

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля
Российской академии наук

На правах рукописи

Моллаева Мария Романовна

**Системы доставки комплексов металлов и мезо-тетрафенилпорфиринов на
основе полимерных частиц для каталитической терапии**

1.5.6. Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
к.х.н., Никольская Е.Д.

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	6
ВВЕДЕНИЕ	9
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	15
1.1 Активные формы кислорода: источники и регуляция в клетках.....	15
1.2 Окислительный стресс как метод лечения опухолевых заболеваний.....	17
1.3 Каталитическая терапия.....	19
2.1 Нанотехнологии в медицине	22
2.2 Нанотехнологии для терапии опухолевых заболеваний	23
2.3 Основные типы наноразмерных систем доставки МелП	24
2.3.1 Твёрдые липидные частицы	25
2.3.2 Липосомы	26
2.3.3 Дендримеры	27
2.3.4 Углеродные нанотрубки	28
2.3.5 Неорганические частицы	29
2.3.6 Полимерные частицы.....	31
2.4 Сополимер молочной и гликолевой кислот и его свойства	32
2.5 Основные методы получения полимерных частиц	34
2.5.1 Метод одинарного/двойного эмульгирования.....	35
2.5.2 Метод высаливания.....	35
2.5.3 Метод преципитации.....	36
2.5.4 Микрофлюидная технология получения частиц	36
2.6 Оптимизация метода получения частиц с помощью планов Бокса-Бенкена	36
2.7 Определение константы связывания	40
2.8 Основные методы анализа полимерных частиц.....	42
2.8.1 Метод динамического светорассеяния.....	42
2.8.2 Метод электрофоретического рассеяния света	42
2.8.3 ИК-спектроскопия	42

2.8.4 Сканирующая и просвечивающая электронная микроскопия	43
2.8.5 Изучение кинетики высвобождения действующего вещества из полимерных частиц	43
2.8.6 Оценка цитотоксической активности полимерных частиц.....	44
2.8.7 Определение уровня внутриклеточных АФК и окислительного стресса	45
2.8.8. Исследование полимерных частиц <i>in vivo</i>	46
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	48
2.1 Реактивы.....	48
2.2 Оборудование	48
2.3 Клеточные линии и лабораторные животные.....	49
2.4 Получение полимерных частиц	49
2.5 Оптимизация процесса получения НЧ с помощью методологии Бокса-Бенкена.....	50
2.6 Анализ частиц.....	51
2.6.1 Определение степени включения и общего содержания МеП в НЧ.....	51
2.6.2 Определение РЧ, дзета-потенциала и ИПД полученных частиц.....	52
2.6.3 Исследование НЧ методом просвечивающей микроскопии.....	52
2.6.4 Рентгеноструктурный анализ	52
2.6.5 ИК-спектроскопия	52
2.6.6 Исследование кинетики высвобождения МеП из НЧ.....	52
2.6.7 Анализ связывания МеП с ПМГК.....	53
2.6.8 Исследование стабильности МеП в условиях окислительной деградации	53
2.6.9 Анализ гемолитической активности.....	53
2.7 Культивирование клеток.....	54
2.7.1 Определение цитотоксической активности МеП, МеП-содержащих частиц с помощью МТТ-теста	54
2.7.2 Определение уровня АФК	55
2.7.3 Определение уровня внутриклеточного супероксид аниона.....	55
2.7.4 Анализ изменения мембранного потенциала митохондрий	55

2.7.5 Анализ уровня клеточной гибели	56
2.7.6 Оценка цитотоксической активности комбинации АК и MnП/MnП-НЧ в условиях ингибирования антиоксидантной системы защиты клеток.....	56
2.7.7 Определение уровня ферментативной активности антиоксидантной системы защиты клеток.....	57
2.7.8 Колониеформирующий анализ	57
2.7.9 TUNEL анализ.....	58
2.8 Исследования острой токсичности MeП и MeП-НЧ.....	58
2.9 Исследование противоопухолевой активности <i>in vivo</i>	58
2.10 Исследование биораспределения MnП-НЧ и MnП <i>in vivo</i> методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой.....	59
2.11 Статистический анализ	60
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ.....	62
3.1 Оптимизация процесса получения НЧ, содержащих MeП.....	62
3.1.1 Анализ данных после получения NiП-НЧ по плану Бокса-Бенкена	65
3.1.1.1 Общее содержание NiП в НЧ.....	66
3.1.1.2 Средний диаметр частиц NiП-НЧ	67
3.1.2 Анализ данных после получения FeП-НЧ по плану Бокса-Бенкена	68
3.1.2.1 Общее содержание FeП в НЧ.....	69
3.1.2.2 Средний диаметр частиц FeП-НЧ	70
3.1.3 Анализ данных после получения MnП-НЧ по плану Бокса-Бенкена.....	71
3.1.3.1 Общее содержание MnП в НЧ	73
3.1.3.2 Средний диаметр частиц MnП-НЧ.....	73
3.1.4 Анализ данных после получения CoП-НЧ по плану Бокса-Бенкена.....	74
3.1.4.1 Общее содержание CoП в НЧ.....	75
3.1.4.2 Средний диаметр частиц CoП-НЧ.....	76
3.1.5 Оптимизация метода получения НЧ.....	77
3.2 Анализ частиц, содержащих MeП	78
3.2.1 Анализ физико-химических характеристик MeП-НЧ.....	78

3.2.2 Анализ МеП-НЧ методом просвечивающей микроскопии.....	79
3.2.3 Рентгенофазовый анализ МеП-НЧ.....	80
3.2.4 ИК-спектроскопия МеП-НЧ.....	81
3.2.5 Исследование взаимодействий между ПМГК и МеП.....	82
3.2.6 Изучение кинетики высвобождения МеП из НЧ.....	83
3.2.7 Исследование стабильности МеП и МеП-НЧ в условиях окислительно-восстановительной реакции.....	85
3.2.8 Оценка гемолитической активности МеП-НЧ.....	87
3.3 Анализ полученных МеП-НЧ <i>in vitro</i>	88
3.3.1 Исследование цитотоксической активности МеП и МеП-НЧ.....	88
3.3.2 Анализ образования АФК, индуцированных МеП и МеП-НЧ.....	90
3.3.3 Оценка уровня окислительного стресса, индуцированного МнП и АК.....	91
3.3.4 Анализ фрагментации ДНК в условиях действия каталитической системы.....	93
3.3.5 Влияние каталитической системы МнП и АК на антиоксидантную систему защиты клеток.....	94
3.3.6 Анализ образования колоний в условиях действия каталитической системы.....	96
3.4 Оценка токсичности МеП и МеП-НЧ.....	97
3.5. Исследование противоопухолевых свойств каталитической системы МнП-НЧ и АК <i>in vivo</i>	98
3.6 Исследование биораспределения МнП-НЧ и МнП <i>in vivo</i> методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой.....	99
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	101
ВЫВОДЫ.....	102
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	103

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- 2FI – модель двухфакторного взаимодействия
- 3AT – 3-амино-1,2,4-триазол
- 4T1 – аденокарцинома молочной железы мыши
- АК – аскорбиновая кислота
- АФК – активные формы кислорода
- ГПР – глутатионпероксидаза
- ДДК – диэтилдитиокарбамат
- ДМСО – диметилсульфоксид
- ДРС – метод динамического светорассеяния
- ДСН – додецилсульфат натрия
- ДХФ – 2'-7'-дихлорфлуоресцеин
- ДХФН-ДА – 2'-7'-дихлородигидрофлуоресцеина диацетат
- ИПД – индекс полидисперсности
- Л – лиганд
- М – молекула
- МеП – металлопорфирины
- МЛ – комплекс молекулы и лиганда
- МН – мизонидазол
- МС-ИСП – метод масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой
- НЧ – наночастицы
- ОВР – окислительно-восстановительная реакция
- ОС – общее содержание лекарственного препарата в наночастицах
- ПАМАМ – полиамидамин
- ПВС – поливиниловый спирт
- ПМГК – сополимер молочной и гликолевой кислот
- ПЭГ – полиэтиленгликоль
- ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия
- РЧ – средний диаметр наночастиц
- СВ – степень включения лекарственного препарата в наночастицы
- СОД – супероксиддисмутаза
- ТЛЧ – твёрдые липидные частицы
- ТРО – торможение роста опухоли
- ТРП – тиоредоксинпероксидаза
- ТФ – Терафтал (натриевая соль 4,5-октакарбокситалоцианина кобальта)

УНТ – углеродные нанотрубки
УСПЖ – увеличение средней продолжительности жизни
ФДТ – фотодинамическая терапия
ФИТЦ – флуоресцеин-5-изотиоцианат
ФСБ – фосфатно-солевой буфер
ЦПЭ – цепь переноса электронов
ЭДТА – этилендиаминтетраацетат
ЭРС – метод электрофоретического рассеяния света
A549 – немелкоклеточная карцинома легкого человека
AsPC-1 – аденокарцинома поджелудочной железы человека
CaOV2 – аденокарцинома яичника человека
FeII – Fe^{III}Cl-тетрафенилпорфирин
Hbc7 – нормальные клетки поджелудочной железы человека
HeLa – карцинома шейки матки человека
IC50 – значения концентрации полумаксимального ингибирования
K562 – хронический миелогенный лейкоз человека
ka – константа скорости связывания
Ka – константа связывания
kd – константа скорости диссоциации
Kd – константа диссоциации
LD50 – полумлетальная доза
MCF-7 – аденокарцинома молочной железы человека
MDA-MB-231 – тройная негативная аденокарцинома молочной железы человека
MIA PaCa-2 – карцинома поджелудочной железы человека
MnII – Mn^{III}Cl-тетрафенилпорфирин
MnT4MpyP – Mn^{III}-тетраakis(N-метилпиридиний-4-ил)порфирина пентахлорид
MnTE-2-PyP⁵⁺ – Mn^{III}-мезотетраakis(N-этилпиридиний-2-ил)порфирин
MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺ – Mn^{III}-мезотетраakis(N-бутоксипиридиний-2-ил)порфирин
МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид
O/W –эмульсия по типу органический растворитель/водный раствор
PANC-1 – эпителиоидная карцинома протока поджелудочной железы человека
SK-OV-3 – аденокарцинома яичника человека
U937 – гистиоцитарная лимфома человека
W/O₁/O₂ –эмульсия по типу водный раствор/органический растворитель/органический растворитель

$W_1/O/W_2$ –эмульсия по типу водный раствор/органический растворитель/водный раствор

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Злокачественные новообразования являются одними из основных причин гибели населения в большинстве стран мира: по оценкам Всемирной Организации Здравоохранения, каждый год регистрируется около 10 миллионов смертельных случаев. В связи с чем, многими исследовательскими группами разрабатываются новые подходы к повышению эффективности препаратов для лечения опухолевых заболеваний.

Актуальной задачей является создание препаратов избирательного действия, а также разработка комбинаций цитотоксических препаратов для комплексного применения (полихимиотерапия), оптимизация протоколов применения химиотерапии и поиск новых свойств у существующих фармакологических средств с целью уменьшения побочных эффектов.

Все больше исследовательских работ посвящены изучению окислительно-восстановительных механизмов, участвующих в клеточной пролиферации и гибели опухолевых тканей. Повышенный интерес сопряжен с поиском новых эффективных препаратов, механизм действия которых основан на формировании активных форм кислорода (АФК). Известно, что увеличение уровня АФК в злокачественных новообразованиях приводит к окислительному стрессу в клетках и их последующей гибели.

Металлопорфирины (MeП) являются перспективными индукторами АФК, широко используются в качестве катализаторов реакций эпоксидирования, гидроксирования, фотоокисления и окисления [1]. В медицине MeП находят применение в качестве агентов для фотодинамической терапии (ФДТ), а также каталитической терапии – перспективного метода лечения опухолевых заболеваний, основанного на образовании АФК в результате взаимодействия MeП с субстратом окисления, например, аскорбиновой кислотой (АК). Стоит отметить, что высокая токсичность и сложность в применении ограничивают использование гидрофобных MeП в качестве объектов исследования. Однако, разработки последних лет в области доставки лекарственных средств открывают широкие возможности использования гидрофобных соединений, в том числе MeП, и представляют большую актуальность для создания новых препаратов на их основе. Преимуществом гидрофобных MeП является высокая цитотоксическая активность, вследствие чего требуются более низкие концентрации MeП.

Комплексы железа (III), марганца (III), кобальта (II), никеля (II) и мезо-тетрафенилпорфиринов являются эффективными катализаторами химических реакций, исследуются для применения в медицине и могут вступать в окислительно-восстановительную реакцию с АК [2-4]. В связи с чем, разработка каталитических систем на основе комплексов Mn (III), Fe (III), Co (II) и Ni (II) с мезо-тетрафенилпорфиринами представляется перспективным направлением в терапии опухолевых заболеваний.

Поскольку в водных средах растворимость выбранных MeП крайне низкая, требуется их солюбилизация. Один из методов улучшения солюбилизации – включение субстанции в наночастицы (НЧ). Данный подход дает дополнительное преимущество, поскольку использование частиц позволяет снизить неспецифическую токсичность, повысить биодоступность субстанций и селективность их накопления в тканях-мишенях за счет эффекта повышенной проницаемости и удержания. Сополимер молочной и гликолевой кислот (ПМГК) широко применяется в качестве носителя для создания систем доставки препаратов, поскольку он не вызывает аллергических реакций, разлагается на продукты, вовлеченные в метаболизм, биосовместим и обеспечивает пролонгированное высвобождение исследуемой субстанции в органе-мишени. ПМГК активно используется в составе лекарственных препаратов, представленных на мировом фармацевтическом рынке [5].

Данная работа посвящена разработке и оптимизации технологии получения MeП-содержащих ПМГК частиц с помощью методологии Бокса-Бенкена и исследованию их противоопухолевой активности. Включение MeП в ПМГК частицы способствует снижению неспецифической токсичности MeП и дозы вводимого вещества, а также может обеспечить применение наноформы MeП в комбинации с АК в каталитической терапии опухолевых заболеваний.

Стоит отметить, что в литературе представлены преимущественно исследования биологических свойств водорастворимых MeП, в то время как эффективность гидрофобных MeП изучена недостаточно [6-9]. Работы о включении гидрофобных MeП в ПМГК частицы также представлены недостаточно широко: Pt-порфирины включали в ПМГК для измерения уровня кислорода *in vitro* и применения в тераностике, ПМГК-НЧ, содержащие Zn-порфирин и In-порфирин, исследовали на цитотоксическую активность [10-14]. Таким образом, данные о разработке и получении полимерных частиц, содержащих гидрофобные MeП, разработке каталитической системы на их основе и изучении активности в отношении культур опухолевых клеток и на животных моделях представляются перспективными для дальнейшей реализации в лечении злокачественных новообразований.

Целью работы являлась разработка каталитических систем, состоящих из комбинации аскорбиновой кислоты и частиц, содержащих гидрофобные металлокомплексы мезо-тетрафенилпорфиринов, и исследование их биологической активности.

Для достижения цели работы поставлены следующие **задачи**:

1. Разработка и оптимизация методов получения полимерных частиц, содержащих гидрофобные металлокомплексы тетрафенилпорфиринов с Fe (III), Mn (III), Co (II), Ni (II).
2. Анализ физико-химических свойств полимерных частиц, содержащих

металлопорфирины, и оценка кинетики высвобождения металлопорфиринов из частиц.

3. Исследование биологической активности металлопорфиринов и частиц, содержащих металлопорфирины, в комбинации с аскорбиновой кислотой *in vitro*.

4. Оценка противоопухолевых свойств наиболее эффективной каталитической системы, исследование биораспределения субстанции и частиц *in vivo*.

Научная новизна

Впервые разработаны и оптимизированы методы получения частиц на основе сополимера молочной и гликолевой кислот, содержащих комплексы Fe (III), Mn (III), Co (II), Ni (II) и мезо-тетрафенилпорфиринов. Обнаружены закономерности влияния параметров получения полимерных частиц (массового соотношения вещества к полимеру, концентрации стабилизатора дисперсии, соотношения органической и водной фаз) на конечные физико-химические характеристики. Сравнение оптимизированных методов получения частиц выявило диапазоны изменения параметров получения частиц, которые могут оказаться универсальными и использоваться для получения частиц с другими металлопорфиринами. Предложена стратегия оценки цитотоксической активности комбинации частиц, содержащих металлопорфирины, и аскорбиновой кислоты. Впервые показано, что частицы, содержащие комплексы мезо-тетрафенилпорфиринов с Fe (III), Mn (III), Ni (II), Co (II), в сочетании с аскорбиновой кислотой проявляют активность в отношении линий опухолевых клеток MCF-7, K562, HeLa, SK-OV-3. Продемонстрирована более высокая цитотоксическая активность комбинации частиц, содержащих Mn-мезо-тетрафенилпорфирин, и аскорбиновой кислоты по сравнению с другими исследуемыми каталитическими системами. Показано, что механизм действия комбинации частиц, содержащих Mn-мезо-тетрафенилпорфирин, и аскорбиновой кислоты основан на образовании активных форм кислорода, что приводит к апоптотическому типу гибели клеток линии MCF-7. Показано, что каталитическая система на основе аскорбиновой кислоты и частиц, содержащих Mn-мезо-тетрафенилпорфирин, эффективно ингибирует рост опухолевых клеток карциномы молочной железы линии 4T1 у мышей линии BALB/c.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты оптимизации методов получения частиц, содержащих комплексы мезо-тетрафенилпорфиринов с Fe (III), Mn (III), Ni (II), Co (II), могут послужить основой для разработки технологии получения и оптимизации полимерных частиц, содержащих металлопорфирины, для применения в диагностике и лечении различных заболеваний, в том числе злокачественных новообразований. В диссертационной работе продемонстрирована возможность использования комплексов мезо-тетрафенилпорфиринов с Fe (III), Mn (III), Ni (II), Co (II) и их полимерных форм в комбинации с аскорбиновой кислотой для применения в

противоопухолевой терапии. Методы определения цитотоксической активности, уровня активных форм кислорода и апоптоза после совместной инкубации аскорбиновой кислоты и частиц с металлопорфиринами могут быть использованы в качестве рекомендаций по оценке каталитической активности системы на основе полимерных частиц. Разработанные частицы, содержащие Mn-мезо-тетрафенилпорфирин, в присутствии аскорбиновой кислоты эффективно ингибировали рост опухолевых клеток карциномы молочной железы линии 4T1 у мышей линии BALB/c и в большей степени накапливались в опухолевой ткани, чем субстанция, поэтому могут быть рекомендованы для дальнейших исследований *in vivo* в качестве компонента для каталитической терапии.

Методология и методы исследования

Для решения поставленных задач в работе был использован комплекс химических, физико-химических и биологических методов исследования. Для получения частиц, содержащих металлопорфирины, использовали методы одинарного эмульгирования и преципитации. Характеризацию частиц проводили с использованием методов динамического рассеивания света, электрофоретического рассеивания света, спектрофотометрии, просвечивающей электронной микроскопии, ИК-спектроскопии. Для оценки активности каталитической системы применяли методы световой микроскопии, МТТ-тест, проточную цитофлуориметрию, TUNEL анализ. Противоопухолевую активность оценивали с использованием самок мышей линии BALB/c.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Варьирование параметров получения полимерных частиц, содержащих комплексы Fe (III), Mn (III), Co (II), Ni (II) и мезо-тетрафенилпорфиринов, позволяет получить частицы с высоким значением общего содержания вещества и низким размером частиц.
2. Включение Mn-мезо-тетрафенилпорфирина в полимерные частицы обеспечивает более эффективное формирование активных форм кислорода и высокую цитотоксическую активность металлопорфирина в комбинации с аскорбиновой кислотой.
3. Цитотоксический эффект комбинации аскорбиновой кислоты и частиц, содержащих Mn-мезо-тетрафенилпорфирин, достигается за счет образования активных форм кислорода, которые способствуют повреждению митохондрий и фрагментации ДНК, что приводит к гибели клетки посредством апоптоза.
4. Совместное использование комбинации аскорбиновой кислоты и полимерных частиц с Mn-мезо-тетрафенилпорфирином способствует эффективному торможению роста опухоли *in vivo*. Полученные частицы, содержащие Mn-мезо-тетрафенилпорфирин, демонстрировали более эффективное накопление в опухоли по сравнению с субстанцией.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием высокоточного оборудования, а также статистической обработкой полученных результатов. Результаты работы были доложены на IX Всероссийской научной молодежной школе-конференции «Химия, физика, биология: пути интеграции» (Москва, Россия 2022), Открытом конкурсе-конференции научно-исследовательских работ по химии элементоорганических соединений и полимеров «ИНЭОС OPEN CUP» (Москва, Россия 2021), SfRBM & MCW Redox Biology Symposium (Индианаполис, США 2021), 45th FEBS congress. «Molecules of Life: Towards New Horizons» (Любляна, Словения 2021), SfRBM 27th Annual Conference (Индианаполис, США 2020), V Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, Россия 2019), 43rd FEBS congress «Biochemistry forever» (Прага, Чешская Республика 2018), X Международной конференции молодых ученых по химии «Менделеев 2017» (Санкт-Петербург, Россия 2017), V Международной конференции «Супрамолекулярные системы на поверхности раздела» (Туапсе, Россия 2017), XX международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, Россия 2016), XIII международной молодежной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов 2016» (Москва, Россия 2016).

Публикации.

По материалам диссертационной работы опубликовано 5 статей в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Scopus/Web of Science, и 11 тезисов докладов на международных и российских конференциях.

Личный вклад автора

Автором был лично проведен комплекс работ по получению и оптимизации метода получения частиц, содержащих металлопорфирины, анализу их физико-химических характеристик. Разработана методика оценки общего содержания металлопорфиринов в частицах, а также их степени включения в частицы. Разработаны подходы к определению цитотоксической активности металлопорфиринов и частиц, содержащих металлопорфирины, в комбинации с аскорбиновой кислотой; проведению исследований с помощью проточной цитофлуориметрии; оценке окислительного стресса в клетках. Эксперименты *in vivo* выполнены при непосредственном участии автора. Автор вносил вклад в постановку задач исследования, планирование экспериментов и интерпретацию результатов исследования. На защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении которых роль соискателя была определяющей. Автор выполнял основную роль при оформлении текста, графического материала статей и их подаче в журнал.

Связь работы с государственными программами

Часть результатов получена в рамках гранта РФФИ (18-29-09022\20).

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 122 страницах машинописного текста, содержит 22 таблицы и 35 рисунков. Список литературы включает 249 ссылок.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Активные формы кислорода: источники и регуляция в клетках

АФК – это высокоактивные ионы и молекулы, являющиеся производными молекулярного кислорода (O_2) и регулирующие клеточный гомеостаз. Наибольшее физиологическое значение имеют гидроксил радикал ($\bullet OH$), супероксид анион ($O_2^{\bullet -}$), а также молекула пероксида водорода (H_2O_2). АФК образуются в различных компартментах клетки, включая мембрану, цитоплазму, эндоплазматический ретикулум, митохондрии и пероксисомы [15]. Супероксид анион, $O_2^{\bullet -}$ является одним из основных радикалов и может быть нейтрализован супероксиддисмутазой (СОД) с образованием H_2O_2 . Далее, в присутствии ионов Fe^{2+} или Cu^{2+} , пероксид водорода восстанавливается до $\bullet OH$ в реакции Фентона [16]. В то же время, к образованию гидроксил радикала может приводить реакция между супероксид анионом и пероксидом водорода. АФК обладают разными диффузионными способностями и активностью по отношению к молекулярным мишеням: гидроксил радикал обладает высокой реакционной активностью, но не способен диффундировать за пределы компартмента образования; $O_2^{\bullet -}$ высокоактивен, но ограниченно проникает через определенные каналы; пероксид водорода легко проникает через мембраны, что делает его идеальной сигнальной молекулой [16].

На образование АФК могут влиять ряд экзогенных и эндогенных факторов. Основным эндогенным источником АФК в большинстве тканей млекопитающих является дыхательная цепь переноса электронов (ЦПЭ). Преимущественно в комплексах I и III ЦПЭ происходит восстановление O_2 с образованием $O_2^{\bullet -}$, который может проникать в митохондриальное межмембранное пространство. Также известно, что $O_2^{\bullet -}$ образуется в комплексе II ЦПЭ и диффундирует в цитозоль через ионные каналы. Другими эндогенными источниками АФК являются ферменты НАДФН-оксидаза, ксантинооксидаза, липоксигеназа и цитохром P450 [16].

Семь известных ферментов семейства НАДФН оксидазы способны образовывать АФК: НАДФН оксидазы 1-5, двойные оксидазы 1 и 2. При активации НАДФН оксидаз 1-3 преимущественно образуется $O_2^{\bullet -}$, а НАДФН-оксидаза 4 и двойные оксидазы 1-2 напрямую продуцируют H_2O_2 . Известно, что в зависимости от компартмента клетки, НАДФН оксидазы могут выполнять ряд биологических функций, используя АФК [17]. В результате окисления гипоксантина ферментом ксантинооксидазой, в качестве побочных продуктов образуются АФК: в пероксисомах происходит преимущественное формирование супероксид аниона, дисмутирующего в присутствии ферментов в основной тип АФК пероксисом – H_2O_2 . Также $O_2^{\bullet -}$ может образовываться в результате окислительного фолдинга белков в эндоплазматическом ретикулуме. Ряд эндогенных факторов, например, радиация, ультрафиолетовое излучение, тяжелые металлы, загрязнители и т.д. также могут приводить к образованию АФК (рис. 1) [16].

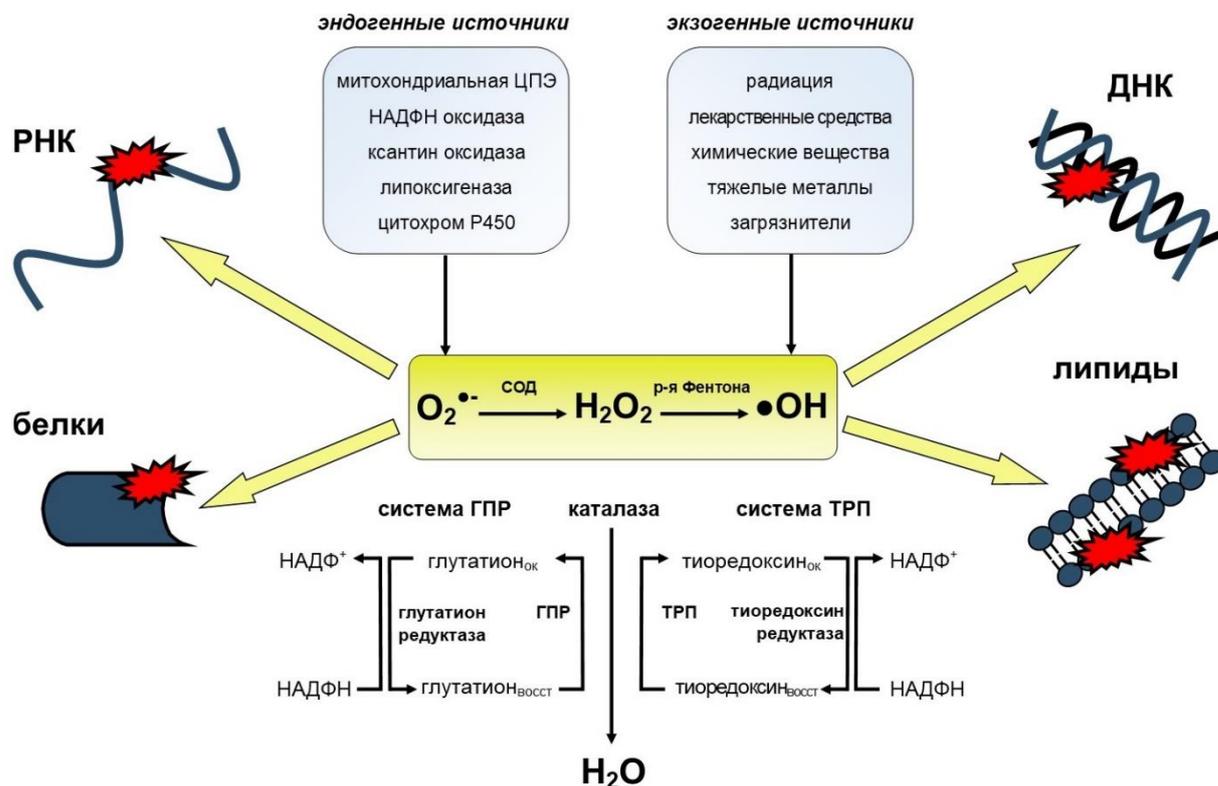


Рисунок 1. Источники АФК; инактивация АФК с помощью антиоксидантной системы защиты клеток и взаимодействие АФК с биомолекулами [16,20].

Баланс между образованием и инактивацией АФК имеет критическое значение, поскольку в низких концентрациях АФК способствуют клеточной пролиферации и выживаемости, а при концентрациях, превышающих физиологические, избыток АФК приводит к повреждению клеточных мембран и структурных белков [16,18]. В клетке окислительно-восстановительный баланс поддерживается за счет антиоксидантной системы. Такие системы делятся на ферментативные (СОД, каталаза, тиоредоксинпероксидаза (ТРП), глутатионпероксидаза (ГПР) и др.) и не ферментативные (АК, глутатион, липоевая кислота, α -токоферол и др.).

СОД, как было отмечено ранее, катализирует дисмутацию $O_2^{\bullet-}$ в пероксид водорода, который восстанавливается до H_2O с помощью системы ТРП/ГПР и каталазы. СОД, в зависимости от металлов, могут быть классифицированы на три группы: медь/цинк-содержащие (CuZn-СОД или СОД1), марганец-содержащие (Mn-СОД или СОД2) и внеклеточные медь/цинк-содержащие (CuZn-СОД или СОД3). Существует два основных класса каталаз: монофункциональные и каталазные пероксидазы. Ферменты каталазы локализуются преимущественно в пероксисомах и цитоплазме; незначительные уровни этих ферментов также могут находиться в митохондриальном матриксе [19].

Система ТРП состоит из двух доноров электронов и двух типов антиоксидантных ферментов: ТРП, тиоредоксин и НАДФН. В процессе метаболизма H_2O_2 происходит окисление

ТРП и его последующее восстановление до активной формы с участием тиоредоксина. Далее тиоредоксин восстанавливается под действием тиоредоксин редуктазы за счет энергии НАДФН. Также H_2O_2 может нейтрализоваться в реакции с глутатионом, катализируемой ГПР; окисленный глутатион восстанавливается с помощью глутатионредуктазы за счет НАДФН-зависимого восстановления (рис. 1) [16].

В некоторых случаях активность антиоксидантной защиты клеток может быть снижена, что приводит к избытку АФК и активации процесса перекисного окисления липидов, содержащих полиненасыщенные жирные кислоты. В результате происходит образование липопероксильных радикалов, реагирующих с липидами с образованием липидных радикалов и гидропероксидов липидов. Ввиду нестабильности, липидные радикалы образуют новые пероксильные и алкоксильные радикалы и разлагаются на вторичные продукты. Однако, некоторые продукты распада перекисного окисления, а именно, альдегиды: малоновый диальдегид, гексаналь, 4-гидроксиноненаль и акролеин – обладают высокой стабильностью и способны диффундировать через мембрану, приводя к повреждениям клетки [20].

Опухолевые клетки, в отличие от нормальных клеток, более резистентны к окислительному стрессу за счет избытка внутриклеточных АФК, поддерживаемого в результате высокой активности митохондрий и эндоплазматического ретикулума. Высокий уровень энергии клетки достигается за счет активного гликолиза. В некоторых случаях, опухолевые клетки получают энергию посредством анаэробного гликолиза с образованием молочной кислоты, адаптируясь, тем самым, к условиям гипоксии и уменьшая повреждение митохондрий [20]. Таким образом, АФК играют важнейшую роль в развитии опухолевой ткани, её образовании, пролиферации и метастазировании. Значительное повышение внутриклеточного уровня АФК может привести к одно- и двухцепочечным разрывам цепей ДНК, активации онкогенов, онкогенных сигналов и инактивации онкосупрессоров [20].

1.2 Окислительный стресс как метод лечения опухолевых заболеваний

Несмотря на значительный прогресс в лечении опухолевых заболеваний, использование многих современных препаратов по-прежнему сопряжено с нежелательными последствиями для пациента [21]. Более того, длительное использование лекарственных средств часто способствует развитию резистентности опухолевых клеток. В последнее время возможности использования АФК в противоопухолевой терапии привлекают все больший исследовательский интерес. Повышение внутриклеточного уровня АФК за счет использования каталитически активных веществ, может открыть новые перспективы в лечении злокачественных новообразований с лекарственной устойчивостью.

В настоящее время уже существуют методы лечения опухолевых заболеваний, основанные на образовании АФК, а также исследуются возможности применения новых молекул для индукции окислительного стресса. Например, механизмы противоопухолевого действия ФДТ и ультразвуковой терапии основаны на образовании АФК. Для ФДТ требуется 3 компонента: фотосенсибилизатор, кислород и источник света. При облучении фотосенсибилизатора происходит его переход из основного в возбужденное состояние, сопровождающееся конверсией кислорода в свободные радикалы, которые могут индуцировать гибель опухолевых клеток посредством трех возможных механизмов: (1) индукция апоптоза, некроза или ферроптоза; (2) нарушение ангиогенеза опухоли и возникновение гипоксии; (3) формирование противоопухолевого иммунного ответа [22]. Развитие исследований в области ФДТ и индукции АФК, привело к появлению нового метода лечения опухолевых заболеваний – ультразвуковой терапии, использующей ультразвук низкой интенсивности и ультразвуковой сенсибилизатор. Недавние исследования показали, что активация ультразвукового сенсибилизатора способствует снижению мембранного потенциала митохондрий и активации апоптотического процесса [23].

Несмотря на ряд побочных эффектов, химиотерапия по-прежнему остается одним из наиболее используемых методов лечения злокачественных новообразований. Согласно литературным данным, некоторые цитотоксические препараты способны стимулировать образование АФК или ингибировать систему антиоксидантной защиты клеток, активируя сигнальные пути программируемой клеточной гибели. Известно, что низкомолекулярные ингибиторы (акситиниб, сорафениб, гефитиниб и др.) способны индуцировать образование АФК, а моноклональное антитело цетуксимаб снижает уровень глутатиона, что приводит к повышению АФК; так, комбинация гефитиниба и салиномицина стимулирует снижение мембранного потенциала митохондрий и дестабилизацию лизосом [23].

В последнее время находится все больше подтверждений влияния АФК на резистентность опухолевых клеток. Как известно, Р-гликопротеины или белки множественной лекарственной устойчивости группы 1 – играют большую роль в выведении лекарственного препарата из клетки и снижении его терапевтического действия. Поэтому ингибирование Р-гликопротеинов представляет большой интерес в качестве стратегии преодоления множественной лекарственной устойчивости опухоли. Недавние исследования показали, что низкий уровень АФК повышает экспрессию Р-гликопротеина в клетках колоректальной карциномы человека, а повышенный уровень АФК, напротив, ингибирует его экспрессию. Таким образом, было предположено, что АФК способны регулировать экспрессию Р-гликопротеина и резистентность опухолевых клеток к лекарственным средствам. Тем не менее, механизм регулирования Р-гликопротеина посредством АФК остается неясным и требует более детального изучения [23].

Таким образом, разработка новых препаратов, образующих АФК, и способных преодолевать множественную лекарственную устойчивость, является перспективной стратегией для лечения опухолевых заболеваний. Для повышения уровня АФК могут быть использованы препараты, напрямую формирующие АФК или ингибирующие систему антиоксидантной защиты, а также их комбинации.

1.3 Каталитическая терапия

В 1976 году появились данные о противоопухолевой активности АК, а в 1988 году стало известно, что она легко окисляется в присутствии каталитических металлов [24-26]. Впоследствии было показано, что $O_2^{\bullet-}$, образующийся в результате каталитической реакции, нарушает баланс окислительно-восстановительной системы и повреждает ДНК опухолевых клеток [27]. Так появилось направление лечения опухолевых заболеваний на основе АФК, формирующихся в ходе окисления АК и получившее название – каталитическая терапия (рис. 2).

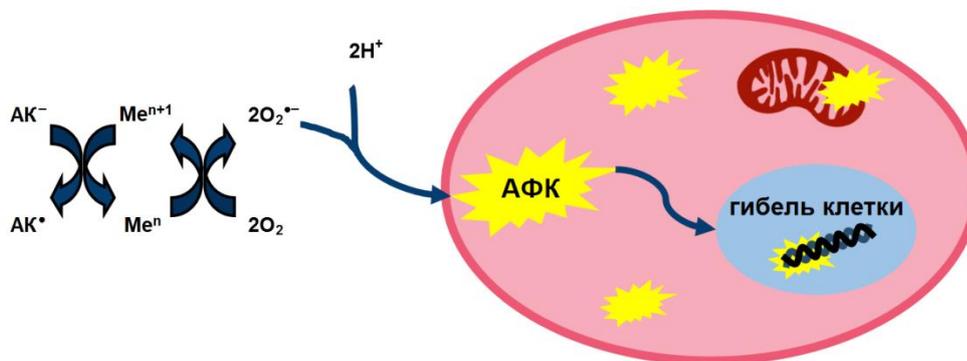


Рисунок 2. Схема индукции гибели опухолевой клетки в условиях проведения каталитической терапии [27].

Выбор окислителя АК играет важную роль в противоопухолевой активности каталитической системы. Комплексы порфиринового и фталоцианинового ряда являются наиболее исследуемыми катализаторами для данной терапии, поскольку MeП являются важнейшими участниками процессов дыхания и обмена веществ в живых организмах. Каталитические свойства MeП обуславливают их широкое применение в медицине (ФДТ, ультразвуковой терапии, тераностике, визуализации и т.д.) [28].

Исследовательский интерес к MeП появился после открытия двух важных MeП в природе: хлорофилла (1817 г.) и гема (1830 г.) [28,29]. На сегодняшний день известно несколько природных MeП, содержащих различные металлы: железо (гем, цитохром P450), магний (хлорофилл), кобальт (витамин B12), медь (турацин), никель (коэнзим F430), комплексы порфиринов с никелем и ванадием обнаружены в нефти (рис. 3) [30-34]. Наличие координационной полости в порфиринах (рис. 3а), ограниченной атомами азота, способствует получению металлокомплексов порфиринов [35].

На сегодняшний день область применения MeП в медицине значительно расширяется: полимерные волокна, содержащие FeCl-тетрафенилпорфирин (FeП), обладают антибактериальными свойствами и могут использоваться в качестве ранозаживляющего материала [36]; CoCl-протопорфирин IX способен повышать экспрессию гем оксигеназы-1, запускающей каскад сигнальных путей, приводящих к ингибированию репликации вируса гриппа [37].

