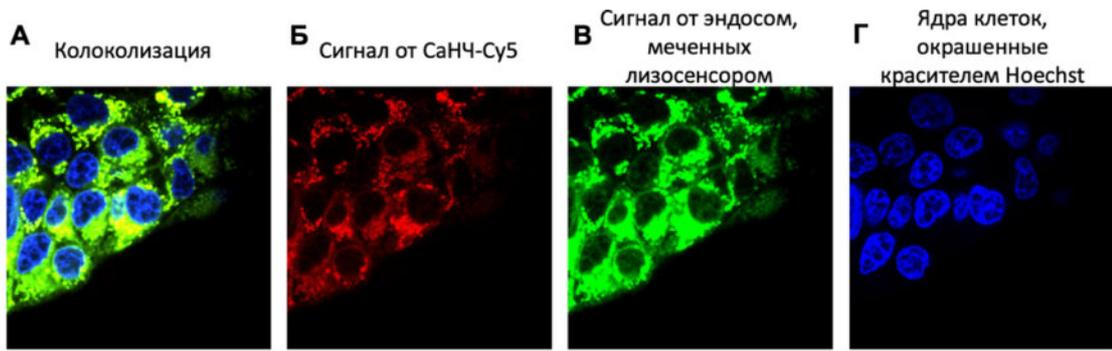
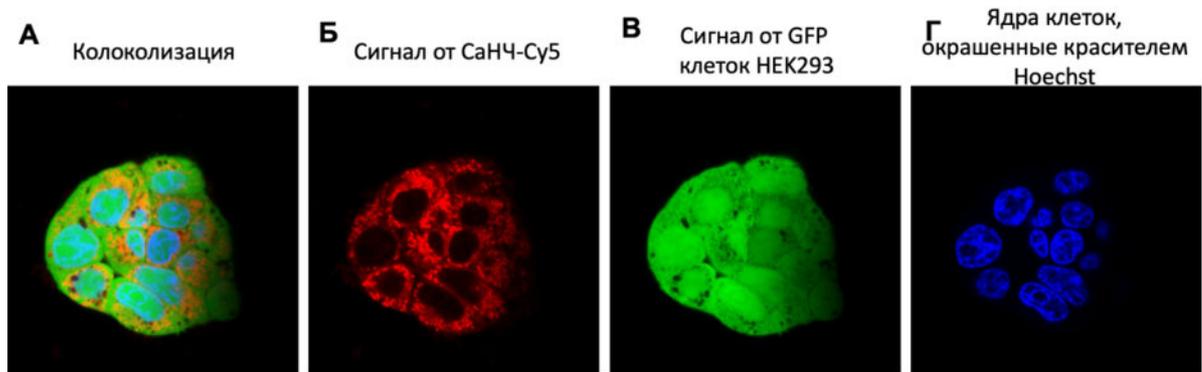


Рисунок 4.37 – Изображения, полученные на конфокальном микроскопе, клеточного проникновения СаНЧ-Су5 на линии клеток НЕК293, демонстрирующие колоколизацию СаНЧ-Су5 (А), сигнал от СаНЧ-Су5 (Б), меченых лизосенсором эндосом (В), GFP клеток НЕК293-GFP (Г)

Видно, что СаНЧ, так же как и SiНЧ, преимущественно локализованы в области эндосом (рисунок 4.37), что подтверждается 3D-реконструкцией (рисунок 4.38).



Д 3D-реконструкция снимков НЕК293-GFP, обработанных SiНЧ-Су5 (400 оптических срезов)

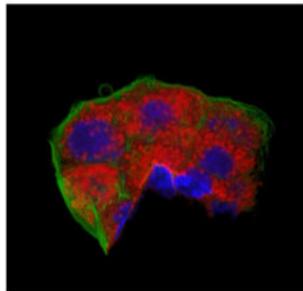


Рисунок 4.38 – Изображения, полученные на конфокальном микроскопе, клеточного проникновения СаНЧ-Су5 на линии клеток НЕК293-GFP, демонстрирующие колоколизацию СаНЧ-Су5 (А), сигнал от СаНЧ-Су5 (Б), меченых лизосенсором эндосом (В), GFP клеток НЕК293-GFP (Г) и их 3D-реконструкция (Д)

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

Таким образом, в данной главе полученные наночастицы (СаНЧ, SiНЧ) и их модифицированные аналоги (Fe@СаНЧ, SiНЧ-нейлон) были протестированы в качестве

носителей противоопухолевого агента – доксорубицина (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) [345, 376], Fe@CaHЧ (1900 ± 27 мкг/мг) [377], SiHЧ (258 ± 6 мкг/мг) [363, 364], SiHЧ-нейлон (493 ± 38 мкг/мг) [375]. Для всех наноносителей показан pH-зависимый профиль высвобождения лекарства из состава наноматериалов: в области опухолевого pH (5 и ниже) высвобождается более 60 % DOX. Наночастицы на основе только карбоната кальция перспективны полной деградацией матрицы носителя в области pH ниже 5, 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 снижении жизнеспособности клеток (таблица 4.13). Интересно, что немодифицированные наночастицы (CaHЧ/DOX и SiHЧ/DOX) по эффективности близки, так же как и их модифицированные аналоги (Fe@CaHЧ/DOX и SiHЧ-нейлон/DOX). Превосходство CaHЧ/DOX и SiHЧ/DOX над Fe@CaHЧ/DOX и SiHЧ-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 был экспериментально установлен оптимум). Кроме того, хотя клеточные исследования не позволяют увидеть эффект pH-зависимости, в работе показана большая токсичность наноматериалов, несущих доксорубицин, в сравнении со свободным доксорубицином.

Таким образом, каждый из исследованных типов наночастиц обладает своими преимуществами: CaHЧ (полная деградация матрицы наноматериала в области опухоли); Fe@CaHЧ (возможность магнитного нацеливания на целевую область); SiHЧ (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, свидетельствуют о целесообразности продолжения исследований на модельных животных.

4.4 Заключение

Таким образом, в ходе данной работы разработаны методы получения наноматериалов на основе карбоната кальция и их магнитных аналогов, обладающих суспензионной стабильностью, монодисперсностью и размером до 200 нм, а также наночастиц диоксида кремния, характеризующиеся, дополнительно к вышеперечисленному, высокой степенью изолированности ядер.

Полученные материалы охарактеризованы методами динамического светорассеяния и просвечивающей электронной микроскопии, ИК-спектроскопии.

Показана стабильность полученных наноматериалов в водных растворах и условиях, близких к физиологическим. Установлен диапазон рН-зависимой стабильности для материалов на основе карбоната кальция.

Предложены варианты ковалентного (для молекул с концевой аминогруппой, на примере нейлона-6, стрептавидина и олигонуклеотида) и нековалентного (на примере доксорубицина) присоединения функциональных молекул к наночастицам. Исследована возможность применения наночастиц, с ковалентно присоединённым стрептавидином, в качестве инструмента для селективного выделения биотинилированных олигонуклеотидов из многокомпонентной смеси. Показан способ УФ-иммобилизации олигонуклеотида на НЧ, ковалентно модифицированные нейлоном-6.

Исследован биологический потенциал полученных ассоциатов наночастиц для доставки доксорубицина, в том числе на моделях *in vitro*, на примере рассмотрения кинетических профилей высвобождения DOX из комплекса НЧ/DOX, а также сравнения эффективностей ингибирования клеточной активности конструкциями НЧ, НЧ/DOX, DOX.

Таким образом, показана оправданность дальнейших биологических испытаний терапевтического потенциала конструкций наноматериалов, несущих лекарственные препараты.

5. 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 счёт формирования ковалентных и нековалентных взаимодействий с поверхностью наноматериалов:

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

- получены нековалентные ассоциаты наночастиц с доксорубицином, характеризующиеся высокими ёмкостными 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 нанокомпозитов с доксорубицином продемонстрирована эффективность в подавлении жизнеспособности онкотрансформированных клеток, сопоставимая или выше, в сравнении с индивидуальным препаратом.

6. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АПТЭС – (3-аминопропил) триэтоксисилан

БАС – биологически активные соединения

БСА – бычий сывороточный альбумин

ДСР – динамическое светорассеяние

ИПД – индекс полидисперсности

МНЧ – магнитные наночастицы

НК – нуклеиновые кислоты

НЧ – наночастицы

ОН – олигонуклеотид

ОН-bio – олигонуклеотид, содержащий биотин

ПАВ – поверхностно-активные вещества

ПВП – поливинилпирролидон

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ТЭОС – тетраэтоксисилан

bio – биотин

CaНЧ – наночастицы карбоната кальция

d – гидродинамический размер частиц, определённый методом динамического светорассеяния

D – диаметр частиц, определённый методом просвечивающей электронной микроскопии

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

DOX – доксорубин

E – ёмкость

$E_{f_{rel}}$ – эффективность извлечения

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

IC 50 – показатель концентрации полумаксимального ингибирования клеточной активности

MPP – коммерческий препарат Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles

SiНЧ – наночастицы диоксида кремния

St – стрептавидин

ζ – Дзета-потенциал

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Huang Y. et al. Repurposing ferumoxytol: Diagnostic and therapeutic applications of an FDA-approved nanoparticle // *Theranostics*. — 2022. — Vol. 12. — N 2. — P. 796–816.
- 2 Al Mahmud M. Z. et al. Advances and Significances of Nanoparticles as Concrete Additives: A Comprehensive Review // *Nano Life*. — 2024. — Vol. 14. — N 4. — P. 2440004.
- 3 Zhang R. et al. How to design nanoporous silica nanoparticles in regulating drug delivery: Surface modification and porous control // *Mater. Sci. Eng. B*. — 2021. — Vol. 263. — P. 114835.
- 4 Fu J., Leo C. P., Show P. L. Recent advances in the synthesis and applications of pH-responsive CaCO₃ // *Biochem. Eng. J.* — 2022. — Vol. 187. — P. 108446.
- 5 Yang X. et al. CaCO₃ nanoplatform for cancer treatment: drug delivery and combination therapy // *Nanoscale*. — 2024. — Vol. 16. — P. 6876–6899.
- 6 Wang S. et al. Nanoparticle-based medicines in clinical cancer therapy // *Nano Today*. — 2022. — Vol. 45. — P. 101512.
- 7 ГОСТ ISO/TS 27687-2014. Термины и определения нанообъектов. Наночастица, нановолокно и нанопластина: дата введения 2014-12-05. — Москва: Изд-во стандартов. — 2014. — С. 5.
- 8 Campora S., Ghersi G. Recent developments and applications of smart nanoparticles in biomedicine // *Nanotechnol. Rev.* — 2022. — Vol. 11. — N 1. — P. 2595–2631.
- 9 Starsich F. H. L., Herrmann I. K., Pratsinis S. E. Nanoparticles for biomedicine: coagulation during synthesis and applications // *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* — 2019. — Vol. 10. — P. 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 // *Coord. Chem. Rev.* — 2023. — Vol. 480. — P. 215025.
- 11 Karaz S., Senses E. Liposomes Under Shear: Structure, Dynamics, and Drug Delivery Applications // *Advanced NanoBiomed Research*. — 2023. — P. 2200101.
- 12 Gao Y. et al. Recent Advance of Liposome Nanoparticles for Nucleic Acid Therapy // *Pharmaceutics*. — 2023. — Vol. 15. — N 1. — P. 178.
- 13 Mittal A., Roy I., Gandhi S. Magnetic nanoparticles: An overview for biomedical applications // *Magnetochemistry*. — 2022. — Vol. 8. — N 9. — P. 107.
- 14 Caraway C. A. et al. Polymeric nanoparticles in brain cancer therapy: A review of current approaches // *Polymers*. — 2022. — Vol. 14. — N 14. — P. 2963.
- 15 Zenze M., Daniels A., Singh M. Dendrimers as Modifiers of Inorganic Nanoparticles for Therapeutic Delivery in Cancer // *Pharmaceutics*. — 2023. — Vol. 15. — N 2. — P. 398.

- 16 Ye L. et al. Noble metal-based nanomaterials as antibacterial agents // *J. Alloys Compd.* — 2022. — Vol. 904. — P. 164091.
- 17 Zhao P. et al. Recent advances of calcium carbonate nanoparticles for biomedical applications // *Bioengineering.* — 2022. — Vol. 9. — N 11. — P. 691.
- 18 Huang Y. et al. Silica nanoparticles: Biomedical applications and toxicity // *Biomed. Pharmacother.* — 2022. — Vol. 151. — P. 113053.
- 19 Liu W., Speranza G. Functionalization of carbon nanomaterials for biomedical applications // *C.* — 2019. — Vol. 5. — N 4. — P. 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. — Vol. 9. — N 4. — P. 359.
- 21 Yan L. et al. Nanoparticle-based drug delivery system: a patient-friendly chemotherapy for oncology // *Dose-Response.* — 2020. — Vol. 18. — N 3. — P. 1559325820936161.
- 22 Anselmo A. C., Mitragotri S. Nanoparticles in the clinic // *Bioengineering & translational medicine.* — 2016. — Vol. 1. — N 1. — P. 10–29.
- 23 Kashapov R. et al. Nanocarriers for biomedicine: From lipid formulations to inorganic and hybrid nanoparticles // *Int. J. Mol. Sci.* — 2021. — Vol. 22. — N 13. — P. 7055.
- 24 Diez-Pascual A. M., Rahdar A. Functional Nanomaterials in Biomedicine: Current Uses and Potential Applications // *ChemMedChem.* — 2022. — Vol. 17. — N 16. — P. e202200142.
- 25 Zhang Y. et al. Preparation and usage of nanomaterials in biomedicine // *Biotechnol. Bioeng.* — 2023. — Vol. 120. — N 10. — P. 2777–2792.
- 26 Trushina D. B. et al. Calcium carbonate vaterite particles for drug delivery: Advances and challenges // *Mater. Today.* — 2022. — Vol. 14. — P. 100214.
- 27 Zhao Y. et al. A preloaded amorphous calcium carbonate/doxorubicin@ silica nanoreactor for pH-responsive delivery of an anticancer drug // *Angew. Chem. -Int. Edit.* — 2015. — Vol. 54. — N 3. — P. 919–922.
- 28 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. — Vol. 14. — N 11. — P. 2296.
- 29 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. — Vol. 27. — N 4. — P. 1372.
- 30 Desai N. et al. Cancer nanovaccines: nanomaterials and clinical perspectives // *Small.* — 2024. — P. 2401631.

- 31 Yadav K. et al. Biomedical applications of nanomaterials in the advancement of nucleic acid therapy: mechanistic challenges, delivery strategies, and therapeutic applications // *Int. J. Biol. Macromol.* — 2023. — Vol. 241. — P. 124582.
- 32 Li Z. et al. Biosafety assessment of delivery systems for clinical nucleic acid therapeutics // *Biosafety and Health.* — 2022. — Vol. 4. — N 2. — P. 105–117.
- 33 Fadia P. et al. Calcium carbonate nano-and microparticles: synthesis methods and biological applications // *3 biotech.* — 2021. — Vol. 11. — P. 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 Res. Int.* — 2023. — P. 112728.
- 35 Namsaraev Z. B. et al. Processes of Nanosized Calcium Carbonate Formation by Microorganisms // *Nanotech. in Russia.* — 2020. — Vol. 15. — P. 20–27.
- 36 Zafar B. et al. Modification of surfaces with vaterite CaCO_3 particles // *Micromachines.* — 2022. — Vol. 13. — N 3. — P. 473.
- 37 Svenskaya Y. I. et al. Key parameters for size-and shape-controlled synthesis of vaterite particles // *Cryst. Growth Des.* — 2018. — Vol. 18. — N 1. — P. 331–337.
- 38 Trushina D. B. et al. CaCO_3 vaterite microparticles for biomedical and personal care applications // *Mater. Sci. Eng. C.* — 2014. — Vol. 45. — P. 644–658.
- 39 Chibowski E., Hotysz L., Szcześ A. Time dependent changes in zeta potential of freshly precipitated calcium carbonate // *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* — 2003. — Vol. 222. — N 1–3. — P. 41–54.
- 40 Muhammad Mailafiya M. et al. Cockle shell-derived calcium carbonate (aragonite) nanoparticles: a dynamite to nanomedicine // *Appl. Sci.* — 2019. — Vol. 9. — N 14. — P. 2897.
- 41 Sudarsanam P., Reddy B. M. *Nanotechnology Commercialisation.* — Vol. 17. — USA: Pan Stanford Publishing, 2013. — P. 73–138.
- 42 Shen Y. et al. Controllable Synthesis of Nano-Micro Calcium Carbonate Mediated by Additive Engineering // *Crystals.* — 2023. — Vol. 13. — N 10. — P. 1432.
- 43 Bastos F. R. et al. Layer-by-layer coated calcium carbonate nanoparticles for targeting breast cancer cells // *Biomater Adv.* — 2023. — Vol. 153. — P. 213563.
- 44 Volodkin D. V. et al. Matrix polyelectrolyte microcapsules: new system for macromolecule encapsulation // *Langmuir.* — 2004. — Vol. 20. — N 8. — P. 3398–3406.
- 45 Babou-Kammoe R. et al. Synthesis of CaCO_3 nanoparticles by controlled precipitation of saturated carbonate and calcium nitrate aqueous solutions // *Can. J. Chem. Eng.* — 2012. — Vol. 90. — N 1. — P. 26–33.

- 46 Cheng J. et al. Tetrahedral DNA—mediated biomineralization of calcium carbonate nanoparticles for pH-responsive drug delivery // *J. Nanoparticle Res.* — 2023. — Vol. 25. — N 10. — P. 211.
- 47 Elbaz N. M. et al. Controlled synthesis of calcium carbonate nanoparticles and stimuli-responsive multi-layered nanocapsules for oral drug delivery // *Int. J. Pharm.* — 2020. — Vol. 574. — P. 118866.
- 48 Boyjoo Y., Pareek V. K., Liu J. Synthesis of micro and nano-sized calcium carbonate particles and their applications // *J. Mater. Chem. A.* — 2014. — Vol. 2. — N 35. — P. 14270–14288.
- 49 Mydin R. B. S. M. N. et al. Potential of Calcium Carbonate Nanoparticles for Therapeutic Applications // *Malays. J. Med. Res.* — 2018. — Vol. 14. — P. 201–206.
- 50 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 aphyrons system // *J. Mol. Liq.* — 2019. — Vol. 282. — P. 213–220.
- 51 Zheng T. et al. Preparation and formation mechanism of calcium carbonate hollow microspheres // *J. Cryst. Growth.* — 2020. — Vol. 549. — P. 125870.
- 52 Liendo F. et al. Factors controlling and influencing polymorphism, morphology and size of calcium carbonate synthesized through the carbonation route: A review // *Powder Technol.* — 2022. — Vol. 398. — P. 117050.
- 53 Popova V. et al. Designing pH-dependent systems based on nanoscale calcium carbonate for the delivery of an antitumor drug // *Nanomaterials.* — 2021. — Vol. 11. — N 11. — P. 2794.
- 54 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. — P. — 587451.
- 55 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. — Vol. 14. — N 18. — P. 3866.
- 56 Arpornmaeklong P. et al. Effects of Calcium Carbonate Microcapsules and Nanohydroxyapatite on Properties of Thermosensitive Chitosan/Collagen Hydrogels // *Polymers.* — 2023. — Vol. 15. — N 2. — P. 416.
- 57 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 // *Arab. J. Chem.* — 2023. — Vol. 16. — N 10. — P. 105135.
- 58 Roth R. et al. Functionalized calcium carbonate microparticles for the delivery of proteins // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* — 2018. — Vol. 122. — P. 96–103.

- 59 Sudareva N. et al. Doxorubicin delivery systems based on doped CaCO₃ cores and polyanion drug conjugates // *J. Microencapsul.* — 2021. — Vol. 38. — N 3. — P. 164–176.
- 60 Balabushevich N. G. et al. Hybrid CaCO₃-mucin crystals: Effective approach for loading and controlled release of cationic drugs // *Mater. Des.* — 2019. — Vol. 182. — P. 108020.
- 61 Xing J. et al. Synthesis of polymer assembled mesoporous CaCO₃ nanoparticles for molecular targeting and pH-responsive controlled drug release // *Adv. Polym. Technol.* — 2020. — Vol. 1. — P. 8749238
- 62 Das A. et al. Synthesis of porous calcium-guar gum benzoate nano-biohybrids for sorptive removal of congo red and phosphates from water // *Int. J. Biol. Macromol.* — 2023. — Vol. 253. — P. 126662.
- 63 Wang P. et al. Fucoidan-Mediated Anisotropic Calcium Carbonate Nanorods of pH-Responsive Drug Release for Antitumor Therapy // *Front. bioeng. biotechnol.* — 2022. — Vol. 10. — P. 845821.
- 64 Munyemana J. C. et al. Recombinant Collagen-Templated Biomineralized Synthesis of Biocompatible pH-Responsive Porous Calcium Carbonate Nanospheres // *ACS omega.* — 2023. — Vol. 8. — N 34. — P. 30879–30887.
- 65 Yakubova A. A. et al. Calcium carbonate nanoparticles tumor delivery for combined chemophotodynamic therapy: Comparison of local and systemic administration // *J. Control. Release.* — 2023. — Vol. 359. — P. 400–414.
- 66 Ghadiri Soltan Meydan T. et al. Green synthesis of CaCO₃ nanoparticles for photocatalysis and cytotoxicity // *Bioprocess Biosyst. Eng.* — 2023. — Vol. 46. — N 5. — P. 727–734.
- 67 Minkowicz L. et al. Controlling calcium carbonate particle morphology, size, and molecular order using silicate // *Materials.* — 2021. — Vol. 14. — N 13. — P. 3525.
- 68 Persano F. et al. Monodisperse and nanometric-sized calcium carbonate particles synthesis optimization // *Nanomaterials.* — 2022. — Vol. 12. — N 9. — P. 1494.
- 69 Huang H. et al. Smart responsive-calcium carbonate nanoparticles for dual-model cancer imaging and treatment // *Ultrasonics.* — 2020. — Vol. 108. — P. 106198.
- 70 Chang Y. et al. Cell-tailored calcium carbonate particles with different crystal forms from nanoparticle to nano/microsphere // *RSC Adv.* — 2020. — Vol. 10. — N 70. — P. 43233–43241.
- 71 Khatami M. et al. Calcium carbonate nanowires: greener biosynthesis and their leishmanicidal activity // *RSC Adv.* — 2020. — Vol. 10. — N 62. — P. 38063–38068.
- 72 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. — Vol. 66. — P. 101390.