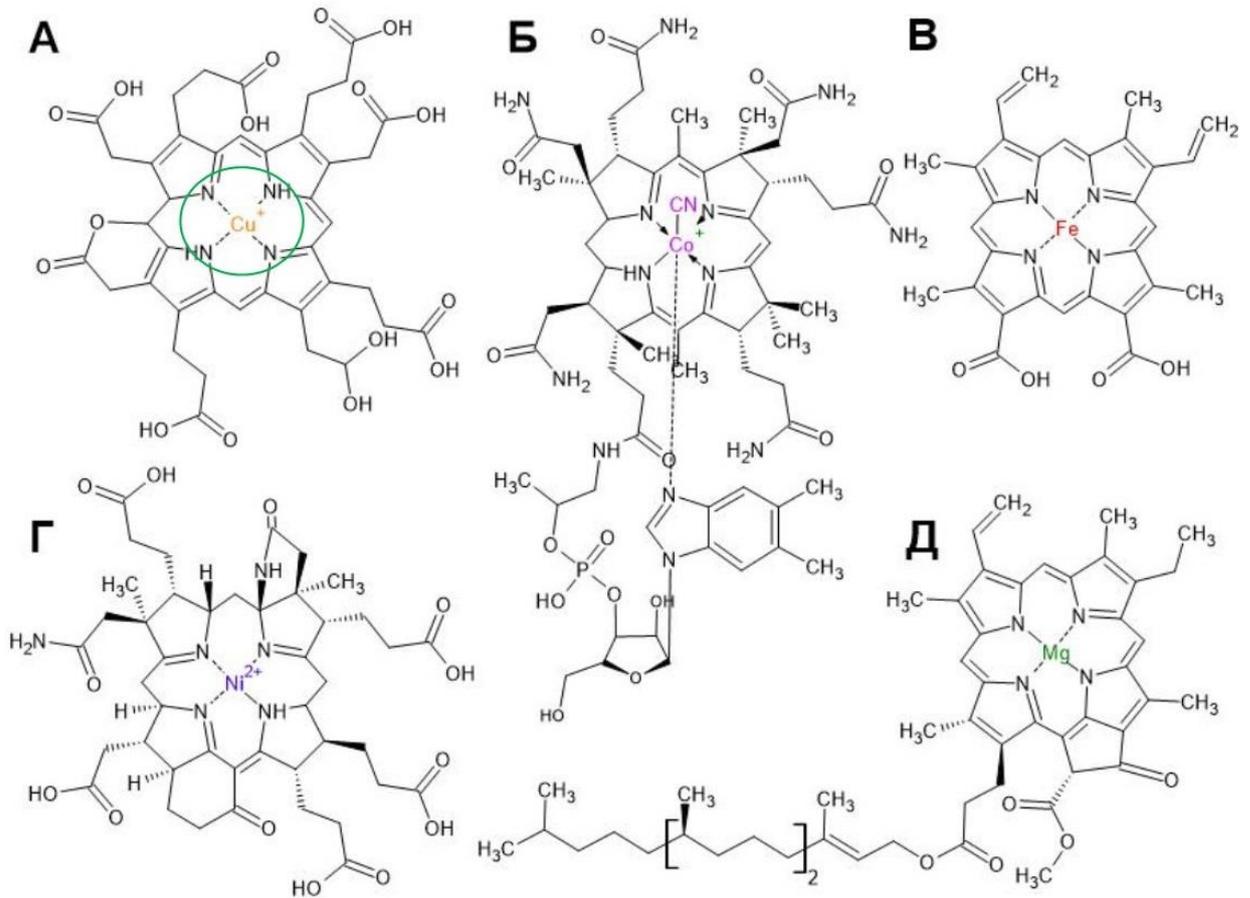


Рисунок 3. Структурные формулы природных металлопорфиринов: турацин (а), витамин В12 (б), гем (в), коэнзим F430 (г) и хлорофилл а (д).

Большинство MeП, исследуемых в рамках каталитической терапии, находятся на стадии клинических испытаний. Например, Mn^{III} -мезотетракис(N-этилпиридиний-2-ил)порфирин ($MnTE-2-PyP^{5+}$, VMX-010), исследуют на наличие терапевтического потенциала в отношении розацеи (NCT03756389) и угревой сыпи (NCT03752242) [38,39].

Tomasyan и коллеги показали, что ОВР между $MnTE-2-PyP^{5+}$ и АК способствует цитотоксической активности комбинации в отношении опухолевых клеток молочной железы линий 4T1 (аденокарцинома молочной железы мыши), MDA-MB-231 (тройная негативная аденокарцинома молочной железы человека), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека) [9,40-42]. Исследования *in vivo* на модели 4T1 показали, что применение

каталитической системы в значительной степени тормозит рост опухолей [6,7,43]. Также было показано, что использование комбинации каталитической и лучевой терапии позволяет повысить уровень АФК и чувствительность клеток к радиотерапии [6,].

Еще одно производное Mn-порфирина – Mn^{III}-мезотетраakis(N-n-бутоксиэтилпиридиний-2-ил)порфирин (MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺, VMX-001) также находится на различных стадиях клинических исследований в качестве радиосенсибилизатора, радиопротектора и противоопухолевого препарата. Наличие антиоксидантной активности MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺ в нормальных тканях и способности к образованию окислительного стресса в опухолевых клетках, обуславливает его изучение в качестве радиопротектора при лечении глиобластомы (NCT02655601), множественных метастазов мозга (NCT03608020), рака анального канала (NCT03386500) [43]. Считается, что дуализм действия MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺ определяется разной концентрацией АФК в нормальных и опухолевых тканях [6-8]. Было показано, что MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺ является эффективным катализатором окисления АК. Комбинация MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺/АК способна формировать АФК, как при воздействии свободного MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺ так и в сочетании с лучевой или химиотерапией. Стоит отметить, что присутствие эндогенной АК снижает образование АФК по сравнению с экзогенной АК. Так, было показано, что ОВР между MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺ и АК происходит преимущественно во внеклеточном пространстве. Образующиеся АФК попадают в клетку и активируют каскад сигнальных путей, приводящих к гибели клеток [6-9]. Также внимание исследователей привлекают исследования эффективности MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺/АК в комбинации с различными цитостатическими препаратами: применение карбоплатина или паклитаксела с MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺/АК нарушало процесс деления клеток линии HOC7 (серозная аденокарцинома яичника человека) и клеток линии SAOV2 (аденокарцинома яичника человека) путем подавления экспрессии регуляторного белка Bcl-2 [44].

Исследования противоопухолевого действия комбинации АК и Mn-тетраakis(N-метилпиридиния-4-ил)порфирина пентахлорида (MnT4MPyP) показали, что комбинированное применение MnT4MPyP/АК и лучевой терапии улучшало противоопухолевую эффективность используемой системы в отношении клеток линий MIA PaCa-2 (карцинома поджелудочной железы человека), AsPC-1 (аденокарцинома поджелудочной железы человека), PANC-1 (эпителиоидная карцинома протока поджелудочной железы человека). В то же время, лечение не оказывало влияния на нормальные клетки поджелудочной железы человека H6c7 [45,46]. Сходным образом, комбинация MnT4MPyP/АК и гемцитабина улучшала активность цитостатического препарата *in vitro* и *in vivo* за счет образования разрывов двухцепочечной ДНК, не оказывая, при этом, токсического действия на нормальные ткани [47].

Также стоит отметить металлокомплекс кобальта – натриевую соль 4,5-карбокситаллоцианина кобальта, «Терафтал» (ТФ) [48]. Каталитическая система на основе АК и ТФ не прошла II стадию клинических испытаний, однако, исследователи разрабатывают стратегии, позволяющие повысить терапевтическую эффективность данной каталитической системы и расширить области применения [49]. Совместное использование ингибитора каталазы (3-аминотриазола) и ТФ/АК повышает цитотоксическую активность ТФ/АК в 2 раза и индуцирует окислительный стресс в клетках линии K562/4 (хронический миелогенный лейкоз человека устойчивый к доксорубину) [49]. В некоторых случаях комбинация ТФ/АК способна повышать чувствительность клеток K562/4 к цитостатическим препаратам, не являясь при этом ингибитором Р-гликопротеина. Кроме того, существуют данные, свидетельствующие о влиянии комбинации ТФ/АК на экспрессию гем-оксигеназы-1 и ферритина в клетках линии U937 (гистиоцитарная лимфома человека) [50,51].

На сегодняшний день возможности применения МеП в медицине не ограничиваются лечением заболеваний: Au-полимерные частицы (НЧ), содержащие MnCl-тетрафенилпорфирин (МнП), исследуются для определения концентрации АК в крови пациентов: система МнП-Au-НЧ позволяет детектировать АК в диапазоне концентраций $2,6 \cdot 10^{-6} \div 4,38 \cdot 10^{-5}$ М [52]. Данный анализ может использоваться для диагностики диабета, злокачественных новообразований и заболеваний печени или коронарных артерий.

Таким образом, физико-химические свойства отдельных МеП определяют их применение в каталитической терапии. МеП/АК отдельно и в сочетании с другими методами лечения проявляют синергизм и увеличивают противоопухолевую активность *in vitro* и *in vivo*. Основным преимуществом системы МеП/АК является двойственный эффект в отношении злокачественных опухолей и нормальных тканей, что приводит к предотвращению повреждения здоровых клеток и избирательной гибели опухолевых клеток. Однако, ввиду преимущественной гидрофобности порфиринового кольца, некоторые порфирины, обладающие высокой терапевтической активностью, агрегируют в водных растворах за счет образования «сэндвичевых» структур, что ограничивает их применение в медицине [53].

2.1 Нанотехнологии в медицине

Нанотехнологии с успехом используются в различных областях знаний [54]. В медицине чаще всего наноразмерные объекты исследуются для лечения сердечно-сосудистых и опухолевых заболеваний в качестве систем доставки лекарственных веществ, поскольку они способны свободно циркулировать в организме человека по сравнению с более крупными частицами [55]. Такие частицы обладают уникальными структурными, химическими, механическими, магнитными, электрическими и биологическими свойствами. Прогресс

последних лет в использовании систем доставки на основе различных материалов, позволил нивелировать недостатки применения как традиционных, так и новых лекарственных препаратов и повысить их терапевтическую эффективность [56]. Так, включение гидрофобного препарата в наночастицы позволяет решить проблему растворимости, низкой биодоступности, значительно повысить время циркуляции в организме и снизить побочные эффекты [54].

2.2 Нанотехнологии для терапии опухолевых заболеваний

Использование пассивного или активного нацеливания на органы и клетки-мишени позволяет повысить внутриклеточную концентрацию лекарственного вещества, не оказывая при этом значительного влияния на нормальные ткани. Поскольку лекарственные препараты попадают в клетку преимущественно путем пассивной диффузии, часть препарата может выводиться обратно во внеклеточную среду. Включение вещества в наноразмерные частицы способствует повышению его накопления в клетках-мишенях за счет других путей интернализации: клатрин- и кавеолин-зависимого эндоцитоза, макропиноцитоза и др. (рис. 4) [57].

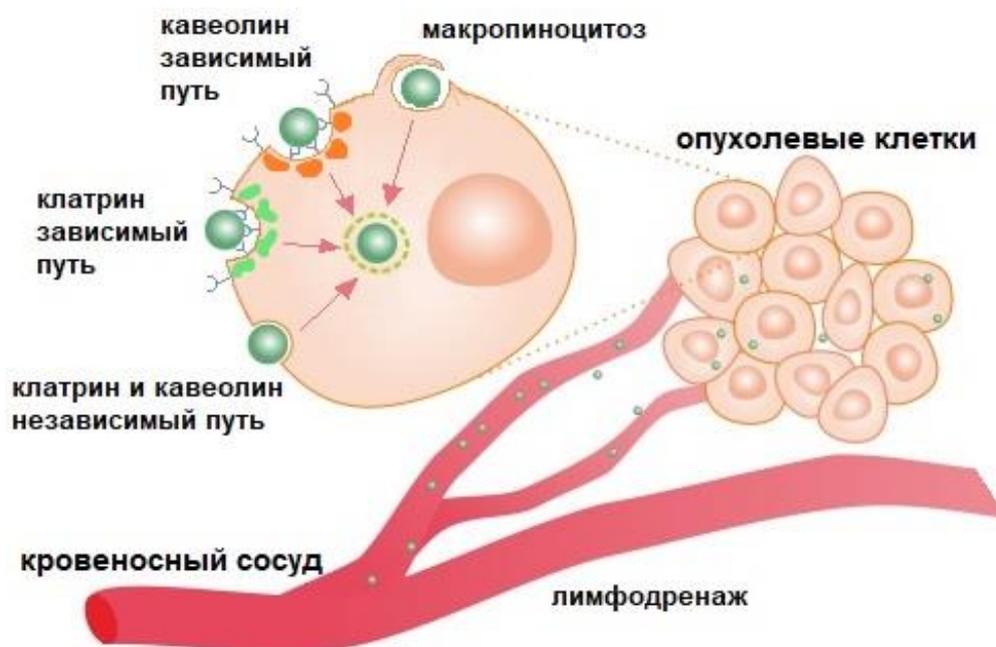


Рисунок 4. Пассивное нацеливание НЧ в опухолевых тканях за счет эффекта повышенной проницаемости и удержания; способы преодоления наночастицами мембраны опухолевых клеток. НЧ попадают в места опухолевых локализаций за счет повышенной проницаемости сосудов и длительное время остаются в опухолевых тканях из-за отсутствия оттока лимфы [59].

При определенных условиях (воспаление или гипоксия, типичные для опухолевых тканей), эндотелий кровеносных сосудов становится более проницаемым за счет стимуляции роста эндотелиальной сети опухолевыми клетками (рис. 4). Неплотные межклеточные контакты новообразованной эндотелиальной сети способствуют повышенной проницаемости для молекул

более 40 кДа и наноразмерных частиц, а отсутствие нормального лимфодренажа опухолевых тканей способствует их удержанию. Данное явление описывают как эффект повышенной проницаемости и удержания, который является основой пассивного нацеливания наноразмерных систем доставки противоопухолевых препаратов. Таким образом, включение низкомолекулярных лекарственных субстанций в субмикронные частицы приводит к увеличению продолжительности периода полувыведения, обеспечивает селективное накопление в опухолевых тканях и уменьшает побочные эффекты. Процесс доставки лекарственных средств с помощью пассивного нацеливания зависит от нескольких факторов: характеристик частиц (размера, поверхностной модификации) и свойств опухоли (ангиогенез, наличие метастазов, анатомической локализации и т.д.) [58].

Размер частиц (РЧ) важен для достижения эффекта проницаемости и удержания в опухолевых тканях, поскольку размер пор опухолевых сосудов находится в диапазоне 200-800 нм. Существуют данные о том, что частицы с размерами менее 6 нм чаще подвержены выведению почками, а более крупные частицы (более 500 нм) эффективнее фагоцитируются макрофагами [58]. Таким образом, оптимальный средний диаметр частиц должен быть в диапазоне 20-400 нм.

2.3 Основные типы наноразмерных систем доставки MeП

На сегодняшний день разработан ряд наноразмерных систем доставки с различными формами (сферы, палочки, трубки и др.), которые позволяют контролировать распределение частиц в организме и их диффузию.

Частицы могут быть получены из различных материалов, таких как липиды, синтетические полимеры, белки, металлы или полупроводники [60]. Выделяют три основные категории: органические частицы (липосомы, дендримеры, полимерные частицы, мицеллы, твёрдые липидные частицы), неорганические частицы (частицы из оксида железа, золотые, керамические, полупроводниковые кристаллы, углеродные трубки) и гибридные частицы (синтезируются из двух или более типов материалов, обычно содержат полимерное или металлическое ядро, покрытое одним или несколькими липидными слоями для повышения биосовместимости системы) (рис. 5) [58].

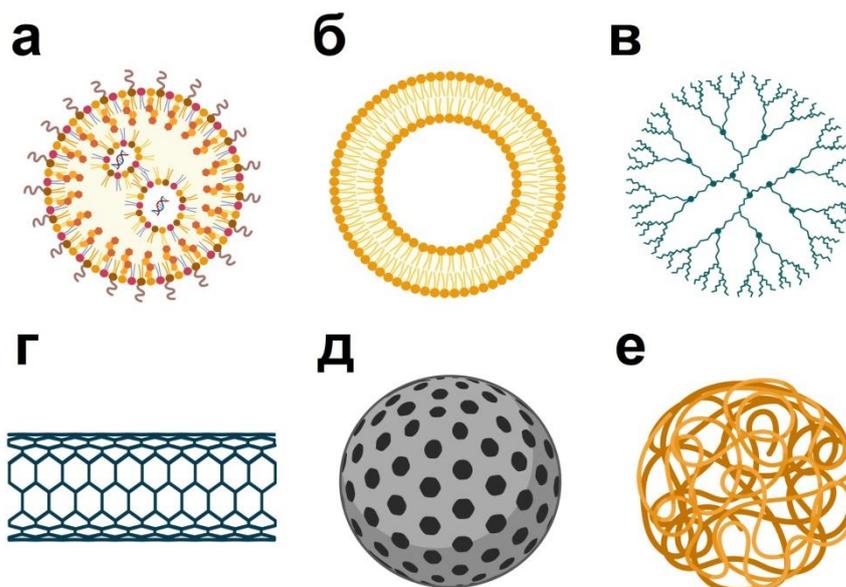


Рисунок 5. Схематическое изображение основных типов частиц: твёрдые липидные частицы (а); липосомы (б); дендримеры (в); углеродные нанотрубки (г); частицы из диоксида кремния (д); полимерные частицы (е).

2.3.1 Твёрдые липидные частицы

Твёрдые липидные наночастицы (ТЛН) представляют собой коллоидные носители размером 50-1000 нм, которые получают методом диспергирования расплавленных твердых липидов в воде с эмульгатором [61,62]. Широкий ряд твердых липидов, включая моно-, ди-, триглицериды; жирные кислоты; жирные спирты; воска и стероиды используется для получения ТЛН [63]. В зависимости от состава ТЛН, лекарственный препарат может быть диспергирован в липидную матрицу, включен в оболочку, окружающую липидный центр или в липидный слой, покрывающий оболочку. Применение ТЛН позволяет снизить побочные эффекты препарата, улучшить его распределение в тканях и биодоступность [64,65].

ТЛН находят широкое применение в качестве систем доставки фотосенсибилизаторов на основе порфиринов, фталоцианинов и хлоринов: Goto и коллеги получали ТЛН, содержащие хлорид фталоцианина алюминия, для увеличения стабильности и активности фотосенсибилизатора в отношении опухолевых клеток меланомы мыши В16-F10 [66]; Navarro с коллегами повышали фототоксический эффект мезо-тетрагидроксибензилхлорина в опухолевых клетках молочной железы [67]. Yeо и соавторы получали ТЛН, содержащие фотосенсибилизатор класса хлоринов – Пурпурин-18, с целью повышения терапевтической эффективности и биодоступности Пурпурина-18. Разработанные НЧ демонстрировали значительную фотоактивность в отношении клеток линий HeLa и A549 и отсутствие темновой токсичности [68].

Таким образом, широкий выбор составных компонентов ТЛН и перспективы получения ТЛН как в лабораторных, так и в промышленных масштабах, делают ТЛН перспективными

системами доставки лекарственных препаратов [69]. Однако, применение ТЛН может быть осложнено повышенной склонностью к агрегации ТЛН после процесса высушивания и быстрым высвобождением лекарственного препарата из ТЛН [70].

2.3.2 Липосомы

За последние 70 лет липосомы стали важным инструментом в биологических исследованиях и медицине, особенно в качестве системы доставки противоопухолевых препаратов [71]. Липосомы – это сферические фосфолипидные бислоиные структуры, состоящие из водного ядра, покрытого одной или несколькими липидными оболочками из природных или синтетических полярных липидов [72]. Благодаря биоразлагаемости и биосовместимости, липосомы находят широкое применение в качестве систем доставки различных биоактивных соединений: лекарственных препаратов, вакцин, косметических средств или пищевых добавок [73]. Липосомы удобны тем, что способны включать как гидрофобные, так и гидрофильные субстанции, что обуславливает их использование для получения биомедицинских препаратов. Для повышения стабильности и времени циркуляции используются стерически стабилизированные липосомы, на поверхности которых экспонированы гибкие полярные полимеры, чаще всего полиэтиленгликоль (ПЭГ) [65].

В настоящее время возрос интерес к включению порфиринов в липосомы для повышения их селективности и биодоступности, о чем свидетельствует ряд работ, посвященных фотоиндуцированным липосомальным системам доставки порфиринов к опухолевым тканям. Данные системы могут быть классифицированы по двум группам: высвобождение вещества в результате фотохимической реакции между липидным бислоем и порфирином; фотохимическая реакция в конъюгатах порфиринов и липосом [74]. К первой группе относят исследования Rwei и соавторов, которые разработали липосомы, активируемые инфракрасным излучением, содержащие фталоцианин (1,4,8,11,15,18,22,25-октабутоксифталоцианинопалладий (II)) и тетродотоксин для местной анестезии; Spring и коллеги получали фотоактивные мультиингибиторные системы, состоящие из ПМГК-ПЭГ наночастиц, содержащих мультикиназный ингибитор – кабозантиниб, покрытых липидным бислоем, легированным фотоактивным вертепорфином [74]. Вторая группа представляется перспективной в качестве multifunctionальной системы доставки лекарственных средств, поскольку может сочетать ФДТ, фототермическую терапию или визуализацию: Liang и коллеги получили самособираемые гибридные структуры на основе конъюгата порфирина и органоалкоксисилилированных липидов с двумя триэтоксисилильными группами для доставки кальцеина, а Riske и соавторы получили самособираемые частицы из конъюгатов протопорфирина IX и димиристоил-фосфатидилэтаноламина [74].

Исходя из результатов исследований, представленных выше, можно отметить, что липосомы обладают большим потенциалом для широкого клинического применения, поскольку они биосовместимы, а их метаболизм в организме хорошо изучен [75]. Однако, несмотря на очевидные преимущества липосом, их недостаточная стабильность при хранении и в условиях *in vivo*, вероятно, обусловленная окислением липидов, гидролизом, потерей биологически активного вещества и распадом липосом, может ограничивать их применение [76].

2.3.3 Дендримеры

Дендримеры представляют собой макромолекулы с большим числом терминальных ветвей, исходящих от центральной части молекулы, состоящих из натуральных или синтетических компонентов, включающих сахара, нуклеотиды и аминокислоты [77]. Ступенчатый синтез дендримеров обеспечивает получение макромолекул с заданным размером, молекулярным весом и количеством терминальных групп. Дендримеры широко применяются в качестве носителей для доставки лекарственных средств за счет следующих характеристик: сферическая форма, монодисперсное распределение в диапазоне 1.5-14.5 нм и возможность модификации поверхности векторными молекулами или лекарственными препаратами за счет большого количества терминальных групп [78]. Уникальные физико-химические свойства дендримеров позволяют провести конъюгацию лекарственного средства с поверхностью дендримеров за счет образования ковалентных связей или включением препарата во внутреннюю полость за счет водородных или гидрофобных взаимодействий [65].

Синтез дендримеров старших поколений и модификация их терминальных групп являются наиболее приоритетными направлениями в химии дендримеров. В литературе широко представлены исследования конъюгатов дендримеров старших поколений и MeP в качестве агентов для ФДТ и тераностики, поскольку известно, что аминогруппы дендримеров способны координироваться с ионами металлов в MeP и распределять MeP по всей поверхности дендримеров, приводя к повышению фототоксичности макромолекул [79,80]. Чаще всего исследуются конъюгаты с хлорином еб и дендримерами 3-5 поколений. Показано, что использование конъюгатов способствует снижению токсичности дендримера, а также повышению уровня синглетного кислорода и фототоксичности в отношении клеток линии HeLa [81]; для повышения чувствительности к ФДТ опухолевых клеток, находящихся в состоянии гипоксии, конъюгаты дендримера и хлорина еб, совместно с 30% масс. пероксидом водорода, включали в амфифильный сополимер, что привело к увеличению локализации НЧ в опухолевых тканях *in vivo* на модели опухоли поджелудочной железы ВхРС-3 по сравнению с ненагруженными дендримерами и снижению уровня гипоксии в опухолевых клетках [82]. В последнее время также особое внимание уделяется дендримерам, содержащим MeP в ядре,

поскольку данные макромолекулы объединяют в себе фотоактивные свойства и универсальность для применения в терапии и диагностике. Подобные структуры в ближайшем будущем смогут найти применение в качестве полупроводников, тераностических агентов, агентов для ФДТ и др. [83,84]. На сегодняшний день активно исследуются дендримеры, содержащие 1,3,5,8-тетраметил-2,4-дивинил-6,7-дипропионовокислый порфин или протопорфирин IX: подобная система обладала большей фотоактивностью в клетках линии HeLa по сравнению со свободным порфирином, эффективно стимулировала образование АФК и последующий апоптоз [85]; также было показано, что включение протопорфирина IX в дендримеры в 2 раза повышает накопление фотосенсибилизатора в клетках линии глиобластомы человека U-87 MG, в частности, в эндоллизосомальном компартменте [86]. Также нередко используют совместное включение фотосенсибилизатора и противоопухолевых препаратов: гематопорфирин и гефитиниб включали в дендримеры, чтобы с помощью ФДТ повысить чувствительность клеток немелкоклеточной карциномы легкого человека H1975 к гефитинибу. Разработанная система накапливалась в лизосомах в течение 2 ч и образовывала АФК, приводящие к окислительному стрессу и апоптозу [87].

Таким образом, физико-химические свойства дендримеров и их способность к преодолению биологических мембран, обуславливают их использование в разработке пролекарств и систем доставки различных препаратов [88]. Тем не менее, наличие избыточного положительного заряда на поверхности дендримеров старших поколений может способствовать их значительному накоплению в фагоцитирующих клетках и нормальных тканях, а также быстрому выведению из кровотока, что ограничивает применение дендримеров в медицине [89,90].

2.3.4 Углеродные нанотрубки

Углеродные нанотрубки (УНТ) представляют собой наноразмерные полые трубчатые молекулы из атомов углерода, образующиеся за счет сворачивания листов графена в трубчатые структуры [91]. УНТ обладают особыми физико-химическими характеристиками: цилиндрическая форма, полая монолитная структура, высокое соотношение длины и диаметра (200:1), большая площадь поверхности, механическая прочность и возможность модификации [92]. Цилиндрическая форма способствует проникновению УНТ в клетку посредством эндоцитоза [93].

УНТ находят применение в получении нанозондов, датчиков, полупроводниковых устройств, средств хранения энергии и т.д. [94]. В медицине УНТ используются в качестве средств доставки лекарственных препаратов, при имплантации тканей и малоинвазивных методах лечения [95].

Получение конъюгатов УНТ и MeP представляет особый интерес в связи с возможностью повышения стабильности триплетного состояния фотосенсибилизатора за счет переноса заряда с возбужденного MeP на УНТ. Так, конъюгаты, состоящие из хлорина е6, УНТ и гиалуроновой кислоты, демонстрируют значительный фотодинамический эффект на клетках меланомы мыши В16/F10 и повышенное накопление в клетках меланомы за счет трансдермальной системы доставки фотосенсибилизатора [96]; увеличивают фототоксичность хлорина е6 в результате повышения его биодоступности и изменения пути поглощения клетками линии Сасо-2 (аденокарцинома толстого кишечника) по сравнению со свободным фотосенсибилизатором [97]. УНТ модифицируются MeP для улучшения терапевтических, термоэлектрических и фотоэлектрических свойств MeP [96-98]. Зачастую, чтобы увеличить стабильность конечного продукта, конъюгаты УНТ-MeP комбинируют с металл-органическими структурами [99].

УНТ имеют большой потенциал для применения в различных отраслях, однако, высокая проводимость и ограниченная растворимость в воде являются существенными ограничениями их использования в медицине [100].

2.3.5 Неорганические частицы

За последние десятилетия неорганические материалы продемонстрировали значительный потенциал в качестве носителей для системы доставки препаратов. Такие неорганические материалы позволяют включать и конъюгировать с поверхностью НЧ лекарственные вещества, обеспечивают стабильность НЧ в кровотоке и биосовместимость. Чаще всего для улучшения терапевтических свойств MeP используют частицы на основе диоксида кремния, оксида железа и золота [101].

Частицы на основе диоксида кремния применяются в биомедицине благодаря простому методу получения и доступности материала [102]. Структура, состоящая из ячеек с большим количеством пор, обеспечивает высокую полезную нагрузку лекарственного средства, а биосовместимость, термическая стабильность и способность включать гидрофобные и гидрофильные вещества, делают частицы диоксида кремния перспективными носителями для доставки лекарственных препаратов [103,104]. Возможность иммобилизации MeP на поверхность частиц диоксида кремния открывает новые возможности для применения MeP в ФДТ, тераностике, ультразвуковой терапии и диагностике опухолевых заболеваний [105]. Например, He и коллеги разработали модифицированные НЧ, содержащие протопорфирин IX для прямой двухфотонной ФДТ, и показали, что полученный комплекс успешно ингибирует рост клеток HeLa; Miao и соавторы улучшали солюбилизацию препарата Фотосан-II за счет его включения в частицы диоксида кремния, что привело к снижению агрегации фотосенсибилизатора, повышению уровня синглетного кислорода и фотодинамической активности системы в

отношении клеток холангиокарциномы человека QBC939 [106]; Youssef и коллеги получали конъюгат НЧ и хлорина еб, который продемонстрировал высокую интернализацию и фототоксичность на клетках U87 (глиобластома человека), а также способность повышать уровень гидроксил радикала и синглетного кислорода [107]. Также конъюгаты частиц на основе диоксида кремния и MeП исследуются для применения в антибактериальной терапии: Scanone и коллеги разработали покрытые диоксидом кремния магнитные частицы, конъюгированные с 5,10,15,20-тетракис(4-карбоксифенил) порфирином; Chanhom и исследователи получали многофункциональные частицы оксида титана-кремния-железа с адсорбированными порфиринами Mn^{II} , Fe^{III} , Cu^{II} , Zn^{II} ; Ferreira и соавторы получали конъюгаты порфиринов и магнитных частиц, покрытых диоксидом кремния и модифицированных ПЭГ [108-110].

Таким образом, благодаря большой удельной площади поверхности, регулируемому размеру пор и биосовместимости, частицы диоксида кремния используются в медицине, пищевых технологиях и сельском хозяйстве [111]. Однако, в последнее время появляется все больше работ, посвященных исследованию хромосомных повреждений, вызванных частицами диоксида кремния, что может ограничивать их применение в медицине [112].

Уникальные химические и физические свойства НЧ на основе золота обуславливают их применение в качестве систем доставки лекарственных препаратов. Размер НЧ на основе золота находится в диапазоне от 1 до 150 нм. Преимуществами таких НЧ является инертность, простота синтеза, возможность модификации поверхности, а также фотофизические свойства, обеспечивающие контролируемое высвобождение препарата из НЧ [113]. Частицы на основе золота широко используются для улучшения противоопухолевой активности фотосенсибилизаторов и визуализации опухолевых тканей, поскольку способствуют поглощению MeП клетками [114]: Feng и исследователи оценивали эффект НЧ, покрытых порфирином, на опухолевые клетки печени и выявили, что полученный комплекс обладал низкой цитотоксической активностью, высокой интенсивностью флуоресценции и интернализацией клетками, что свидетельствует о потенциале НЧ в качестве диагностического препарата [115]; Zeng и коллеги получали конъюгат мезо-тетракис(4-сульфонатофенил)порфирина и НЧ, который был менее токсичен по сравнению с порфирином и НЧ по отдельности, эффективно образовывал синглетный кислород и проявлял эффективность в отношении клеток фибробластов мыши линии L929 в составе гипертермической и фотодинамической терапии [116];

Тем не менее, недостатком использования НЧ на основе золота является их агрегация в физиологических условиях, а также токсичность, зависящая от размера и применяемой дозы [117].

Частицы оксида железа относятся к классу ферромагнитных материалов и используются в биомедицине и биоинженерии. Среди таких НЧ чаще всего выделяют магнетит (Fe_3O_4),

маггемит ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) и смешанные ферриты (MFe_2O_4 , где $\text{M}=\text{Co}$, Mn , Ni или Zn). Модификация поверхности НЧ обеспечивает их использование в магнитно-резонансной томографии, составе системы доставки лекарств, белков, антител и нуклеиновых кислот, а также для разделения биомолекул [118]. Широкое применение НЧ также находят в ФДТ и тераностике: Au-порфирин конъюгировали с НЧ и покрывали метоксиполиэтиленгликоль-тиолом, что позволило добиться магнитного нацеливания фотосенсибилизатора в клетки MCF-7 с помощью магнитного поля [119]; НЧ на основе оксида железа, покрытые хлорином еб, продемонстрировали значительную интернализацию препарата в опухолевые ткани, детектировались с помощью оптической визуализации и МРТ, а также способствовали замедлению роста аденокарциномы молочной железы мыши 4T1 *in vivo* [120]; также показано, что модификация НЧ хлорином еб способствует увеличению уровня АФК и гибели клеток гепатомы H22 после ультразвукового воздействия [121]. Однако существуют ограничения для применения НЧ на основе оксида железа в медицине: попадая в клетку, НЧ образуют АФК посредством реакции Фентона, т.е. использование НЧ может нарушить гомеостаз и сигнальные пути нормальных клеток. Для снижения побочных эффектов НЧ, их поверхность модифицируют дополнительными молекулами или используют дополнительные материалы для покрытия [122]. Также существуют данные о том, что НЧ на основе оксида железа могут накапливаться в печени, селезенке и лимфатических узлах через 24 ч после введения, поэтому систематическое введение препарата на основе таких НЧ может оказывать токсические эффекты [117].

Таким образом, неорганические НЧ представляют собой перспективные системы доставки лекарственных препаратов, однако, основным ограничением использования подобных НЧ является долгосрочная токсичность и недостаточно изученный механизм выведения НЧ из организма [123]. Также при получении таких НЧ следует учитывать размер НЧ, модификацию поверхности НЧ, путь введения НЧ и количество вводимого препарата [117].

2.3.6 Полимерные частицы

На протяжении последних десятилетий полимеры и материалы из них, такие как системы доставки, неизменно представляют большой интерес для ученых. Благодаря уникальным свойствам, НЧ активно исследуются для применения в различных областях биомедицины, в том числе и для доставки лекарственных препаратов [124,125]. Чаще всего полимерные НЧ получают из полимолочной кислоты, полигликолевой кислоты, ди- или три-блок сополимеров кислот, поликапролактона, сополимера N-(2-гидроксипропил) метакриламида, полиаспарагиновой кислоты и полиглутаминовой кислоты и др. НЧ на основе природных полимеров, таких как альбумин, альгинат, хитозан, коллаген, декстран, желатин и гепарин также находят широкое применение [126,127]. Помимо общих особенностей, характерных для всех носителей,

полимерные НЧ обеспечивают высокую стабильность при хранении и контролируемое высвобождение вещества из носителя [128].

Большое количество работ посвящено получению систем доставки на основе полимерных НЧ для различных видов противоопухолевой терапии: Deirram и коллеги получили pH-чувствительные НЧ на основе комбинации поли(этиленгликоль)-b-поли(2-(диэтиламино)этилметакрилата с сополимерами 2-(диэтиламино)этилметакрилата или 2-(диизопропиламино)этилметакрилата для повышения эффективности доставки лекарственных веществ к опухолевым клеткам для применения в химиотерапии [129]; Huang и соавторы синтезировали ПМГК-НЧ, модифицированные политаниновой кислотой, для преобразования света узкого спектра в тепловую энергию, активирующую дендритные клетки, для применения в комбинированной фототермической и иммунотерапии [130]; Jamali и коллеги синтезировали НЧ на основе 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтанолламин-N-[малеимид (полиэтиленгликоль)-2000], содержащие куркумин и конъюгированные с эпидермальным фактором роста, которые эффективно накапливались в клетках глиобластомы человека и обладали фототоксичностью для использования в ФДТ [131].

НЧ, содержащие MeP, также разрабатываются для оптимизации технологических процессов и детекции молекул: Xu и коллеги получали MeP-содержащие частицы на основе ПЭГ, чтобы повысить диспергируемость MeP в воде и перенести каталитическую реакцию из органического растворителя в водную фазу; Pandey и соавторы синтезировали гибридные НЧ на основе ПМГК-НЧ, содержащих Pt-порфирин и коэнкапсулированные в альгинатные микросферы вместе с глюкозооксидазой, для детекции глюкозы [132,133].

Таким образом, разработка полимерных НЧ является перспективным направлением для применения в различных областях химии и медицины. Физико-химические свойства полимеров делают их идеальными кандидатами для создания систем доставки противоопухолевых препаратов, вакцин и иммунотерапевтических препаратов [134].

2.4 Сополимер молочной и гликолевой кислот и его свойства

ПМГК является одним из наиболее применяемых полимерных материалов, поскольку он биосовместим и биоразлагаем. На его основе получают хирургические шовные нити, изделия для ортопедии и травматологии, а также системы доставки лекарственных средств (противоопухолевые препараты, антибиотики, антисептики, противовоспалительные и антиоксидантные средства) [135,136]. В водных средах *in vitro* и *in vivo*, сложноэфирные связи ПМГК расщепляются с образованием мономеров молочной и гликолевой кислот: *D*-молочная кислота выводится из организма в неизменном виде, *L*-молочная кислота метаболизируется в пируват и выводится в виде CO₂ и воды, а гликолевая кислота в неизменном виде выводится из

организма почками [135,136]. НЧ попадают в клетку посредством эндоцитоза и накапливаются в эндолизосомных компартментах с кислыми значениями рН. В некоторых случаях, физико-химические свойства НЧ способствуют преодолению частицами эндосомальных и лизосомальных мембран и попаданию в цитозоль, где происходит высвобождение препарата из НЧ [137,138].

Следует выделить основные типы механизмов высвобождения вещества из НЧ: диффузия препарата из объема частиц; эрозия полимерного носителя и набухание полимера (рис. 6). Диффузия – это наиболее распространенный механизм высвобождения вещества, зависящий от концентрации растворенного соединения в соответствии со вторым законом Фика. Эрозия, в значительной мере, зависит от кинетики деградации используемого полимера. При механизме набухания, полимер поглощает значительное количество воды, что приводит к повышению внутреннего давления, пористости и способствует высвобождению препарата во внешнюю среду [139]. Чаще всего выбор полимерного носителя и методика получения НЧ оказывают значительное влияние на механизм высвобождения лекарственного препарата.