- 73 Ferrari P. F. et al. Dextran/poly-L-arginine multi-layered CaCO₃-based nanosystem for vascular drug delivery // *Int. J. Biol. Macromol.* — 2021. — Vol. 177. — P. 548–558.
- 74 Xu X. et al. Intra-gastric amorphous calcium carbonate consumption triggered generation of in situ hydrogel piece for sustained drug release // *Int. J. Pharm.* — 2020. — Vol. 590. — P. 119880.
- 75 Kiranda H. K. et al. Fabrication, characterization and cytotoxicity of spherical-shaped conjugated gold-cockle shell derived calcium carbonate nanoparticles for biomedical applications // *Nanoscale Res. Lett.* — 2018. — Vol. 13. — P. 1–10.
- 76 Chuzeville L. et al. Eco-friendly processes for the synthesis of amorphous calcium carbonate nanoparticles in ethanol and their stabilisation in aqueous media // *Green Chem.* — 2022. — Vol. 24. — N 3. — P. 1270–1284.
- 77 Wang C. et al. Size-controlled preparation and behavior study of phospholipid—calcium carbonate hybrid nanoparticles // *Int. J. Nanomed.* — 2020. — Vol. 19. — P. 4339–4356.
- 78 Abeywardena M. R. et al. Surfactant assisted synthesis of precipitated calcium carbonate nanoparticles using dolomite: Effect of pH on morphology and particle size // *Adv. Powder Technol.* — 2020. — Vol. 31. — N 1. — P. 269–278.
- 79 Sun R. et al. Highly porous amorphous calcium phosphate for drug delivery and bio-medical applications // *Nanomaterials.* — 2019. — Vol. 10. — N 1. — P. 20.
- 80 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 // *Sci. Rep.* — 2021. — Vol. 11. — N 1. — P. 9246.
- 81 Moulay I., Park J., Yoo Y. Synthesis of nano-sized calcium carbonates employing molecular effect on CO₂ conversion via biodegradable chelating-system // *J. Chem. Eng.* — 2023. — Vol. 474. — P. 145281.
- 82 Li Y. et al. CaCO₃ nanoparticles incorporated with KAE to enable amplified calcium overload cancer therapy // *Biomaterials.* — 2021. — Vol. 277. — P. 121080.
- 83 Wang C. et al. Mitoxantrone-preloaded water-responsive phospholipid-amorphous calcium carbonate hybrid nanoparticles for targeted and effective cancer therapy // *Int. J. Nanomed.* — 2019. — P. 1503–1517.
- 84 Wang J. et al. Calcium supplement by tetracycline guided amorphous calcium carbonate potentiates osteoblast promotion for synergetic osteoporosis therapy // *Theranostics.* — 2020. — Vol. 10. — N 19. — P. 8591.

- 85 Wang C. et al. Correction: Facile preparation of phospholipid—amorphous calcium carbonate hybrid nanoparticles: toward controllable burst drug release and enhanced tumor penetration // *Chem. Commun.* — 2020. — Vol. 56. — N 73. — P. 10768–10769.
- 86 Jalali-Jivan M., Garavand F., Jafari S. M. Microemulsions as nano-reactors for the solubilization, separation, purification and encapsulation of bioactive compounds // *Adv. Colloid Interface Sci.* — 2020. — Vol. 283. — P. 102227.
- 87 Misra N. et al. Photochromism and magneto-optic response of ZnO: Mn semiconductor quantum dots fabricated by microemulsion route // *Cent. Eur. J. Phys.* — 2008. — Vol. 6. — P. 109–115.
- 88 Ohshima, H. *Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development* / H. Ohshima, K. Makino. — Amsterdam: Elsevier Inc., 2014. — 516 P. — ISBN 978-0-44462-614-1.
- 89 Ferreira A. M., Vikulina A. S., Volodkin D. CaCO₃ crystals as versatile carriers for controlled delivery of antimicrobials // *J. Control. Release.* — 2020. — Vol. 328. — P. 470–489.
- 90 Wang Y. et al. Superhydrophobic fluorescent micro-/nano-composites from carbon dots encapsulated in CaCO₃-SiO₂ // *Compos. Interfaces.* — 2023. — Vol. 31. — N 4. — P. 401–415.
- 91 Pai R. K., Pillai S. Nanoparticles of amorphous calcium carbonate by miniemulsion: synthesis and mechanism // *CrystEngComm.* — 2008. — Vol. 10. — N 7. — P. 865–872.
- 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 // *J. Control. Release.* — 2019. — Vol. 302. — P. 42–53.
- 93 Sun N. et al. pH-dependent and cathepsin B activable CaCO₃ nanoprobe for targeted in vivo tumor imaging // *Int. J. Nanomed.* — 2019. — Vol. 14 — P. 4309–4317.
- 94 Li H. et al. CaCO₃ nanoparticles pH-sensitively induce blood coagulation as a potential strategy for starving tumor therapy // *J. Mater. Chem. B.* — 2020. — Vol. 8. — N 6. — P. 1223–1234.
- 95 Zhao P. et al. Biomimetic calcium carbonate nanoparticles delivered IL-12 mRNA for targeted glioblastoma sono-immunotherapy by ultrasound-induced necroptosis // *J. Nanobiotechnol.* — 2022. — Vol. 20. — N 1. — P. 1–10.
- 96 Zhao Q. et al. Target reprogramming lysosomes of CD8⁺ T cells by a mineralized metal-organic framework for cancer immunotherapy // *Adv. Mater.* — 2021. — Vol. 33. — N 17. — P. 2100616.
- 97 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 // *Int. J. Nanomed.* — 2019. — Vol. 14. — P. 3753–3771.

- 98 Wang Y. et al. Construction of calcium carbonate-liposome dual-film coated mesoporous silica as a delayed drug release system for antitumor therapy // *Colloids Surf. B Biointerfaces*. — 2022. — Vol. 212. — P. 112357.
- 99 Wei K. et al. High density lipoprotein coated calcium carbonate nanoparticle for chemotherapy of breast cancer // *J. Biomater. Appl.* — 2019. — Vol. 34. — N 2. — P. 178–187.
- 100 Chatzidaki M. D., Papadimitriou V., Xenakis A. Encapsulation of food ingredients by microemulsions // *Lipid-Based Nanostructures for Food Encapsulation Purposes*. — Academic Press, 2019. — P. 129–149.
- 101 Azarian M. H., Sutapun W. Biogenic calcium carbonate derived from waste shells for advanced material applications: A review // *Front. Mater.* — 2022. — Vol. 9. — P. 1024977.
- 102 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 // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* — 2021. — Vol. 61. — P. 102230.
- 103 Azarian, Mohammad Hossein, and Wimonlak Sutapun. Tuning polymorphs of precipitated calcium carbonate from discarded eggshells: effects of polyelectrolyte and salt concentration // *RSC Adv.* — 2022. — Vol. 12. — N 23. — P. 14729–14739.
- 104 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 // *J. Biomed. Mater. Res.* — 2021. — Vol. 61. — P. 102230.
- 105 Ibiyeye K. M., Zuki A. B. Z. Cockle shell-derived aragonite CaCO_3 nanoparticles for co-delivery of doxorubicin and thymoquinone eliminates cancer stem cells // *Int. J. Mol. Sci.* — 2020. — Vol. 21. — N 5. — P. 1900.
- 106 Wenliang F. et al. In vivo evaluation of anticancer efficacy of drug loaded cockle shell-derived aragonite nanoparticles // *J. Biomed. Mater. Res. Part B*. — 2019. — Vol. 107. — N 6. — P. 1898–1907.
- 107 Hussein A. I. et al. Synthesis and characterization of spherical calcium carbonate nanoparticles derived from cockle shells // *Appl. Sci.* — 2020. — Vol. 10. — N 20. — P. 7170.
- 108 Chemmalar S. et al. Synthesis and characterization of gefitinib and paclitaxel mono and dual drug-loaded blood cockle shells (*Anadara granosa*)-derived aragonite CaCO_3 nanoparticles // *Nanomaterials*. — 2021. — Vol. 11. — N 8. — P. 1988.
- 109 Baláž, Matej, et al. State-of-the-art of eggshell waste in materials science: recent advances in catalysis, pharmaceutical applications, and mechanochemistry // *Front. bioeng. biotechnol.* — 2021. — Vol. 8. — P. 612567.