Процесс биодеструкции ПМГК проходит в соответствии со следующими механизмами: проникновение воды внутрь частиц; гидролиз ПМГК; диффузия лекарственного вещества из полимерного носителя. По мере деградации ПМГК, происходит отделение мелких фрагментов и мономеров ПМГК от частиц и ускорение диффузии лекарственного средства во внешнюю среду [137].

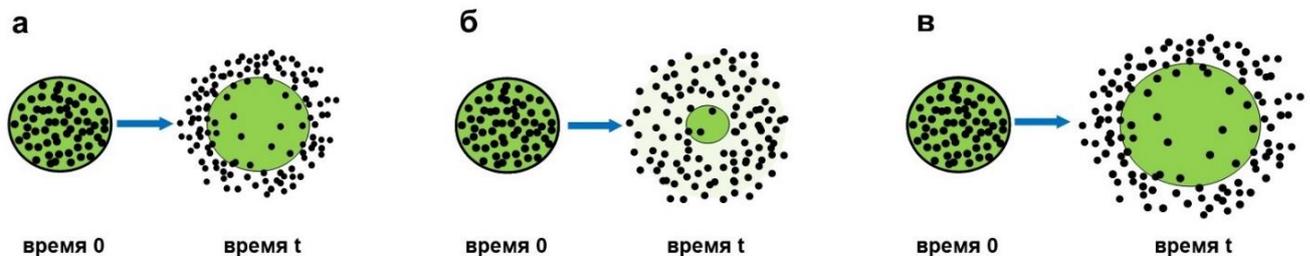


Рисунок. 6. Механизмы высвобождения субстанции из НЧ: диффузия (а), эрозия полимера (б), набухание полимера (в) [139].

Полиглицолевая кислота представляет собой полимер с низкой растворимостью в воде и высокой скоростью деградации в физиологических условиях; полимолочная кислота, напротив, является полимером с низкой механической прочностью. Таким образом, ПМГК обладает комбинированными свойствами лактида и гликолида, а соотношение звеньев мономеров в сополимере регулирует скорость его биодegradации в физиологических условиях. Чем больше мономерных звеньев молочной кислоты в ПМГК, тем гидрофобнее будет сополимер и длительнее процесс его биодegradации. Молекулярная масса ПМГК также оказывает влияние на кинетику высвобождения лекарственного препарата и биодegradацию полимера. Уменьшение

молекулярной массы ПМГК увеличивает скорость деградации ПМГК и способствует более быстрому высвобождению лекарственного вещества [137]. Лекарственный препарат, включенный в полимерный носитель, также может влиять на механизм высвобождения: низкомолекулярные вещества быстрее диффундируют через матрицу ПМГК, поэтому их высвобождение происходит ещё до полной деградации и эрозии полимера [140]. Включение гидрофильного препарата в НЧ приводит к попаданию воды внутрь частиц и формированию высокопористой полимерной сети, а использование гидрофобных субстанций может препятствовать диффузии воды в частицы и снижать скорость деградации полимера. Таким образом, влияние субстанции, типа и физико-химических параметров используемого полимера имеют решающее значение для получения НЧ с желаемыми параметрами и высоким содержанием лекарственного вещества [141].

2.5 Основные методы получения полимерных частиц

Методы получения НЧ оказывают значительное влияние на их дзета-потенциал, стабильность и распределение частиц по размеру. Наиболее используемыми методами получения ПМГК частиц являются одинарное/двойное эмульгирование, преципитация, высаливание и микрофлюидная технология (рис. 7) [142].

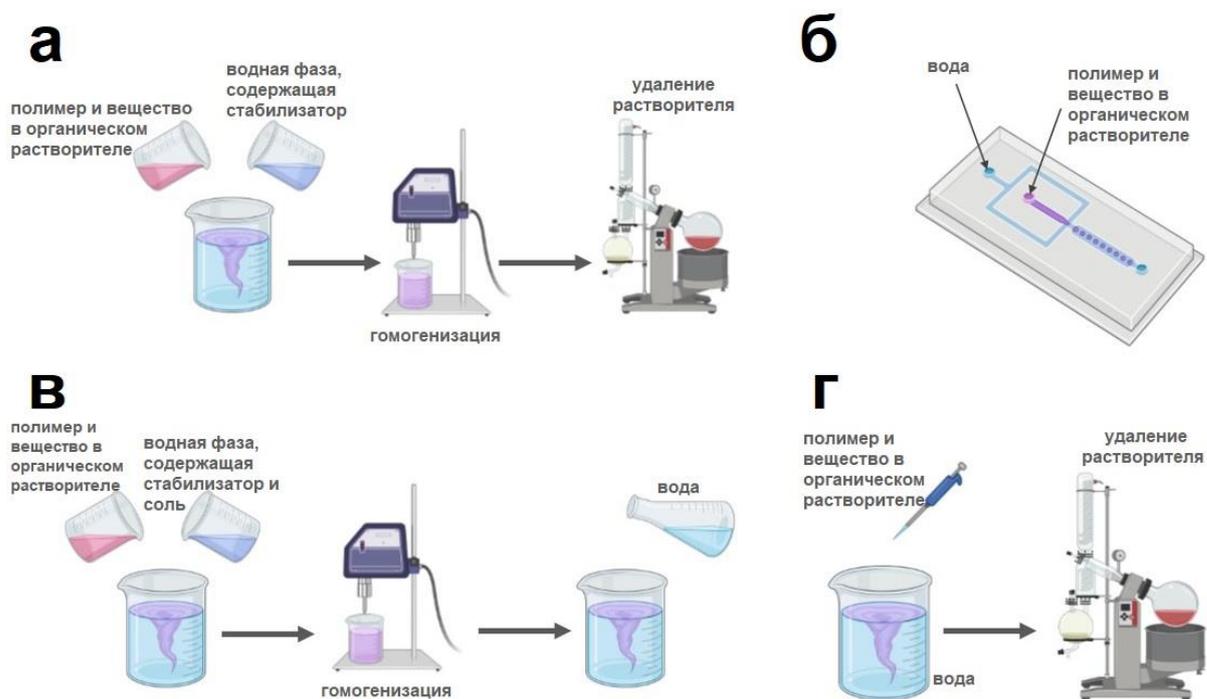


Рисунок. 7. Методы получения полимерных частиц: эмульгирование (а), микрофлюидная технология (б), высаливание (в) и преципитация (г) [142].

2.5.1 Метод одинарного/двойного эмульгирования

Метод эмульгирования часто применяют для получения ПМГК частиц. Данный метод основан на получении дисперсной фазы в несмешивающейся жидкости. В зависимости от растворимости лекарственного средства могут использоваться эмульсии: органический растворитель/вода (O/W) и вода/органический растворитель/вода ($W_1/O/W_2$). Эмульсии типа органический растворитель/вода (O/W) (рис. 7А) характеризуются растворением препарата и ПМГК в летучем растворителе (не смешивающимся с водой) с последующим добавлением к водной фазе, содержащей поверхностно-активное вещество [138,140]. Подобный метод получения эмульсий широко применяется для включения гидрофобных препаратов, в то время как двойные эмульсии типа $W_1/O/W_2$ используются для получения частиц с гидрофильными препаратами [138].

При получении эмульсий обычно применяют галогенсодержащие растворители (хлороформ, хлористый метилен), ацетон, этилацетат или ДМСО, считающиеся опасными в высоких концентрациях для человека в соответствии с постановлением ИСН от 1997 года (Международной конференции по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения) [143]. Поэтому при разработке технологии получения НЧ вводят дополнительные этапы отмывки частиц перед лиофилизацией, чтобы добиться достижения предельно допустимых концентраций остаточных растворителей (0.05-0.3% масс/масс НЧ) [144].

Метод эмульгирования применяется при включении широкого спектра лекарственных препаратов, контрастирующих агентов или совместного включения нескольких субстанций [144]. Данный метод позволяет получать НЧ в промышленных масштабах. Одинарное эмульгирование подходит для включения водонерастворимых веществ, а двойное эмульгирование для гидрофильных субстанций, но следует учитывать, что для получения частиц данным методом может потребоваться нагрев суспензии или вакуум для удаления растворителя [145].

2.5.2 Метод высаливания

Принцип метода высаливания заключается в использовании полимера, лекарственного препарата и органического растворителя, смешивающегося с водой, которые добавляются к водной фазе, содержащей соль и стабилизатор эмульсии. Дополнительное введение воды в эмульсию способствует диффузии органического растворителя в водную фазу и последующему образованию НЧ (рис. 7В) [146]. Метод высаливания подходит для использования высоких концентраций полимера, термолабильных лекарственных препаратов и белков, ДНК, РНК, но,

плохо применим для включения водонерастворимых субстанций и требует несколько этапов очистки от стабилизатора эмульсии, что затрудняет его применение в промышленности [147].

2.5.3 Метод преципитации

Метод преципитации заключается в добавлении смеси полимера и препарата в органическом растворителе, смешивающемся с водой, к водной фазе. После добавления органического растворителя происходит его диффузия в водную фазу и, как следствие, образование НЧ (рис. 7Г). Данный метод является простым и масштабируемым, что обеспечивает его широкое применение в разработке НЧ [148]. Физико-химические свойства НЧ, получаемых методом преципитации, зависят от состава и молекулярной массы полимера, растворителя и соотношения органической/водной фаз [148].

2.5.4 Микрофлюидная технология получения частиц

Микрофлюидная технология получения НЧ использует небольшие объемы жидкости (микро- или нанолитры) и микроканалы, что позволяет добиться более воспроизводимых и точных результатов по сравнению с обычными методами. В зависимости от соотношения между капиллярными числами, формирование эмульсии может быть двух типов: струйный и капающий поток. Использование струйного течения потоков способствует образованию наноразмерных НЧ, а капающий режим формирует частицы микронных размеров. В условиях струйного режима раствор полимера и препарата в органическом растворителе попадает в место соединения с каналом непрерывной водной фазы. На выходе из фокусирующего отверстия образуется длинная струя жидкости, в которой происходит образование капель за счет неустойчивости Релея вследствие действия сил поверхностного натяжения (рис. 7Б), в случае капающего потока – формирование капель происходит непосредственно на выходе из фокусирующего отверстия [149]. Преимуществами данного метода являются: узкое распределение по размеру, контролируемое время получения НЧ, улучшенный тепло- и массоперенос, высокая воспроизводимость от партии к партии [150,151]. Недостатками данной технологии являются быстрое засорение микроканалов и ограничения при масштабировании процесса [151].

2.6 Оптимизация метода получения частиц с помощью планов Бокса-Бенкена

В последние годы для оптимизации процессов получения НЧ стали применяться хемометрические инструменты, позволяющие уменьшить количество экспериментов и снизить расход материалов. Такие инструменты основаны на использовании математических моделей, позволяющих оценить статистическую значимость варьируемых параметров и эффекты взаимодействия между ними. Возможно проведение одномерной и многомерной оптимизации, однако в случаях сильного взаимодействия между параметрами, результаты обоих методов могут

сильно отличаться. Чем больше эффекты взаимодействия, тем больше будет разница между использованием одномерных и многомерных методов оптимизации. Таким образом, одномерных исследований может оказаться недостаточно для проведения оптимизации процесса, поскольку эффект одной переменной может находиться в зависимости от уровня других параметров. Поэтому зачастую схемы многомерной оптимизации многоступенчатые – в них одновременно изменяются уровни всех параметров [152].

Анализ Бокса-Бенкена относится к классу вращающихся или почти вращающихся конструкций второго порядка, основанных на трехуровневых неполных факторных планах. Для трех факторов, его графическое изображение можно увидеть на рисунке 8 [153].

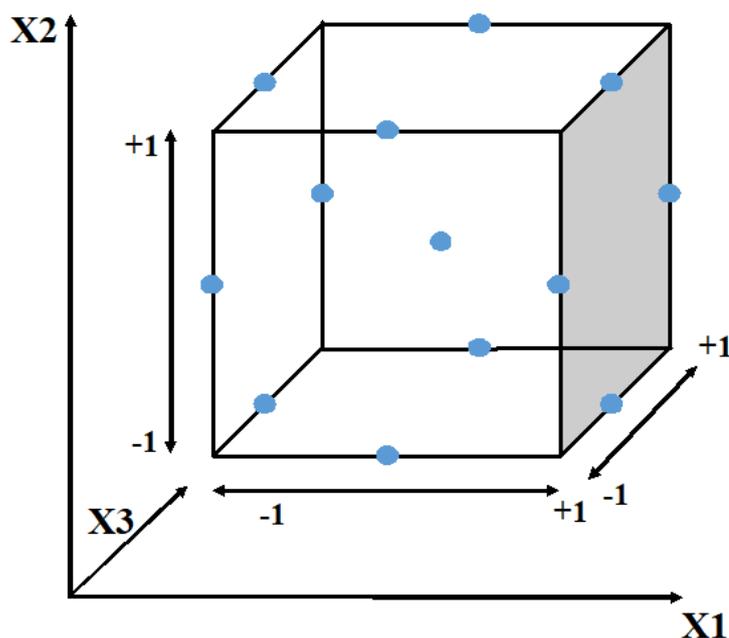


Рисунок 8. Графическое изображение анализа Бокса-Бенкена [154].

Анализ Бокса-Бенкена проводится для выявления оптимальных условий проведения различных процессов. Планирование эксперимента начинается с определения параметров оптимизации (в литературе чаще представлены как отклики), а именно, численных характеристик конечного продукта, к которым стремятся исследователи. Далее следует выделить факторы (или параметры), оказывающие прямое влияние на отклики. Следует отметить, что параметры, используемые при оптимизации процесса должны быть независимы друг от друга, иначе поддержание необходимых условий эксперимента и планирование будут невозможны. Задачей оптимизации получения НЧ является обеспечение стабильности и терапевтической эффективности НЧ. Для её решения нередко используется диаграмма Исикавы, позволяющая определить причинно-следственные связи между условиями получения НЧ и их конечными свойствами (рис. 9) [155].

После выбора критических параметров необходимо установить диапазон их варьирования для проведения экспериментов. Для этого выбирают центральное численное значение параметра, от которого в равных интервалах получают значения в отрицательную и положительную сторону. Полученные значения параметров кодируют в координатах -1; 0; +1.

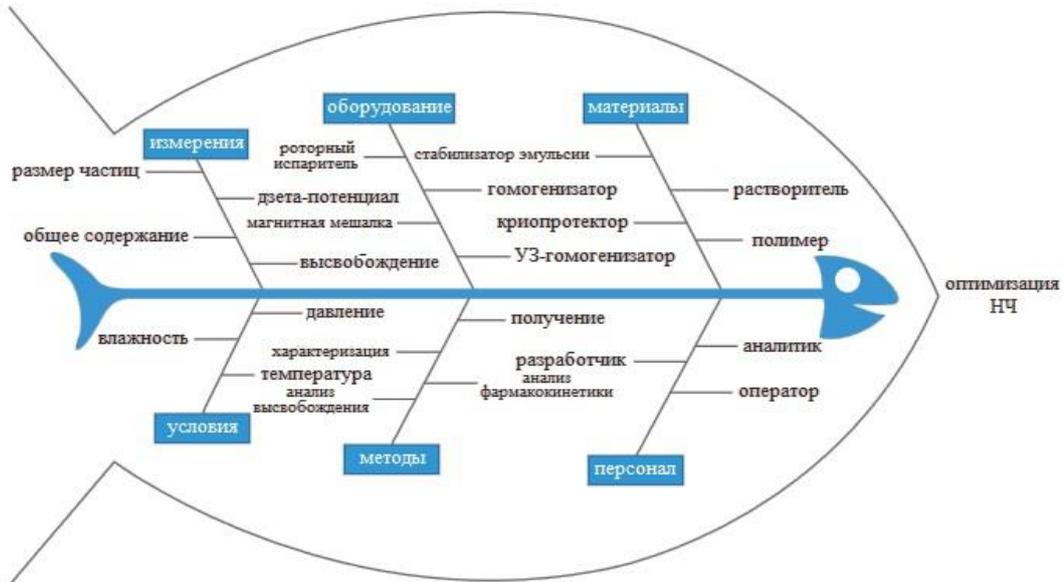


Рисунок 9. Диаграмма Исикавы, демонстрирующая причинно-следственные связи между параметрами и откликами для НЧ [155].

На основе количества варьируемых параметров, определяется число экспериментов, необходимых для проведения анализа Бокса-Бенкена (уравнение 1), и строится матрица планирования.

$$N = 2k(k-1) + C_0 \quad (1),$$

где k – число параметров, C_0 – число центральных точек.

Исходя из матрицы планирования получают партии частиц с варьируемыми параметрами и анализируют их по выбранным откликам (рис. 10).

На основе анализа ANOVA выбирают математическую модель для анализа влияния параметров, которая позволяет получить уравнение функции отклика и его графическую интерпретацию – поверхность отклика. Модели отличаются количеством коэффициентов в уравнении регрессии (уравнение 2) и могут быть линейными, двухфакторного взаимодействия (2FI), квадратичными и кубическими.

1. линейная – $X_1, X_2, X_3 \dots$

2. 2FI – $X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3 \dots$

3. квадратичная – $X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3, X_1^2, X_2^2, X_3^2 \dots$

4. кубическая – $X_1X_2X_3, X_2X_1^2, X_3X_1^2, X_1X_2^2, X_1^3, X_2^3, X_3^3 \dots$ (2),

где X_1, X_2, X_3 – варьируемые параметры при оптимизации процесса.

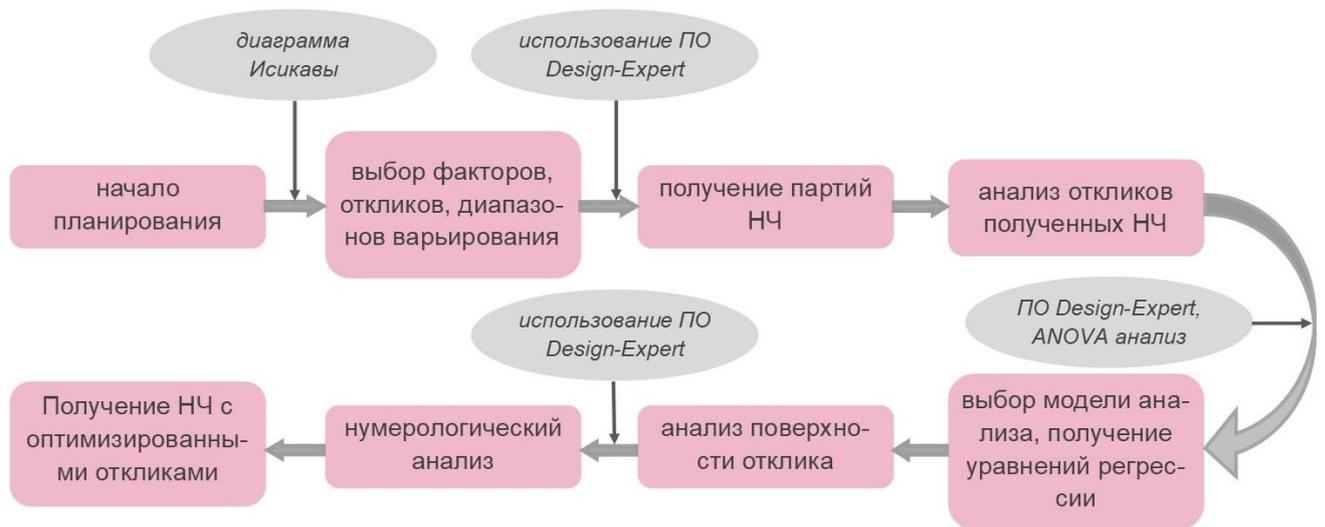


Рисунок 10. Схема оптимизации НЧ по плану Бокса-Бенкена [156].

Если выбранная математическая модель имеет высокое значение по критерию Фишера и низкое по p -критерию ($p < 0.05$), то она является значимой и с её помощью возможно предсказание численных значений откликов в дальнейших экспериментах [157]. Нередко для анализа взаимодействия параметров применяется квадратичная модель, характеризующаяся нелинейной диаграммой поверхности отклика, в отличие от линейных моделей, оценивающих индивидуальное влияние каждого параметра [158].

Далее по выбранным моделям определяют влияние параметров на поверхности отклика. Для проверки адекватности модели используют коэффициент детерминации и скорректированный коэффициент детерминации. Схожесть численных значений данных коэффициентов (< 0.2) указывает то, что выбранная модель подходит для описания влияния параметров [159]. В соответствии с выбранной моделью записывают уравнение регрессии для каждого отклика (уравнение 3). Полученные уравнения позволяют выявить значимость каждого параметра в получении НЧ и характер взаимодействия пар параметров на отклик: синергетический (повышение численного значения параметра приводит к увеличению значения отклика, если коэффициенты имеют положительный знак) или антагонистический (повышение численного значения параметра приводит к уменьшению значения отклика, если коэффициенты имеют отрицательный знак).

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{1,2} X_1 X_2 + \beta_{1,3} X_1 X_3 + \beta_{2,3} X_2 X_3 + \beta_{11} X_{12} + \beta_{22} X_{22} + \beta_{33} X_{32} \quad (3),$$

где Y – зависимая переменная; β_0 – среднее значение отклика от количества проведенных экспериментов; $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ – коэффициенты регрессии для каждого параметра; $\beta_{1,2}, \beta_{2,3}, \beta_{1,3}$ – коэффициенты взаимодействия уравнения; $\beta_{1,1}, \beta_{2,2}, \beta_{3,3}$ – значимость коэффициентов.

На основе полученных уравнений строятся 2D и 3D-диаграммы поверхности отклика, которые демонстрируют ключевые совместные эффекты взаимодействий двух параметров при фиксированном уровне третьего параметра [160]. Далее проводят оптимизацию процесса для получения заданных числовых значений откликов. В некоторых случаях одновременная оптимизация каждой характеристики невозможна, поэтому размерную величину откликов переводят в безразмерную шкалу, объединяющую показатели отклика. На основе заданных унифицированных откликов получают ряд условий, удовлетворяющих заданным требованиям и обозначенных шкалой желательности. Значения желательности указывают на соответствие заданных характеристик продукта предсказанным значениям. Соответствие предпочтительных и предсказанных значений классифицируется следующими отметками в шкале желательности: 0.8-1 (очень хорошо); 0.63-0.8 (хорошо); 0.37-0.63 (удовлетворительно); 0.2-0.4 (плохо); 0-0.2 (очень плохо). На основе самого подходящего значения желательности выбираются условия получения продукта с наилучшими характеристиками, проводится анализ откликов конечного продукта и сравнение полученных экспериментальных данных с прогнозируемыми [161].

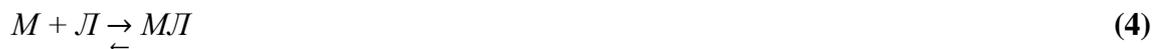
Сравнение плана Бокса-Бенкена и других методов (центрального композиционного плана, матрицы Догерта и трехуровневого полного факторного плана) показало, что план Бокса-Бенкена и матрица Догерта более эффективны для оптимизации процессов. Дополнительным преимуществом плана Бокса-Бенкена является отсутствие комбинаций, при которых все параметры одновременно на высоких или низких уровнях. Таким образом, анализ позволяет избежать проведения экспериментов в крайних точках значений параметров и последующих неудовлетворительных результатов [162].

Планы Бокса-Бенкена применяются для оптимизации многих аналитических методов: флуоресцентная спектроскопия, эмиссионная спектроскопия, тонкослойная хроматография, газовая хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография и т.д. Известно, что оптимизацию также проводят при детекции комплексообразования и разработке процессов электрохимического окисления [162]. Также планы Бокса-Бенкена находят широкое применение в оптимизации процессов получения НЧ, содержащих лекарственные препараты [163-165].

2.7 Определение константы связывания

Образование комплекса между молекулой и лигандом является основным и важнейшим процессом в супрамолекулярной химии. В силу того, что связывание молекулы с лигандом многоточечно и специфично, можно предположить, что наряду с комплексом, в котором реализованы все возможные точки связывания молекула-лиганд, возможно присутствие не полностью связавшихся субъединиц. Кроме того, молекула (М) может находиться в различных конформационных состояниях, которые могут образовывать различные комплексы (МЛ) с

лигандами (Л) (уравнение 4). Это связано со сложностью равновесной системы МЛ–Л–М и процесса образования самого комплекса. Тем не менее, для ряда систем и задач, связанных с комплексообразованием, широко используется модель, учитывающая два состояния – отсутствие и наличие комплекса, т.е. следующий процесс:



Данный процесс характеризуется двумя кинетическими параметрами – константой скорости связывания k_a и константой скорости диссоциации k_d . Их отношение представляет собой константу связывания:

$$K_a = k_a / k_d = [ML] / [M] \cdot [L], \text{ или } K_d = 1 / K_a = [M] \cdot [L] / [ML] \quad (5),$$

где $[M]$, $[L]$, $[ML]$ – равновесные концентрации участников реакции.

Размерность константы скорости связывания k_a равна $[M^{-1}c^{-1}]$, константы скорости диссоциации k_d – $[c^{-1}]$, константы связывания K_a – $[M^{-1}]$, константы диссоциации K_d – $[M]$ (уравнение 5).

Константа связывания характеризует эффективность связывания лиганда с молекулой и является важным параметром в ферментативной кинетике. Широко распространенным является термин «сродство лиганда к молекуле», оцениваемый величиной константы связывания. Сродство лиганда к биополимеру тем выше, т.е. комплекс ПЛ прочнее, чем выше величина K_a [166]. С помощью константы связывания можно также оценить сродство полимера к лекарственной субстанции, а значит, предсказать с каким полимером или препаратом частицы будут содержать высокую полезную нагрузку лекарственного средства.

Метод Бенеш-Гильдебранда является одним из используемых методов определения константы связывания и стехиометрии взаимодействий, поскольку для его расчета требуются данные, полученные с помощью доступных спектрофотометрических методов (УФ-спектры поглощения, спектры флуоресценции, инфракрасные спектры) [167]. Для анализа взаимодействий М и Л, регистрируют спектры поглощения М в присутствии восходящих концентраций Л или его отсутствии. На основе полученных данных строят графическую зависимость, рассчитанную из уравнения 6:

$$1 / (A - A_0) = 1 / [K_a \cdot (A_{max} - A_0) \cdot L] + 1 / (A_{max} - A_0) \quad (6),$$

где A_0 – оптическая плотность М в отсутствии Л, A – оптическая плотность М в присутствии Л, A_{max} – оптическая плотность М, полностью связавшегося с Л.

Далее находят тангенс наклона прямой $1 / (A - A_0)$ от $1 / [L]$, который является значением константы связывания [168].

Таким образом, на основе спектрофотометрического метода можно рассчитать константу связывания для всех комплексов, начиная с комплексов неорганических веществ и заканчивая

комплексом белок – лекарственное вещество [169,170]. В данном случае, имеет смысл проведение расчетов константы связывания с целью выявления пары ПМГК-МеП с наибольшим содержанием субстанции.

2.8 Основные методы анализа полимерных частиц

Определение физико-химических характеристик НЧ является важным этапом исследования, который позволяет оценить и предугадать эффективность доставки лекарственного средства к тканям-мишеням и терапевтическую активность НЧ.

2.8.1 Метод динамического светорассеяния

Метод динамического светорассеяния (ДРС) широко применяется для определения индекса полидисперсности (ИПД) НЧ, а также определения среднего диаметра или радиуса частиц, наряду с микроскопией. Принцип метода ДРС заключается в облучении раствора частиц лазером и регистрации его интенсивности рассеяния с помощью фотонного детектора при фиксированном или переменном угле рассеивания. Основными преимуществами ДРС являются доступность и простота измерений [171].

2.8.2 Метод электрофоретического рассеяния света

Метод электрофоретического рассеяния света (ЭРС) применяется для измерения дзета-потенциала НЧ и позволяет определить силу электростатического взаимодействия между частицами и их стабильность. С целью измерения дзета-потенциала НЧ, образец помещают между электродами, подают напряжение и регистрируют скорость движения частиц с помощью лазерного доплеровского анемометра. Преимуществами данного метода перед другими методами измерения (с помощью атомно-силового или электронного микроскопа) являются простота подготовки образцов для измерения и эксплуатации, возможность автоматизации процесса и воспроизводимость [172].

2.8.3 ИК-спектроскопия

Измерения с помощью инфракрасной (ИК) спектроскопии с преобразованием Фурье зачастую проводятся с целью выявления и классификации взаимодействий между полимером и лекарственным веществом, поскольку в ИК-области находится подавляющее число колебательных и вращательных спектров молекул. Изменение или возникновение характеристических полос поглощения в спектрах НЧ позволяют выявить группы, входящие в состав полимера и лекарственной субстанции, и оценить наличие взаимодействий между ними [173].

2.8.4 Сканирующая и просвечивающая электронная микроскопия

Просвечивающая (ПЭМ) и сканирующая электронная микроскопия являются основными методами исследования формы НЧ и распределения частиц по размеру. Получение изображений методом ПЭМ основано на прохождении когерентного пучка электронов через образец и фокусировке прошедших через образец электронов с помощью магнитной линзы в изображение на люминофорном экране. Энергия электронов в случае ПЭМ значительно выше, чем для сканирующей электронной микроскопии (80-300 кэВ), что позволяет электронам более эффективно проникать через образец [174]. В случае сканирующей электронной микроскопии при прохождении пучка электронов, происходит их обратное рассеивание, которое фиксируется с помощью детектора вторичных электронов. Таким образом, описанные методы позволяют оценить размер и морфологию образцов размером от 0.001 до 5 мкм и могут применяться для анализа НЧ [175].

2.8.5 Изучение кинетики высвобождения действующего вещества из полимерных частиц

Некоторые свойства НЧ, например, высвобождение вещества, могут быть исследованы с помощью *in vitro* экспериментов, для оценки влияния физиологических условий на лекарственную форму.

Как отмечалось ранее, основными механизмами высвобождения вещества из полимерного носителя считаются диффузия, эрозия или набухание [139]. Использование кинетических моделей зачастую помогает определить механизм высвобождения лекарственного препарата и, тем самым, контролировать его процесс. Уравнения кинетических моделей представлены в таблице 1 [167].

Таблица 1. Математические модели для описания кинетики высвобождения препаратов из полимерных носителей, где C – концентрация вещества в растворе за время t , C_0 – исходная концентрация вещества в растворе, K_0 – константа высвобождения нулевого порядка, t – время, K_1 – константа высвобождения первого порядка, A – область матрицы, в которой происходит диффузия вещества, C_s – растворимость вещества внутри капсулы, D – коэффициент диффузии вещества из матрицы, C_t/C_∞ – концентрация вещества, высвобожившаяся за время t , K – константа скорости высвобождения, n – экспонента, учитывающая высвобождение вещества из НЧ цилиндрической формы, C_t – концентрация вещества, оставшегося внутри НЧ за время t , $K_{НС}$ – константа, которая учитывает соотношение поверхность/объем [167].

Модель	Уравнение модели	Механизм высвобождения
Нулевой порядок	$C = C_0 + K_0 t$	Дегградация
Первый порядок	$\log C = \log C_0 - K_1 t / 2.303$	Растворение

Хигучи	$C = [A(2C - C_s)C_s t]^{1/2}$	Диффузия
Корсмейер-Пеппас	$C_t / C_\infty = Kt^n$	Полуэмпирическая модель, диффузия
Хиксон-Кроуэлл	$C_0^{1/3} - C_t^{1/3} = K_{HCT}$	Эрозия

Кинетика нулевого порядка описывает процесс высвобождения лекарственного препарата из носителя с постоянной скоростью, не зависящей от концентрации препарата (может использоваться для таблетированных форм гидрофобных препаратов, таблеток, покрытых оболочкой, капсул); моделью первого порядка считается система, в которой скорость высвобождения вещества зависит от концентрации оставшегося в носителе лекарственного препарата (описывает профиль высвобождения водорастворимых препаратов из пористых носителей); основываясь на уравнении диффузии Фика, модель Хигучи оценивает процесс высвобождения лекарственного препарата из нерастворимого носителя как зависимость от квадратного корня времени (может использоваться для описания высвобождения водорастворимых и нерастворимых препаратов из полутвердых и твердых носителей); модель Корсмейера-Пеппаса относится к ряду полуэмпирических моделей, описывающих индивидуальные механизмы высвобождения (для высвобождения препарата из набухающих и ненабухающих полимерных носителей); модель Хиксона-Кроуэлла характеризует систему, в которой кубический корень концентрации высвобожденного количества из носителя находится в линейной зависимости от времени, то есть поверхность НЧ изменяется с течением времени (описывает процесс высвобождения из систем, меняющих свою площадь поверхности: частицы, таблетки) [176].

Соответствие профиля высвобождения лекарственного препарата из полимерного носителя определенной математической модели определяется благодаря коэффициенту корреляции (R) и коэффициенту детерминации (R²) [140]. Таким образом, подобранная математическая модель может стать прогностическим фактором для *in vivo* фармакокинетического поведения НЧ.

2.8.6 Оценка цитотоксической активности полимерных частиц

Первым этапом оценки эффективности НЧ являются эксперименты *in vitro*, в том числе на моделях опухолевых клеток. Несмотря на то, что такие исследования не могут заменить полноценных экспериментов на животных, их проведение является фундаментальным для оценки безопасности и активности полученных НЧ [177].

В исследованиях оценки токсичности *in vitro* применяются различные протоколы, однако, наиболее используемым является МТТ тест. После 72 ч инкубации клеток с исследуемыми образцами, к ним добавляется водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-

тетразолиум бромид (МТТ), который живые клетки при помощи НАДФ-Н-зависимых оксидоредуктаз преобразуют в пурпурный формазан. Далее, по окончании 4 ч инкубации клеток с МТТ, к клеткам добавляют ДМСО, который растворяет образованные кристаллы формазана, и измеряют оптическую плотность полученного раствора. [178]. Таким образом, высокое значение оптической плотности раствора формазана будет свидетельствовать о том, что на момент добавления МТТ, клетки сохраняли свою жизнеспособность. Жизнеспособность клеток определяют, как процент жизнеспособных клеток по сравнению с контрольными (нелечеными) клетками. МТТ-тест является простым, воспроизводимым и чувствительным, однако, каждый раз, применяя его для конкретной диагностической задачи, следует индивидуально подбирать условия проведения эксперимента [178].

2.8.7 Определение уровня внутриклеточных АФК и окислительного стресса

Клетки непрерывно образуют АФК во время аэробного метаболизма, в связи с чем, существует множество методов, оценивающих уровень внутриклеточных АФК и продуктов их окисления.

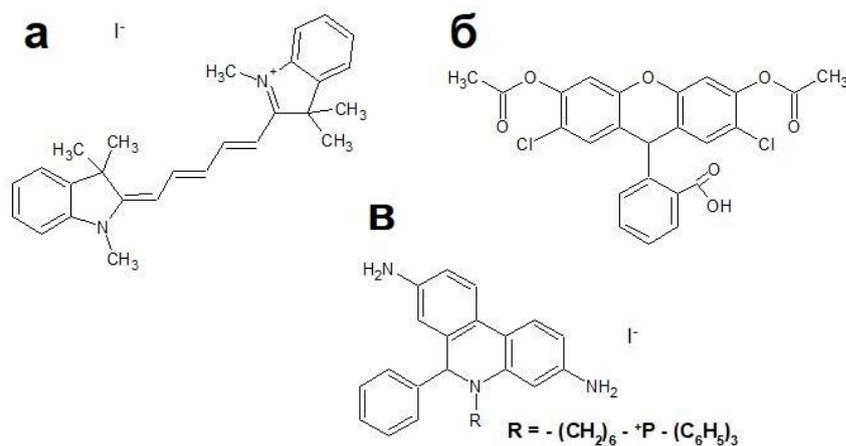


Рисунок 11. Структурные формулы применяемых в цитофлуориметрическом анализе флуоресцентных зондов: 1,1',3,3',3',3'-гексаметилиндодикарбоцианина йодид [DiI(1)] (а), 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеина диацетат [ДФХФН-ДА] (б), конъюгат дигидроэтидия и трифенилфосфония [MitoSOX Red] (в).

Один из них – детекция АФК с помощью флуоресцентных и хемилюминесцентных зондов. 2',7'-Дихлородигидрофлуоресцеина диацетат (ДФХФН-ДА) широко применяется для прямого измерения окислительно-восстановительного состояния клетки (рис. 11Б). При попадании в клетку, внутриклеточные эстеразы расщепляют сложноэфирные связи в ДФХФН-ДА, что приводит к образованию более полярной молекулы, не способной проникнуть через клеточную мембрану – H₂-ДФХФ. Данная молекула, не обладающая флуоресцентными свойствами, накапливается внутри клетки, а последующее её окисление приводит к образованию

флуоресцирующего продукта ДХФ. Преимуществами данного соединения являются простота в использовании, высокая чувствительность к изменениям окислительно-восстановительного состояния клетки, низкая стоимость и возможность для времязависимой регистрации уровня АФК [179].

Для анализа отдельных АФК используют различные флуоресцентные зонды. MitoSOX Red (рис. 11В), конъюгат липофильного иона трифенилфосфония и флуоресцентного зонда дигидроэтидия, широко используется для высокоселективной детекции митохондриальных АФК в живых клетках, а именно, супероксид аниона. При попадании в клетку липофильный MitoSOX Red селективно накапливается в митохондриях, где происходит окисление дигидроэтидия супероксид анионом и образование флуоресцирующего продукта – 2-гидроксиэтидия. Преимуществом использования MitoSOX Red является его избирательное окисление супероксид анионом, а не другими АФК [180].

Повышение АФК приводит к снижению потенциала мембраны митохондрий и их дисфункции, что является одним из основных маркеров окислительного стресса. Изменения в потенциале мембраны митохондрий можно измерить с помощью проточной цитофлуориметрии. В качестве флуоресцентных зондов применяют различные катионные метки (родамин 123, JC-1 или DiI C1(5) (рис. 11А)), которые накапливаются на внутренней мембране митохондрий за счет ассиметричного распределения H^+ через мембрану. Снижение потенциала мембраны митохондрий детектируется за счет уменьшения накопления флуоресцентного зонда на внутренней мембране митохондрий [181].

Окислительный стресс может приводить не только к повреждению митохондрий, но и фрагментации ДНК [22]. Одним из наиболее применяемых методов для оценки повреждения ДНК является TUNEL анализ (TdT-опосредованный анализ меченая ник-концов dUTP (дезоксинуридин-трифосфат). Его принцип основан на присоединении метки dUTP к 3'-ОН-концам фрагментов ДНК при помощи терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (TdT) [182].