- 110 Drew G. H. The action of some denitrifying bacteria in tropical and temperate seas, and the bacterial precipitation of calcium carbonate in the sea // *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* — 1911. — Vol. 9. — N 2. — P. 142-155.
- 111 Muhammad N. Z. et al. Tests and methods of evaluating the self-healing efficiency of concrete: A review // *Constr. Build. Mater.* — 2016. — Vol. 112. — P. 1123–1132.
- 112 Enyedi N. T. et al. Cave bacteria-induced amorphous calcium carbonate formation // *Sci. Rep.* — 2020. — Vol. 10. — N 1. — P. 8696.
- 113 Febrida R. et al. Synthesis and characterization of porous CaCO₃ vaterite particles by simple solution method // *Materials.* — 2021. — Vol. 14. — N 16. — P. 4425.
- 114 Liang T. et al. Research progress of calcium carbonate nanomaterials in cancer therapy: challenge and opportunity // *Front. bioeng. biotechnol.* — 2023. — Vol. 11. P. 1–13.
- 115 Gindele M. B., Steingrube L. V., Gebauer D. Generality of liquid precursor phases in gas diffusion-based calcium carbonate synthesis // *CrystEngComm.* — 2021. — Vol. 23. — N 45. — P. 7938–7943.
- 116 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. — Vol. 11. — N 3. — P. 132.
- 117 Wu J. The enhanced permeability and retention (EPR) effect: The significance of the concept and methods to enhance its application // *J. Pers. Med.* — 2021. — Vol. 11. — N 8. — P. 771.
- 118 Sun R. et al. The tumor EPR effect for cancer drug delivery: Current status, limitations, and alternatives // *Adv. Drug Deliv. Rev.* — 2022. — P. 114614.
- 119 Ding Y. et al. Investigating the EPR effect of nanomedicines in human renal tumors via ex vivo perfusion strategy // *Nano Today.* — 2020. — Vol. 35. — P. 100970.
- 120 Ward C. et al. The impact of tumour pH on cancer progression: strategies for clinical intervention // *Explor. target. anti-tumor ther.* — 2020. — Vol. 1. — N 2. — P. 71.
- 121 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. — Vol. 12. — N 6. — P. 1616.
- 122 Mboge M. Y. et al. Carbonic anhydrases: role in pH control and cancer // *Metabolites.* — 2018. — Vol. 8. — N 1. — P. 19.
- 123 Li X. et al. Recent development of pH-responsive theranostic nanoplateforms for magnetic resonance imaging-guided cancer therapy // *Exploration.* — 2023. — Vol. 3. — N 3. — P. 20220002.
- 124 Thews O., Riemann A. Tumor pH and metastasis: a malignant process beyond hypoxia // *Cancer Metastasis Rev.* — 2019. — Vol. 38. — P. 113–129.

- 125 Chhikara B. S., Parang K. Global Cancer Statistics 2022: the trends projection analysis // *Chem. Biol. Lett.* — 2023. — Vol. 10. — N 1. — P. 451–451.
- 126 Li S., Lian B. Application of Calcium Carbonate as a Controlled Release Carrier for Therapeutic Drugs // *Minerals.* — 2023. — Vol. 13. — N 9. — P. 1136.
- 127 Proksch E. pH in nature, humans and skin // *J. Dermatol.* — 2018. — Vol. 45. — N 9. — P. 1044–1052.
- 128 Xiao Y. et al. Recent advances in calcium-based anticancer nanomaterials exploiting calcium overload to trigger cell apoptosis // *Adv. Funct. Mater.* — 2023. — Vol. 33. — N 3. — P. 2209291.
- 129 Goss S. L. et al. Determination of calcium salt solubility with changes in pH and PCO₂, simulating varying gastrointestinal environments // *J. Pharm. Pharmacol.* — 2007. — Vol. 59. — N 11. — P. 1485–1492.
- 130 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. — Vol. 110. — P. 60–70.
- 131 Ibiyeye K. M. et al. Combine drug delivery of Thymoquinone/DOXorubicin by Cockle shell-derived pH-sensitive aragonite CaCO₃ nanoparticles // *Nanosci. Nanotechnol. - Asia.* — 2020. — Vol. 10. — N 4. — P. 518–533.
- 132 Popova V. et al. Doxorubicin-Loaded Silica Nanocomposites for Cancer Treatment // *Coatings.* — 2023. — Vol. 13. — N 2. — P. 324.
- 133 Ji F. et al. A dual pH/magnetic responsive nanocarrier based on PEGylated Fe₃O₄ nanoparticles for doxorubicin delivery // *J. Nanosci. Nanotechnol.* — 2018. — Vol. 18. — N 7. — P. 4464–4470.
- 134 Semkina A. et al. Core-shell-corona doxorubicin-loaded superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles for cancer theranostics // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* — 2015. — Vol. 136. — P. 1073–1080.
- 135 Cai W. et al. Modified green synthesis of Fe₃O₄@SiO₂ nanoparticles for pH responsive drug release // *Mater. Sci. Eng. C.* — 2020. — Vol. 112. — P. 110900.
- 136 Dai Z. et al. SiO₂-coated magnetic nano-Fe₃O₄ photosensitizer for synergistic tumour-targeted chemo-photothermal therapy // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* — 2020. — Vol. 195. — P. 111274.
- 137 Demin A. M. et al. Features of doxorubicin adsorption on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles coated with SiO₂ or SiO₂/aminopropylsilane // *Mendeleev Commun.* — 2023. — Vol. 33. — N 2. — P. 160–163.
- 138 Tan C. et al. Advanced CaCO₃-derived delivery systems for bioactive compounds // *Adv. Colloid Interface Sci.* — 2022. — Vol. 309. — P. 102791.

- 139 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. — Vol. 14. — N 5. — P. 909.
- 140 Roncato F. et al. Improvement and extension of anti-EGFR targeting in breast cancer therapy by integration with the Avidin-Nucleic-Acid-Nano-Assemblies // *Nat. Commun.* — 2018. — Vol. 9. — N 1. — P. 4070.
- 141 Smith B. et al. Hyperthermia-triggered intracellular delivery of anticancer agent to HER2+ cells by HER2-specific affibody (ZHER2-GS-Cys)-conjugated thermosensitive liposomes (HER2+ affisomes) // *J. Control. Release*. — 2011. — Vol. 153. — N 2. — P. 187–194.
- 142 Schieber C. et al. Conjugation of Transferrin to Azide-Modified CdSe/ZnS Core-Shell Quantum Dots using Cyclooctyne Click Chemistry // *Angew. Chem. Int. Ed.* — 2012. — Vol. 51. — N 42. — P. 10523.
- 143 Choi K. Y. et al. Smart nanocarrier based on PEGylated hyaluronic acid for cancer therapy // *ACS Nano*. — 2011. — Vol. 5. — N 11. — P. 8591–8599.
- 144 Chi L. et al. Enhanced delivery of liposomes to lung tumor through targeting interleukin-4 receptor on both tumor cells and tumor endothelial cells // *J. Control. Release*. — 2015. — Vol. 209. — P. 327–336.
- 145 Lu Z. et al. A size-shrinkable nanoparticle-based combined anti-tumor and anti-inflammatory strategy for enhanced cancer therapy // *Nanoscale*. — 2018. — Vol. 10. — N 21. — P. 9957–9970.
- 146 Duo Y. et al. CX-5461-loaded nucleolus-targeting nanoplatform for cancer therapy through induction of pro-death autophagy // *Acta Biomater.* — 2018. — Vol. 79. — P. 317–330.
- 147 He X. et al. Sequentially triggered nanoparticles with tumor penetration and intelligent drug release for pancreatic cancer therapy // *Adv. Sci.* — 2018. — Vol. 5. — N 5. — P. 1701070.
- 148 Nogueira E. et al. Folate-targeted nanoparticles for rheumatoid arthritis therapy // *Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.* — 2016. — Vol. 12. — N 4. — P. 1113–1126.
- 149 Dasargyri A., Kumin C. D., Leroux J. C. Targeting nanocarriers with anisamide: fact or artifact? // *Adv. Mater.* — 2017. — Vol. 29. — N 7. — P. 1603451.
- 150 Deshayes S. et al. Phenylboronic acid-installed polymeric micelles for targeting sialylated epitopes in solid tumors // *J. Am. Chem. Soc.* — 2013. — Vol. 135. — N 41. — P. 15501–15507.
- 151 Yang H. et al. MiRNA-204-5p and oxaliplatin-loaded silica nanoparticles for enhanced tumor suppression effect in CD44-overexpressed colon adenocarcinoma // *Int. J. Pharm.* — 2019. — Vol. 566. — P. 585–593.
- 152 Hoy S. M. Patisiran: first global approval // *Drugs*. — 2018. — Vol. 78. — P. 1625–1631.

- 153 Chen Y. et al. Engineering micro-nanomaterials for biomedical translation // *Advanced NanoBiomed Research*. — 2021. — Vol. 1. — N 9. — P. 2100002.
- 154 Zhukova V. et al. Fluorescently labeled plga nanoparticles for visualization in vitro and in vivo: The importance of dye properties // *Pharmaceutics*. — 2021. — Vol. 13. — N 8. — P. 1145.
- 155 Cheng J. et al. Formulation of functionalized PLGA-PEG nanoparticles for in vivo targeted drug delivery // *Biomaterials*. — 2007. — Vol. 28. — N 5. — P. 869–876.
- 156 Wu Z. H., Tseng W. L. Combined cloud point extraction and Tween 20-stabilized gold nanoparticles for colorimetric assay of silver nanoparticles in environmental water // *Anal. Methods*. — 2011. — Vol. 3. — N 12. — P. 2915–2920.
- 157 Campbell J., Kastania G., Volodkin D. Encapsulation of low-molecular-weight drugs into polymer multilayer capsules templated on vaterite CaCO₃ crystals // *Micromachines*. — 2020. — Vol. 11. — N 8. — P. 717.
- 158 Sana B., Finne-Wistrand A., Pappalardo D. Recent development in near infrared light-responsive polymeric materials for smart drug-delivery systems // *Mater. Today Chem*. — 2022. — Vol. 25. — P. 100963.
- 159 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.
- 160 Li J. et al. Biomembrane-inspired design of medical micro/nanorobots: From cytomembrane stealth cloaks to cellularized Trojan horses // *Aggregate*. — 2023. — P. e359.
- 161 Li L. et al. Nucleic acid aptamers for molecular diagnostics and therapeutics: advances and perspectives // *Angew. Chem. Int. Ed.* — 2021. — Vol. 60. — N 5. — P. 2221–2231.
- 162 Raskov H. et al. Cancer-associated fibroblasts and tumor-associated macrophages in cancer and cancer immunotherapy // *Front. oncol.* — 2021. — Vol. 11. — P. 668731.
- 163 Zhao Y. et al. Co-delivery of gemcitabine and Triapine by calcium carbonate nanoparticles against chemoresistant pancreatic cancer // *Int. J. Pharm.* — 2023. — Vol. 636. — P. 122844.
- 164 Chemmalar S. et al. Synthesis and characterization of Gefitinib and Paclitaxel dual drug loaded Cockle shell (*Anadara granosa*) derived Calcium carbonate nanoparticles // *Mater. Proc.* — 2020. — Vol. 4. — N 1. — P. 63.
- 165 Ibiyeye K. M. et al. Ultrastructural changes and antitumor effects of doxorubicin/thymoquinone-loaded CaCO₃ nanoparticles on breast cancer cell line // *Front. oncol.* — 2019. — Vol. 9. — P. 599.
- 166 Yu J. et al. Multifunctional nanoparticles codelivering doxorubicin and amorphous calcium carbonate preloaded with indocyanine green for enhanced chemo-photothermal cancer therapy // *Int. J. Nanomed.* — 2023. — P. 323–337.

- 167 Wu Y. et al. Devising new lipid-coated calcium phosphate/carbonate hybrid nanoparticles for controlled release in endosomes for efficient gene delivery // *J. Mater. Chem. B.* — 2017. — Vol. 5. — N 34. — P. 7194–7203.
- 168 Wu Y., Gu W., Xu Z. P. Enhanced combination cancer therapy using lipid-calcium carbonate/phosphate nanoparticles as a targeted delivery platform // *Nanomedicine.* — 2019. — Vol. 14. — N 1. — P. 77–92.
- 169 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 Dev. Ind. Pharm.* — 2019. — Vol. 45. — N 4. — P. 603–610.
- 170 Chesneau C. et al. Cyclodextrin-calcium carbonate micro-to nano-particles: Targeting vaterite form and hydrophobic drug loading/release // *Pharmaceutics.* — 2023. — Vol. 15. — N 2. — P. 653.
- 171 Popova V. et al. 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.
- 172 Zhou F. et al. A calcium hydroxide/oleic acid/phospholipid nanoparticle induced cancer cell apoptosis by the combination of intracellular calcium overload and lactic acidosis elimination // *J. Mater. Chem. B.* — 2023. — Vol. 11. — N 25. — P. 5856–5869.
- 173 Wang C. et al. Cancer-specific therapy by artificial modulation of intracellular calcium concentration // *Adv. Healthc. Mater.* — 2019. — Vol. 8. — N 18. — P. 1900501.
- 174 Fang T. et al. Bioresponsive and immunotherapeutic nanomaterials to remodel tumor microenvironment for enhanced immune checkpoint blockade // *Bioact. Mater.* — 2023. — Vol. 32. — P. 530–542.
- 175 Chenthamara D. et al. Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration // *Biomater. Res.* — 2019. — Vol. 23. — N 1. — P. 1–29.
- 176 Kim M. et al. Nanosized ultrasound enhanced-contrast agent for in vivo tumor imaging via intravenous injection // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* — 2016. — Vol. 8. — N 13. — P. 8409–8418.
- 177 Som A. et al. Monodispersed calcium carbonate nanoparticles modulate local pH and inhibit tumor growth in vivo // *Nanoscale.* — 2016. — Vol. 8. — N 25. — P. 12639–12647.
- 178 Kim S. K., Foote M. B., Huang L. Targeted delivery of EV peptide to tumor cell cytoplasm using lipid coated calcium carbonate nanoparticles // *Cancer Lett.* — 2013. — Vol. 334. — N 2. — P. 311–318.
- 179 Zhang Y. et al. Tumor microenvironment-responsive hyaluronate-calcium carbonate hybrid nanoparticle enables effective chemotherapy for primary and advanced osteosarcomas // *Nano Res.* — 2018. — Vol. 11. — P. 4806–4822.

- 180 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 J. Biol. Sci.* — 2020. — Vol. 27. — N 6. — P. 1538–1552.
- 181 Svenskaya Y. I. et al. Non-invasive transcutaneous influenza immunization using vaccine-loaded vaterite particles // *J. Mater. Chem. B.* — 2023. — Vol. 11. — N 17. — P. 3860–3870.
- 182 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 // *Mater. Des.* — 2023. — Vol. 227. — P. 111703.
- 183 Canelli E. et al. Nano-adjuvanted dry powder vaccine for the mucosal immunization against airways pathogens // *Front. Vet. Sci.* — 2023. — Vol. 10. — P. 1116722.
- 184 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 // *J. Occup. Environ. Med.* — 2023. — Vol. 65. — N 2. — P. 184–191.
- 185 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 // *J. Curr. Vet. Res.* — 2022. — Vol. 4. — N 2. — P. 113–123.
- 186 Yu Y. G. et al. CaCO₃ vaterites as components of target drug delivery systems // *Cellular therapy and transplantation.* — 2020. — Vol. 9. — N 2. — P. 13–19.
- 187 Popryadukhin P. V. et al. Morphology of Porous CaCO₃ Vaterites as Components of Target Drug Delivery Systems in Rat Muscle Tissue // *Cell and Tissue Biol.* — 2021. — Vol. 15. — P. 208–213.
- 188 Render D. et al. Biomaterial-derived calcium carbonate nanoparticles for enteric drug delivery // *J. Nanomater.* — 2016. — Vol. 2016. — P. 1–8.
- 189 Lee J. A. et al. The fate of calcium carbonate nanoparticles administered by oral route: Absorption and their interaction with biological matrices // *Int. J. Nanomed.* — 2015. — P. 2273–2293.
- 190 Kim M. K. et al. Cytotoxicity, uptake behaviors, and oral absorption of food grade calcium carbonate nanomaterials // *Nanomaterials.* — 2015. — Vol. 5. — N 4. — P. 1938–1954.
- 191 Liu D. et al. Oral delivery of insulin using CaCO₃-based composite nanocarriers with hyaluronic acid coatings // *Mater. Lett.* — 2017. — Vol. 188. — P. 263–266.
- 192 Borodina T. et al. A novel formulation of zolpidem for direct nose-to-brain delivery: synthesis, encapsulation and intranasal administration to mice // *J. Pharm. Pharmacol.* — 2018. — Vol. 70. — N 9. — P. 1164–1173.

- 193 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 Technol. Ther.* — 2003. — Vol. 5. — N 1. — P. 1–9.
- 194 Ishikawa F. et al. Insoluble powder formulation as an effective nasal drug delivery system // *Pharm. Res.* — 2002. — Vol. 19. — P. 1097–1104.
- 195 Morçöl T. et al. Calcium phosphate particles as pulmonary delivery system for interferon- α in mice // *AAPS PharmSciTech.* — 2018. — Vol. 19. — P. 395–412.
- 196 Miranda M. S. et al. Development of inhalable superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) in microparticulate system for antituberculosis drug delivery // *Adv. Healthc. Mater.* — 2018. — Vol. 7. — N 15. — P. 1800124.
- 197 Lauth V. et al. Self-assembly and shape control of hybrid nanocarriers based on calcium carbonate and carbon nanodots // *Chem. Mater.* — 2016. — Vol. 28. — N 11. — P. 3796–3803.
- 198 Gusliakova O. et al. Use of submicron vaterite particles serves as an effective delivery vehicle to the respiratory portion of the lung // *Front. Pharmacol.* — 2018. — Vol. 9. — P. 559.
- 199 Guan Y. et al. Selective Delivery of Tofacitinib Citrate to Hair Follicles Using Lipid-Coated Calcium Carbonate Nanocarrier Controls Chemotherapy-Induced Alopecia Areata // *Int. J. Mol. Sci.* — 2023. — Vol. 24. — N 9. — P. 8427.
- 200 Higaki M. et al. Transdermal delivery of CaCO_3 -nanoparticles containing insulin // *Diabetes Technol. Ther.* — 2006. — Vol. 8. — N 3. — P. 369–374.
- 201 Svenskaya Y. I. et al. A simple non-invasive approach toward efficient transdermal drug delivery based on biodegradable particulate system // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* — 2019. — Vol. 11. — N 19. — P. 17270–17282.
- 202 Lengert E. et al. Mesoporous carriers for transdermal delivery of antifungal drug // *Mater. Lett.* — 2019. — Vol. 248. — P. 211–213.
- 203 Utz S. R. et al. Targeted photosensitizer delivery: A prospective approach to vitiligo photochemotherapy // *Vestn. Dermatol. Venerol.* — 2019. — Vol. 95. — N 1. — P. 21–29.
- 204 Svenskaya Y. I. et al. Enhanced topical psoralen-ultraviolet A therapy via targeting to hair follicles // *Br. J. Dermatol.* — 2020. — Vol. 182. — N 6. — P. 1479–1481.
- 205 Gusliakova O. et al. Transdermal platform for the delivery of the antifungal drug naftifine hydrochloride based on porous vaterite particles // *Mater. Sci. Eng. C.* — 2021. — Vol. 119. — P. 111428.
- 206 Zhuang Y., Cui W. Biomaterial-based delivery of nucleic acids for tissue regeneration // *Adv. Drug Deliv. Rev.* — 2021. — Vol. 176. — P. 113885.

- 207 Mendonça M. C. P. et al. Design of lipid-based nanoparticles for delivery of therapeutic nucleic acids // *Drug Discov. Today*. — 2023. — Vol. 28. — N 3. — P. 103505.
- 208 Schulz-Siegmund M., Aigner A. Nucleic acid delivery with extracellular vesicles // *Adv. Drug Deliv. Rev.* — 2021. — Vol. 173. — P. 89–111.
- 209 Yamada Y. Nucleic acid drugs—current status, issues, and expectations for exosomes // *Cancers*. — 2021. — Vol. 13. — N 19. — P. 5002.
- 210 Cao Y., Dong X., Chen X. Polymer-modified liposomes for drug delivery: from fundamentals to applications // *Pharmaceutics*. — 2022. — Vol. 14. — N 4. — P. 778.
- 211 Lin M., Qi X. Advances and challenges of stimuli-responsive nucleic acids delivery system in gene therapy // *Pharmaceutics*. — 2023. — Vol. 15. — N 5. — P. 1450.
- 212 Wang C. Q. et al. Dual-functionalized calcium carbonate based gene delivery system for efficient gene delivery // *RSC Adv.* — 2014. — Vol. 4. — N 73. — P. 38623–38629.
- 213 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 Ther.* — 2008. — Vol. 15. — N 3. — P. 193–202.
- 214 Chen C. et al. Polyethyleneimine-modified calcium carbonate nanoparticles for p53 gene delivery // *Regen. Biomater.* — 2016. — Vol. 3. — N 1. — P. 57–63.
- 215 Kanvinde S. et al. Non-viral vectors for delivery of nucleic acid therapies for cancer // *BioTech.* — 2022. — Vol. 11. — N 1. — P. 6.
- 216 Teixeira P. V. et al. Natural compounds: co-delivery strategies with chemotherapeutic agents or nucleic acids using lipid-based Nanocarriers // *Pharmaceutics*. — 2023. — Vol. 15. — N 4. — P. 1317.
- 217 Zhao P. et al. MiR-375 delivered by lipid-coated doxorubicin-calcium carbonate nanoparticles overcomes chemoresistance in hepatocellular carcinoma // *Nanomed.: Nanotechnol. Biol. Med.* — 2017. — Vol. 13. — N 8. — P. 2507–2516.
- 218 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 Biomater.* — 2018. — Vol. 72. — P. 248–255.
- 219 Xu X. et al. Programming assembly of biomimetic exosomes: an emerging theranostic nanomedicine platform // *Mater. Today Bio.* — 2023. — P. 100760.
- 220 Qi C. et al. Calcium-based biomaterials for diagnosis, treatment, and theranostics // *Chem. Soc. Rev.* — 2018. — Vol. 47. — N 2. — P. 357–403.
- 221 Min K. H. et al. pH-controlled gas-generating mineralized nanoparticles: a theranostic agent for ultrasound imaging and therapy of cancers // *ACS Nano*. — 2015. — Vol. 9. — N 1. — P. 134–145.