2.8.8. Исследование полимерных частиц *in vivo*

Исследования *in vivo* предполагают использование широкого ряда животных моделей, например, пресноводных рыб Данио-рерио, мышей, крыс, кроликов и собак, в зависимости от цели исследований и типа эксперимента. Данные модели позволяют получить биологическую и физиологическую информацию о метаболизме и биораспределении лекарственного препарата, его эффективности и безопасности [183].

Поскольку физико-химические характеристики НЧ (например, размер, заряд и гидрофильность, кинетика высвобождения препарата) в значительной степени могут влиять на

их биораспределение в организме, необходимо проводить изучение эффектов, возникающих после введения НЧ [183].

Для оценки биодоступности лекарственных препаратов проводят различные эксперименты *in vivo*. Одним из них является оценка метаболического баланса, который позволяет определить концентрацию поглощенного тканями вещества и его выведение в заданные промежутки времени, например, через просвет желудочно-кишечного тракта. В случае высокоабсорбируемых биологически активных веществ может использоваться метод определения концентрации вещества в плазме. Для изучения метаболизма, абсорбции и скорости выведения биологически активных веществ могут применяться методы визуализации, например, использование радиоизотопов, а для анализа механизмов превращения биологически активных веществ во время процесса пищеварения используют метод масс-спектрометрии [183]. Таким образом, на основе данных исследований можно определить состояние лекарственного препарата после его введения в организм, биораспределение по органам и тканям, оценить метаболизм и скорость выведения [184].

Проведение экспериментов по изучению токсичности препаратов позволяет оценить их безопасность при однократном или длительном введении. Изучение острой токсичности лекарственного препарата позволяет определить полудетальную дозу (LD50), исходя из которой корректируется план эксперимента и вводимые дозы [185].

Оценка противоопухолевой эффективности лекарственных препаратов *in vivo* и подбор режима введения – являются одними из основных задач доклинических исследований противоопухолевых препаратов. Противоопухолевую эффективность можно оценить по таким показателям как торможение роста опухоли и увеличение средней продолжительности жизни по сравнению с контрольными группами [186].

Таким образом, на основе показателей, полученных в процессе проведения доклинических испытаний на животных моделях, можно судить о безопасности исследуемого лекарственного препарата – полимерных частиц, и их противоопухолевой эффективности в сравнении с контролем (препарат сравнения, свободная субстанция, не включенная в частицы, пустые частицы).

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Реактивы

Сополимер молочной и гликолевой кислот (ПМГК с карбоксильной концевой группой, 50/50 средней характеристической вязкости 0,4 дл/г; молекулярная масса 17000–21000 Да) (LACTEL Absorbance Polymers, Бирмингем, Алабама, США); D-маннит, поливиниловый спирт (ПВС, молекулярная масса 30000–70000 Да), додецилсульфат натрия (ДСН), Тритон X-100, трис(гидроксиметил)аминометана гидрохлорид (Трис), N-бутиловый спирт, АК, ФИТЦ, p-p Гимза, о-фталдальдегид, ЗАТ, нитротетразолий синий, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), МН (Toronto Research Chemicals Inc., Торонто, Канада); MitoSox Red (Invitrogen, Уолтем, США); DilC1 (Immunostep, Саламанка, Испания); пропидий иодид, аннексин V (Biolegend, Сан-Диего, Калифорния, США); хлороформ, хлористый метилен и ацетон (ООО «Русхим», Москва, Россия); диметилсульфоксид (ДМСО), фосфатно-солевой буфер (ФСБ) (Amreso, Солон, Огайо, США); Cremophor EL (MedChemExpress, Нью-Джерси, США); Твин-80, параформальдегид (Serva, Гейдельберг, Германия); азотная кислота 65% Suprapur® (Merck, Дармштадт, Германия); среды для культивирования клеток DMEM и RPMI1640, эмбриональная бычья сыворотка (ЭБС), гентамицин (Gibco, Гранд Айленд, Нью-Йорк, США); 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ил]-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ), Хёкст 33342, трипсин, 2,7-дихлородигидрофлуоресцеина диацетат (ДХФН-ДА), (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США); версен, (ПанЭко, Москва, Россия); TACS•XL®-Blue Label in Situ Apoptosis Detection Kit (Trevigen Inc., Гейтерсбург, Мэриленд, США).

2.2 Оборудование

Аналитические весы Sartorius Extend ED (Sartorius, Геттинген, Германия); магнитная мешалка (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США), магнитная мешалка с контролем температуры Thermoline Nuova Stir Plate (Merck, Дармштадт, Германия), ультразвуковой гомогенизатор U.V.Braun (Labsonic, Мельзунген, Германия); вакуумный роторный испаритель НВ10 (ИКА, Штауфен-им-Брайсгау, Германия); центрифуга J2-21 (Beckman, Пало-Альто, Калифорния, США); лиофильная сушка Alpha-I-5 (Christ, Ханау, Германия); анализатор Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments, Вустершир, Великобритания); спектрофотометр Hitachi 557 (Hitachi, Япония); спектрофотометр Ultrospec 2000 (Pharmacia Biotech, Пискатауэй, Нью-Джерси, США); центрифуга Eppendorf 5417 R (Eppendorf, Гамбург, Германия); спектрофотометр Spectronic Helios α (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США); ИК-спектрометр (FTIR, Bruker Equinox 55, Bruker, Биллерика, Массачусетс, США); рентгеновский дифрактометр (Philips PW1710, Эйндховен, Нидерланды); просвечивающий электронный микроскоп Osiris (Текнаи Осирис, FEI, Хиллсборо, Орегон, США); лабораторный миксер Eppendorf Mixer 5432

(Eppendorf, Гамбург, Германия); термостат TERMO 24-15 (Biokom, Москва, Россия); спектрофлуориметр Shimadzu RF-6000 (Shimadzu Corporation, Киото, Япония); планшетный спектрофотометр Multiscan M (Labsystems, Хельсинки, Финляндия); вортекс Vortex 2 (ИКА, Штауфен-им-Брайсгау, Германия); ультразвуковая баня ODA-LQ20 (ОДА-сервис, Москва, Россия); автоклав с резистивным нагревом ЭТАС-6 (ИПТМ РАН, Московская обл., Черноголовка, Россия); масс-спектрометр с индуктивно связанной плазмой X Series 2 (Thermo Scientific, Уолтем, Массачусетс, США); термостат Heraeus (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США); ламинарный шкаф Gelaire (Flow Laboratories, Меккенхайм, Германия); CO₂-инкубатор MCO-17AIC (Sanyo, Осака, Япония); инвертированный световой микроскоп Diaphot (Nikon, Токио, Япония); проточный цитофлуориметр Cyan ADP (Beckman Coulter, Бреа, Калифорния, США).

2.3 Клеточные линии и лабораторные животные

В работе использовали опухолевые клетки линий HeLa (карцинома шейки матки человека), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека), K562 хронический миелогенный лейкоз человека), SK-OV-3 (аденокарцинома яичника человека), 4T1 аденокарцинома молочной железы мыши).

В экспериментах *in vivo* использовали мышей-самок линии BALB/c с массой тела 20-22 г, представленных питомником «Столбовая», Московская обл.

2.4 Получение полимерных частиц

FeП-НЧ, MnП-НЧ и NiП-НЧ были получены методом одинарного эмульгирования [188]. Точную навеску 10 мг FeП, MnП или NiП и ПМГК (табл. 2, 2 столбец) растворяли в 2.5 мл хлороформа (для FeП и MnП) или хлористого метилена (для NiП). Суспензию по каплям добавляли к раствору ПВС (табл. 2 (3 и 4 столбцы)) и перемешивали в течение 20 мин. Затем суспензию переносили в ледяную баню и обрабатывали ультразвуковым гомогенизатором в режиме High +, Repeating duty Cycle = 0,9. Процесс повторяли 5 раз по 40 сек с интервалами в 20 сек между циклами. Удаляли органический растворитель на роторном испарителе при пониженном давлении и температуре водяной бани +36 °С. Полученные НЧ центрифугировали в течение 1 ч при 15000 g, +4 °С. После центрифугирования супернатант декантировали и замораживали, а осадок ресуспендировали в 10 мл дистиллированной воды, фильтровали с использованием стеклянного фильтра Шотта с пористостью 47–111 мкм и добавляли 10% (мас./мас.) D-маннита. Полученные НЧ лиофилизировали и хранили при +4°С.

Таблица 2. Массы ПМГК, концентрация ПВС и соотношение органической/водной фаз, используемые при получении НЧ с МеП.

<i>Партия НЧ</i>	<i>ПМГК, мг</i>	<i>ПВС, %</i>	<i>О/В</i>
1	25	1.3	0.13
2	25	1.3	0.13
3	45	2.0	0.13
4	45	0.5	0.13
5	5	1.3	0.20
6	5	0.5	0.13
7	25	2.0	0.05
8	5	2.0	0.13
9	25	1.3	0.13
10	45	1.3	0.05
11	25	2.0	0.20
12	25	1.3	0.13
13	25	0.5	0.20
14	5	1.3	0.05
15	25	0.5	0.05
16	45	1.3	0.20
17	25	1.3	0.13

СоП-НЧ были получены методом нанопреципитации [189]. Указанные навески СоП и ПМГК растворяли в ацетоне, полученную смесь по каплям добавляли к раствору ПВС и перемешивали в течение 20 мин. Далее удаляли растворитель, центрифугировали суспензию, фильтровали и лиофилизировали, как было описано для FeП-НЧ, MnП-НЧ и NiП-НЧ.

2.5 Оптимизация процесса получения НЧ с помощью методологии Бокса-Бенкена

Процесс получения НЧ с FeП, MnП, NiП и СоП был оптимизирован с помощью методологии Бокса-Бенкена, основанного на 2-х уровневом 3-факторном плане с пятью повторениями центральных параметров. В качестве независимых параметров, влияющих на физико-химические характеристики частиц, были выбраны: масса ПМГК (X_1), концентрация стабилизатора эмульсии (ПВС) (X_2) и соотношение органической и водной фаз (О/В) (X_3). В качестве основных параметров оценки полученных НЧ использовались общее содержание МеП в частицах (ОС, %) (Y_1) и средний диаметр частиц (РЧ, нм) (Y_2). Оптимизация проводилась на двух уровнях (низком и высоком), как указано в таблице 3. Взаимодействие независимых переменных и откликов оценивалось на основе уравнения регрессии 3 [160].

Таблица 3. Параметры варьирования, используемые в экспериментах. X_1 – масса ПМГК, мг; X_2 – концентрация ПВС, %; X_3 – соотношение органической и водной фазы (О/В).

Параметры		Уровни			
		<i>низкий</i>	<i>шифр</i>	<i>высокий</i>	<i>шифр</i>
X_1	ПМГК, мг	5	-1	45	1

X_2	ПВС, %	0.5	-1	2	1
X_3	O/W (об./об.)	0.05	-1	0.2	1

Определение параметров, оказывающих наибольшее влияние на функции отклика, уровня взаимодействий между параметрами и статистический анализ были выполнены с использованием программного обеспечения Design-Expert (Stat-Ease Inc., версия 7.0; программное обеспечение Design-Expert; Миннеаполис, Миннесота, США).

Оптимизация НЧ была проведена с помощью метода многокритериальной оптимизации. Критериями для оптимизированной методики были максимальное ОС и минимальный РЧ [190]. Из результатов, предложенных программным решением, были выбраны числовые значения, ближайšie к оптимальным (поскольку вероятность достижения желаемого результата выше). На основе рассчитанных значений независимых переменных были получены оптимизированные НЧ с МеП и проанализированы на ОС и РЧ. Экспериментально полученные результаты сравнивали с предсказанными данными и рассчитывали процент относительной ошибки согласно уравнению 7:

$$\delta = (X_{пред} - X_{эксп}) / X_{пред} \quad (7),$$

где $X_{пред}$ – предсказанное значение зависимых параметров, $X_{эксп}$ – полученное экспериментально значение зависимых параметров.

Пустые НЧ получали по описанным выше методикам, за исключением того, что навеску только ПМГК (без активной субстанции) растворяли в растворителе и по каплям добавляли к раствору ПВС.

2.6 Анализ частиц

2.6.1 Определение степени включения и общего содержания МеП в НЧ

Для оценки ОС МеП точную навеску 4 мг НЧ растворяли в 4 мл ДМСО. Оптическую плотность МеП оценивали в ДМСО при 410 нм для FeП, 465 нм для MnП, 433 нм для NiП и 428 нм для CoП, а ОС рассчитывалось в соответствии с уравнением 8 [191]:

$$ОС (\%) = \text{Оптическая плотность} * V_{ДМСО} * M_w / l * \epsilon * m_{НЧ} * 100\% \quad (8),$$

где $V_{ДМСО}$ – конечный объем раствора (л); ϵ – коэффициент экстинкции МеП в ДМСО ($\epsilon = 86\ 502\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для FeП, $\epsilon = 116\ 280\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для MnП, $\epsilon = 36\ 797\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для NiП, $\epsilon = 87\ 448\ \text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ для CoП); M_w – молярная масса МеП ($M_w = 668.59$ г/моль для FeП, $M_w = 703.11$ г/моль для MnП, $M_w = 671.41$ г/моль для NiП, $M_w = 671.65$ г/моль для CoП), $m_{НЧ}$ – масса НЧ, используемых в анализе, l – длина оптического пути (1 см).

СВ МеП определяли спектрофотометрическим методом: для этого к навеске НЧ (4 мг) добавляли 4 мл дистиллированной воды, центрифугировали суспензию при 520 г в течение 3 мин, декантировали надосадочную жидкость и проводили лиофилизацию супернатанта и осадка.

Оптическую плотность осадка и супернатанта оценивали после их растворения в 3 мл ДМСО при 410 нм для FeП, 465 нм для MnП, 433 нм для NiП и 428 нм для CoП. Степень включения MeП (СВ) рассчитывали по уравнению 9 [190]:

$$СВ (\%) = [m_{обц} - m_{сн}] / m_{обц} * 100\% \quad (9),$$

где $m_{обц}$ – общая масса MeП, использованная для получения частиц, мг; $m_{сн}$ – масса MeП в супернатанте, мг.

2.6.2 Определение РЧ, дзета-потенциала и ИПД полученных частиц

РЧ и ИПД НЧ были проанализированы с помощью метода динамического рассеяния света (ДРС), а дзета-потенциал – с помощью метода электрофоретического рассеяния света (ЭРС) [190]. Образцы диспергировали в дистиллированной воде до конечной концентрации 1 мг/мл и проводили три независимых измерения с использованием стандартизированного протокола исследования (SOP) [192].

2.6.3 Исследование НЧ методом просвечивающей микроскопии

Морфологию MeП-НЧ исследовали с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) [193]. Водную суспензию НЧ (1 мг/мл) помещали на 3 мм медную сетку, покрытую пленкой формвара, и сушили в течение 30 мин. Образцы контрастировали 1%-ым водным раствором уранил ацетата.

2.6.4 Рентгеноструктурный анализ

Кристалличность MeП, ПМГК и MeП-НЧ определяли на рентгеновском дифрактометре с излучением Cu K α 1, $\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$, напряжением 50 кВ и током 250 мА. Дифрактограмму определяли в области $5^\circ < 2\text{-тета} < 80^\circ$ ступенчатым методом (0.2 °/с) [194].

2.6.5 ИК-спектроскопия

ИК-спектры образцов MeП, ПМГК и MeП-НЧ регистрировали с использованием ИК-спектрометра [190]. Образцы готовили с использованием микронизированного KBr (FTIR-grade, Merck, Германия), предварительно нагретого до 100°C в течение 2 ч. Далее 1% образца (по отношению к KBr) смешивали и прессовали с порошком KBr в диск диаметром 13 мм (толщиной 1.5 мм) под давлением 5000 фунтов на квадратный дюйм в течение 2 минут. Образцы анализировались в диапазоне волновых чисел от 400 до 4000 см⁻¹.

2.6.6 Исследование кинетики высвобождения MeП из НЧ

Точную навеску (3 мг) НЧ, содержащих MeП, диспергировали в 1 мл ФСБ (0.01 М, pH 7.4) и переносили в колбу с завинчивающейся крышкой из темного стекла, содержащую 40 мл ФСБ (0.01 М, pH 7.4) и 0.1% (масс./об.) раствор Твин-80. Объем суспензии доводили до 50 мл ФСБ (0.01 М, pH 7.4) и помещали в термостат при постоянном перемешивании (90 г) и температуре

+37 °С. Исследование проводили путем отбора 1 мл суспензии из колбы с последующим внесением 1 мл ФСБ в колбу для сохранения начального общего объема. Пробы отбирали через 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 24.0, 48.0, 72.0, 120.0, 144.0 и 192.0 ч. Отобранные аликвоты центрифугировали 3 мин при 520 g при +37°С. Супернатанты декантировали и лиофилизировали также, как и осадки [195]. Массы MeП, высвобожденных из полимерных частиц в каждый момент времени, рассчитывали согласно уравнению 8.

Математическое моделирование профилей высвобождения MeП из НЧ проводили с помощью приложения-макроса DDSolver для Microsoft Excel (программное обеспечение Microsoft, Санта-Роза, Калифорния, США).

2.6.7 Анализ связывания MeП с ПМГК

Для определения сродства (константы связывания (Ka)) FeП, MnП, NiП и CoП к ПМГК готовили стоковые растворы MeП (1.65 мкМ) в хлороформе/хлористом метилена/ацетоне (в зависимости от растворителя, используемого в методе получения соответствующих НЧ). Раствор MeП объемом 30 мкл добавляли к растворам ПМГК с массовыми концентрациями 1, 3, 5, 7 и 9% масс./масс. УФ-спектры растворов MeП с ПМГК в различных массовых концентрациях регистрировали в диапазоне 200-600 нм. Для расчета константы связывания (Ka) полученных комплексов (MeП-ПМГК) использовали уравнение Бенеши-Гильдебранда (уравнение 6) [168]:

2.6.8 Исследование стабильности MeП в условиях окислительной деградации

Оптическую плотность MeП (6 мкМ) в присутствии 0.12 mM АК в Трис-буфере (0.05 M, pH 7.8) и 0.1% (масс./об.) растворе Твин-80 регистрировали на спектрофотометре через 0, 5, 60 и 180 мин в диапазоне от 300 до 550 нм [196]. В качестве стандарта использовали Трис-буфер. Массу MeП рассчитывали согласно уравнению 10:

$$m_{MeП} = OC * m_{MeП-НЧ} / 100 \quad (10),$$

где OC – общее содержание MeП в НЧ, используемых в анализе, %; $m_{MeП-НЧ}$ – масса НЧ, используемых в анализе, мг.

2.6.9 Анализ гемолитической активности

Анализ гемолитической активности MeП-НЧ проводили с помощью гемихромного метода, основанного на выявлении окисленных форм гемоглобина. Кровь кролика центрифугировали при 358 g, +4°С в течение 5 мин. Супернатант декантировали и добавляли 0.001 M ФСБ. Процедуру повторяли трижды, далее разбавляли эритроциты 0.001 M ФСБ до соотношения 1:5. Образцы крови при постоянном перемешивании инкубировали с пустыми НЧ, MnП-НЧ, CoП-НЧ и NiП-НЧ в концентрациях 25, 2.5 и 0.25 мг/мл (по массе MeП-НЧ) в течение 3 ч при +37°С (соотношение кровь:образец 1:1). Из-за выраженной гемолитической активности было решено исследовать дополнительные концентрации MnП-НЧ (0.09 мг/мл и 0.009 мг/мл).

Положительный контроль содержал 1% Triton X-100, стимулирующий 100% гемолиз, а 0.001 М ФСБ использовали в качестве отрицательного контроля [197].

После окончания инкубации интактные эритроциты отделяли с помощью центрифугирования при 2,000 g, +4°C в течение 5 мин. Супернатанты переносили в 96-луночный планшет с плоским дном, прикапывали к каждому образцу додецилсульфат натрия (ДСН) до конечной концентрации 0.06%, стимулируя тем самым образование гемихромов. Анализ гемолиза проводили путем сравнения оптической плотности образцов при 540 нм с положительным и отрицательным контролями (уравнение 11) [197]:

$$\text{Гемолиз (\%)} = [A_{\text{образца}} - A_{\text{отр.контр.}}] / [A_{\text{образца}} - A_{\text{поз.контр.}}] * 100\% \quad (11),$$

где $A_{\text{образца}}$ – оптическая плотность образца (среднее значение), $A_{\text{отр.контр.}}$ – оптическая плотность отрицательного контроля (среднее значение), а $A_{\text{поз.контр.}}$ – оптическая плотность положительного контроля (среднее значение).

2.7 Культивирование клеток

Клетки линий MCF-7, 4T1 и HeLa культивировали на среде DMEM или RPMI 1640 в случае клеток линий K562 и SK-OV-3. К культуральным средам добавляли 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина. Культивирование проводили в пластиковых флаконах с площадью нижней стенки 25 см² при +37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Клетки рассевали до достижения 80% конфлюэнтности с использованием раствора трипсин/версена (0.05% и 0.02% соответственно).

2.7.1 Определение цитотоксической активности MeP, MeP-содержащих частиц с помощью МТТ-теста

Клетки линий MCF-7, SK-OV-3 и HeLa рассевали на 96-луночные планшеты (5×10^3 клеток на лунку) за 24 ч до эксперимента и инкубировали в стандартных условиях, клетки линии K562 (12×10^3 клеток на лунку) рассевали непосредственно в день эксперимента. MeP, MeP-НЧ добавляли к клеткам в диапазоне концентраций 0.125–100 мкМ (в соответствии с концентрацией MeP) и инкубировали в течение 2 ч (препараты растворяли в ДМСО и разводили культуральной средой до достижения необходимой концентрации, конечная концентрация растворителя в среде с клетками составляла менее 0.5%). Далее к клеткам прикапывали АК (молярное соотношение MeP к АК составило 1:20) и инкубировали в течение 72 часов. Выживаемость клеток определяли с помощью стандартного МТТ анализа [198]. Жизнеспособность клеток определяли по уравнению 12:

$$\text{Выживаемость} = (A_{\text{образца}} / A_{\text{контр}}) * 100\% \quad (12),$$

где $A_{\text{образца}}$ – значение оптической плотности клеток, инкубированных с экспериментальными образцами; $A_{\text{контр}}$ – значение оптической плотности контрольных клеток, инкубированных

только в культуральной среде. Значения IC50 определяли по графику зависимости выживаемости клеток (%) от концентрации образцов.

Средние значения выживаемости рассчитывались в Excel (Microsoft Corporation, Редмонд, Вашингтон, округ Колумбия, США)), а визуализация данных выполнялась в OriginPro (версия 2020b, OriginLab Corp., Нортгемптон, Массачусетс, США).

2.7.2 Определение уровня АФК

Клетки линии MCF-7 высевали на чашки Петри (3.5 см) в количестве 1×10^5 в 1.5 мл культуральной среды за 24 ч до эксперимента. MeП и MeП-НЧ добавляли к клеткам в концентрации 3 мкМ (по MeП) и инкубировали в течение 2 ч при +37 °С (препараты растворяли в ДМСО и разводили культуральной средой до достижения необходимой концентрации, конечная концентрация растворителя в среде с клетками составляла менее 0.5%). Далее прикапывали АК в молярной концентрации 1:20 по отношению к MeП. После 2 ч инкубации с АК, клеткам удаляли питательную среду и вносили 1 мл ФСБ, содержащий 10 мкМ глюкозы и 20 мкМ ДХФН-ДА. После 20 мин инкубации, клетки дважды промывали ФСБ, переносили в пробирки типа эппендорф и центрифугировали в течение 5 мин при 400 g, +4°С. Далее измеряли интенсивность флуоресценции в клетках на проточном цитофлуориметре Cyan ADP (λex 488 нм, λem 525 для ДХФ) [199].

2.7.3 Определение уровня внутриклеточного супероксид аниона

Клетки линии MCF-7 рассеивали на чашки Петри в количестве 1×10^5 в 1.5 мл культуральной среды за 24 ч до эксперимента. MnП и MnП-НЧ добавляли к клеткам в концентрации 3 мкМ (по MnП) и инкубировали 2 ч в стандартных условиях (препараты растворяли в ДМСО и разводили культуральной средой до достижения необходимой концентрации, конечная концентрация растворителя в среде с клетками составляла менее 0.5%). После инкубации к клеткам прикапывали 60 мкМ АК и оставляли на 24 ч в CO₂-инкубаторе. Далее клетки дважды отмывали ФСБ и окрашивали 10 мкМ MitoSOX® Red в течение 20 мин, переносили в пробирки типа эппендорф и дважды отмывали ФСБ. Интенсивность флуоресценции клеток измеряли на проточном цитофлуориметре Cyan ADP (λex 488 нм, λem 580 нм для MitoSOX® Red).

2.7.4 Анализ изменения мембранного потенциала митохондрий

Клетки линии MCF-7 рассеивали на чашки Петри в количестве 1×10^5 в 1.5 мл культуральной среды за 24 ч до эксперимента. MnП и MnП-НЧ добавляли к клеткам в концентрации 3 мкМ (по MnП) и инкубировали 2 ч в стандартных условиях (препараты растворяли в ДМСО и разводили культуральной средой до достижения необходимой концентрации, конечная концентрация растворителя в среде с клетками составляла

менее 0.5%). По окончании инкубации к клеткам прикапывали 60 мкМ АК и оставляли на 24 ч в CO₂-инкубаторе. Затем клетки переносили в пробирки типа эппендорф и центрифугировали в течение 5 мин при 400 g, +4°C, удаляли питательную среду. Клетки промывали 1 мл ФСБ, центрифугировали в тех же условиях и инкубировали с 10 мкМ DiIC1 в течение 15 минут при +37°C. Далее клетки промывали дважды холодным ФСБ и измеряли их интенсивность флуоресценции на проточном цитофлуориметре Cyan ADP (λ_{ex} 638 нм, λ_{em} 658 нм для DiIC1).

2.7.5 Анализ уровня клеточной гибели

Клетки линии MCF-7 рассеивали на чашки Петри в количестве 1×10^5 в 1.5 мл культуральной среды за 24 ч до эксперимента. MnII и MnII-НЧ добавляли к клеткам в концентрации 3 мкМ (по MnII) и инкубировали 2 ч в стандартных условиях (препараты растворяли в ДМСО и разводили культуральной средой до достижения необходимой концентрации, конечная концентрация растворителя в среде с клетками составляла менее 0.5%). После инкубации к клеткам прикапывали 60 мкМ АК и оставляли на 24 ч в CO₂-инкубаторе. Затем клетки переносили в пробирки типа эппендорф и центрифугировали в течение 5 мин при 400 g, +4°C и удаляли питательную среду. После чего клетки инкубировали с 10 мкл пропидий йодида в концентрации 20 мкг/мл и 10 мкл аннексина V в концентрации 5 мкг/мл в течение 15 минут. Клетки дважды промывали ФСБ и измеряли их интенсивность флуоресценции на проточном цитофлуориметре Cyan ADP (λ_{ex} 488 нм, λ_{em} 617 нм для пропидий йодида и λ_{em} 525 нм для аннексина V).

2.7.6 Оценка цитотоксической активности комбинации АК и MnII/MnII-НЧ в условиях ингибирования антиоксидантной системы защиты клеток

Для оценки цитотоксической активности клетки линии MCF-7 высевали в 96-луночные планшеты по 5×10^3 клеток в лунку за 24 ч до эксперимента. Клетки линии K562 высевали в 96-луночные планшеты по 12×10^3 клеток в лунку непосредственно перед экспериментом. За 2 ч до начала эксперимента к клеткам добавлялись ингибиторы антиоксидантной защиты клеток в концентрациях, не оказывающих влияния на клеточную пролиферацию: ЗАТ – 25.0 мкМ, ДДК – 50.1 нМ, МН – 12.3 нМ. После инкубации к клеткам добавляли MnII и MnII-НЧ в диапазоне концентраций 0.078–10 мкМ (для клеток линии K562) и 0.20–25 мкМ (для клеток линии MCF-7) и инкубировали в течение 2 ч (препараты растворяли в ДМСО и разводили культуральной средой до достижения необходимой концентрации, конечная концентрация растворителя в среде с клетками составляла менее 0.5%). Далее к клеткам прикапывали АК (молярное соотношение АК к MeII = 1:20) и инкубировали в течение 72 часов. Выживаемость клеток определяли с помощью МТТ-теста как указано в разделе 3.7.1.

2.7.7 Определение уровня ферментативной активности антиоксидантной системы защиты клеток

Определение ферментативной активности каталазы, супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы проводили в клетках линий MCF-7 и K562. Клетки линии MCF-7 в количестве 5×10^5 в 10 мл рассевали на чашки Петри (10 см) за день до эксперимента или в день эксперимента для K562 (10×10^5 клеток на чашку Петри). На следующий день к клеткам прикапывали раствор MnП. Растворение образцов проводили по методике, описанной выше, до концентрации 0.45 мкМ MnП (для K562) и 0.67 мкМ MnП (для MCF-7) (раздел 3.7.1). Через 2 ч инкубации с образцами, к клеткам добавляли раствор АК (молярное соотношение АК к MeП составило 1:20) и инкубировали 24 ч или 48 ч. По окончании эксперимента клетки переносили в пробирки типа эппендорф и центрифугировали в течение 5 мин при 400 g, +4°C и удаляли питательную среду. Клетки промывали 1 мл ФСБ, центрифугировали в тех же условиях и ресуспендировали в лизисном буфере, содержащем 10мМ Трис-НСl, 0.25 М сахарозы, 1 мМ этилендиаминтетраацетата (ЭДТА), 0.5 мМ D,L-дитиотриэтол, 0.1 мМ фенилметилсульфонил фторид и Тритон X-100 в конечной концентрации 1%, и инкубировали при +4°C в течение 30 мин. После инкубации клетки центрифугировали в течение 15 мин при 400 g, +4°C, затем надосадочную жидкость отбирали и переносили в пробирки типа эппендорф. Далее в полученных лизатах анализировали на ферментативную активность. Активность каталазы определяли по изменению скорости конверсии 15 мМ перекиси водорода при длине волны 240 нм в ФСБ, рН 7.0 [200]. Активность супероксиддисмутазы оценивали по изменению оптической плотности 0.025 мМ нитротетразолия синего при длине волны 550 нм в ФСБ, рН 7.0. Оптическая плотность нитротетразолия синего уменьшалась за счет образования супероксид аниона, генерируемого в процессе окисления ксантина ксантинооксидазой [201]. Анализ глутатионпероксидазы проводили с использованием спектрофлуориметра в присутствии о-фталевогодиальдегида в ФСБ, рН 7.0 при $\lambda_{ex} = 350$ нм, $\lambda_{em} = 420$ нм [202].

2.7.8 Колониеформирующий анализ

Клетки линии 4Т1 высевали на 6-луночные планшеты в количестве 4×10^3 в 1.5 мл культуральной среды за 24 часа до эксперимента. В день эксперимента клетки линии 4Т1 инкубировали с MnП (30 нМ) и MnП-НЧ (30 нМ по MnП) отдельно и в комбинации с АК в течение 72, 48 и 24 ч. По истечении времени, меняли культуральную среду и инкубировали в течение 14 дней до образования колоний. Клеточные колонии фиксировали в течение 5 мин при комнатной температуре смесью 75% метанол/25% уксусная кислота, затем окрашивали 5% раствором Гимза в течение 30 мин [199]. Колонии считали с помощью программы ImageJ (Национальный институт здоровья, США).

2.7.9 TUNEL анализ

Клетки линии MCF-7 рассеивали в 24-луночные планшеты (4×10^3 клеток на лунку) за день до эксперимента и инкубировали в стандартных условиях. Далее вносили MnII и MnII-НЧ (3 мкМ по MnII) по отдельности и в комбинации с АК, инкубировали в течение 24 ч в условиях описанных выше. Затем клетки дважды отмывали ФСБ, фиксировали 4% параформальдегидом и дегидратировали в серии растворов этилового спирта восходящей концентрации (от 70% до 100%). TUNEL анализ проводили с использованием коммерческого набора TACS•XL®-Blue Detection Kit. TUNEL-положительные клетки изучали при помощи инвертированного светового микроскопа Diaphot.

2.8 Исследования острой токсичности MeII и MeII-НЧ

Анализ острой токсичности MeII и MeII-НЧ (и пустых НЧ) проводили после формирования групп мышей линии BALB/c методом случайной выборки ($n = 3$ для предварительной оценки переносимости и $n = 7$ для оценки LD50). Значения LD50 рассчитывали с помощью Probit-анализа в программном пакете MS Excel согласно руководству по проведению долинических исследований [203]. Образцы в дозах 6.25, 12.5, 25, 50, 100 и 200 мг/кг диспергировали в физиологическом растворе (в случае НЧ) или в растворе кремофора – Cremophor EL (в случае субстанции) и вводили внутривенно в хвостовую вену. В случае субстанции сначала готовили концентрат, состоящий из субстанции, спирта и кремофора, который предварительно перед введением разбавляли физиологическим раствором, получая следующий состав: спирт 5%, кремофор 7%, и до 100% физиологический раствор [204].

Объем введения составлял 200 мкл на каждое животное. Препараты вводили однократно. За состоянием животных осуществляли постоянный контроль на протяжении первых суток и дважды в течение дня утром и вечером в последующие 14 суток с момента введения.

2.9 Исследование противоопухолевой активности *in vivo*

Для эксперимента были выбраны самки мышей линии BALB/c массой 20-22 г. Эксперимент проводили после формирования групп животных ($n = 6$) с помощью метода случайной выборки. Противоопухолевую активность каталитической системы с MnII и MnII-НЧ исследовали на модели привитой опухоли молочной железы мыши 4T1. Опухолевые клетки в количестве 2×10^5 клеток на мышь вводили подкожно в область подлопаточного пространства. Лечение животных начинали через 24 ч после прививки суспензии опухолевых клеток двукратным внутривенным введением на 1-е и 7-е сутки. Животным в 1-й группе вводили физиологический раствор (контроль), во 2-й и 3-й группе – АК в физиологическом растворе из расчета 100 и 1000 мг на кг массы тела животного соответственно, в 4-й и 5-й – MnII в физиологическом растворе из расчета 5 и 50 мг на кг массы тела животного соответственно; в 6-

й и 7-й группе – MnП-НЧ в физиологическом растворе из расчета 5 и 50 мг на кг (по MnП) массы тела животного. Через 2 ч после введения MnП или MnП-НЧ, внутрибрюшинно вводили АК в 20-кратном избытке по отношению к введенному количеству MnП [205]. Противоопухолевую активность MnП и MnП-НЧ оценивали по среднему значению объема опухоли в контрольной и экспериментальных группах животных. Размер опухоли регистрировали каждые 2 дня, а объем опухоли рассчитывали по уравнению 13:

$$V = (a \cdot b^2) / 2 \quad (13),$$

где a – наибольший диаметр опухоли, см; b – наименьший диаметр опухоли, см [206].

Для оценки противоопухолевого эффекта препаратов были определены параметры: торможение роста опухоли (ТРО), рассчитанное по формуле 14:

$$TPO = [(C-T)/C] \times 100\% \quad (14),$$

где C – средний размер опухоли в контрольной группе, получавшей физ.раствор, T – размер опухоли в экспериментальной группе;

среднюю продолжительность жизни определяли по формуле 15:

$$СПЖ = [\sum(PЖ)_n] / N \quad (15),$$

где $(PЖ)_n$ – продолжительность жизни n -го животного (сут), N – число животных в группе; увеличение средней продолжительности жизни животных (УСПЖ) в опытных группах, по сравнению с контрольной, рассчитывали по формуле 16:

$$УСПЖ = (T/C - 1) \times 100\% \quad (16),$$

где T – средняя продолжительность жизни (СПЖ) леченых животных, дни; C – СПЖ контрольных животных, дни [207].

2.10 Исследование биораспределения MnП-НЧ и MnП *in vivo* методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой

Исследование биораспределения MnП и MnП-НЧ проводили после формирования групп мышей линии BALB/c ($n = 3$) методом случайной выборки. Образцы в дозе 25 мг/кг (по MeП) диспергировали в физиологическом растворе (в случае НЧ) или в растворе кремофора – Cremophor EL (в случае субстанции) и вводили внутривенно в хвостовую вену. В случае субстанции сначала готовили концентрат, состоящий из субстанции, спирта и кремофора, который предварительно перед введением разбавляли физиологическим раствором, получая следующий состав: спирт 5%, кремофор 7%, и до 100% физиологический раствор. Через 24 ч после введения животные подвергались эвтаназии. Органы извлекали и замораживали, хранили при -70°C до проведения количественного анализа.

Определение Mn в образцах тканей проведено с использованием масс-спектрометра. Методика определения основана на использовании автоклавного кислотного разложения

анализируемых образцов и последующего анализа полученных растворов методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (МС-ИСП).

Для разложения проб тканей использовали систему автоклавного разложения с резистивным нагревом (ЭТАС-6), производства ИПТМ РАН. Разложение образцов проводили партиями, состоящими из анализируемых образцов, стандартного образца и контрольного (холостого) образца. Масса анализируемых и стандартного образца составляют от 50 до 350 мг. Замороженные образцы тканей взвешивали в тефлоновых реакционных емкостях автоклавов и добавляли в зависимости от массы образца от 0,5 до 1,2 см³ концентрированной азотной кислоты [208]. Реакционные емкости закрывали крышками и герметизировали в титановых кожухах аналитических автоклавов. Автоклавы помещали в электронагреватель и выдерживали 1 час при 180°C и 1 час при 200°C. После охлаждения автоклавы открывали в вытяжном шкафу, полученные растворы переносили в полиэтиленовые пробирки. Конечный объем раствора, полученный добавлением деионизованной воды, составлял от 6 до 12 мл в зависимости от массы образца. В каждый раствор, в зависимости от объема, добавляли от 0,06 до 0,12 мл раствора, содержащего 1 мг/дм³ Sc, так чтобы содержание Sc в каждой пробирке составляло 10 мкг/дм³ (*внутренний стандарт при масс-спектральных измерениях*). В качестве контрольных (холостых) образцов в тефлоновых реакционных емкостях проводят описанные выше процедуры без образца.

Содержание Mn в образцах определяли методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой (X Series 2, Thermo Scientific, США). Определение проводили при следующих параметрах работы масс-спектрометра: выходная мощность генератора – 1400 Вт; распылитель – концентрический PolyCon; распылительная камера – кварцевая охлаждаемая (3°C); расход плазмообразующего потока Ar – 13 л/мин; расход вспомогательного потока Ar – 0.90 л/мин; расход потока Ar в распылителе – 0.90 л/мин; расход анализируемого образца – 0.8 мл/мин; разрешение – 0.8M. Определение Mn в образцах проводили количественным методом с использованием градуировочных растворов, содержащих от 1 до 150 мкг/л определяемого элемента. Обработку масс-спектров и расчеты содержания элементов в пробах проводили с использованием программного обеспечения масс-спектрометра. Относительное стандартное отклонение для всех элементов не превышало 0.2 при измерении содержания этих элементов до 5*ПО и не превышало 0.10 при измерении содержания >5*ПО. Для проверки правильности проведения анализа образцов использовали международный стандартный образец Oriental Polish Virginia Tobacco Leaves (INCT-PVTL-6).

2.11 Статистический анализ

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения Design Expert 7.0 (Stat-Ease Inc., версия 7.0; Миннеаполис, Миннесота, США), Data Acquisition Station (DAS) (MREL Group of Companies, версия 2.0; Онтарио, Канада). Также статистический анализ

проводился с использованием t-критерия Стьюдента или теста ANOVA, различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0.05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

MeП – известные катализаторы ОВР, широко использующиеся в медицине [23], что делает их актуальными кандидатами для применения в каталитической терапии. На сегодняшний день существует всего несколько соединений, перспективных для применения в качестве агентов каталитической терапии опухолевых заболеваний (MnTE-2-PyP⁵⁺, MnTnBuOE-2-PyP⁵⁺, ТФ), в связи с чем, поиск MeП, проявляющих терапевтическую эффективность в составе каталитической системы, представляется актуальной задачей [6,9,49].

В данной работе были исследованы аналоги природных MeП, таких как: Fe (гем, цитохром P450), Co (витамин B12) и Ni (коэнзим F430), поскольку соединения данного ряда ранее показали перспективность применения в каталитической терапии [30-35,209-213]. Согласно литературным данным, значительную противоопухолевую активность проявляют комбинации АК и производных Mn-порфиринов, поэтому Mn-тетрафенилпорфирин также был исследован в рамках данной работы [7,39,44-46]. Дополнительное включение MeП в НЧ на основе ПМГК способствует сохранению активности MeП в организме и позволяет уменьшить токсические побочные эффекты [55]. В рамках данной работы было проведено исследование, позволяющее определить влияние технологических параметров метода получения НЧ, содержащих MeП, на конечные характеристики синтезированных НЧ, оптимизировать технологию получения MeП-НЧ. Также были проведены эксперименты *in vitro* и *in vivo* для подтверждения противоопухолевой активности каталитических систем MeП-НЧ и АК.

3.1 Оптимизация процесса получения НЧ, содержащих MeП

Включение гидрофобных препаратов в НЧ позволяет решить проблему ограниченной растворимости в физиологических условиях и снизить побочные эффекты. Однако, для получения частиц с наилучшими физико-химическими характеристиками необходимо провести тщательный подбор технологических параметров и выявить какие из них оказывают наибольшее влияние на конечные показатели НЧ.

Методология анализа поверхности отклика (планы Бокса-Бенкена) позволяет исследовать взаимосвязь между параметрами процесса (независимыми переменными) и характеристиками полученного продукта (переменными отклика; зависимыми переменными). Преимуществами данной методики являются относительно небольшое количество экспериментов, возможность многофакторного анализа и выявление наиболее подходящих условий и прогнозов отклика. На основе экспериментальных данных строятся контурные графики и модельные уравнения, что позволяет определить степень влияния параметра на зависимые переменные и получить оптимальные значения исследуемых параметров.

Ранее проведенные исследования выявили значимое влияние массы полимера, концентрации стабилизатора эмульсии и соотношения органической/водной фаз на содержание активного вещества в частицах и их средний размер [214]. ПМГК был выбран в качестве носителя для создания системы доставки MeП, поскольку он не вызывает аллергических реакций, и разлагается на продукты, вовлеченные в метаболизм [135]. В качестве стабилизатора эмульсии использовали поливиниловый спирт, поскольку, согласно литературным данным, он является наиболее применяемым стабилизатором формирующихся полимерных частиц [140]. В качестве органической фазы использовали хлороформ (для получения частиц с FeП или MnП), хлористый метилен (для NiП) и ацетон (для CoП). Преципитация и одинарное эмульгирование являются одними из самых распространенных технологий получения НЧ благодаря своей простоте и воспроизводимости [149]. Исходя из используемой органической фазы, частицы, содержащие FeП, MnП и NiП, получали методом одинарного эмульгирования, а частицы с CoП – методом преципитации.

В связи с этим, оптимизацию процесса получения НЧ, содержащих FeП, MnП, CoП и NiП, проводили с помощью метода Бокса-Бенкена, а в качестве параметров, влияющих на физико-химические характеристики частиц, как было отмечено ранее, были выбраны масса ПМГК (X_1), концентрация поливинилового спирта (ПВС) (X_2), соотношение органической и водной фазы (O/W) (X_3). Высокие значения ОС (Y_1 , %) и низкие значения РЧ (Y_2 , нм) считались важными условиями оптимизации параметров НЧ.

Оптимизация проводилась на двух уровнях (низком и высоком), как указано в таблице 4.

Таблица 4. Параметры варьирования, используемые в экспериментах. X_1 – масса ПМГК, мг; X_2 – концентрация ПВС, %; X_3 – соотношение органической и водной фазы (O/W).

Параметры		Уровни	
		<i>Низкий</i>	<i>высокий</i>
X_1	ПМГК, мг	5	45
X_2	ПВС, %	0.5	2
X_3	O/W (об./об.)	0.05	0.2

Планирование эксперимента основывалось на 2-х уровневом 3-х факторном плане с пятью повторами центральных параметров, в результате чего требовалось получение 17 партий частиц, содержащих MeП (таблица 5).

Результаты эксперимента анализировали с помощью теста ANOVA, который позволяет выбрать математическую модель для анализа влияния параметров и получить уравнение регрессии и его графическую интерпретацию – поверхность отклика. Если выбранная математическая модель имела высокое значение по критерию Фишера и низкое по р-критерию

($p < 0.05$), то она являлась значимой и с её помощью было возможно предсказание численных значений откликов в дальнейших экспериментах [157].

Таблица 5. Планирование эксперимента по планам Бокса-Бенкена, основанное на 2-х уровневом 3-х факторном плане с пятью повторами центральных параметров.

№	Независимые переменные		
	X_1	X_2	X_3
1	-1	0	-1
2	-1	0	1
3	0	0	0
4	1	0	1
5	-1	1	0
6	0	0	0
7	1	1	0
8	0	-1	1
9	0	0	0
10	1	0	-1
11	1	-1	0
12	0	0	0
13	0	0	0
14	-1	-1	0
15	0	1	-1
16	0	1	1
17	0	-1	-1

Для проверки адекватности предсказания численных значений выбранной моделью использовали коэффициент детерминации и скорректированный коэффициент детерминации. Уравнения регрессии, двух- и трехмерные диаграммы поверхностей отклика определяли параметры, оказывающие наибольшее влияние на функции отклика, что способствовало дальнейшей оптимизации технологии получения НЧ. Полученные уравнения позволили выявить значимость каждого параметра в получении НЧ и характер взаимодействия пар параметров на отклик: синергетический (повышение значений параметров приводит к увеличению значения отклика, если коэффициенты имеют положительный знак) или антагонистический (повышение значений параметров приводит к уменьшению значения отклика, если коэффициенты имеют отрицательный знак) [162]. Полученные двух- и трехмерные диаграммы поверхностей отклика представляли собой графическую интерпретацию уравнений регрессии. Линейно наклоненные диаграммы поверхности отклика указывали на выраженное позитивное или негативное влияние варьируемых параметров, а также на их синергетические или антагонистические эффекты взаимодействия. Нелинейные диаграммы поверхности отклика (эллипсоид, гиперболоид и др.) описывали более сложные взаимодействия параметров, когда в средних точках используемых параметров наблюдалось повышение или уменьшение отклика.

Подробное описание процессов оптимизации для получения НЧ, содержащих FeII, MnII, NiII и CoII, представлено ниже.

3.1.1 Анализ данных после получения NiII-НЧ по плану Бокса-Бенкена

Результаты 17 экспериментов, уровни параметров и кодированные величины приведены в таблице 6. На их основе был проведен статистический анализ, позволивший получить диаграммы поверхностей отклика и определить уравнения регрессии (рис. 12 и 13, уравнение 14 и 15).

По результатам, приведенным в таблице 6, можно заключить, что варьирование параметров оказывает значительное влияние на ОС (ОС полученных частиц находилось в широком диапазоне от 2% до 20%, таблица 6, зависимые переменные Y_1) и РЧ (РЧ находился в широком диапазоне от 270 нм до 700 нм, таблица 6, зависимые переменные Y_2).

Таблица 6. Влияние независимых параметров на функции отклика при получении НЧ с NiII.

№	Независимые переменные			Зависимые переменные	
	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2
1	-1	0	-1	5±0	395±4
2	-1	0	1	14±1	376±10
3	0	0	0	3±1	350±7
4	1	0	1	3±0	272±4
5	-1	1	0	7±0	372±7
6	0	0	0	3±0	370±4
7	1	1	0	3±0	454±10
8	0	-1	1	5±1	435±11
9	0	0	0	3±1	338±6
10	1	0	-1	2±0	557±7
11	1	-1	0	5±1	338±5
12	0	0	0	3±1	347±8
13	0	0	0	3±1	300±2
14	-1	-1	0	20±0	341±6
15	0	1	-1	3±1	419±4
16	0	1	1	5±1	409±2
17	0	-1	-1	4±1	700±20

Для обоих откликов были подобраны и проанализированы математические модели: линейная (первый порядок), 2FI (двухфакторное взаимодействие) и квадратичная (второй порядок). На основе значимостей р-величины и F-критерия Фишера была выбрана квадратичная модель для дальнейшей оптимизации НЧ (таблица 7).

Для зависимого параметра (ОС) адекватность модели была подтверждена с использованием р-величины ($0.034 < 0.05$) и коэффициента детерминации (R^2) ($0.9049 > 0.9000$). Значения РЧ были близки к значениям сравнения (р-значение: $0.0518 > 0.05$, R^2 : $0.8258 < 0.9000$), что частично поставило под сомнение адекватность модели прогноза для этого параметра.

ANOVA анализ показал, что квадратичная модель надежна и точна в отношении чистой ошибки [157,158].

Таблица 7. Регрессионный анализ результатов эксперимента по получению NiП-НЧ по планам Бокса-Бенкена (* выбранная модель для построения диаграмм поверхности отклика).

Модель	R ²	скорректированный R ²	F-величина	p-величина
Отклик Y₁ (ОС NiП, %)				
Линейная	0.5590	0.4572	215.08	<0.0001
2FI	0.6943	0.5109	223.43	<0.0001
Квадратичная*	0.9049	0.7827	138.07	0.0002
Отклик Y₂ (РЧ, нм)				
Линейная	0.2887	0.1246	19.04	0.0061
2FI	0.5068	0.2110	19.60	0.0062
Квадратичная*	0.8258	0.6019	12.98	0.0158

3.1.1.1 Общее содержание NiП в НЧ

ОС является важным параметром оценки полученных НЧ, поскольку успешное применение НЧ в терапии различных заболеваний тесно связано с содержанием лекарственного препарата в НЧ, влияющим на его эффективность, количество вводимой дозы и кратность введения [214].

ОС NiП в НЧ находилось в диапазоне от 2 до 20 % (таблица 6, зависимые переменные, Y₁).

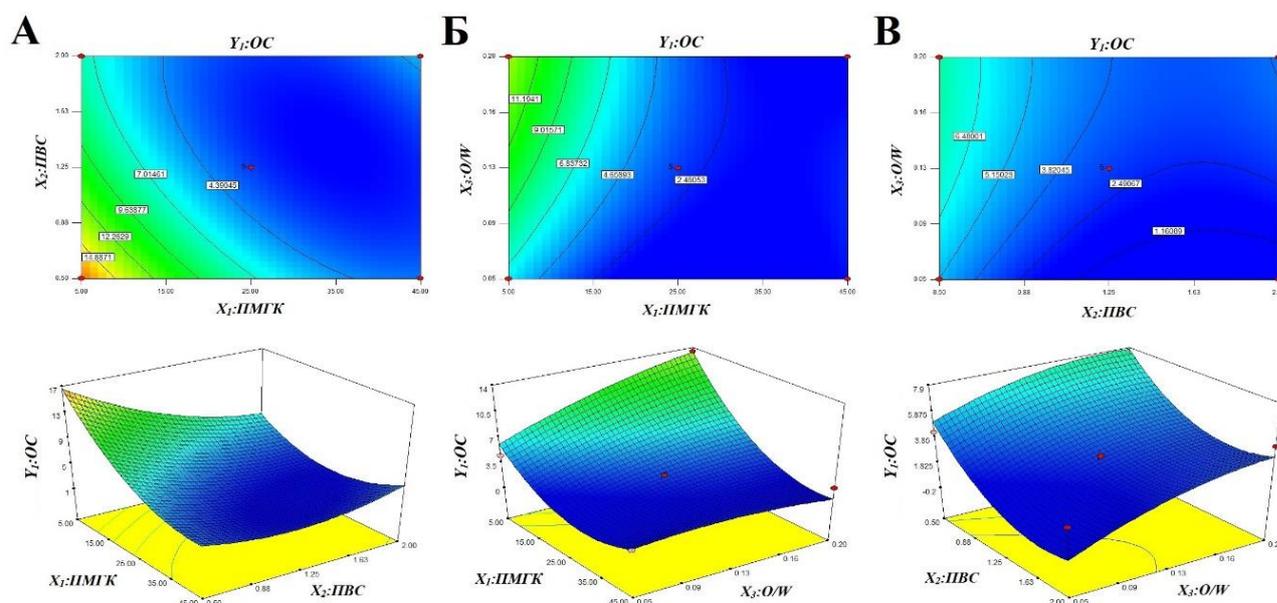


Рисунок 12. Двух- и трехмерные графики поверхности отклика для Y₁, описывающие взаимодействие ПМС (%) и ПМГК (мг) (А), О/В (об/об) и ПМГК (мг) (Б), О/В (об/об) и ПМС (%) (В).

Для оценки влияния независимых переменных на ОС NiП в НЧ, было использовано уравнение регрессии, полученное с помощью теста ANOVA:

$$Y_1 = 20.3 - 0.7X_1 - 17.1X_2 + 83.1X_3 + 0.2X_1X_2 - 1.3X_1X_3 + 4.9X_2X_3 + 0.01X_1^2 + 3.6X_2^2 - 138.0X_3^2 \quad (17)$$

Согласно коэффициентам регрессии из квадратного уравнения 17, соотношение O/W являлось положительно значимым параметром (+83.1X₃), что подтверждалось двух- и трехмерными диаграммами поверхностей отклика (рис. 12). Уменьшение объема водной фазы препятствовало диффузии органического растворителя в водный раствор и приводило к образованию НЧ с повышенным ОС NiП [190]. ПМГК и ПВС были отрицательно значимыми параметрами (-0.7X₁ и -17.1X₂, соответственно): низкая концентрация ПВС способствовала облегченной диффузии органического растворителя в водную фазу и стабилизации НЧ, а низкая концентрация ПМГК приводила к быстрому формированию НЧ [190]. Таким образом, взаимодействие ПМГК-ПВС и ПВС-O/W оказывало синергетический эффект на функцию отклика (+0.2X₁X₂ и +4.9X₂X₃, соответственно), тогда как взаимодействие O/W с ПМГК имело антагонистический эффект (-1.3X₁X₃).

3.1.1.2 Средний диаметр частиц NiП-НЧ

РЧ – также является важной характеристикой НЧ, влияющей на такие функции как неспецифический захват НЧ ретикулоэндотелиальной системой, быстрое выведение почками и накопление в клетках-мишенях [59]. РЧ NiП-НЧ находился в диапазоне от 272 до 700 нм (таблица 6, зависимые переменные, Y₂). На основе анализа ANOVA, было получено уравнение регрессии для предсказания формы поверхности отклика:

$$Y_2 = 929.3 + 8.1X_1 - 483.3X_2 - 5133.2X_3 + 1.4X_1X_2 - 44.4X_1X_3 + 1136.0X_2X_3 - 0.1X_1^2 + 111.6X_2^2 + 15430.2X_3^2 \quad (18)$$

Из уравнения регрессии 18 можно заключить, что наиболее значимым параметром, влияющим на РЧ является O/W (коэффициент регрессии +15430.2X₃²), а ПМГК оказывал позитивный эффект на РЧ (коэффициент регрессии +8.1X₁): с повышением массы ПМГК увеличивался размер получаемых частиц. Также выявлен антагонистический эффект взаимодействия ПМГК и O/W (коэффициент регрессии (-44.4X₁X₃)), что подтверждается диаграммами поверхности отклика (рис. 13Б).

Повышение РЧ, вызванное увеличением массы ПМГК в процессе получения НЧ, описывается во многих исследованиях [188,189,214]. Однако, в данном случае взаимодействие ПВС с ПМГК и O/W вызывало синергетический эффект: уменьшение объема водной фазы по отношению к органической приводило к снижению РЧ [215]. Описанные условия, вероятно, лучше стабилизировали капли частиц в водной фазе и предотвращали их агрегацию в

присутствии высокой концентрации ПВС [216]. Как и ожидалось, эффект взаимодействия между ПМГК и соотношением О/В на РЧ оказался антагонистическим.

Оптимизацию получения НЧ проводили на основе метода многокритериальной оптимизации (раздел 3.1.5) и выбирали условия с наибольшим значением критерия желательности (таблица 14). Таким образом, оптимизированные НЧ с максимальным ОС и минимальным РЧ были получены с использованием ПМГК – 5 мг, ПВС – 1.47%, О/В – 1:7.

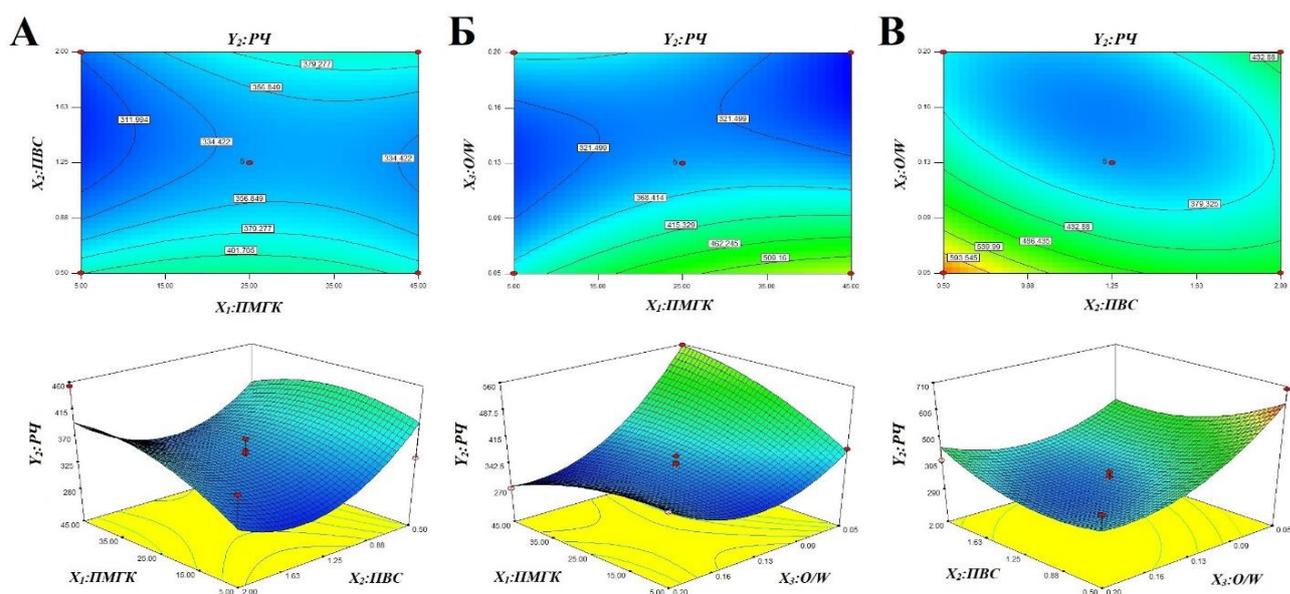


Рисунок 13. Двух- и трехмерные графики поверхности отклика для Y_2 , описывающие взаимодействие ПВС (%) и ПМГК (мг) (А), О/В (об/об) и ПМГК (мг) (Б), О/В (об/об) и ПВС (%) (В).

3.1.2 Анализ данных после получения FeП-НЧ по плану Бокса-Бенкена

В таблице 8 представлены результаты 17 экспериментов, проведенных в соответствии с планами Бокса-Бенкена.

Таблица 8. Влияние независимых параметров на функции отклика при получении НЧ с FeСiТФП.

№	Независимые переменные			Зависимые переменные	
	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2
1	0	0	0	17±1	298±4
2	0	0	0	8±1	278±4
3	1	1	0	12±0	274±2
4	1	-1	0	16±0	226±2
5	-1	0	1	5±1	261±5
6	-1	-1	0	12±1	303±7
7	0	1	-1	12±0	275±7
8	-1	1	0	13±0	392±3

9	0	0	0	7±1	305±3
10	1	0	-1	16±1	247±5
11	0	1	1	12±0	283±5
12	0	0	0	18±1	291±3
13	0	-1	1	12±1	275±6
14	-1	0	-1	7±0	261±4
15	0	-1	-1	6±0	304±9
16	1	0	1	12±1	336±8
17	0	0	0	11±0	305±1

Среди значений зависимых переменных выявлен широкий разброс, что указывает на значительное влияние независимых переменных. Для обеих поверхностей отклика были рассчитаны F-критерий Фишера, коэффициент детерминации R^2 и скорректированный R^2 , на основе которых были подобраны математические модели, способные предсказывать максимально близкие величины зависимых параметров к экспериментально полученным данным. Квадратичные модели были выбраны как наиболее подходящие для описания влияния независимых переменных на ОС и РЧ (таблица 9).

Таблица 9. Регрессионный анализ результатов эксперимента по получению FeП-НЧ по планам Бокса-Бенкена (*выбранная модель для построения диаграмм поверхности отклика).

Модель	R^2	скорректированный R^2	F-величина	p-величина возможно > F
Отклик Y_1 (ОС FeП, %)				
<i>Линейная</i>	0.1776	-0.0122	0.40	0.8841
<i>2FI</i>	0.2620	-0.1808	0.47	0.8060
<i>Квадратичная*</i>	0.3830	-0.4104	0.56	0.6669
Отклик Y_2 (РЧ, нм)				
<i>Линейная</i>	0.2001	0.0155	14.74	0.0099
<i>2FI</i>	0.3132	-0.0989	18.89	0.0067
<i>Квадратичная*</i>	0.3689	-0.4424	34.60	0.0025

Далее на основе квадратичной полиномиальной модели были получены уравнения для обеих функций отклика и построены диаграммы.

3.1.2.1 Общее содержание FeП в НЧ

По результатам 17 экспериментов были получены частицы с ОС в диапазоне от 5 до 18 % (таблица 4, зависимые переменные, Y_1). Как показано в уравнении 19, полученном с помощью теста ANOVA, коэффициенты регрессии, указывающие на влияние взаимодействия параметров, имели отрицательный знак ($-0.1X_1X_2$, $-0.3X_1X_3$, $-29.7X_2X_3$), что указывает на то, что с повышением каждого из варьируемых параметров будет снижаться ОС FeП в частицах.

$$Y_1 = -4.1 + 0.3X_1 + 2.4X_2 + 157.5X_3 - 0.1X_1X_2 - 0.3X_1X_3 - 29.7X_2X_3 - 0.0002X_1^2 \quad (19) \\ + 1.5X_2^2 - 445.2X_3^2$$

Наиболее значимым параметром оказалось соотношение О/В (коэффициент регрессии $445.2X_3^2$), в то же время, все параметры, варьируемые в эксперименте, сами по себе оказывали позитивный эффект на ОС FeП ($+0.3X_1 + 2.4X_2 + 157.5X_3$), что свидетельствует о том, что повышение значений данных параметров приводит к повышению ОС.

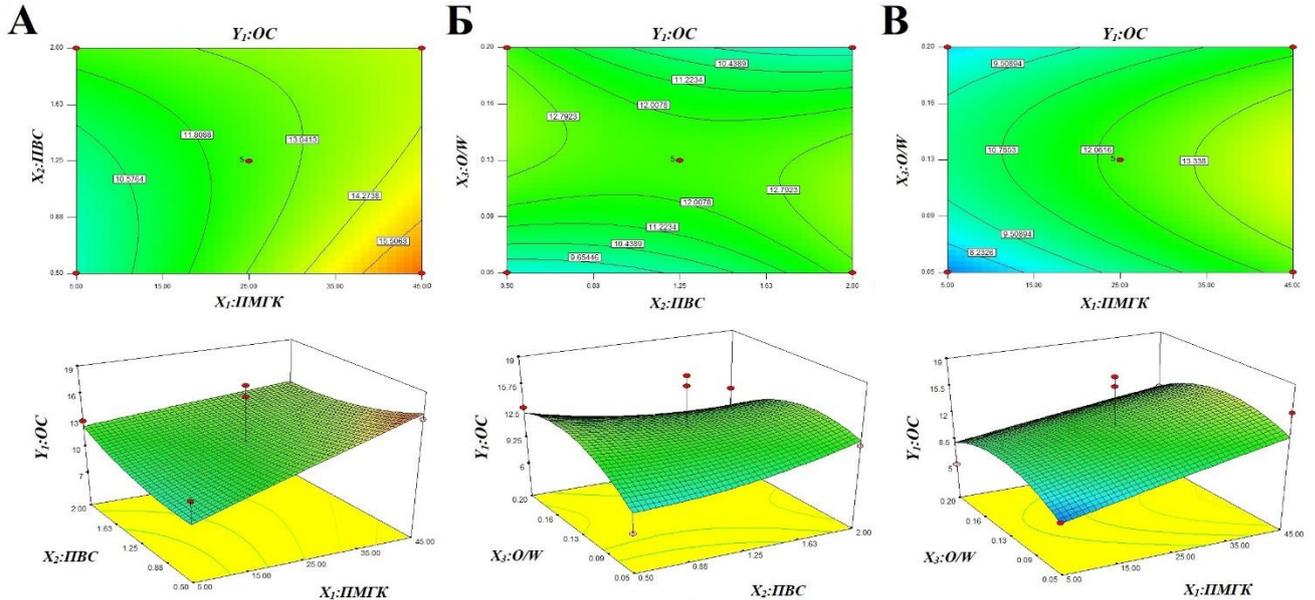


Рисунок 14. Двух- и трехмерные графики поверхности отклика для Y_1 , описывающие взаимодействие ПВС (%) и ПМГК (мг) (А), О/В (об/об) и ПВС (%) (Б), О/В (об/об) и ПМГК (мг) (В).

Как показано на рисунке 14, с увеличением массы полимера повышалась вязкость органической фазы, которая снижала уровень распределения активного вещества в водную фазу и сохраняла вещество внутри частиц. Высокая концентрация ПВС, вероятно, способствовала улучшению солубилизации FeП и его ускоренной диффузии в большой объём водной фазы, что приводило к уменьшению ОС FeП в частицах [217].

3.1.2.2 Средний диаметр частиц FeП-НЧ

Согласно результатам анализа, представленным в таблице 8 (зависимые переменные, Y_2), РЧ находился в диапазоне от 226 до 392 нм. Зависимость РЧ от независимых параметров была представлена в виде регрессионного уравнения 20, полученного с помощью теста ANOVA:

$$Y_2 = 290.1 - 1.2X_1 - 13.0X_2 + 319.0X_3 - 0.7X_1X_2 + 14.7X_1X_3 + 81.3X_2X_3 - 0.01X_1^2 + 14.5X_2^2 - 2567.1X_3^2 \quad (20)$$

Из регрессионного уравнения 20 можно отметить, что взаимодействия О/В с ПМГК (коэффициент регрессии $+14.7X_1X_3$) и О/В с ПВС (коэффициент регрессии $+81.3X_2X_3$) проявляли синергетический эффект. На рисунке 15Б,В также показан синергетический эффект взаимодействия О/В с ПВС или ПМГК на РЧ, который может зависеть от вязкости как

органической, так и водной фазы. Повышение массы ПМГК увеличивало вязкость органической фазы и устойчивость НЧ к распаду на более мелкие частицы, в результате чего, вероятно, происходило образование капель большего размера. Высокая вязкость органической фазы могла также способствовать снижению скорости диффузии растворителя во внешнюю водную фазу, что приводило к повышению РЧ [217].

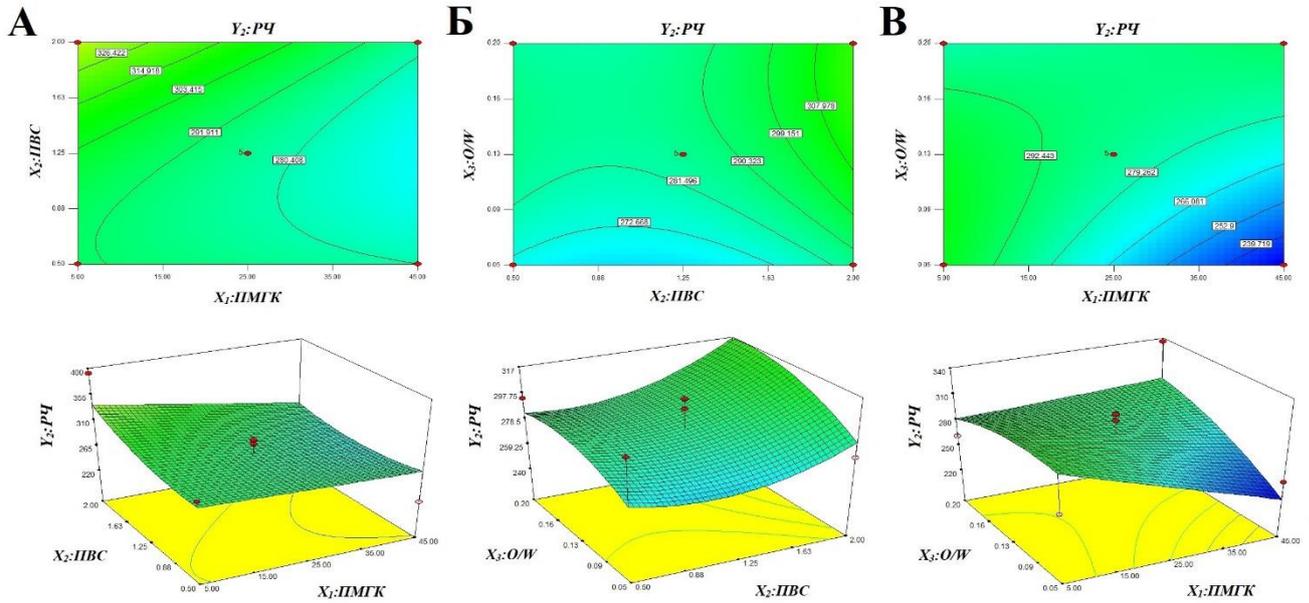


Рисунок 15. Двух- и трехмерные графики поверхности отклика для Y_2 , описывающие взаимодействие ПВС (%) и ПМГК (мг) (А), О/В (об/об) и ПВС (%) (Б), О/В (об/об) и ПМГК (мг) (В).

По результатам метода многокритериальной оптимизации (раздел 3.1.5, таблица 14) были выбраны следующие значения параметров: ПМГК – 45 мг, ПВС – 2%, О/В – 1:20. Стоит отметить, что из всех исследуемых МеП-НЧ, масса полимера и концентрация стабилизатора оказывали синергетический эффект только на ОС FeП в НЧ (уравнение 19), что может обуславливать выбор высоких значений параметров для оптимизации частиц.

3.1.3 Анализ данных после получения МнП-НЧ по плану Бокса-Бенкена

Полученные частицы характеризовались ОС МнП в диапазоне от 3.4 до 17.0 % (таблица 8, зависимые переменные, Y_1) и РЧ от 247 до 485 нм (таблица 10, зависимые переменные, Y_2).

Таблица 10. Влияние независимых параметров на функции отклика при получении НЧ с MnCl₂ФП.

№	Независимые переменные			Зависимые переменные	
	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2
1	0	0	0	10±1	257±4

2	0	0	0	10±0	250±4
3	1	1	0	6±1	287±2
4	1	-1	0	8±0	270±2
5	-1	0	1	8±1	325±5
6	-1	-1	0	17±0	289±7
7	0	1	-1	3±0	381±7
8	-1	1	0	13±0	260±3
9	0	0	0	10±1	260±3
10	1	0	-1	7±1	358±5
11	0	1	1	10±1	304±5
12	0	0	0	10±1	248±3
13	0	-1	1	16±1	477±6
14	-1	0	-1	8±0	325±4
15	0	-1	-1	15±1	484±9
16	1	0	1	9±1	256±8
17	0	0	0	10±1	256±1

Значения коэффициента детерминации R^2 и скорректированного R^2 подтвердили адекватность математической модели (таблица 11). Значения коэффициентов детерминации ≥ 0.9 свидетельствовали о высокой степени корреляции между рассчитанными и экспериментальными данными [157].

Таблица 11. Регрессионный анализ результатов эксперимента по получению MnII-НЧ по планам Бокса-Бенкена (* выбранная модель для построения диаграмм поверхности отклика).

Модель	R^2	скорректированный R^2	F-величина	p-величина возможно > F
Отклик Y_1 (ОС MnII, %)				
<i>Линейная</i>	0.6454	0.5636	1848.64	<0.0001
<i>2FI</i>	0.8639	0.7822	1063.97	<0.0001
<i>Квадратичная*</i>	0.9142	0.8038	1341.31	<0.0001
Отклик Y_2 (РЧ, нм)				
<i>Линейная</i>	0.1800	-0.0092	295.54	<0.0001
<i>2FI</i>	0.2136	-0.2582	425.13	<0.0001
<i>Квадратичная*</i>	0.8972	0.7649	110.03	0.0003

Для анализа влияния параметров на ОС MnII в частицах была выбрана квадратичная модель, поскольку её адекватность была подтверждена значениями p-величины ($p < 0.05$) и коэффициента детерминации (R^2) ($0.9142 > 0.9000$). Также квадратичная модель была выбрана для РЧ, поскольку критерии адекватности для данной модели были близки к значениям сравнения (p-значение: $0.0003 < 0.05$, R^2 : $0.8972 < 0.9000$). Тем не менее, схожесть R^2 и скорректированного R^2 (< 0.2) указывает то, что выбранная модель подходит для описания влияния параметров.

3.1.3.1 Общее содержание МнП в НЧ

Уравнение регрессии 21, полученное с помощью теста ANOVA, выявило синергетические эффекты взаимодействия ПМГК с ПВС (коэффициент регрессии $+0.04X_1X_2$) и ПВС с О/В (коэффициент регрессии $+25.78X_2X_3$). Стоит также отметить, что влияние массы ПМГК (коэффициент регрессии $-0.004X_1$) и концентрации ПВС (коэффициент регрессии $-3.45X_3$) оказывало антагонистический эффект на ОС: с увеличением каждого из параметров понижается ОС МнП в НЧ. В свою очередь, уменьшение объема водной фазы (коэффициент регрессии $+30.24X_3$) могло замедлять диффузию хлороформа в воду, способствуя сохранению массы МнП внутри НЧ [217].

$$Y_1 = 12.94 - 0.04X_1 - 3.45X_2 + 30.24X_3 + 0.04X_1X_2 - 3.65X_1X_3 + 25.78X_2X_3 + 0.004X_1^2 - 1.86X_2^2 + 331.20X_3^2 \quad (21)$$

Рисунок 16А,В демонстрирует антагонистическое влияние ПВС на ОС МнП. Вероятно, низкая концентрация ПВС способствовала повышению ОС за счет уменьшения поверхностного натяжения эмульсии [189].

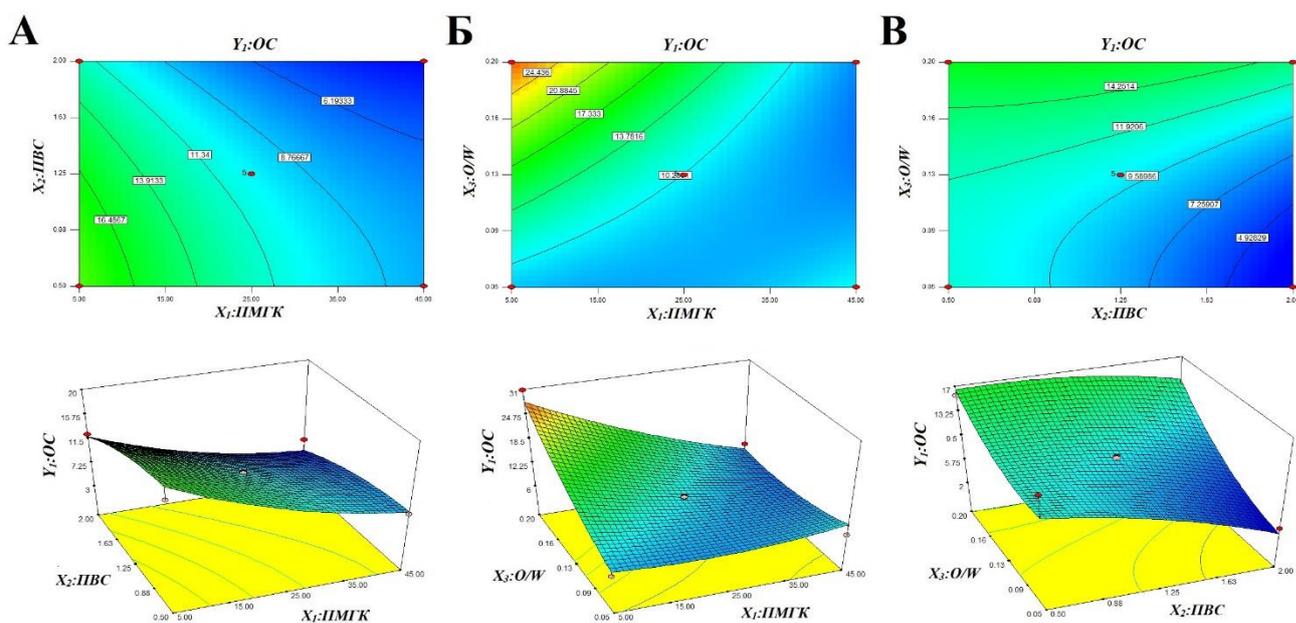


Рисунок 16. Двух- и трехмерные графики поверхности отклика для Y_1 , описывающие взаимодействие ПВС (%) и ПМГК (мг) (А), О/В (об/об) и ПМГК (мг) (Б), О/В (об/об) и ПВС (%) (В).