- 222 Chiang P. H. et al. Enhancing Doxorubicin Delivery in Solid Tumor by Superhydrophobic Amorphous Calcium Carbonate-Doxorubicin Silica Nanoparticles with Focused Ultrasound // *Mol. Pharmaceutics*. — 2022. — Vol. 19. — N 11. — P. 3894–3905.
- 223 Feng Q. et al. pH/ultrasound dual-responsive gas generator for ultrasound imaging-guided therapeutic inertial cavitation and sonodynamic therapy // *Adv. Healthc. Mater.* — 2018. — Vol. 7. — N 5. — P. 1700957.
- 224 Sarbadhikary P., George B. P., Abrahamse H. Recent advances in photosensitizers as multifunctional theranostic agents for imaging-guided photodynamic therapy of cancer // *Theranostics*. — 2021. — Vol. 11. — N 18. — P. 9054.
- 225 Kong F. et al. Biodegradable photothermal and pH responsive calcium carbonate@ phospholipid@ acetalated dextran hybrid platform for advancing biomedical applications // *Adv. Funct. Mater.* — 2016. — Vol. 26. — N 34. — P. 6158–6169.
- 226 Guan Q. et al. A glycosylated covalent organic framework equipped with BODIPY and CaCO₃ for synergistic tumor therapy // *Angew. Chem. Int. Ed.* — 2020. — Vol. 59. — N 41. — P. 18042–18047.
- 227 Wang P. et al. Cell-Friendly Isolation and pH-Sensitive Controllable Release of Circulating Tumor Cells by Fe₃O₄@CaCO₃ Nanoplatform // *Adv. Mater. Interfaces*. — 2021. — Vol. 8. — N 21. — P. 2101191.
- 228 Liu M. C. et al. Calcium carbonate end-capped, folate-mediated Fe₃O₄@mSiO₂ core-shell nanocarriers as targeted controlled-release drug delivery system // *J. Biomater. Appl.* — 2018. — Vol. 32. — N 8. — P. 1090–1104.
- 229 Xue J. et al. Magnetic drug-loaded osteoinductive Fe₃O₄/CaCO₃ hybrid microspheres system: efficient for sustained release of antibiotics // *J. Phys. D Appl. Phys.* — 2020. — Vol. 53. — N 24. — P. 245401.
- 230 Lin C. et al. Recent Developments in CaCO₃ Nano-Drug Delivery Systems: Advancing Biomedicine in Tumor Diagnosis and Treatment // *Pharmaceutics*. — 2024. — Vol. 16. — N 2. — P. 275.
- 231 Kanellakopoulou K., Giamarellos-Bourboulis E. J. Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections // *Drugs*. — 2000. — Vol. 59. — P. 1223–1232.
- 232 Maleki S. et al. Calcium carbonate nanoparticles; potential applications in bone and tooth disorders // *J. Pharm. Sci.* — 2015. — Vol. 20. — N 4. — P. 175–182.
- 233 Korkusuz F. et al. In vivo response to biodegradable controlled antibiotic release systems // *J. Biomed. Mater. Res.* — 2001. — Vol. 55. — N 2. — P. 217–228.
- 234 Lucas A. et al. A synthetic aragonite-based ceramic as a bone graft substitute and substrate for antibiotics // *Int. J. Inorg. Mater.* — 2001. — Vol. 3. — N 1. — P. 87–94.

- 235 Che Y. J. et al. Lymph-Node-Targeted Drug Delivery for Effective Immunomodulation to Prolong the Long-Term Survival After Heart Transplantation // *Adv. Mater.* — 2023. — Vol. 35. — N 16. — P. 2207227.
- 236 Su X., Wang T., Guo S. Applications of 3D printed bone tissue engineering scaffolds in the stem cell field // *Regen. Ther.* — 2021. — Vol. 16. — P. 63–72.
- 237 Wang T. et al. Three-dimensional printing of calcium carbonate/hydroxyapatite scaffolds at low temperature for bone tissue engineering // *3D Print. Addit. Manuf.* — 2021. — Vol. 8. — N 1. — P. 1–13.
- 238 Shaked H. et al. Long-term stabilized amorphous calcium carbonate—an ink for bio-inspired 3D printing // *Mater. Today Bio.* — 2021. — Vol. 11. — P. 100120.
- 239 Gang F. et al. 3D printing of PLLA/biomineral composite bone tissue engineering scaffolds // *Materials.* — 2022. — Vol. 15. — N 12. — P. 4280.
- 240 Donate R. et al. Calcium carbonate coating of 3D-printed PLA scaffolds intended for biomedical applications // *Polymers.* — 2023. — Vol. 15. — N 11. — P. 2506.
- 241 Harish V. et al. Review on nanoparticles and nanostructured materials: Bioimaging, biosensing, drug delivery, tissue engineering, antimicrobial, and agro-food applications // *Nanomaterials.* — 2022. — Vol. 12. — N 3. — P. 457.
- 242 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 // *Mater. Sci. Eng. C.* — 2021. — Vol. 122. — P. 111909.
- 243 Saveleva M. S. et al. Hybrid PCL/CaCO₃ scaffolds with capabilities of carrying biologically active molecules: Synthesis, loading and in vivo applications // *Mater. Sci. Eng. C.* — 2018. — Vol. 85. — P. 57–67.
- 244 Ren B. et al. Injectable polysaccharide hydrogel embedded with hydroxyapatite and calcium carbonate for drug delivery and bone tissue engineering // *Int. J. Biol. Macromol.* — 2018. — Vol. 118. — P. 1257–1266.
- 245 Liu H. et al. Unlocking the potential of amorphous calcium carbonate: A star ascending in the realm of biomedical application // *Acta Pharm. Sin. B.* — 2024. — Vol. 14. — N 2. — P. 602–606.
- 246 Ambrogi V. A New Challenge for the Old Excipient Calcium Carbonate: To Improve the Dissolution Rate of Poorly Soluble Drugs // *Pharmaceutics.* — 2023. — Vol. 15. — N 1. — P. 300.
- 247 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. — Vol. 36. — P. 101038.

- 248 Wang X. et al. Inorganic nanomaterials with rapid clearance for biomedical applications // *Chem. Soc. Rev.* — 2021. — Vol. 50. — N 15. — P. 8669–8742.
- 249 Sharma S. et al. An insight into functionalized calcium based inorganic nanomaterials in biomedicine: Trends and transitions // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* — 2015. — Vol. 133. — P. 120–139.
- 250 Docter D. et al. No king without a crown-impact of the nanomaterial-protein corona on nanobiomedicine // *Nanomedicine.* — 2015. — Vol. 10. — N 3. — P. 503–519.
- 251 Martel J., Young J. D. E. Purported nanobacteria in human blood as calcium carbonate nanoparticles // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2008. — Vol. 105. — N 14. — P. 5549–5554.
- 252 Shan D. et al. Development of amperometric biosensor for glucose based on a novel attractive enzyme immobilization matrix: calcium carbonate nanoparticles // *Biosens. Bioelectron.* — 2007. — Vol. 22. — N 8. — P. 1612–1617.
- 253 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.
- 254 Kovrigina E., Chubarov A., Dmitrienko E. High drug capacity doxorubicin-loaded iron oxide nanocomposites for cancer therapy // *Magnetochemistry.* — 2022. — Vol. 8. — N 5. — P. 54.
- 255 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. — Vol. 12. — N 5. — P. 1094.
- 256 Rao K. S. et al. A novel method for synthesis of silica nanoparticles // *J. Colloid Interface Sci.* — 2005. — Vol. 289. — N 1. — P. 125–131.
- 257 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 // *Inorg. Mater.* — 2018. — Vol. 54. — P. 156–162.
- 258 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. — Vol. 56. — N 3. — P. 139–145.
- 259 Dumontel B. et al. Natural biopolymers as smart coating materials of mesoporous silica nanoparticles for drug delivery // *Pharmaceutics.* — 2023. — Vol. 15. — N 2. — P. 447.

- 260 Attia M. S. et al. Mesoporous silica nanoparticles: Their potential as drug delivery carriers and nanoscavengers in Alzheimer's and Parkinson's diseases // *Saudi Pharm. J.* — 2023. — Vol. 31. — N 3. — P. 417–432.
- 261 Sreena R., Nathanael A. J. Biodegradable biopolymeric nanoparticles for biomedical applications—challenges and future outlook // *Materials.* — 2023. — Vol. 16. — N 6. — P. 2364.
- 262 Ma X., Luan Z., Li J. Inorganic nanoparticles-based systems in biomedical applications of stem cells: opportunities and challenges // *Int. J. Nanomed.* — 2023. — P. 143–182.
- 263 Hickey J. W. et al. Control of polymeric nanoparticle size to improve therapeutic delivery // *J. Control. Release.* — 2015. — Vol. 219. — P. 536–547.
- 264 Shinde V. R. et al. Enhanced Permeability and Retention Effect: A key facilitator for solid tumor targeting by nanoparticles // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* — 2022. — P. 102915.
- 265 Khouzani M. F. et al. Disordered amorphous calcium carbonate from direct precipitation // *CrystEngComm.* — 2015. — Vol. 17. — N 26. — P. 4842–4849.
- 266 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 Appl. Nano Mater.* — 2022. — Vol. 5. — N 2. — P. 2994–3006.
- 267 Akbari J. et al. The effect of Tween 20, 60, and 80 on dissolution behavior of sprinonolactone in solid dispersions prepared by PEG 6000 // *Adv. Pharm. Bull.* — 2015. — Vol. 5. — N 3. — P. 435.
- 268 Koennings S. et al. Influence of wettability and surface activity on release behavior of hydrophilic substances from lipid matrices // *J. Control. Release.* — 2007. — Vol. 119. — N 2. — P. 173–181.
- 269 Jiao W. et al. Design of magnetic nanoplatforms for cancer theranostics // *Biosensors.* — 2022. — Vol. 12. — N 1. — P. 38.
- 270 Lamichhane N. et al. Iron oxide-based magneto-optical nanocomposites for in vivo biomedical applications // *Biomedicines.* — 2021. — Vol. 9. — N 3. — P. 288.
- 271 Anderson S. D., Gwenin V. V., Gwenin C. D. Magnetic functionalized nanoparticles for biomedical, drug delivery and imaging applications // *Nanoscale Res. Lett.* — 2019. — Vol. 14. — N 1. — P. 188.
- 272 Ayub A., Wettig S. An overview of nanotechnologies for drug delivery to the brain // *Pharmaceutics.* — 2022. — Vol. 14. — N 2. — P. 224.
- 273 Wang C. et al. Preparation and characterization of magnetic hollow PMMA nanospheres via in situ emulsion polymerization // *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* — 2010. — Vol. 363. — N 1–3. — P. 71–77.
- 274 Ibarra J. et al. Synthesis and characterization of magnetite/PLGA/chitosan nanoparticles // *Mater. Res. Express.* — 2015. — Vol. 2. — N 9. — P. 095010.

- 275 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. — Vol. 3. — N 1. — P. 265–271.
- 276 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. — Vol. 12. — N 1. — P. 234–241.
- 277 Di J. et al. Size, shape, charge and “stealthy” surface: Carrier properties affect the drug circulation time in vivo // *Asian J. Pharm. Sci.* — 2021. — Vol. 16. — N 4. — P. 444–458
- 278 Han S., Chen X., Huang L. The tumor therapeutic potential of long non-coding RNA delivery and targeting // *Acta Pharm. Sin. B.* — 2023. — Vol. 13. — N 4. — P. 1371–1382.
- 279 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. — Vol. 12. — N 1. — P. 83.
- 280 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 Food Sci. Technol.* — 2023. — Vol. 133. — P. 75–86.
- 281 Abbasi M. et al. Mesoporous silica nanoparticle: heralding a brighter future in cancer nanomedicine // *Microporous Mesoporous Mater.* — 2021. — Vol. 319. — P. 110967.
- 282 Rao K. S. et al. A novel method for synthesis of silica nanoparticles // *J. Colloid Interface Sci.* — 2005. — Vol. 289. — N 1. — P. 125–131.
- 283 Kirla H. et al. Use of Silica Nanoparticles for Drug Delivery in Cardiovascular Disease // *Clin. Ther.* — 2023.
- 284 Wiogo H. T. R. et al. Stabilization of magnetic iron oxide nanoparticles in biological media by fetal bovine serum (FBS) // *Langmuir*. — 2011. — Vol. 27. — N 2. — P. 843–850.
- 285 Khullar P. et al. Bovine serum albumin bioconjugated gold nanoparticles: synthesis, hemolysis, and cytotoxicity toward cancer cell lines // *J. Phys. Chem. C*. — 2012. — Vol. 116. — N 15. — P. 8834–8843.
- 286 Singh S. et al. Nanoparticle formulations: A smart era of advanced treatment with nanotoxicological imprints on the human body // *Chem. Biol. Interact.* — 2023. — Vol. 373. — P. 110355.
- 287 Li Z. et al. Applications of surface modification technologies in nanomedicine for deep tumor penetration // *Adv. Sci.* — 2021. — Vol. 8. — N 1. — P. 2002589.

- 288 Ahangaran F., Navarchian A. H. Recent advances in chemical surface modification of metal oxide nanoparticles with silane coupling agents: A review // *Adv. Colloid Interface Sci.* — 2020. — Vol. 286. — P. 102298.
- 289 Darwish M. S. A., Mostafa M. H., Al-Harbi L. M. Polymeric nanocomposites for environmental and industrial applications // *Int. J. Mol. Sci.* — 2022. — Vol. 23. — N 3. — P. 1023.
- 290 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 Appl. Mater. Interfaces.* — 2016. — Vol. 8. — N 18. — P. 11336–11341.
- 291 Snoderly H. T. et al. PEGylation of metal oxide nanoparticles modulates neutrophil extracellular trap formation // *Biosensors.* — 2022. — Vol. 12. — N 2. — P. 123.
- 292 Schwaminger S. P., Bauer D., Fraga-García P. Gold-iron oxide nanohybrids: Insights into colloidal stability and surface-enhanced Raman detection // *Nanoscale Adv.* — 2021. — Vol. 3. — N 22. — P. 6438–6445.
- 293 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 Commun.* — 2022. — Vol. 12. — N 5. — P. 632–639.
- 294 Dragos-Pinzaru O. G. et al. Synthesis and characterization of gold-shell magnetic nanowires for theranostic applications // *Coatings.* — 2022. — Vol. 12. — N 11. — P. 1755.
- 295 Vismara E. et al. Albumin and hyaluronic acid-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles loaded with paclitaxel for biomedical applications // *Molecules.* — 2017. — Vol. 22. — N 7. — P. 1030.
- 296 Schubert J., Chanana M. Coating matters: Review on colloidal stability of nanoparticles with biocompatible coatings in biological media, living cells and organisms // *Curr. Med. Chem.* — 2018. — Vol. 25. — N 35. — P. 4553–4586.
- 297 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 // *Biotechnol. J.* — 2019. — Vol. 14. — N 3. — P. 1800055.
- 298 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 // *Russ. J. Org. Chem.* — 2010. — Vol. 36. — N 5. — P. 645–656.
- 299 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.

- 300 Long J. et al. Preparation of streptavidin-coated magnetic nanoparticles for specific immobilization of enzymes with high activity and enhanced stability // *Ind. Eng. Chem. Res.* — 2021. — Vol. 60. — N 4. — P. 1542–1552.
- 301 Norris J. L. et al. Covalent and non-covalent strategies for the immobilization of Tobacco Etch Virus protease (TEVp) on superparamagnetic nanoparticles // *J. Biotechnol.* — 2020. — Vol. 322. — P. 1–9.
- 302 Hao N. et al. The shape effect of PEGylated mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake pathway in Hela cells // *Microporous Mesoporous Mater.* — 2012. — Vol. 162. — P. 14–23.
- 303 Azarshin S., Moghadasi J., Aboosadi Z. Surface functionalization of silica nanoparticles to improve the performance of water flooding in oil wet reservoirs // *Energy Explor. Exploit.* — 2017. — Vol. 35. — N 6. — P. 685–697.
- 304 Xiao Y., Li C. M., Liu Y. Electrochemical impedance characterization of antibody-antigen interaction with signal amplification based on polypyrrole-streptavidin // *Biosens. Bioelectron.* — 2007. — Vol. 22. — N 12. — P. 3161–3166.
- 305 Golshaei R., Guler Z., Sarac S. A. (Au/PANA/PVAc) nanofibers as a novel composite matrix for albumin and streptavidin immobilization // *Mater. Sci. Eng. C.* — 2016. — Vol. 60. — P. 260–275.
- 306 Gao F. et al. Recent advances in aptamer-based targeted drug delivery systems for cancer therapy // *Front. bioeng. biotechnol.* — 2022. — Vol. 10. — P. 972933.
- 307 Carton-Garcia F. et al. Oligonucleotide-based therapies for renal diseases // *Biomedicines.* — 2021. — Vol. 9. — N 3. — P. 303.
- 308 Fan M. et al. Ultrasmall gold nanoparticles in cancer diagnosis and therapy // *Theranostics.* — 2020. — Vol. 10. — N 11. — P. 4944.
- 309 Roberts T. C., Langer R., Wood M. J. A. Advances in oligonucleotide drug delivery // *Nat. Rev. Drug Discov.* — 2020. — Vol. 19. — N 10. — P. 673–694.
- 310 Ramasamy T. et al. Nano drug delivery systems for antisense oligonucleotides (ASO) therapeutics // *J. Control. Release.* — 2022. — Vol. 352. — P. 861–878.
- 311 Minkner R. et al. Oligonucleotide separation techniques for purification and analysis: What can we learn for today's tasks? // *Electrophoresis.* — 2022. — Vol. 43. — N 23–24. — P. 2402–2427.
- 312 Bost J. P. et al. Delivery of oligonucleotide therapeutics: chemical modifications, lipid nanoparticles, and extracellular vesicles // *ACS Nano.* — 2021. — Vol. 15. — N 9. — P. 13993–14021.
- 313 Дмитриенко, Е.В., Тронин, А.В., Попов, В.П., Пышная, И.А., Пышный, Д.В. Иммунизация биомолекулярных зондов на поверхность Si/SiO₂ // *Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина.* — 2013. — Т. 11. — №. 4. — С. 35–43.

- 314 Jain A., Cheng K. The principles and applications of avidin-based nanoparticles in drug delivery and diagnosis // *J. Control. Release.* — 2017. — Vol. 245. — P. 27–40.
- 315 Li D. et al. AACC guidance document on biotin interference in laboratory tests // *J. Appl. Lab. Med.* — 2020. — Vol. 5. — N 3. — P. 575–587.
- 316 Balzer A. H. A., Whitehurst C. B. An Analysis of the Biotin-(Strept) avidin System in Immunoassays: Interference and Mitigation Strategies // *Curr. Issues Mol. Biol.* — 2023. — Vol. 45. — N 11. — P. 8733-8754.
- 317 Xu G., Poelarends G. J. Unlocking new reactivities in enzymes by iminium catalysis // *Angew. Chem. Int. Ed.* — 2022. — Vol. 61. — N 30. — P. e202203613.
- 318 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 // *Environ. Pollut.* — 2020. — Vol. 266. — P. 115389.
- 319 Lincy S. A. et al. Streptavidin Fe₂O₃-gold nanoparticles functionalized theranostic liposome for antibiotic resistant bacteria and biotin sensing // *Biosens. Bioelectron.* — 2023. — Vol. 219. — P. 114849.
- 320 Gross B. P. et al. Biotinylated streptavidin surface coating improves the efficacy of a PLGA microparticle-based cancer vaccine // *Bioconjugate Chem.* — 2020. — Vol. 31. — N 9. — P. 2147–2157.
- 321 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. — Vol. 57. — N 1. — P. 129–137.
- 322 Zamoskovtseva A. A. et al. Search for a new type of spatial organization of nucleic acids in human genome // *Systems Biology and Bioinformatics.* — 2020. — Vol. 12. — P. 56–56.
- 323 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. — Vol. 15. — N 7. — P. 1596.
- 324 Liu R. et al. Advances of nanoparticles as drug delivery systems for disease diagnosis and treatment // *Chin. Chem. Lett.* — 2023. — Vol. 34. — N 2. — P. 107518.
- 325 Afzal O. et al. Nanoparticles in drug delivery: From history to therapeutic applications // *Nanomaterials.* — 2022. — Vol. 12. — N 24. — P. 4494.
- 326 Nikezić A. V. V., Bondžić A. M., Vasić V. M. Drug delivery systems based on nanoparticles and related nanostructures // *Eur. J. Pharm. Sci.* — 2020. — Vol. 151. — P. 105412.