3.1.3.2 Средний диаметр частиц МнП-НЧ

Из коэффициентов регрессии в уравнении 22, полученном с помощью ANOVA анализа, видно, что ПМГК оказывает положительный эффект на РЧ (коэффициент регрессии $+5.6X_1$), следовательно, повышение массы ПМГК будет способствовать уменьшению РЧ.

$$Y_2 = 670.8 + 5.6X_1 - 307.7X_2 - 3879.9X_3 + 0.8X_1X_2 - 11.8X_1X_3 - 315.1X_2X_3 - 0.1X_1^2 + 112.1X_2^2 + 16829.3X_3^2 \quad (22)$$

Между тем, взаимодействие О/В с ПМГК (коэффициент регрессии $-11.8X_1X_3$) и О/В с ПВС (коэффициент регрессии $-315.1X_2X_3$) оказывало антагонистический эффект на РЧ. Рисунок 17В иллюстрирует влияние О/В и ПВС по типу «купола» на поверхность отклика, указывая на начальное нелинейное уменьшение, сопровождающееся повышением РЧ, содержащих МнП. Возможно, синергетическое взаимодействие параметров ПВС и О/В влияло на вязкость водной фазы: снижение вязкости, вызванное уменьшением концентрации ПВС или увеличением объема водной фазы, могло привести к потере агрегативной устойчивости частиц и их коагуляции [218].

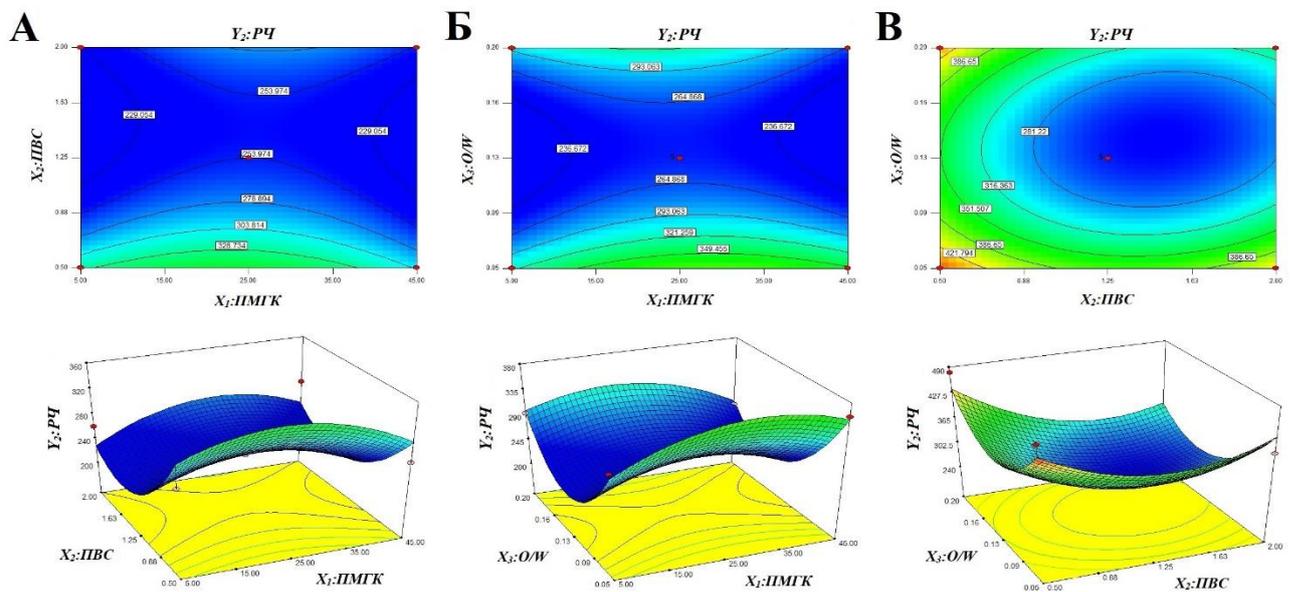


Рисунок 17. Двух- и трехмерные графики поверхности отклика для Y_2 , описывающие взаимодействие ПВС (%) и ПМГК (мг) (А), О/В (об/об) и ПМГК (мг) (Б), О/В (об/об) и ПВС (%) (В).

На основе метода многокритериальной оптимизации (раздел 3.1.5, таблица 14) были выявлены следующие значения параметров: ПМГК – 5 мг, ПВС – 1.42%, О/В – 1:5.6.

3.1.4 Анализ данных после получения СоП-НЧ по плану Бокса-Бенкена

По результатам 17 экспериментов были получены частицы, с ОС СоП в диапазоне от 0.4 до 10.9 % и РЧ от 203 до 714 нм (таблица 12).

Таблица 12. Влияние независимых параметров на функции отклика при получении НЧ с СоП.

№	Независимые переменные			Зависимые переменные	
	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2
1	0	0	0	2 ± 0	590 ± 5

2	0	0	0	2±0	606±9
3	1	1	0	1±0	397±4
4	1	-1	0	1±0	319±3
5	-1	0	1	8±1	572±2
6	-1	-1	0	6±1	442±3
7	0	1	-1	0±1	206±5
8	-1	1	0	11±0	672±4
9	0	0	0	3±1	597±5
10	1	0	-1	2±1	686±8
11	0	1	1	2±1	203±1
12	0	0	0	2±0	587±8
13	0	-1	1	2±1	252±9
14	-1	0	-1	1±1	544±7
15	0	-1	-1	3±0	241±9
16	1	0	1	1±1	714±6
17	0	0	0	2±0	596±10

Далее, по результатам регрессионного анализа определяли уравнения регрессии для частиц с СоП.

Таблица 13. Регрессионный анализ результатов эксперимента по получению СоП-НЧ по планам Бокса-Бенкена (*выбранная модель для построения диаграмм поверхности отклика).

Модель	R ²	скорректированный R ²	F-величина	p-величина возможно > F
Отклик Y₁ (ОС СоП, %)				
<i>Линейная</i>	0.5065	0.3927	491.16	<0.0001
<i>2FI</i>	0.6924	0.5079	458.97	<0.0001
<i>Квадратичная*</i>	0.8725	0.7086	379.65	<0.0001
Отклик Y₂ (РЧ, нм)				
<i>Линейная</i>	0.0165	-0.2105	1018.37	<0.0001
<i>2FI</i>	0.0279	-0.5554	1509.78	<0.0001
<i>Квадратичная*</i>	0.8468	0.6499	474.68	<0.0001

На основе теста ANOVA (таблица 13) для анализа ОС и РЧ выбрали квадратичные модели, адекватность которых была подтверждена р-критерием (р < 0.05), а адекватность предсказанных значений подтверждалась схожестью численных значений R² и скорректированного R² (< 0.2).

3.1.4.1 Общее содержание СоП в НЧ

На основе полученного с помощью ANOVA теста уравнения регрессии 23 можно заключить, что влияние ПВС и соотношение О/В оказывало позитивный эффект на ОС (коэффициенты регрессии для ПВС: +0.3X₂, для О/В: +0.8X₃), в то время как ПМГК проявлял антагонистический эффект (коэффициент регрессии -2.7X₁).

$$Y_1 = 2.4 - 2.7X_1 + 0.3X_2 + 0.8X_3 - 1.2X_1X_2 - 2.0X_1X_3 + 0.7X_2X_3 + 2.0X_1^2 + 0.5X_2^2 - 1.2X_3^2 \quad (23)$$

Взаимодействие ПВС и О/В вызывало синергетический эффект (коэффициент регрессии $+0.7X_2X_3$), в то время как взаимодействие ПМГК с ПВС (коэффициент регрессии $-1.2X_1X_2$) и ПМГК с О/В (коэффициент регрессии $-2.0X_1X_3$) проявляло антагонистический эффект.

Рисунок 18А,Б демонстрирует выраженное влияние ПМГК на ОС СоП в частицах, в то время как соотношение О/В и концентрация ПВС не оказывали значительных изменений. Известно, что масса полимера может в значительной мере влиять на ОС и РЧ [219]. Вероятно, за счет низкой концентрации ПМГК в органической фазе, происходила диффузия растворителя в водную фазу, приводящая к быстрому формированию частиц и сохранению СоП внутри полимерного носителя.

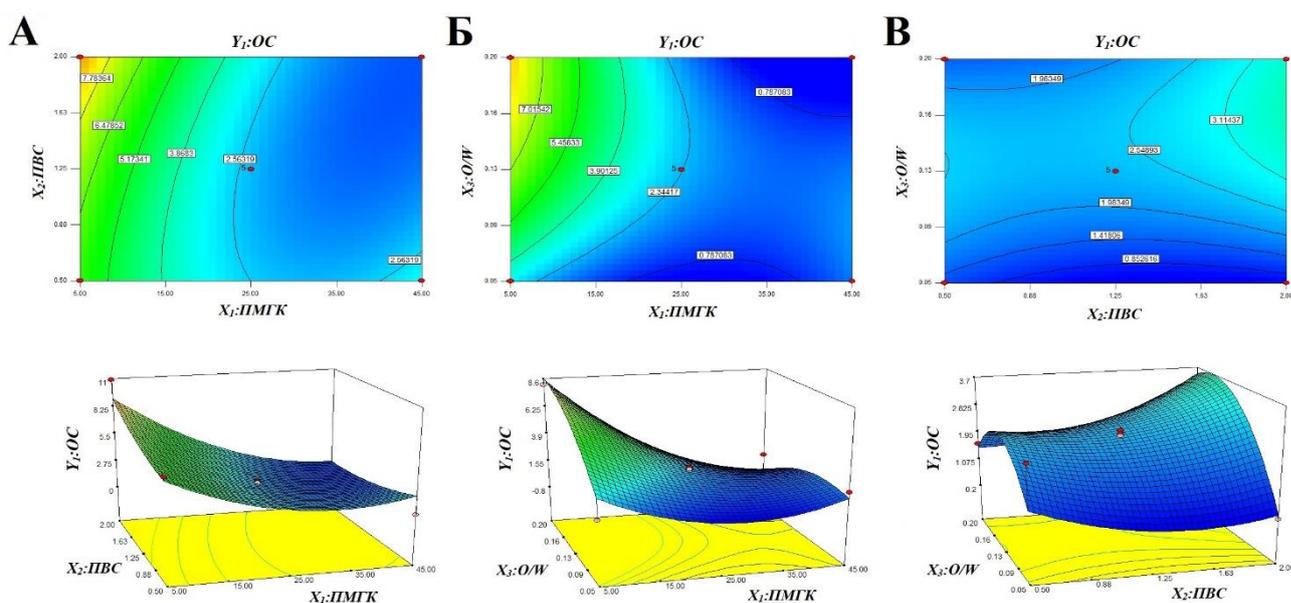


Рисунок 18. Двух- и трехмерные графики поверхности отклика для Y_1 , описывающие взаимодействие ПВС (%) и ПМГК (мг) (А), О/В (об/об) и ПМГК (мг) (Б), О/В (об/об) и ПВС (%) (В).

Таким образом, при получении частиц, наибольшее ОС (> 7.0 %) достигается с использованием 5 мг ПМГК, при условии, что соотношение О/В и концентрация ПВС останутся минимальными.

3.1.4.2 Средний диаметр частиц СоП-НЧ

Уравнение регрессии 24, полученное с помощью ANOVA теста, указывает на то, что влияние ПМГК на РЧ является обратно пропорциональным (коэффициент регрессии $-14.3X_1$), а взаимодействие ПВС с ПМГК (коэффициент регрессии $-38.0X_1X_2$) и ПВС с О/В (коэффициент регрессии $-3.3X_2X_3$) оказывало антагонистический эффект по отношению к РЧ.

$$Y_2 = 595.0 - 14.3X_1 + 27.9X_2 + 8.0X_3 - 38.0X_1X_2 + 0.2X_1X_3 - 3.3X_2X_3 + 133.0X_1^2 - 270.5X_2^2 - 98.8X_3^2 \quad (24)$$

В то же время, индивидуальное влияние массы ПМГК и О/В на РЧ носило нелинейный характер (рис. 19).

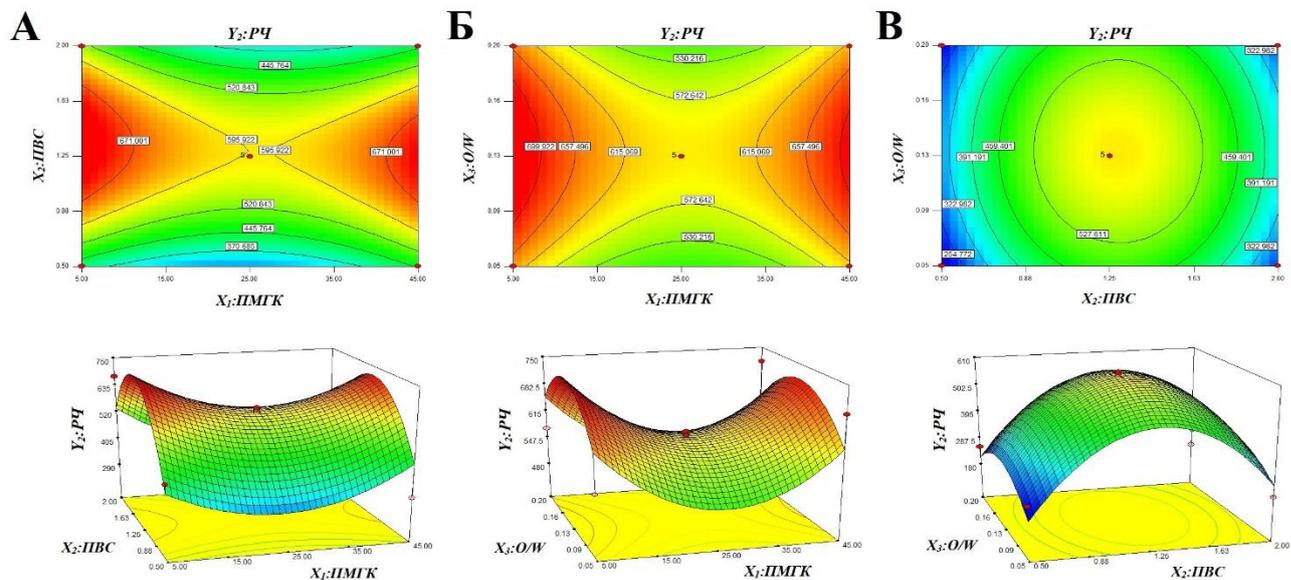


Рисунок 19. Двух- и трехмерные графики поверхности отклика для Y_2 , описывающие взаимодействие ПВС (%) и ПМГК (мг) (А), О/В (об/об) и ПМГК (мг) (Б), О/В (об/об) и ПВС (%) (В).

При уменьшении концентрации ПВС (до 0.5%), значение РЧ достигало порядка 180 нм. Низкая концентрация ПВС способствовала снижению вязкости водной среды и облегчала диффузию органического растворителя, что приводило к образованию частиц с меньшим размером [190].

По результатам метода многокритериальной оптимизации (раздел 3.1.5, таблица 14) выбрали следующие параметры получения НЧ: ПМГК – 7.2 мг, ПВС – 2%, О/В – 1:5.

Следует отметить, что для СоП, NiП и MnП наблюдались схожие значения параметров, что может быть связано со схожим влиянием О/В и значимостью ПВС при получении НЧ с высоким общим содержанием (уравнения 17,21,23).

3.1.5 Оптимизация метода получения НЧ

Оптимизация процесса получения НЧ была проведена с использованием функции желательности. С помощью метода многокритериальной оптимизации были составлены оптимальные теоретические условия для получения НЧ с минимальным РЧ и максимальным ОС. Из всех предсказанных вариантов были выбраны значения параметров с наибольшей желательностью, на их основе были получены НЧ с MeП и проанализированы их физико-химические характеристики. Сравнение полученных и прогнозируемых данных выявило близость значений и низкую относительную погрешность.

Согласно результатам, представленным в таблице 14, экспериментальные значения для двух откликов были достаточно близки к предсказанным значениям, а относительно небольшие погрешности обеспечивают достоверность и воспроизводимость выбранной квадратичной модели [220]. На основе полученных данных можно сделать вывод о том, что планы Бокса-Бенкена подходят для разработки метода получения НЧ на основе ПМГК, содержащих МеП.

Таблица 14. Сравнение экспериментальных и прогнозируемых данных для НЧ, содержащих МеП, полученных с помощью планов Бокса-Бенкена.

МеП	Условия	Отклик	Экспериментальные данные	Прогнозируемые данные	Отн. погрешность, %
NiП-НЧ	X_1 : 5 мг X_2 : 1.47% X_3 : 1:7	Y_1 , %	11	10	-10
		Y_2 , нм	323	297	-9
CoП-НЧ	X_1 : 7.2 мг X_2 : 2% X_3 : 1:5	Y_1 , %	9	10	15
		Y_2 , нм	345	411	16
MnП-НЧ	X_1 : 5 мг X_2 : 1.42% X_3 : 1:5.6	Y_1 , %	28	23	-27
		Y_2 , нм	205	247	17
FeП-НЧ	X_1 : 45 мг X_2 : 2% X_3 : 1:20	Y_1 , %	14	14	-5
		Y_2 , нм	235	232	-2

Стоит отметить, что, в случае оптимизации MnП, NiП и CoП, наилучшие значения зависимых переменных были предсказаны с использованием схожих значений независимых параметров: массы ПМГК (5-7 мг); концентрации ПВС (1.4-2%); соотношения O/W (1:5 – 1:7). В процессе оптимизации FeП были выявлены условия, сильно отличающиеся от других МеП, что может объясняться более высокой агрегационной способностью FeП, требующей повышения вязкости органической фазы и стабилизации частиц [193]. В свою очередь, выбор условий получения частиц с MnП, NiП и CoП может быть связан со схожими характеристиками МеП, например, растворимостью в органическом растворителе или водной фазе. Rouhani и соавторы проводили оптимизацию ПМГК частиц, содержащих ZnП, с тем же значением параметра X_3 [210], также, как Lorenzoni и коллеги, которые оптимизировали Ga (III)-фталоцианин-содержащие ПМГК частицы [221]. Данные результаты могут свидетельствовать об универсальности некоторых параметров для создания НЧ, содержащих тетрапиррольные макрогетероциклические соединения.

3.2 Анализ частиц, содержащих МеП

3.2.1 Анализ физико-химических характеристик МеП-НЧ

У НЧ, полученных по оптимизированным методикам, были проанализированы следующие параметры: СВ, дзета-потенциал и ИПД (таблица 15).

Таблица 15. Общее содержание MeП (ОС), степень включения (СВ), размер частиц (РЧ) – средний диаметр, дзета-потенциал и индекс полидисперсности (ИПД) НЧ, содержащих NiП, CoП, FeП и MnП.

MeП-НЧ	общее содержание, %мас.	степень включения, %мас.	размер частиц, нм	дзета-потенциал, мВ	ИПД
NiП-НЧ	11±1	24±1	323±10	-15±2	0.17
CoП-НЧ	9±1	80±2	345±16	-11±2	0.19
MnП-НЧ	28±2	80±2	205±10	+18±2	0.14
FeП-НЧ	14±1	82±3	236±13	-18±7	0.15

MnСiТФП-НЧ обладали наибольшими ОС и СВ, а также наименьшими значениями РЧ и ИПД по сравнению с другими частицами. РЧ в диапазоне 200-350 нм способствует свободному перемещению частиц по кровотоку к местам опухолевой локализации, избегая при этом выведения почками [59]. CoП-НЧ, FeП-НЧ и NiП-НЧ имели отрицательный дзета-потенциал за счет наличия концевых карбоксильных групп ПМГК, а также небольшого количества ПВС на поверхности частиц. Заряд поверхности MnП-НЧ был положительным. Данный эффект можно объяснить присутствием MnП на поверхности НЧ и наличием координационного центра MnП с аксиальным хлорид-ионом. ИПД НЧ составил менее 0.200, что указывает на монодисперсное распределение частиц по размеру [189].

3.2.2 Анализ MeП-НЧ методом просвечивающей микроскопии

На основе микрофотографий НЧ, полученных методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), можно заключить, что анализируемые НЧ имели сферическую форму и размер менее 400 нм (рис. 20).

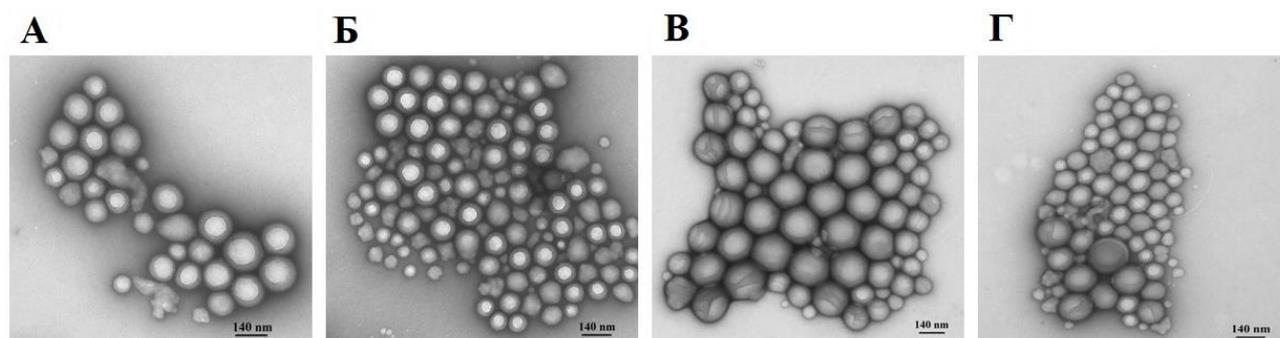


Рисунок 20. Микрофотографии НЧ, содержащих CoП (А), MnП (Б), NiП (В) и FeП (Г), полученные методом ПЭМ.

Результаты коррелировали с данными определения РЧ, полученными методом ДРС (таблица 15).

3.2.3 Рентгенофазовый анализ MeП-НЧ

Для изучения кристалличности структуры MeП в чистом виде и MeП, включенных в НЧ, были получены рентгенограммы методом рентгенофазового анализа. Характерные резкие и интенсивные пики в диапазоне от 7 до 30 θ наблюдались на рентгенограмме CoП, FeП и NiП, что указывало на их кристаллическое состояние (рис. 21А,В,Г). Это совпадало с результатами исследований Maclean и соавторов [222]. Наличие острых и интенсивных пиков при 14 θ указывало на кристаллическое состояние MnП (рис. 21Б). В случае ПМГК наблюдалась низкая интенсивность пиков в диапазоне от 15 до 25 θ , образующая куполообразную область из-за аморфного состояния полимера (рис. 21), что коррелирует с данными предыдущих исследований [223].

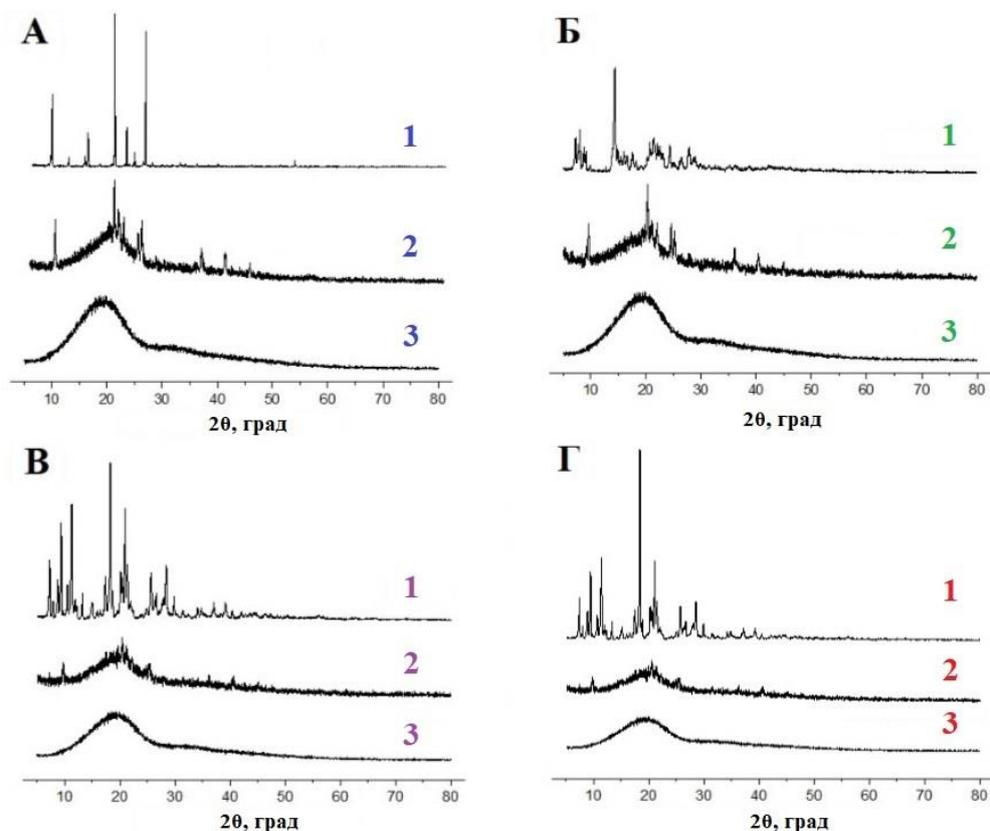


Рисунок 21. Рентгенограммы NiП (А), MnП (Б), CoП (В) и FeП (Г). Каждая диаграмма (сверху вниз) отображает спектры вещества (1), НЧ (2) и ПМГК (3).

На рентгенограмме MeП-НЧ были отмечены различимые пики более низкой и средней интенсивности MeП, по сравнению со свободными субстанциями, что может объясняться частичной маскировкой пиков ПМГК. Таким образом, можно сделать вывод о том, что MeП в составе НЧ находятся преимущественно в кристаллическом состоянии, а не аморфном.

3.2.4 ИК-спектроскопия МеП-НЧ

Для исследования наличия взаимодействий между ПМГК и МеП, был использован метод ИК-спектроскопии (рис. 22). Анализ ПМГК показал наличие полос поглощения, характерных для валентных колебаний групп: О-Н на 3500 см^{-1} , С-Н на 2950 и 3000 см^{-1} , С=О на 1758 см^{-1} , С-С(=О)-О- на 1150 см^{-1} и 1300 см^{-1} [224].

В ИК-спектрах МеП полосы в области $2900\text{--}3100\text{ см}^{-1}$ соответствовали валентным колебаниям =С-Н групп, а наличие интенсивных полос в области $999\text{--}1012\text{ см}^{-1}$ на спектрах МнП, FeП и СоП и 1007 см^{-1} на спектре NiП, вероятно, характеризует Мп-Н (рис. 22,1Б), Fe-Н (рис. 22,1В), Со-Н (рис. 22,1Г) и Ni-Н (рис. 22,1А) связи и может быть индикатором плоскостных деформаций МеП [225]. Стоит отметить, что ранее аналогичные пики наблюдались у нескольких производных тетрафенилпорфирина [222].

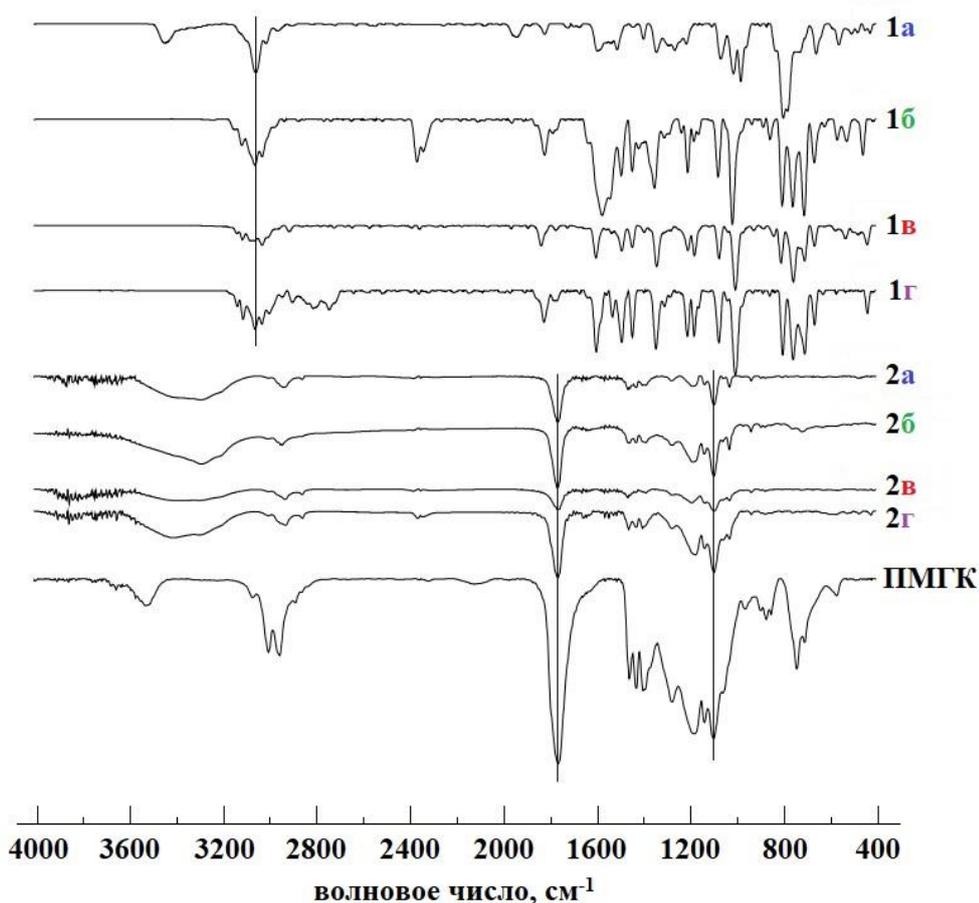


Рисунок 22. ИК-спектры NiП (1А), МнП (1Б), FeП (1В), СоП (1Г), НЧ, содержащих NiП (2А), МнП (2Б), FeП (2В), СоП (2Г) и ПМГК.

При анализе ИК-спектров НЧ с МеП наблюдалось взаимодействие -ОН групп ПМГК с МеП, что подтверждалось смещением характеризующих валентных колебаний из области 3500

см⁻¹ в 3288-3399 см⁻¹ [226]. Полученные данные свидетельствуют о наличии взаимодействий между ПМГК и МеП, формирующихся в процессе образования НЧ.

Для других полос, соответствующих валентным колебаниям, значительных сдвигов не наблюдалось, что указывает на отсутствие других взаимодействий между ПМГК и МеП.

3.2.5 Исследование взаимодействий между ПМГК и МеП

Для определения сродства FeП, MnП, NiП и CoП к ПМГК были приготовлены стоковые растворы МеП (1.65 мкМ) в ацетоне, хлороформе или хлористом метиле (растворитель соответствовал тому, который был использован при получении НЧ), которые были добавлены в одинаковом количестве к растворам ПМГК для получения 1, 3, 5, 7 и 9% массовых концентраций. Далее были получены УФ-спектры растворов МеП с ПМГК в различных массовых концентрациях в диапазоне 220-600 нм (рис. 23). Для определения константы связывания (K_a) полученных комплексов МеП-ПМГК использовали уравнение Бенеша-Гильдебранда (раздел 2.7, уравнение 6) [166,167].

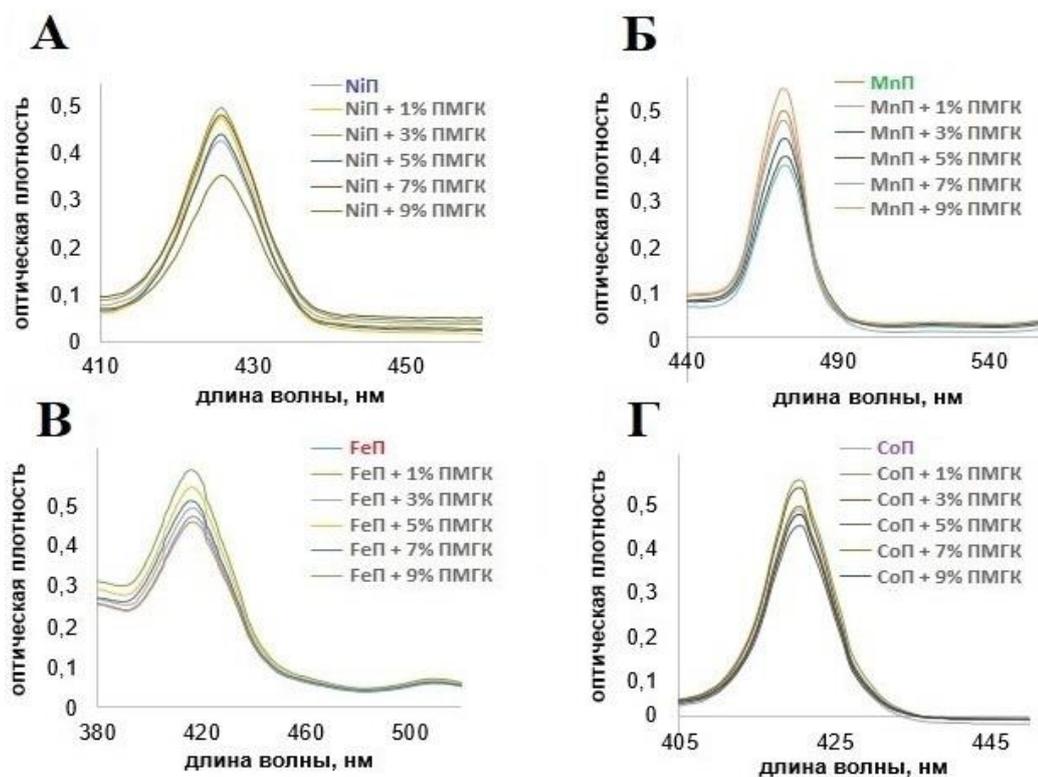


Рисунок 23. УФ-спектры NiП (А), MnП (Б), FeП (В) и CoП (Г) и их смеси с ПМГК.

Константа связывания была определена графическим методом в результате построения графиков зависимости $1/(A-A_0)$ от $1/[ПМГК]$, как показано на рисунке 24. Из полученных линейных зависимостей были рассчитаны константы связывания (таблица 16).

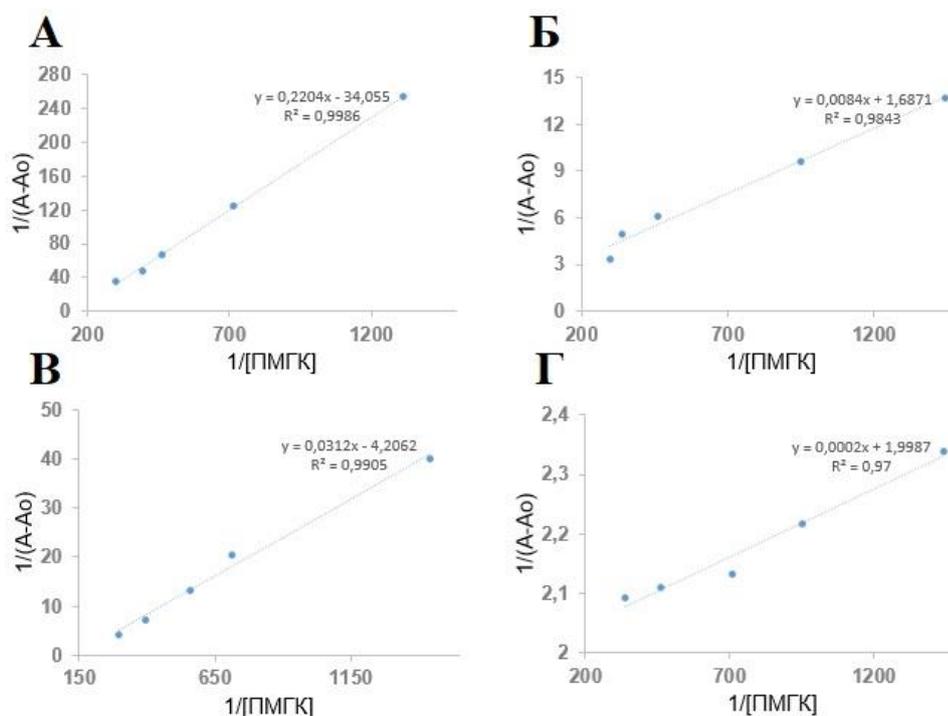


Рисунок 24. Графики Бенеси-Хильдебранда для комплексов ПМГК-NiII (А), ПМГК-MnII (Б), ПМГК-FeII (В), ПМГК-CoII (Г).

Таблица 16. Сводная таблица данных константы связывания для комплекса ПМГК-MeII и степени включения MeII в полимерных частицах.

MeII	FeII	MnII	CoII	NiII
K_a, M	33×10^{-3}	10×10^{-3}	0.2×10^{-3}	0.2×10^{-3}
СВ, %	81.8	79.9	79.7	24.1

Как видно из таблицы 16, взаимодействие MeII и ПМГК приводило к образованию комплекса ПМГК-MeII, константа связывания которого коррелирует со СВ MeII в частицы.

Константа связывания MeII с ПМГК также может оказывать значительное влияние на высвобождение вещества из полимерной матрицы (рис. 25) [227]: высокое значение константы связывания комплекса ПМГК-MeII, указывает на высокое сродство MeII к ПМГК и свидетельствует о более продолжительном профиле высвобождения MeII из частиц. Таким образом, на основе константы связывания комплекса «полимер-субстанция» возможно прогнозирование СВ субстанции в частицы, а также ее профиль высвобождения.

3.2.6 Изучение кинетики высвобождения MeII из НЧ

Анализ кинетики высвобождения MeII из полимерной матрицы был проведен по методике Abouelmag и коллег с использованием фосфатно-солевого буфера (ФСБ) при pH 7.4, содержащего 0.1% Твин-80 (рис. 25) [195]. Использование Твин-80 в качестве эмульгатора позволило повысить стабильность гидрофобных MeII в среде [228].

НЧ, содержащие MnП и FeП, демонстрировали схожий двухфазный профиль высвобождения, что согласуется с литературными данными [218]. В течение первых 15 мин отмечалось быстрое высвобождение MnП и FeП из НЧ, что может быть вызвано десорбцией MeП с поверхности НЧ. Через 25-50 ч наблюдался выход на плато концентрации MnП из НЧ, что может способствовать пролонгированному эффекту. Схожий профиль высвобождения FeП и MnП, может быть обусловлен использованием одинакового растворителя при получении НЧ, схожими РЧ и довольно высоким ОС по сравнению с NiП и CoП, а также большей константой связывания полимера с MeП (таблица 16). Характер высвобождения CoП из полимерной матрицы также соответствовал двухфазному профилю, в результате которого в первые 30 мин отмечалось быстрое высвобождение MeП из НЧ, сменяющееся на замедленное.