- 327 L rida-Viso A. et al. Biosafety of mesoporous silica nanoparticles; towards clinical translation // *Adv. Drug Deliv. Rev.* — 2023. — P. 115049.
- 328 Lakkakula J. R. et al. A comprehensive review on alginate-based delivery systems for the delivery of chemotherapeutic agent: Doxorubicin // *Carbohydr. Polym.* — 2021. — Vol. 259. — P. 117696.
- 329 Nicoletto R. E., Ofner III C. M. Cytotoxic mechanisms of doxorubicin at clinically relevant concentrations in breast cancer cells // *Cancer Chemother. Pharmacol.* — 2022. — Vol. 89. — N 3. — P. 285–311.
- 330 Jain K. K. An overview of drug delivery systems // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* — 2020. — P. 1–54.
- 331 Ikeda-Imafuku M. et al. Strategies to improve the EPR effect: A mechanistic perspective and clinical translation // *J. Control. Release.* — 2022. — Vol. 345. — P. 512–536.
- 332 Sun R. et al. The tumor EPR effect for cancer drug delivery: Current status, limitations, and alternatives // *Adv. Drug Deliv. Rev.* — 2022. — Vol. 191. — P. 114614.
- 333 Boedtkjer E., Pedersen S. F. The acidic tumor microenvironment as a driver of cancer // *Annu. Rev. Physiol.* — 2020. — Vol. 82. — P. 103–126.
- 334 Karimi M. et al. pH-Sensitive stimulus-responsive nanocarriers for targeted delivery of therapeutic agents // *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnology.* — 2016. — Vol. 8. — N 5. — P. 696–716.
- 335 Subhan M. A. et al. Recent advances in tumor targeting via EPR effect for cancer treatment // *J. Pers. Med.* — 2021. — Vol. 11. — N 6. — P. 571.
- 336 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. — Vol. 9. — N 26. — P. 8018.
- 337 Park J. et al. Alliance with EPR effect: combined strategies to improve the EPR effect in the tumor microenvironment // *Theranostics.* — 2019. — Vol. 9. — N 26. — P. 8073.
- 338 Muthana M. et al. Directing cell therapy to anatomic target sites in vivo with magnetic resonance targeting // *Nat. Commun.* — 2015. — Vol. 6. — N 1. — P. 8009.
- 339 Niu Y. et al. Magnetic Microcapsules Based on Fe₃O₄ Nanoparticles: Preparation, Properties, and Applications // *Mater. Today Commun.* — 2024. — P. 108660.
- 340 Zyuzin M. V. et al. Comprehensive and systematic analysis of the immunocompatibility of polyelectrolyte capsules // *Bioconjugate Chem.* — 2017. — Vol. 28. — N 2. — P. 556–564.
- 341 Qiu N. et al. Calcium carbonate microspheres as carriers for the anticancer drug camptothecin // *Mater. Sci. Eng. C.* — 2012. — Vol. 32. — N 8. — P. 2634–2640.

- 342 Bansal R., Singh R., Kaur K. Quantitative analysis of doxorubicin hydrochloride and arterolane maleate by mid IR spectroscopy using transmission and reflectance modes // *BMC Chem.* — 2021. — Vol. 15. — N 1. — P. 27.
- 343 Liang J. et al. Lipid/hyaluronic acid-Coated Doxorubicin-Fe₃O₄ as a dual-targeting nanoparticle for enhanced cancer therapy // *AAPS PharmSciTech.* — 2020. — Vol. 21. — P. 1–9.
- 344 Pallaeva T. N. et al. High-capacity calcium carbonate particles as pH-sensitive containers for doxorubicin // *Kristallografija.* — 2023. — Vol. 68. — N 2. — P. 309–315.
- 345 Li L. et al. Porous calcite CaCO₃ microspheres: Preparation, characterization and release behavior as doxorubicin carrier // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* — 2020. — Vol. 186. — P. 110720.
- 346 Wu J. L. et al. Multi-drug delivery system based on alginate/calcium carbonate hybrid nanoparticles for combination chemotherapy // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* — 2014. — Vol. 123. — P. 498-505.
- 347 Swietach P. et al. The chemistry, physiology and pathology of pH in cancer // *Philos. Trans. R. Soc. B.* — 2014. — Vol. 369. — N 1638. — P. 20130099.
- 348 Vakili-Ghartavol R. et al. Toxicity assessment of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in different tissues // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* — 2020. — Vol. 48. — N 1. — P. 443–451.
- 349 Malhotra N. et al. Potential toxicity of iron oxide magnetic nanoparticles: a review // *Molecules.* — 2020. — Vol. 25. — N 14. — P. 3159.
- 350 Dong L. et al. A review on recent advances in the applications of composite Fe₃O₄ magnetic nanoparticles in the food industry // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* — 2024. — Vol. 64. — N 4. — P. 1110–1138.
- 351 Ganapathe L. S. et al. Magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles in biomedical application: From synthesis to surface functionalisation // *Magnetochemistry.* — 2020. — Vol. 6. — N 4. — P. 68.
- 352 Lu C. H., Hsiao J. K. Diagnostic and therapeutic roles of iron oxide nanoparticles in biomedicine // *Tzu Chi Med. J.* — 2023. — Vol. 35. — N 1. — P. 11–17.
- 353 Liu Y. et al. Biomaterialized calcium carbonate nanohybrids for mild photothermal heating-enhanced gene therapy // *Biomaterials.* — 2021. — Vol. 274. — P. 120885.
- 354 Idris S. B. et al. In vitro cytotoxicity evaluation of oxytetracycline loaded cockle shell derived calcium carbonate aragonite nanoparticles // *Nanosci. Nanotechnol. - Asia.* — 2021. — Vol. 11. — N 2. — P. 237–242.
- 355 Razzaghi S. et al. Spherical PEG/SiO₂ promising agents for Lamivudine antiviral drug delivery, a molecular dynamics simulation study // *Sci. Rep.* — 2023. — Vol. 13. — N 1. — P. 3323.
- 356 Abu-Dief A. M. et al. Recent advances in mesoporous silica nanoparticles for targeted drug delivery applications // *Curr. Drug Deliv.* — 2022. — Vol. 19. — N 4. — P. 436–450

- 357 Mezan S. O. Silica/Polystyrene Nanocomposite (SiO₂/PsNCs) using Sol-Gel Method Drug Delivery System: A Review // *Des. Eng.* — 2021. — P. 10175–10181.
- 358 Ortiz-Islas E. et al. Mesoporous silica nanoparticles functionalized with folic acid for targeted release Cis-Pt to glioblastoma cells // *Rev. Adv. Mater. Sci.* — 2021. — Vol. 60. — N 1. — P. 25–37.
- 359 Miao C. et al. The size-dependent in vivo toxicity of amorphous silica nanoparticles: A systematic review // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* — 2024. — Vol. 271. — P. 115910.
- 360 Zhuang J., Yu Y., Lu R. Mesoporous silica nanoparticles as carrier to overcome bacterial drug resistant barriers // *Int. J. Pharm.* — 2023. — Vol. 631. — P. 122529.
- 361 Selvarajan V., Obuobi S., Ee P. L. R. Silica nanoparticles—a versatile tool for the treatment of bacterial infections // *Front. Chem.* — 2020. — Vol. 8. — P. 602.
- 362 Abu-Dief A. M. et al. Recent advances in mesoporous silica nanoparticles for targeted drug delivery applications // *Curr. Drug Deliv.* — 2022. — Vol. 19. — N 4. — P. 436–450.
- 363 Racles C. et al. Functionalized Mesoporous Silica as Doxorubicin Carriers and Cytotoxicity Boosters // *Nanomaterials.* — 2022. — Vol. 12. — N 11. — P. 1823
- 364 Khatami F. et al. Targeted delivery system using silica nanoparticles coated with chitosan and AS1411 for combination therapy of doxorubicin and anti-miR-21 // *Carbohydr. Polym.* — 2021. — Vol. 266. — P. 118111.
- 365 Al-Nadaf A. H. et al. Folic acid-hydrophilic polymer coated mesoporous silica nanoparticles target doxorubicin delivery // *Pharm. Dev. Technol.* — 2021. — Vol. 26. — N 5. — P. 582–591.
- 366 Hakeem A. et al. Polyaspartic acid-anchored mesoporous silica nanoparticles for pH-responsive doxorubicin release // *Int. J. Nanomed.* — 2018. — P. 1029–1040.
- 367 Moodley T., Singh M. Sterically stabilised polymeric mesoporous silica nanoparticles improve doxorubicin efficiency: Tailored cancer therapy // *Molecules.* — 2020. — Vol. 25. — N 3. — P. 742.
- 368 Qin Y. et al. Study of pH-responsive and polyethylene glycol-modified doxorubicin-loaded mesoporous silica nanoparticles for drug delivery // *J. Nanosci. Nanotechnol.* — 2020. — Vol. 20. — N 10. — P. 5997–6006.
- 369 Ferjaoui Z. et al. Doxorubicin-loaded thermoresponsive superparamagnetic nanocarriers for controlled drug delivery and magnetic hyperthermia applications // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* — 2019. — Vol. 11. — N 34. — P. 30610–30620.
- 370 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. — Vol. 3. — N 7. — P. 8017–8026.

- 371 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. — Vol. 8. — N 24. — P. 12152–12161.
- 372 Nguyen T. N. et al. Optical properties of doxorubicin hydrochloride load and release on silica nanoparticle platform // *Molecules*. — 2021. — Vol. 26. — N 13. — P. 3968.
- 373 Ahmed H. et al. Biomedical applications of mesoporous silica nanoparticles as a drug delivery carrier // *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* — 2022. — Vol. 76. — P. 103729.
- 374 Zhao H. et al. Environmental stimulus-responsive mesoporous silica nanoparticles as anticancer drug delivery platforms // *Colloids Surf. B Biointerfaces*. — 2024. — P. 113758.
- 375 Mdlovu N. V. et al. Green synthesis and characterization of silicate nanostructures coated with Pluronic F127/gelatin for triggered drug delivery in tumor microenvironments // *Int. J. Biol. Macromol.* — 2023. — Vol. 251. — P. 126337.
- 376 Luo W. et al. Polyethylenimine-CO₂ adduct templated CaCO₃ nanoparticles as anticancer drug carrier // *Cancer Nanotechnol.* — 2023. — Vol. 14. — N 1. — P. 7.
- 377 Zhu H. et al. Preparation of pH-Responsive Hydroxyapatite-Encapsulated Magnetic Fe₃O₄ Composite Materials with Sandwich Construction for Drug Delivery of Doxorubicin // *Sci. Adv. Mater.* — 2019. — Vol. 11. — N 10. — P. 1353–1361.