Стоит отметить, что высвобождение CoП и NiП протекало гораздо быстрее, чем для FeП и MnП, что может объясняться схожестью РЧ и ОС сравниваемых пар. Сродство ПМГК к MeП определяло характер высвобождения MeП из полимерной матрицы: низкое значение константы связывания комплекса ПМГК-MeП, характеризовало высокое сродство и более длительное высвобождение MeП из полимерной матрицы (как в случае MnП и FeП).

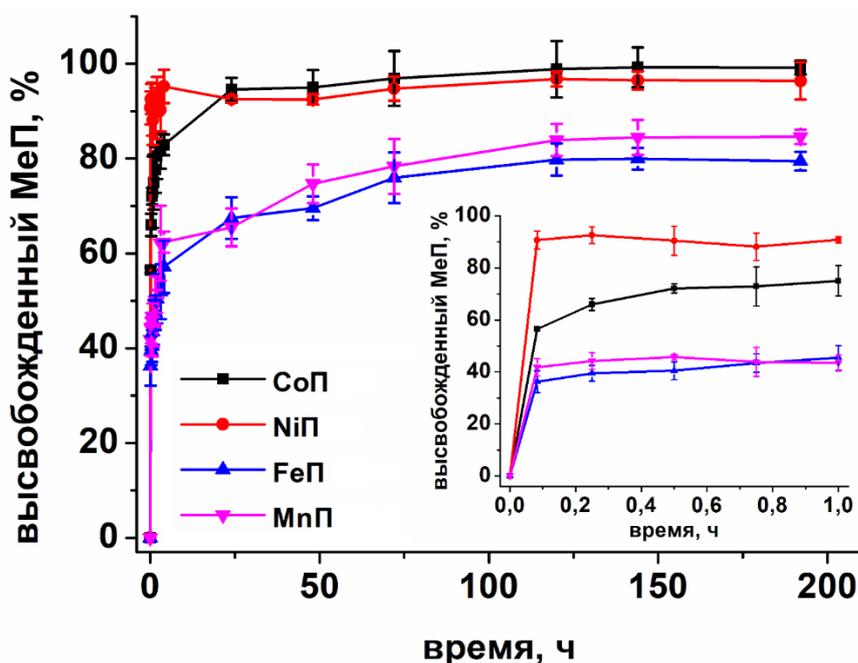


Рисунок 25. Профиль высвобождения MeП из полимерной матрицы в ФСБ при pH 7.4 и температуре 37 °C.

В свою очередь, резкое высвобождение NiП могло быть связано с низким значением константы связывания. Тем не менее, такие профили высвобождения могут способствовать быстрому накоплению свободного MeП во внутриклеточном пространстве и сокращению времени введения АК для достижения противоопухолевого эффекта. Таким образом, результаты

кинетики высвобождения MeII совпадали с литературными данными и коррелировали с константами связывания и ОС [229].

Таблица 17. Значения кинетического параметра высвобождения MeII из ПМГК – коэффициента корреляции (R^2) для различных математических моделей.

Математическая модель	MeII			
	NiII-НЧ	CoII-НЧ	MnII-НЧ	FeII-НЧ
Нулевой порядок	-10.1967	-5.7916	-2.8711	-2.7454
Первый порядок	0.7965	0.6060	0.0180	-0.1234
Хигучи	-7.4722	-3.5087	-1.3010	-1.1887
Хиксон-Кроуэлл	-8.4886	-4.2651	-1.8479	-1.7732
Корсмейера-Пеппаса	0.9948	0.9876	0.9763	0.9939

Для определения механизмов высвобождения MeII из НЧ были использованы несколько кинетических моделей высвобождения (таблица 17). Высокие значения коэффициентов корреляции (R^2) показали, что модель Корсмейера-Пеппаса лучше описывает кинетику высвобождения MeII из НЧ для всех полученных частиц [230]. Значения показателей диффузии n составили: 0.01 для NiII, 0.06 для CoII, 0.11 для MnII и 0.11 для FeII. Поскольку значение n менее 0.45, то процесс высвобождения MeII из НЧ считается диффузионным, подчиняющимся закону Фика [231], что подтверждается ранее опубликованными данными, описывающими механизмы высвобождения гидрофобных веществ из НЧ [232,233].

3.2.7 Исследование стабильности MeII и MeII-НЧ в условиях окислительно-восстановительной реакции

Стабильность MeII и их полимерных форм в процессе ОВР была исследована спектрофотометрическим методом. Было предположено, что более стабильные MeII в присутствии АК будут эффективнее стимулировать образование АФК, а включение MeII в полимерные частицы будет способствовать более пролонгированному действию каталитической системы. Таким образом, для оценки стабильности MeII регистрировали зависимое от времени изменение спектров MeII в присутствии АК (рис. 26 и 27).

FeII проявлял низкую стабильность в присутствии АК, характеризующуюся уменьшением пика поглощения при 420 нм, который соответствует степени окисления +3 у атома железа в комплексе с ТФП (рис. 26А,В). Предполагается, что деградация FeII *in vitro* происходит за счет восстановления железа до степени окисления +2 в присутствии АК [234]. FeII-НЧ и свободное вещество показали стабильность в присутствии АК: после 3 ч инкубации в трехвалентной форме сохранилось 69.8% и 62.4% порфирина соответственно.

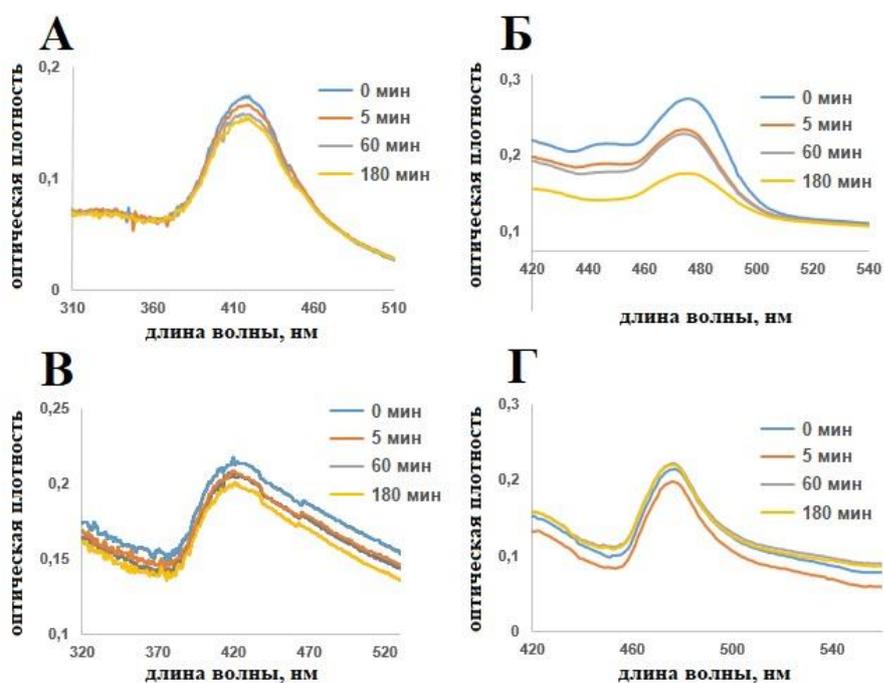


Рисунок 26. УФ-спектры FeП (А) и FeП-НЧ (В), MnП (Б) и MnП-НЧ (Г) в присутствии АК.

Результаты стабильности MnП и его полимерной формы демонстрируют постепенное снижение основных полос при 475 нм, соответствующих $Mn^{3+}P$ (рис. 16Б,Г). Однако, из литературных данных известно, что окислительно-восстановительный потенциал пары Mn^{3+}/Mn^{2+} ($E_{1/2}$ -250 мВ) ограничивает восстановление порфирина с помощью АК [235]. Поэтому представляется возможным процесс самоокисления аскорбата до монодегидроаскорбат радикала и последующего образования $O_2^{\bullet-}$ и H_2O_2 . Далее H_2O_2 окисляет Mn^{3+} в порфирине, что приводит к образованию высокоактивного комплекса оксо- Mn^{5+} , который разлагается на Mn^{4+} и переходит обратно в Mn^{3+} [196]. Вероятно, данный процесс окисления приводит к деградации MnП и способствует снижению интенсивности полос поглощения Mn-порфирина. Появление пика на 443 нм может быть связано с образованием взаимодействий между Mn и АК [53]. Стоит отметить, что включение MnП в НЧ повысило стабильность субстанции в три раза (8.8% для MnП и 31.5% для MnП-НЧ) в присутствии АК.

Стабильность NiП и CoП в условиях ОВР представлена на рисунке 27. В присутствии АК наблюдалось снижение интенсивности полосы поглощения Soret (интенсивная полоса поглощения (около 400 нм), характерная для всех тетрапиррольных макроциклов [236] при 430 нм (для CoП) и 434 нм (для NiП), что соответствовало низкой стабильности NiП и CoП. По сравнению со свободной субстанцией, на спектре поглощения NiП-НЧ наблюдалось уширение полосы поглощения Soret, что может быть вызвано частичным образованием H-агрегатов NiП из-за их десорбции с поверхности частиц [237]. В случае CoП-НЧ также наблюдалось уширение полосы поглощения Soret и появление нового пика на длине волны 465 нм, что может свидетельствовать об образовании H- и J-агрегатов CoП, соответственно [237]. Тем не менее,

включение Co- и Ni-порфиринов в НЧ повысило стабильность до 2 ч, после чего содержание MeП в исследуемых растворах снижалось (для MeП и MeП-НЧ после 3 ч инкубации в двухвалентной форме сохранилось 34.2% и 56.3% Co; 62.4% и 72.9% Ni, соответственно), что может быть связано с быстрым высвобождением NiП и CoП из НЧ и взаимодействием с АК.

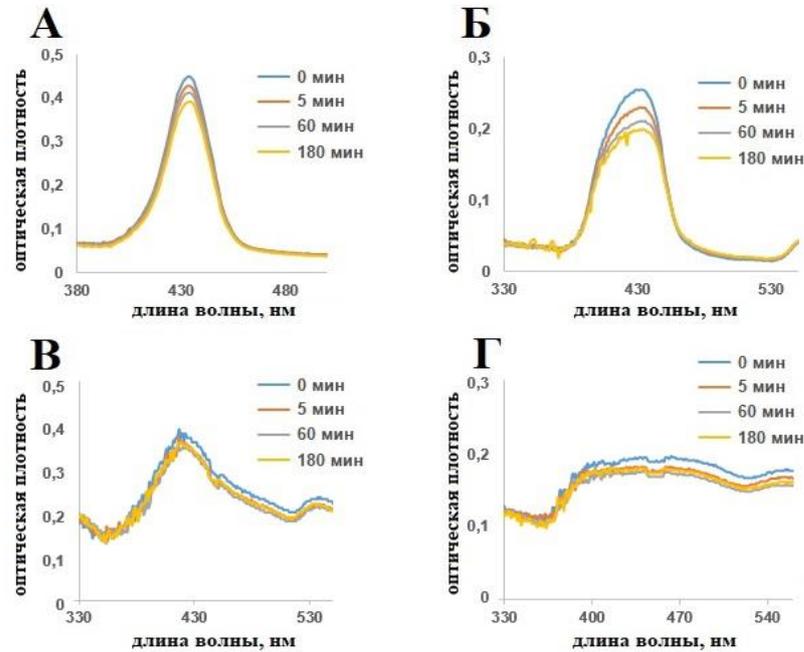


Рисунок 27. УФ-спектры NiП (А) и NiП-НЧ (В), СоП (Б) и СоП-НЧ (Г) в присутствии АК.

Таким образом, включение MeП в НЧ повысило стабильность порфиринов до 2 ч, что может в дальнейшем способствовать снижению количества вводимой дозы и кратности введения MeП-НЧ, а также увеличению эффективности терапии.

3.2.8 Оценка гемолитической активности MeП-НЧ

Анализ гемолитической активности НЧ является важным этапом оценки биосовместимости лекарственных средств для парентерального применения [238]. В литературных источниках отмечено, что НЧ могут вызывать гемолитическую активность за счет повышения проницаемости мембраны эритроцитов [239]. Поскольку данный анализ основан на регистрации окисленных форм гемоглобина, измерение MeП, содержащего железо, представляется довольно затруднительным, в связи с чем, анализ проводили с НЧ, содержащими MnП, NiП и CoП.

Пустые НЧ и CoП-НЧ не проявляли гемолитической активности в течение 3 ч после инкубации с эритроцитами, выделенными из крови кролика (Таблица 18). NiП-НЧ обладали незначительной гемолитической активностью в максимальной концентрации (гемолиз составлял 6.5%) [240], что может объясняться частичным присутствием NiП на поверхности частиц и его десорбцией во время инкубации. Также стоит отметить, что ранее уже была описана способность

NiП адсорбироваться на мембране красных кровяных телец, разрушать её и вызывать гемолиз [241].

Таблица 18. Гемолитическая активность пустых НЧ и НЧ, содержащих NiП, CoП или MnП.

Образец	Концентрация НЧ, мг/мл	Концентрация MeП в НЧ, мкМ	Гемолиз, %
пустые НЧ	25	-	3.8
	2.5		1.4
	0.25		0.8
NiП-НЧ	25	4000	6.5
	2.5	400	2.2
	0.25	40	0.3
CoП-НЧ	25	3400	3.3
	2.5	340	1.3
	0.25	34	0.3
MnП-НЧ	25	10000	107.5
	2.5	1000	102.5
	0.25	100	88.1
	0.09	36	23.4
	0.009	3.6	1.8

MnП-НЧ при высоких концентрациях (0.09-25 мг/мл) обладали значительной гемолитической активностью, что может объясняться наличием положительного поверхностного заряда MnП-НЧ [197]. В то же время, MnП-НЧ в концентрациях ниже 0.09 мг/мл не вызывали гемолитическую активность, что свидетельствует об их биосовместимости и возможности применения в наномедицине [242].

Таким образом, НЧ, содержащие MeП, продемонстрировали значительный потенциал для применения в качестве систем доставки для парентерального введения.

3.3 Анализ полученных MeП-НЧ *in vitro*

3.3.1 Исследование цитотоксической активности MeП и MeП-НЧ

Цитотоксическую активность MeП, MeП-НЧ и комбинаций MeП+АК / MeП-НЧ+АК исследовали в отношении клеток линий HeLa (карцинома шейки матки человека), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека), K562 (хронический миелогенный лейкоз человека) и SK-OV-3 (аденокарцинома яичника человека) (рис. 28). Анализ проводили при концентрации АК, не влияющей на клеточную пролиферацию [191]. Каталитические системы MeП+АК / MeП-НЧ+АК проявляли активность в отношении всех выбранных линий клеток, в то время как эффективность MeП и MeП-НЧ без добавления аскорбиновой кислоты была ниже, что указывает на протекание каталитической реакции между MeП и АК как в свободном виде, так и в составе полимерных частиц.

Значения концентраций MeП, при которых наблюдается гибель 50% клеток (IC50), для каталитических систем FeП/FeП-НЧ + АК в отношении клеток линий SK-OV-3 и K562 были сопоставимы (рис. 28Б,Г), а для клеток линий MCF-7 и HeLa, значение IC50 пары FeП-НЧ+АК было незначительно выше по сравнению FeП+АК (рис. 28А,В). Таким образом, можно заключить, что при получении НЧ, содержащих FeП, сохраняется каталитическая активность соединения.

Рисунок 28А,Б четко демонстрирует увеличение цитотоксической активности пары MnП-НЧ+АК по сравнению с MnП+АК. Стоит отметить, что комбинации как MnП+АК, так и MnП-НЧ+АК обладали наиболее значительной активностью по сравнению с другими MeП в отношении всех линий клеток (таблица 19).

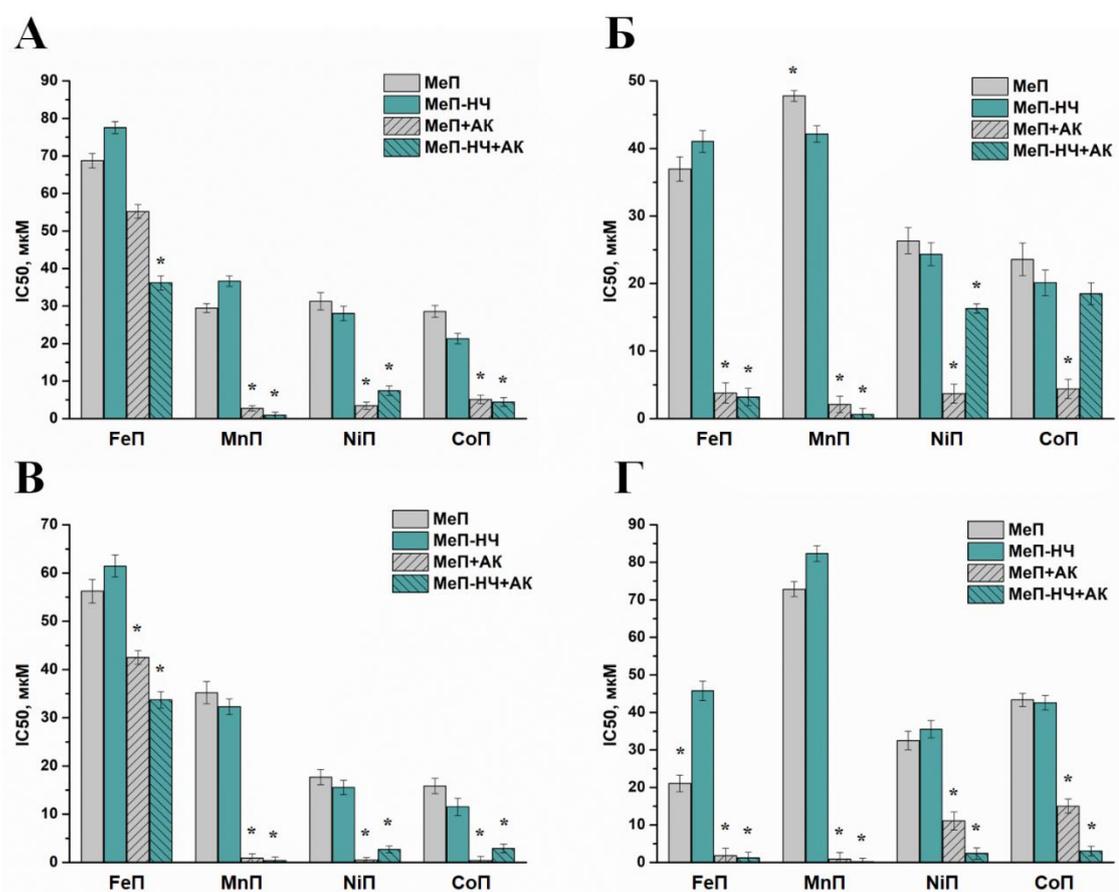


Рисунок 28. Значения IC50 для клеток линий MCF-7 (А), SK-OV-3 (Б), HeLa (В) и K562 (Г) после 72 часов инкубации с комбинацией АК и MeП/MeП-НЧ. * значимые различия ($p < 0,05$) по сравнению с клетками, леченными MeП-НЧ.

Цитотоксическая активность NiП и CoП была схожа в отношении всех линий клеток. Стоит отметить, что как CoП+АК, так и NiП+АК продемонстрировали противоопухолевую активность, аналогичную токсичности комбинаций на основе полимерных форм. Было предположено, что быстрое высвобождение NiП из НЧ и более резкое высвобождение CoП по сравнению с MnП-НЧ и FeП-НЧ не позволяет выявить различия в цитотоксической активности

между MeП и MeП-НЧ. Полученные результаты могут указывать на то, что NiП и CoП обладают сходными каталитическими характеристиками и проявляют более низкую активность, чем FeП и MnП, в то время как комбинация АК и MnП является наиболее перспективной для применения в каталитической терапии злокачественных новообразований.

Профили высвобождения MeП из НЧ и значения РЧ могут оказывать значительное влияние на цитотоксическую активность НЧ [189]. Двухфазный профиль высвобождения MnП и FeП из полимерной матрицы и небольшой РЧ повышают эффективность НЧ и селективность накопления в опухолевых клетках, в то время как низкий уровень ОС (для CoП) или СВ (для NiП), а также быстрое высвобождение CoП и NiП из НЧ приводят к незначительному снижению активности [243].

Таблица 19. Результаты анализа цитотоксической активности MnП и АК, наиболее перспективной комбинации для использования в каталитической терапии.

<i>Линия клеток/Каталитическая система</i>	MCF-7	SK-OV-3	HeLa	K562
	IC50, мкМ			
MnП+АК	2.67	2.12	0.94	0.86
MnП-НЧ+АК	0.98	0.56	0.40	0.18

Тем не менее, РЧ всех полученных частиц, согласно литературным данным, обеспечивает свободную циркуляцию НЧ в кровотоке, ОС является достаточным для быстрого высвобождения MeП из НЧ и достижения необходимой концентрации в клетках для взаимодействия с АК, индуцирующей образование АФК [78]. Таким образом, комбинации АК с выбранными MeП как в свободном виде, так и в составе НЧ, являются многообещающими для лечения опухолевых заболеваний методом с помощью каталитической терапии.

3.3.2 Анализ образования АФК, индуцированных MeП и MeП-НЧ

Уровень АФК, индуцированный каталитическими системами, регистрировали в клетках линии MCF-7, поскольку они оказались одними из наиболее чувствительных к исследуемым комбинациям (раздел 3.3.1, таблица 19). В качестве маркера окислительного стресса был использован флуоресцентный зонд 2,7-дихлорфлуоресцеиндиацетат (ДХФН-ДА), окисленная форма которого – ДХФ – позволяет детектировать внутриклеточные АФК, в отличие от исходной формы [199]. Результаты исследований показали, что эффект каталитических систем достигался, в том числе, и за счет образования АФК в результате ОВР между MeП и АК.

Интенсивность флуоресценции ДХФ была почти в 2 раза выше после инкубации с MnП+АК и MnП-НЧ+АК по сравнению с остальными каталитическими системами (рис. 29), что свидетельствует об эффективной индукции АФК и подтверждается данными МТТ теста (раздел 3.3.1). В свою очередь, комбинации АК с NiП, FeП и CoП как в свободном виде, так и в составе

НЧ проявили схожую способность к образованию АФК, что согласуется с результатами стабильности MeП в условиях ОВР, а также активности MeП (раздел 3.2.7, раздел 3.3.1, рис. 28). Полученные результаты подтверждаются литературными данными предыдущих исследований Mn-, Fe- и Co-порфиринов [45,49,234].

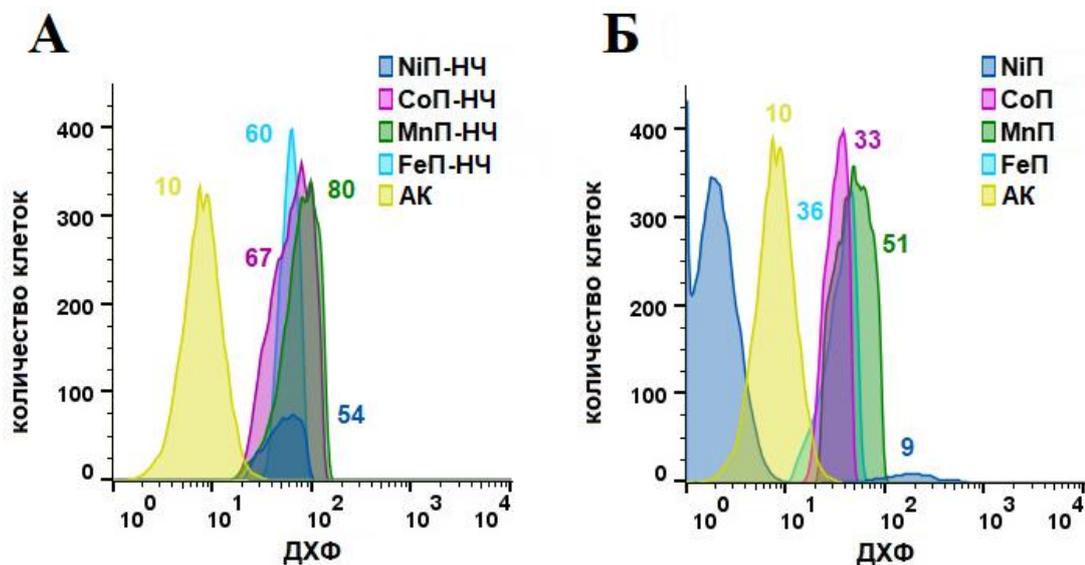


Рисунок 29. Уровень внутриклеточных АФК в клетках линии MCF-7 после инкубации с комбинацией АК и MeП-НЧ (А), комбинацией АК и MeП (Б), определенный с помощью проточной цитофлуориметрии. Контроль – нелеченные клетки без добавления флуорофора. Числовые значения – средняя интенсивность флуоресценции ДХФ в образце.

Таким образом, было показано, что включение MeП в полимерную матрицу способствует их внутриклеточному накоплению и повышенной индукции АФК, стимулирующей гибель клеток.

3.3.3 Оценка уровня окислительного стресса, индуцированного MnП и АК

Поскольку MnП/MnP-НЧ и АК проявляли наибольшую цитотоксическую активность, было решено проводить дальнейшие исследования с Mn-содержащими комбинациями. Супероксид анион является важным побочным продуктом клеточного метаболизма [15,16]. Способность MnП/MnP-НЧ и АК индуцировать образование митохондриального супероксид аниона была оценена с помощью флуоресцентной метки MitoSOX Red в клетках линии MCF-7. Было установлено, что в ходе каталитической реакции между MnП и АК происходит образование супероксид аниона (рис. 30А). Интенсивность флуоресценции MitoSOX Red была значительно выше для комбинации АК и MnП-НЧ, что согласуется с результатами оценки уровня АФК. Таким образом, можно предположить, что за счет рецептор-опосредованного эндоцитоза происходило более эффективное поглощение клетками MnП-НЧ, которые в комбинации с АК формировали АФК, в том числе супероксид анион, повреждающие клеточные структуры [244,245].

Поскольку митохондрии играют важнейшую роль в качестве источников энергии, регуляторов клеточной пролиферации и гибели клеток, любые изменения в мембранном потенциале могут привести к их повреждению и последующей гибели клетки [16]. Изменения митохондриального потенциала после инкубации с MnΠ+AK и MnΠ-НЧ+AK регистрировали с использованием флуоресцентного зонда DiIC1(5) в клетках линии MCF-7 (рис. 30Б). Инкубация с АК не приводила к значительным изменениям потенциала мембраны митохондрий, о чем свидетельствовала высокая интенсивность флуоресценции DiIC1(5). Использование комбинации MnΠ-НЧ+AK приводило к более выраженному снижению потенциала мембраны по сравнению с MnΠ+AK. Вероятно, высокий уровень АФК, формируемый комбинацией MnΠ-НЧ+AK за счет более эффективного поглощения НЧ клетками, приводил к снижению потенциала мембраны митохондрий, что активировало программируемую гибель клеток [244].

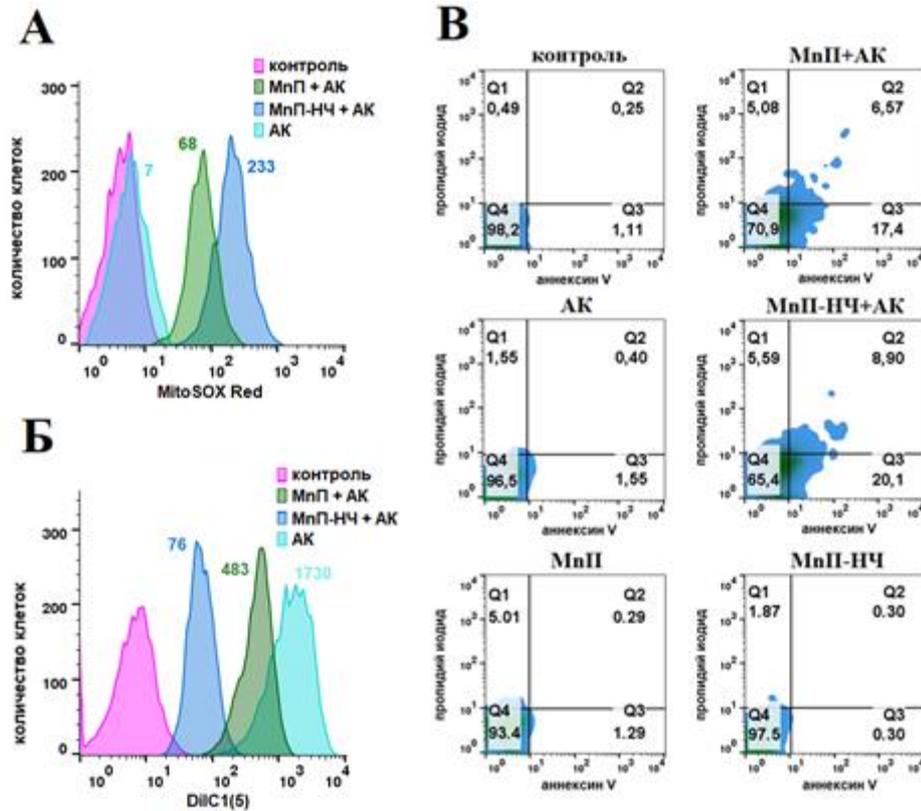


Рисунок 30. Анализ уровня образования супероксид аниона в клетках линии MCF-7, стимулированного комбинацией MnΠ/MnΠ-НЧ+AK в течение 24 ч, оцененный методом проточной цитофлуориметрии (А). Оценка митохондриального потенциала в клетках линии MCF-7 после инкубирования с комбинацией MnΠ/MnΠ-НЧ+AK в течение 24 ч, определенного методом проточной цитофлуориметрии (Б). Контроль – нелеченные клетки без добавления флуорофора. Числовые значения – средняя интенсивность флуоресценции реагента в образце. Анализ апоптотических и некротических популяций клеток линии MCF-7, проведенный методом

проточной цитофлуориметрии (В). Контроль – клетки линии MCF-7 без воздействия каталитической системы, не окрашенные флуорофором.

Для анализа механизма гибели клеток MCF-7 проводили двойное окрашивание аннексином V/пропидий иодидом после инкубации с каталитическими системами (рис. 30В). Для выявления клеток в состоянии раннего апоптоза использовался аннексин V, который связывается с фосфатидилсеринем в присутствии кальция. Пропидий иодид – маркер некроза, который проникает в клетку через проницаемую мембрану и не способен окрашивать живые и ранние апоптотические клетки из-за неповрежденной плазматической мембраны. Как показано на рисунке 30В, клетки, проинкубированные с каталитической системой, разделены на четыре квадранта (Q1, Q2, Q3 и Q4). В квадранте Q1 клетки, которые окрашены положительно только пропидий иодидом, что указывает на некроз; в квадранте Q2 клетки положительно окрашены аннексином V и пропидий иодидом и представляют позднюю апоптотическую популяцию. В квадранте Q3 клетки окрашены положительно только на аннексин V и указывают на раннюю апоптотическую популяцию. Неокрашенные клетки являются живыми и представлены в квадранте Q4 [199]. Установлено, что инкубация с АК, MnΠ и MnΠ-НЧ практически не приводила к появлению апоптотических популяций, в то время как комбинация MnΠ-НЧ+АК стимулировала схожее количество ранних апоптотических популяций (20%) с MnΠ+АК (17%). Вероятно, данный эффект может проявляться за счет индукции окислительного стресса, который приводил к гибели клеток посредством апоптоза.

Таким образом, разработанная каталитическая система индуцировала избыточное образование АФК, в том числе супероксид аниона, которые приводили к дисфункции митохондрий и последующей гибели клеток посредством апоптоза, при этом, включение MnΠ в частицы не приводило к снижению активности MeΠ [86,88].

3.3.4 Анализ фрагментации ДНК в условиях действия каталитической системы

С целью выявления фрагментации ДНК в клетках MCF-7, вызванной окислительным стрессом, был проведен TUNEL анализ (рис. 31).

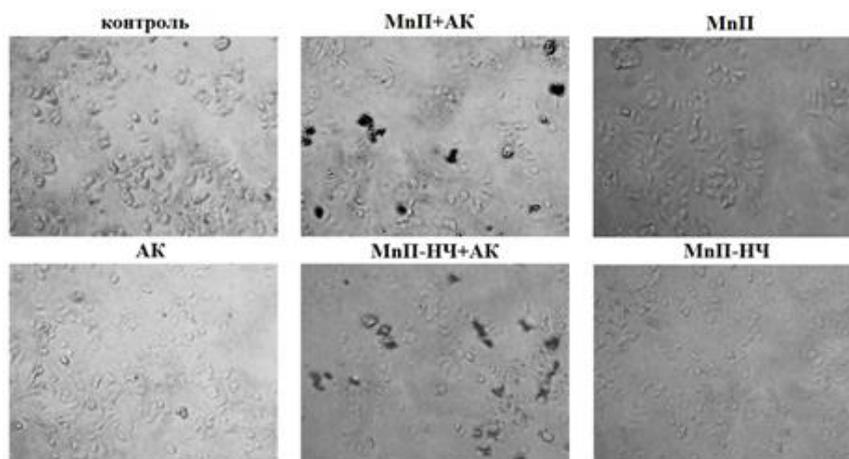


Рисунок 31. Оценка фрагментации ДНК в клетках линии MCF-7 после инкубации с MnII и MnII-НЧ отдельно или в комбинации с АК в течение 24 ч методом TUNEL анализа.

Результаты экспериментов показали, что MnII+AK, и MnII-НЧ+AK эффективно индуцировали повреждение ДНК, а АК, MnII и MnII-НЧ не вызывали подобных эффектов. На основании полученных результатов можно заключить, что включение MnII в НЧ способствует повышению противоопухолевой активности комбинации MnII-НЧ+AK, а механизм действия каталитической системы заключается в образовании АФК, в том числе супероксид аниона, которые повреждают ДНК и митохондрии, приводя к активации апоптоза.

3.3.5 Влияние каталитической системы MnII и АК на антиоксидантную систему защиты клеток

Далее было проведено исследование возможности увеличения эффективности каталитической системы MnII и АК за счет ингибирования ферментов антиоксидантной защиты клеток, поскольку предполагалось, что их снижение активности позволит повысить уровень АФК. Для этого были выбраны 3-амино-1,2,4-триазол (ЗАТ) для ингибирования каталазы, диэтилдитиокарбамат (ДДК) для ингибирования СОД и мизонидазол (МН) для ингибирования ГПР [200-202]. Поскольку ранее было показано, что хелатирующий агент ДДК способен инактивировать СОД *in vitro* и *in vivo* [201]; ЗАТ вступает в реакцию с комплексом пероксида водорода-каталазы, инактивируя каталазу [200]; МН – тиол-содержащее соединение, способно ковалентно связываться с атомом селена в активном сайте ГПР [202]. Эксперименты по исследованию активности каталитической системы и ингибиторов проводились в отношении клеток линий MCF-7 и K562, поскольку в предыдущих экспериментах они проявили наибольшую чувствительность к каталитической системе (раздел 3.3.1, таблица 19). Также, на основе литературных данных известно, что клетки линии K562 обладают высокой экспрессией фермента каталазы и более низкой экспрессией СОД по сравнению с клетками линии MCF-7 [246].

Результаты исследований показали, что ингибирование ферментов с наибольшей экспрессией в клетке повышает цитотоксическую активность каталитической системы (таблица

20). Использование MnII+AK в комбинации с 3AT в 4 раза увеличило активность в отношении клеток линии K562, в то время как ингибирование СОД в клетках MCF-7 повысило эффективность системы в 3 раза. Преинкубирование с МН не оказывало значительного влияния на цитотоксическую активность MnII+AK, что может объясняться низкой активностью ГПР в данных линиях клеток [247].

Таблица 20. Результаты анализа цитотоксической активности MnII и АК в комбинации с ингибиторами антиоксидантной защиты клеток.

Линия клеток / Каталитическая система	K562	MCF-7
	IC50, мкМ	
MnII + АК	0.86	2.67
MnII + АК + 3AT	0.23	7.41
MnII + АК + ДДК	0.53	1.01
MnII + АК + МН	1.58	4.30

Результаты экспериментов определения ферментативной активности каталазы, СОД и ГПР в отношении клеток линий MCF-7 и K562 показали, что комбинация MnII+AK не оказывала прямого влияния на активность каталазы (рис. 32А) в клетках линии K562, что может быть связано с высоким уровнем экспрессии фермента [50]. Однако, система MnII+AK стимулировала активность СОД в первые 24 ч (рис. 32Б) в отношении обеих линий клеток. Вероятно, MnII+AK индуцирует избыточное образование супероксид аниона, который стимулирует экспрессию СОД [248].

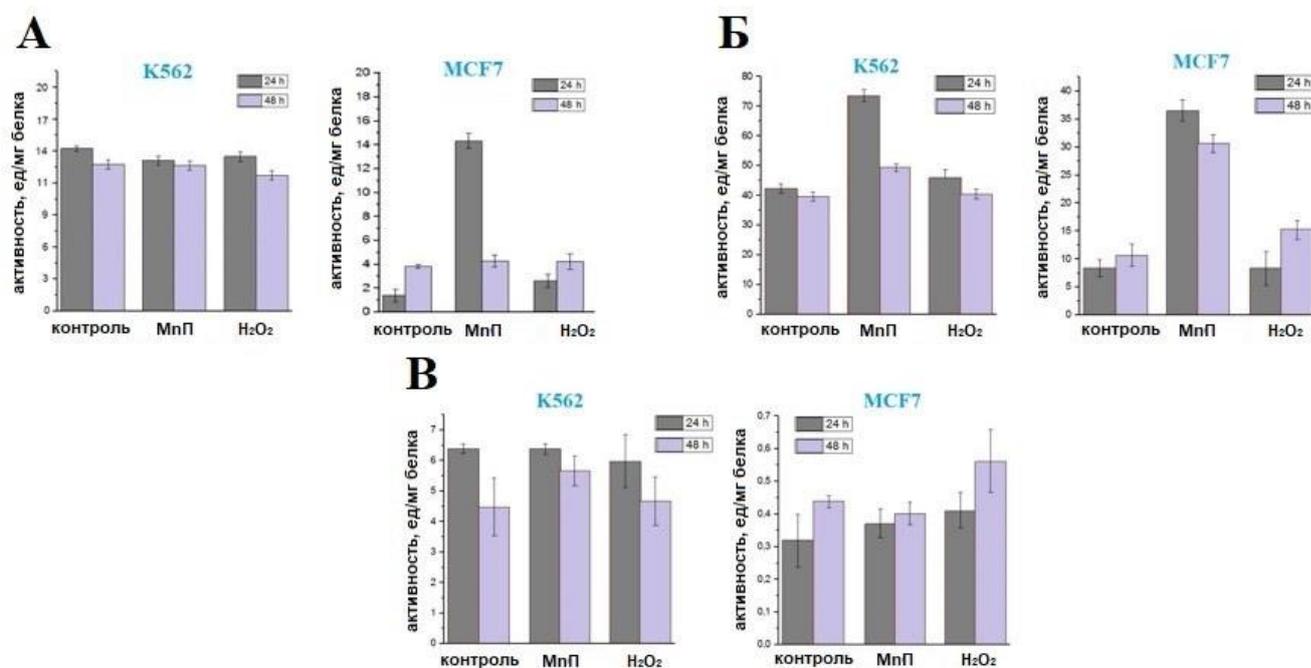


Рисунок 32. Определение активности каталазы (А), СОД (Б) и ГПР (В) в клетках линий K562 и MCF-7 в условиях инкубации с MnII+AK после 24 ч и 48 ч. H₂O₂ использовали в качестве положительного контроля, стимулирующего окислительный стресс.

Результаты определения активности ГПР в отношении клеток линий K562 и MCF-7 указывают на то, что данный фермент не участвует в ряде сигнальных каскадов, активируемых MnII+AK (рис. 32B), что согласуется с результатами ингибирования ГПР.

3.3.6 Анализ образования колоний в условиях действия каталитической системы

Анализ образования колоний клеток линии 4T1 проводили, чтобы оценить влияние каталитической системы на способность одиночных клеток образовывать колонии. Клетки линии 4T1 были выбраны в качестве аналога наиболее чувствительной линии клеток молочной железы MCF-7 для проведения дальнейших экспериментов *in vivo* (раздел 3.5).

Показано, что количество колоний, формируемых в образцах, инкубированных с MnII + АК в течение 24 ч, приближалось к 100%, а после более длительного времени воздействия (48 и 72 ч) снижалось до 83%, что может свидетельствовать о недостаточной эффективности поглощения MeII клетками (рис. 33). В случае комбинации АК и MnII-НЧ наблюдалось уменьшение количества колоний на 56% после 48 ч и на 71% после 72 ч инкубации с каталитической системой, что указывает на высокую способность комбинации АК и MnII-НЧ снижать клоногенный потенциал клеток 4T1.

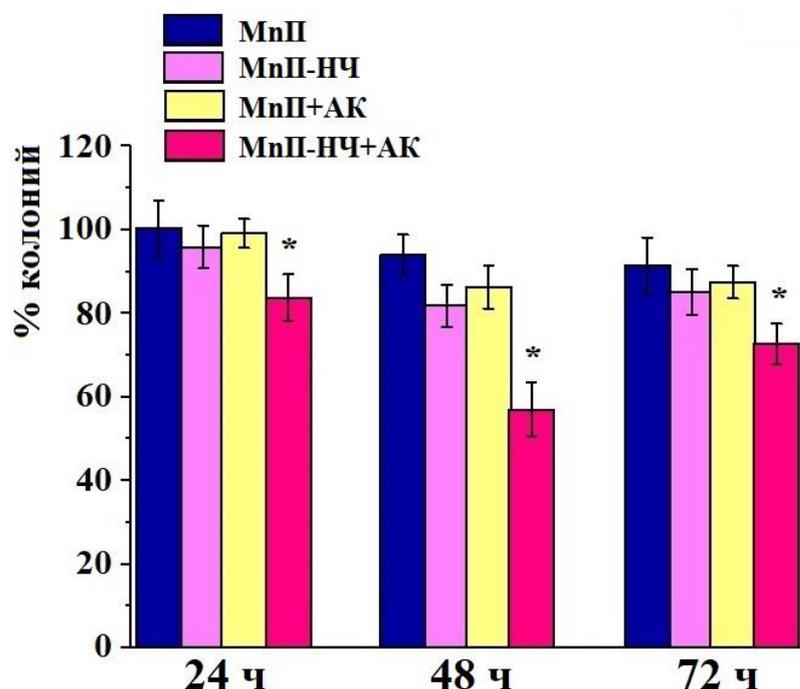


Рисунок 33. Оценка количества сформированных колоний клеток линии 4T1 после инкубации с MnII и MnII-НЧ отдельно и в комбинации с АК в течение 24 ч, 48 ч и 72 ч. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем (A).

Таким образом, было показано, что комбинации MnII/MnII-НЧ и АК приводят к снижению колониеобразующей активности клеток и гибели опухолевых клеток.

3.4 Оценка токсичности MeП и MeП-НЧ

Для установления переносимости MeП и MeП-НЧ, проводили предварительный анализ острой токсичности, при этом были использованы малые группы, включавшие по 3 особи. Было показано, что MeП-НЧ в концентрации 100 мг/кг (по MeП) безопасны для применения, в то время как MeП продемонстрировали более высокую токсичность (таблица 21).

Таблица 21. Анализ острой токсичности MeП в отношении мышей BALB/c.

Доза MeП, мг/кг	6.25	12.5	25	50	100	LD50, мг/кг
	Количество выживших животных					
NiП+АК	3/3	3/3	1/3	0/3	-	
CoП+АК	3/3	3/3	2/3	0/3	-	
MnП+АК	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3	62,7
FeП+АК	3/3	3/3	3/3	2/3	0/3	
NiП-НЧ+АК	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	
CoП-НЧ+АК	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	
MnП-НЧ+АК	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	141,4
FeП-НЧ+АК	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	
пустые НЧ	-	-	-	-	-	>2000
АК	-	-	-	-	-	>2000

При подробном исследовании острой токсичности комбинаций MnП и АК, а также MnП-НЧ и АК были определены значения LD50 (смертность не приведена в виде таблицы). Для исследования были использованы аналогичные дозы, в том числе доза 200 мг/кг для комбинации MnП-НЧ и АК, группы животных включали по 6 особей, а значения LD50 рассчитывались с помощью Probit-анализа в программном пакете MS Excel. Полученные значения LD50 составили 62,7 мг/кг для комбинации MnП/АК и 141,4 мг/кг для комбинации MnП-НЧ и АК, свидетельствовали о значительном снижении острого токсического действия наноформы MeП.

Также стоит отметить, что у мышей, получавших MeП в концентрации 25 мг/кг и 50 мг/кг, наблюдались точечные кровоизлияния в легких, что может ограничить их применение для противоопухолевой терапии. Таким образом, в предварительных исследованиях полученные MeП-НЧ проявили более высокую безопасность для медицинского применения и представляются перспективными агентами для каталитической терапии.

В то же самое время, частицы, не содержащие MeП, и АК не проявляли выраженного токсического воздействия на животных - значение LD50 в обоих случаях превышало 2000 мг/кг.

Таким образом, было подтверждено снижение общей токсичности MeП, включенных в состав полимерных НЧ.

3.5. Исследование противоопухолевых свойств каталитической системы MnII-НЧ и АК *in vivo*

Следующий этап работы заключался в оценке противоопухолевого эффекта MnII и частиц, содержащих MnII, в эксперименте *in vivo* на модели подкожно привитой карциномы молочной железы мышей 4T1 (рис. 34). В эксперименте были использованы мыши линии BALB/c. В каждой группе было по 6 животных. Лечение начинали через 24 ч после подкожной инокуляции животным суспензии $2 \cdot 10^5$ опухолевых клеток 4T1. MnII и MnII-НЧ вводили двум группам мышей внутривенно в двух дозах (5 мг/кг и 50 мг/кг), АК – внутривенно (в массовом соотношении 1 к 20 соответственно). Доза 5 мг/кг была выбрана на основе литературных данных [249]; в качестве максимальной дозы была использована концентрация MnII – 50 мг/кг, также выбранная в соответствии с литературным источником [249] и исходя из результатов исследования токсичности. Далее проводили 2-х кратное введение: на 1-ые и 7-ые сутки после прививки опухолевых клеток. Введение комбинаций MnII+АК и MnII-НЧ+АК в двух дозах способствовало существенному снижению роста опухоли. Как показано на рисунке 34, при использовании физиологического раствора, АК в дозе 1000 мг/кг, MnII в дозе 50 мг/кг и MnII-НЧ в дозе 50 мг/кг не наблюдалось снижения скорости роста опухолей.

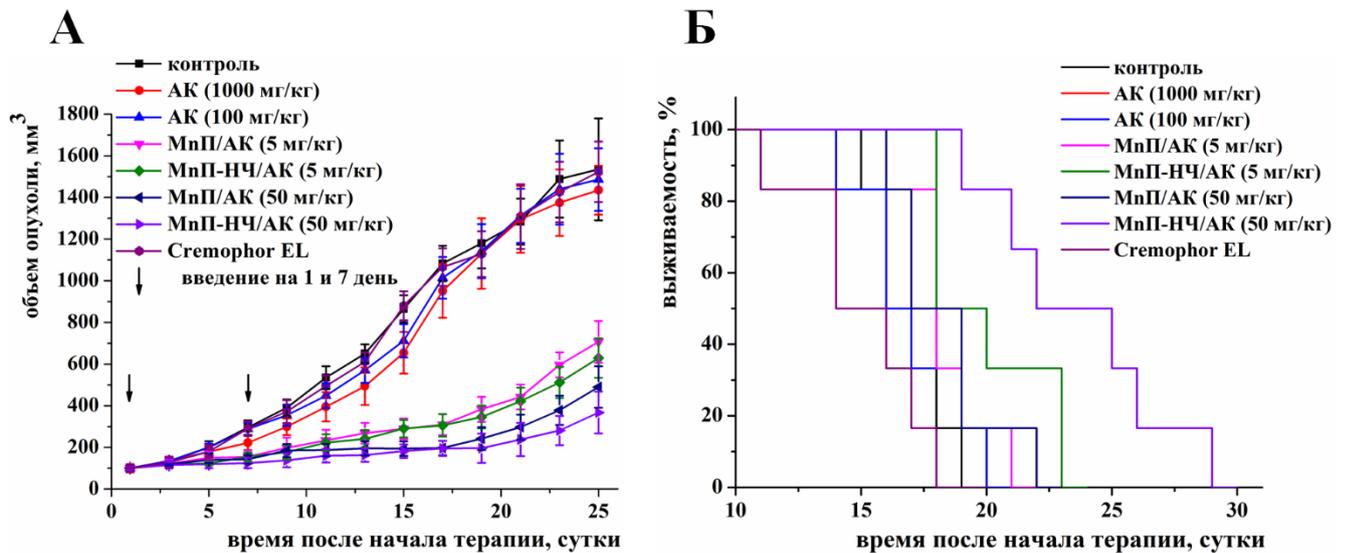


Рисунок 34. Динамика роста опухолей у мышей BALB/c с привитой аденокарциномой линии 4T1 после внутривенного введения MnII и MnII-НЧ в дозах 5 мг/кг и 50 мг/кг, а также внутривенного введения АК в дозе 100 или 1000 мг/кг. Стрелки указывают на сроки введения субстанций. Интервал между введением MeII и АК составил 2 ч. Стрелки указывают на времена введения субстанций. В каждой группе было по 6 животных (А). График выживаемости животных с привитой опухолью линии 4T1 после внутривенного введения MnII и MnII-НЧ в дозах 5 мг/кг и 50 мг/кг, а также внутривенного введения АК в дозе 100 или 1000 мг/кг (Б).

Следует отметить, что значимых различий в противоопухолевой эффективности каталитической системы АК и MnII/MnII-НЧ в дозах 5 мг/кг и 50 мг/кг на данной модели нет, что может свидетельствовать о том, что дозы 5 мг/кг достаточно для реализации эффекта.

Таблица 22. Увеличение средней продолжительности жизни (УСПЖ, %) мышей линии BALB/c с привитой опухолью молочной железы линии 4Т1 после внутривенного введения MnII и MnII-НЧ в дозах 5 мг/кг и 50 мг/кг, а также внутрибрюшинного введения АК в дозе 100 или 1000 мг/кг.

Группа	АК, 100 мг/кг	АК, 1000 мг/кг	MnII/АК, 5 мг/кг	MnII- НЧ/АК, 5 мг/кг	MnII/АК, 50 мг/кг	MnII- НЧ/АК, 50 мг/кг	Раствор Cremophor EL
УСПЖ, %	1,9	2,2	9,4	18,9	9,4	39,6	-10,1

Результаты исследования выживаемости животных показали, что в группах, лечение которых проводили НЧ, можно отметить значительное увеличение СПЖ по сравнению с группами, получавшими субстанцию. Наиболее выраженный эффект УСПЖ в 39,6% наблюдался для группы, получавшей комбинацию MnII-НЧ+АК в дозе 50 мг/кг (таблица 22).

Резюмируя совокупность полученных результатов, стоит отметить выраженную противоопухолевую эффективность препаратов на основе MnII. Несмотря на отсутствие значимого влияния на динамику роста опухоли между частицами и исходной формой MnII, наблюдался значимый эффект в сравнении с контрольной группой, явное увеличение СПЖ групп, получавших наноформу MnII, а также менее выраженное острое токсическое воздействие комбинации MnII-НЧ+АК на организм здоровых животных.

Полученные экспериментальные данные подтверждают противоопухолевую эффективность синтезированных НЧ в комбинации с АК, большую, чем при использовании субстанции: увеличение средней продолжительности жизни и торможение роста опухоли, а также их низкую неспецифическую токсичность. Таким образом, полученная каталитическая система является перспективной для терапии опухолевых заболеваний и может быть далее подробно изучена при проведении доклинических испытаний.

3.6 Исследование биораспределения MnII-НЧ и MnII *in vivo* методом масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой

Исследование биораспределения проводили на мышах линии BALB/c с привитой опухолью молочной железы линии 4Т1 (после достижения объема ~300 мм³) через 24 ч после введения MnII-НЧ и MnII в дозе 25 мг/кг.

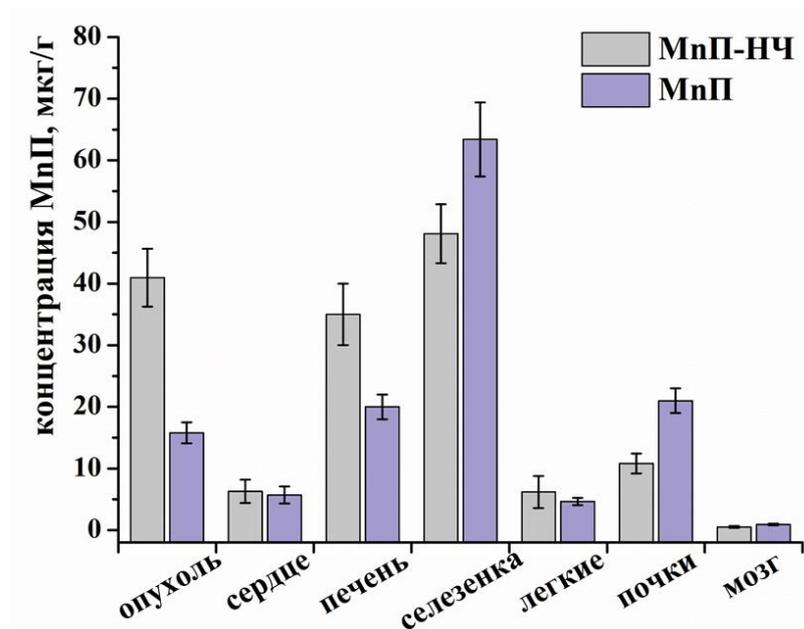


Рисунок 35. Биораспределение MnП по органам на мышах BALB/c через 24 ч после внутривенного введения MnП и MnП-НЧ в дозе 25 мг/кг.

Как видно из рисунка 35, через 24 ч после введения препаратов, НЧ в несколько раз более эффективно накапливались в опухоли, чем субстанция. При этом наблюдается характерный для полимерных НЧ и гидрофобных субстанций профиль биораспределения по органам, в том числе и высокий уровень накопления в органах выведения (печень, селезенка, почки).

Таким образом, полученные НЧ в большей степени накапливались в опухолевой ткани, чем субстанция, что могло способствовать увеличению противоопухолевого эффекта при проведении терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При разработке и оптимизации метода получения НЧ необходимо учитывать такие параметры как РЧ и ОС, поскольку НЧ размером менее 800 нм накапливаются в опухолевых тканях [59], а значение ОС влияет на дозу вводимого препарата [190]. Таким образом, избирательное накопление в опухолевых тканях и снижение дозы лекарственного средства являются решающими параметрами для уменьшения токсических эффектов. Оптимизацию получения НЧ проводили с использованием методологии Бокса-Бенкена, в качестве задачи оптимизации были выбраны условия низкого РЧ и максимального ОС. В процессе оптимизации было выявлено, что для каждого MeП параметры (масса ПМГК, концентрация ПВС, соотношение фаз O/W) оказывали различное влияние на РЧ и ОС. Однако, диапазон изменения этих параметров для NiП, MnП и CoП был довольно узким. Предполагается, что оптимизированный метод получения данных MeП может быть использован для включения других тетрапиррольных макрогетероциклических соединений в НЧ.

Результаты ИК-спектроскопии выявили наличие взаимодействий между ПМГК и MeП, формирующихся в процессе образования НЧ. Профиль высвобождения MeП из НЧ был двухфазным и характеризовался резким всплеском с последующим замедленным высвобождением MeП в течении 200 ч. Аналогичные результаты были описаны для НЧ, содержащих гидрофобные лекарственные препараты [232,233].

Также было показано, что НЧ, содержащие MnП, FeП и CoП, эффективно индуцировали гибель опухолевых клеток. Наиболее активные комбинации MnП+АК и MnП-НЧ+АК демонстрировали увеличение внутриклеточного уровня АФК, а также значительное торможение роста опухоли в экспериментах *in vivo*.

Установлено, что НЧ, содержащие MnП, FeП и CoП, эффективно индуцировали гибель опухолевых клеток. Наиболее активные комбинации MnП+АК и MnП-НЧ+АК демонстрировали увеличение внутриклеточного уровня АФК, индукцию апоптоза за счет повреждения ДНК и митохондрий, а также значительное торможение роста опухоли в экспериментах *in vivo*. Результаты *in vivo* исследования биораспределения свидетельствовали о более высоком накоплении MnП-НЧ в опухоли по сравнению с MnП. Таким образом, полученные MnП-НЧ в комбинации с АК представляются перспективными лекарственными средствами для каталитической терапии опухолевых заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны методы получения частиц, содержащих комплексы Fe (III), Mn (III), Ni (II), Co (II) и *мезо*-тетрафенилпорфиринов. Оптимизация условий позволила получить частицы с низким размером (200-345 нм) и высоким общим содержанием металлопорфирина в частицах (9-29%).

2. Определены физико-химические характеристики частиц: выявлены сферическая форма частиц и наличие взаимодействий между полимером и металлопорфирином. Выявлены двухфазные профили высвобождения металлопорфиринов из частиц.

3. Исследуемые комбинации аскорбиновой кислоты и частиц, содержащих металлопорфирины, демонстрировали цитотоксическую активность в отношении опухолевых линий клеток MCF-7, K562, SK-OV-3 и HeLa. Комбинация аскорбиновой кислоты и частиц, содержащих Mn-*мезо*-тетрафенилпорфирин, способствовала повышению уровня активных форм кислорода, повреждению ДНК и митохондрий, стимулировала апоптоз.

4. Комбинация аскорбиновой кислоты и частиц, содержащих Mn-*мезо*-тетрафенилпорфирин, обладала выраженной противоопухолевой эффективностью *in vivo*. Включение Mn-*мезо*-тетрафенилпорфирина в частицы способствовало его более эффективному накоплению в опухоли по сравнению со свободной субстанцией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Groves J. T. Reactivity and mechanisms of metalloporphyrin catalyzed oxidations //Journal of Porphyrins and Phthalocyanines. – 2000. – V. 4. – №. 4. – P. 350-352.
2. Mansuy D., Fontecave M., Battioni J. P. Intermediate formation of a σ -alkyl iron (III) complex in the reduction of 4-nitrobenzyl chloride catalysed by iron (II)-prophyrins //Journal of the Chemical Society, Chemical Communications. – 1982. – №. 5. – P. 317-319.
3. Deng K., Zhou J., Li X. Noncovalent nanohybrid of cobalt tetraphenylporphyrin with graphene for simultaneous detection of ascorbic acid, dopamine, and uric acid //Electrochimica Acta. – 2013. – V. 114. – P. 341-346.
4. Wang X. Y. et al. Cobalt (II) and nickel (II) ions as promoters of free radicals in vivo: detected directly using electron spin resonance spectrometry in circulating blood in rats //Archives of biochemistry and biophysics. – 1993. – V. 306. – №. 2. – P. 402-406.
5. Operti M. C. et al. PLGA-based nanomedicines manufacturing: Technologies overview and challenges in industrial scale-up //International Journal of Pharmaceutics. – 2021. – V. 605. – P. 120807.
6. Tovmasyan A. et al. Anticancer therapeutic potential of Mn porphyrin/ascorbate system //Free Radical Biology and Medicine. – 2015. – V. 89. – P. 1231-1247.
7. Tovmasyan A. et al. Redox-Active Mn Porphyrins, MnTE-2-PyP5+ and MnTnBuOE-2-PyP5+ But Not Redox-Inert MnTBAP3-Suppress Tumor Growth in an Environment Where H₂O₂ Is Produced //Free Radical Biology and Medicine. – 2016. – V. 100. – P. S93.
8. Weitzel D. H. et al. Neurobehavioral radiation mitigation to standard brain cancer therapy regimens by Mn (III) n-butoxyethylpyridylporphyrin-based redox modifier //Environmental and molecular mutagenesis. – 2016. – V. 57. – №. 5. – P. 372-381.
9. Batinic-Haberle I., Tovmasyan A., Spasojevic I. Mn porphyrin-based redox-active drugs: differential effects as cancer therapeutics and protectors of normal tissue against oxidative injury //Antioxidants & redox signaling. – 2018. – V. 29. – №. 16. – P. 1691-1724.
10. Pandey G. et al. Fluorescent biocompatible platinum-porphyrin-doped polymeric hybrid particles for oxygen and glucose biosensing //Scientific reports. – 2019. – V. 9. – №. 1. – P. 1-12
11. Vepris O. et al. Optically coupled PtOEP and DPA molecules encapsulated into PLGA-nanoparticles for cancer bioimaging //Biomedicines. – 2022. – V. 10. – №. 5. – P. 1070.
12. Dantas K. C. F., Rosário J. S., Silva-Caldeira P. P. Polymeric Nanosystems Applied for Metal-Based Drugs and Photosensitizers Delivery: The State of the Art and Recent Advancements //Pharmaceutics. – 2022. – V. 14. – №. 7. – P. 1506.

13. Smith C. B. et al. Photodynamic therapy of inorganic complexes for the treatment of cancer //Photochemistry and Photobiology. – 2022. – V. 98. – №. 1. – P. 17-41.
14. Clement S. et al. Radiodynamic therapy using TAT peptide-targeted verteporfin-encapsulated PLGA nanoparticles //International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – V. 22. – №. 12. – P. 6425.
15. Redza-Dutordoir M., Averill-Bates D. A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species //Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research. – 2016. – V. 1863. – №. 12. – P. 2977-2992.
16. Galadari S. et al. Reactive oxygen species and cancer paradox: to promote or to suppress? //Free Radical Biology and Medicine. – 2017. – V. 104. – P. 144-164.
17. Feng Z. et al. Control of Reactive Oxygen Species through Antioxidant Enzymes Plays a Pivotal Role during the Cultivation of *Neopyropia yezoensis* //Journal of Marine Science and Engineering. – 2022. – V. 10. – №. 1. – P. 109.
18. Juan C. A. et al. The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies //International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – V. 22. – №. 9. – P. 4642.
19. Irwin M. E., Rivera-Del Valle N., Chandra J. Redox control of leukemia: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities //Antioxidants & redox signaling. – 2013. – V. 18. – №. 11. – P. 1349-1383.
20. Kumari S., Badana A. K., Malla R. R. Reactive oxygen species: a key constituent in cancer survival //Biomarker insights. – 2018. – V. 13. – P. 1177271918755391.
21. Sadeghian M. et al. A review of fasting effects on the response of cancer to chemotherapy //Clinical Nutrition. – 2021. – V. 40. – №. 4. – P. 1669-1681.
22. Yuan Z. et al. Photodynamic therapy synergizes with PD-L1 checkpoint blockade for immunotherapy of CRC by multifunctional nanoparticles //Molecular Therapy. – 2021. – V. 29. – №. 10. – P. 2931-2948.
23. Zou Z. et al. Induction of reactive oxygen species: an emerging approach for cancer therapy //Apoptosis. – 2017. – V. 22. – №. 11. – P. 1321-1335.
24. Cameron E., Pauling L. Supplemental ascorbate in the supportive treatment of cancer: Prolongation of survival times in terminal human cancer //Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1976. – V. 73. – №. 10. – P. 3685-3689.
25. Buettner G. R. In the absence of catalytic metals ascorbate does not autoxidize at pH 7: ascorbate as a test for catalytic metals //Journal of biochemical and biophysical methods. – 1988. – V. 16. – №. 1. – P. 27-40.

26. Levine M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid //New England Journal of Medicine. – 1986. – V. 314. – №. 14. – P. 892-902.
27. Batinic-Haberle I., Tovmasyan A., Spasojevic I. An educational overview of the chemistry, biochemistry and therapeutic aspects of Mn porphyrins—from superoxide dismutation to H₂O₂-driven pathways //Redox biology. – 2015. – V. 5. – P. 43-65.
28. Pelletier P. J., Caventou J. B. Recherches chimiques sur les quinquinas. – Crochard, 1820.
29. Thirupathi A., Chang Y. Z. Brain iron metabolism and CNS diseases //Brain Iron Metabolism and CNS Diseases. – 2019. – P. 1-19.
30. Romslo I., Husby P. Iron, porphyrin and heme transport in mitochondria //International Journal of Biochemistry. – 1980. – V. 12. – №. 5-6. – P. 709-712.
31. Schultz I. J. et al. Iron and porphyrin trafficking in heme biogenesis //Journal of Biological Chemistry. – 2010. – V. 285. – №. 35. – P. 26753-26759.
32. Kieninger C. et al. Replacement of the Cobalt Center of Vitamin B12 by Nickel: Nibalamin and Nibyric Acid Prepared from Metal-Free B12 Ligands Hydrogenobalamin and Hydrogenobyric Acid //Angewandte Chemie. – 2020. – V. 132. – №. 45. – P. 20304-20311.
33. Church A. W. II. Researches on turacine, an animal pigment containing copper //Proceedings of the Royal Society of London. – 1869. – №. 17. – P. 436-436.
34. Simonyan G. S. The role of nickel and vanadium metal porphyrins in the abiogenous formation of oil //Modern high technology. – 2015. – №. 9. – P. 82-85.
35. Gujarathi P. B. Recent emerging applications of porphyrins and Metalloporphyrins and their analogue in diverse areas //Pharma Innov. – 2020. – V. 9. – №. 4. – P. 80-86.
36. Ol'khov A. A. et al. Effect of the addition of iron (III) tetraphenylporphyrin complex on the structure of poly (3-hydroxybutyrate) fibers prepared by electrospinning //Russian Journal of Applied Chemistry. – 2019. – V. 92. – №. 4. – P. 505-516.
37. Ma L. L. et al. heme oxygenase-1 agonist CoPP suppresses influenza virus replication through IRF3-mediated generation of IFN- α/β //Virology. – 2019. – V. 528. – P. 80-88.
38. Dall'Oglio F., Nasca M. R., Micali G. Emerging topical drugs for the treatment of rosacea //Expert Opinion on Emerging Drugs. – 2021. – V. 26. – №. 1. – P. 27-38.
39. Nițescu D. A. M. et al. Experimental research in topical psoriasis therapy //Experimental and Therapeutic Medicine. – 2021. – V. 22. – №. 3. – P. 1-13.
40. Ye X. et al. Cytotoxic effects of Mn (III) N-alkylpyridylporphyrins in the presence of cellular reductant, ascorbate //Free radical research. – 2011. – V. 45. – №. 11-12. – P. 1289-1306.
41. Tovmasyan A. et al. Redox proteomics of 4T1 breast cancer cell after treatment with MnTE-2-PyP5+/ascorbate system //Free Radical Biology and Medicine. – 2016. – V. 100. – P. S112-S113.

42. Tovmasyan A. et al. Radiation-mediated tumor growth inhibition is significantly enhanced with redox-active compounds that cycle with ascorbate //Antioxidants & redox signaling. – 2018. – V. 29. – №. 13. – P. 1196-1214.
43. Zhao Y. et al. A novel redox regulator, MnTnBuOE-2-PyP5+, enhances normal hematopoietic stem/progenitor cell function //Redox biology. – 2017. – V. 12. – P. 129-138.
44. Batinic-Haberle I. et al. Mn porphyrin/ascorbate sensitizes serous epithelial ovarian cancer to chemotherapy //Free Radical Biology and Medicine. – 2018. – V. 128. – P. S74-S75.
45. Alexander M. S. et al. Enhanced pharmacological ascorbate oxidation radiosensitizes pancreatic cancer //Radiation research. – 2019. – V. 191. – №. 1. – P. 43-51.
46. Alexander M. S. et al. MnT4MPyP Enhances Ascorbate-Induced Radiosensitization in Pancreatic Cancer //Journal of the American College of Surgeons. – 2017. – V. 225. – №. 4. – P. S135.
47. Cieslak J. A. et al. Manganoporphyrins and ascorbate enhance gemcitabine cytotoxicity in pancreatic cancer //Free Radical Biology and Medicine. – 2015. – V. 83. – P. 227-237.
48. Филоненко Д. В. и др. Оценка перспективности бинарных каталитических систем с использованием фталоцианинов и аскорбиновой кислоты для внутриплеврального лечения опухолевых плевритов //Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11. – №. 1. – С. 29-33.
49. Сидорова Т. А. и др. Роль каталазы в защите опухолевых клеток от окислительного стресса, индуцированного бинарной каталитической системой «терафтал+ аскорбиновая кислота» //Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика. – 2014. – Т. 7. – №. 3. – С. 282-289.
50. Герасимова Г. К. и др. Эффективность каталитической системы терафтал+ аскорбиновая кислота в отношении опухолевых клеток с фенотипом множественной лекарственной устойчивости //Российский биотерапевтический журнал. – 2009. – Т. 8. – №. 3. – С. 20.
51. Sidorova T. A. et al. Teraphthal (sodium salt of cobalt 4, 5-carboxyphthalocyanine) Decreases Sensitivity of Tumor Cells to Anthracycline Antibiotics and Mitoxantrone in Vitro //Clinical oncohematology. – 2018. – V. 11. – P. 10-25.
52. Sebarchievici I. et al. Optical and electrochemical-mediated detection of ascorbic acid using manganese porphyrin and its gold hybrids //Comptes Rendus Chimie. – 2018. – V. 21. – №. 3-4. – P. 327-338.
53. Zhou Y., Liang X., Dai Z. Porphyrin-loaded nanoparticles for cancer theranostics //Nanoscale. – 2016. – V. 8. – №. 25. – P. 12394-12405.
54. Кастарнова Е. С. и др. Особенности новых лекарственных форм и задачи, выдвигаемые при создании новых систем и средств доставки //Актуальные вопросы ветеринарной

- биологии. – 2023. – №. 4 (60). – С. 69-75.
55. Battistella C., Liang Y., Gianneschi N. C. Innovations in Disease State Responsive Soft Materials for Targeting Extracellular Stimuli Associated with Cancer, Cardiovascular Disease, Diabetes, and Beyond //Advanced Materials. – 2021. – V. 33. – №. 46. – P. 2007504.
56. Hosseini S. M. et al. Nano drug delivery in intracellular bacterial infection treatments //Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2022. – V. 146. – P. 112609.
57. Casas A. et al. Mechanisms of resistance to photodynamic therapy //Current medicinal chemistry. – 2011. – V. 18. – №. 16. – P. 2486-2515.
58. Attia M. F. et al. An overview of active and passive targeting strategies to improve the nanocarriers efficiency to tumour sites //Journal of Pharmacy and Pharmacology. – 2019. – V. 71. – №. 8. – P. 1185-1198.
59. Sun W. et al. Leveraging physiology for precision drug delivery //Physiological reviews. – 2017. – V. 97. – №. 1. – P. 189-225.
60. Chenthamara D. et al. Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration //Biomaterials research. – 2019. – V. 23. – №. 1. – P. 1-29.
61. Müller R. H., Mäder K., Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art //European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. – 2000. – V. 50. – №. 1. – P. 161-177.
62. Malam Y., Loizidou M., Seifalian A. M. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer //Trends in pharmacological sciences. – 2009. – V. 30. – №. 11. – P. 592-599.
63. Üner M., Yener G. Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives //International journal of nanomedicine. – 2007. – V. 2. – №. 3. – P. 289.
64. Muller R. H. et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations //Advanced drug delivery reviews. – 2002. – V. 54. – №. 1. – P. S131.
65. ud Din F. et al. Effective use of nanocarriers as drug delivery systems for the treatment of selected tumors //International journal of nanomedicine. – 2017. – V. 12. – P. 7291.
66. Goto P. L., Siqueira-Moura M. P., Tedesco A. C. Application of aluminum chloride phthalocyanine-loaded solid lipid nanoparticles for photodynamic inactivation of melanoma cells //International journal of pharmaceutics. – 2017. – V. 518. – №. 1-2. – P. 228-241.
67. Silva L. B. et al. Hybrid nanoparticles as an efficient porphyrin delivery system for cancer cells to enhance photodynamic therapy //Frontiers in bioengineering and biotechnology. – 2021. – V. 9.

68. Yeo S. et al. Synthesis and Design of Purpurin-18-Loaded Solid Lipid Nanoparticles for Improved Anticancer Efficiency of Photodynamic Therapy //Pharmaceutics. – 2022. – V. 14. – №. 5. – P. 1064.
69. Naseri N., Valizadeh H., Zakeri-Milani P. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: structure, preparation and application //Advanced pharmaceutical bulletin. – 2015. – V. 5. – №. 3. – P. 305.
70. Duan Y. et al. A brief review on solid lipid nanoparticles: Part and parcel of contemporary drug delivery systems //RSC Advances. – 2020. – V. 10. – №. 45. – P. 26777-26791.
71. Lee W. H. et al. Nano- and micro-based inhaled drug delivery systems for targeting alveolar macrophages //Expert opinion on drug delivery. – 2015. – V. 12. – №. 6. – P. 1009-1026.
72. Torchilin V. P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers //Nature reviews Drug discovery. – 2005. – V. 4. – №. 2. – P. 145-160.
73. Deshpande P. P., Biswas S., Torchilin V. P. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting //Nanomedicine. – 2013. – V. 8. – №. 9. – P. 1509-1528.
74. Massiot J., Rosilio V., Makky A. Photo-triggerable liposomal drug delivery systems: from simple porphyrin insertion in the lipid bilayer towards supramolecular assemblies of lipid-porphyrin conjugates //Journal of Materials Chemistry B. – 2019. – V. 7. – №. 11. – P. 1805-1823.
75. Li M. et al. Composition design and medical application of liposomes //European journal of medicinal chemistry. – 2019. – V. 164. – P. 640-653.
76. Nkanga C. I. et al. General perception of liposomes: formation, manufacturing and applications //Liposomes-advances and perspectives. – 2019.
77. Pedziwiatr-Werbicka E. et al. Dendrimers and hyperbranched structures for biomedical applications //European Polymer Journal. – 2019. – T. 119. – C. 61-73.
78. Basu S., Sandanaraj B. S., Thayumanavan S. Molecular recognition in dendrimers //Encyclopedia of polymer science and technology. – 2002.
79. Sandland J. et al. Bio-Orthogonal Conjugation of a Cationic Metalloporphyrin to BSA and HSA via “Click” Chemistry //ChemBioChem. – 2021. – V. 22. – №. 16. – P. 2624-2631.
80. Das M. et al. Emerging hybrid biomaterials for oxidative stress induced photodynamic therapy //Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2021. – V. 34. – P. 102259.
81. Díaz C. F. et al. Polyamidoamine dendrimers of the third generation–chlorin e6 nanoconjugates: Nontoxic hybrid polymers with photodynamic activity //Journal of Applied Polymer Science. – 2022. – V. 139. – №. 12. – P. 51835.
82. Li J. et al. Light-triggered clustered vesicles with self-supplied oxygen and tissue penetrability for photodynamic therapy against hypoxic tumor //Advanced Functional Materials. – 2017. – V. 27. – №. 33. – P. 1702108.

83. Concellón A. et al. Semiconducting and electropolymerizable liquid crystalline carbazole-containing porphyrin-core dendrimers //Organic Chemistry Frontiers. – 2020. – V. 7. – №. 15. – P. 2008-2015.
84. Abid S. et al. Impact of Changing the Core in Tetrapyrrolic Dendrimers Designed for Oxygen Sensitization: New Fluorescent Phthalocyanine-Based Dendrimers with High Two-Photon Absorption Cross-sections //Macromolecules. – 2021. – V. 54. – №. 14. – P. 6726-6744.
85. Kumar M. S., Aruna P., Ganesan S. Influence of protoporphyrin IX loaded phloroglucinol succinic acid dendrimer in photodynamic therapy //Materials Research Express. – 2018. – V. 5. – №. 3. – P. 034004.
86. Lin M. H. C. et al. Photochemical Internalization of Etoposide Using Dendrimer Nanospheres Loaded with Etoposide and Protoporphyrin IX on a Glioblastoma Cell Line //Pharmaceutics. – 2021. – V. 13. – №. 11. – P. 1877.
87. Zhu F. et al. Co-delivery of gefitinib and hematoporphyrin by aptamer-modified fluorinated dendrimer for hypoxia alleviation and enhanced synergistic chemo-photodynamic therapy of NSCLC //European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2021. – V. 167. – P. 106004.
88. Wu L. et al. Dendrimers in medicine: therapeutic concepts and pharmaceutical challenges //Bioconjugate chemistry. – 2015. – V. 26. – №. 7. – P. 1198-1211.
89. Pooresmaeil M., Namazi H. Advances in development of the dendrimers having natural saccharides in their structure for efficient and controlled drug delivery applications //European Polymer Journal. – 2021. – P. 110356.
90. Lorenz M. R. et al. Uptake of functionalized, fluorescent-labeled polymeric particles in different cell lines and stem cells //Biomaterials. – 2006. – V. 27. – №. 14. – P. 2820-2828.
91. Bianco A. Carbon nanotubes for the delivery of therapeutic molecules //Expert opinion on drug delivery. – 2004. – V. 1. – №. 1. – P. 57-65.
92. Madani S. Y. et al. A new era of cancer treatment: carbon nanotubes as drug delivery tools //International journal of nanomedicine. – 2011. – V. 6. – P. 2963.
93. Pérez-Herrero E., Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy //European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics. – 2015. – V. 93. – P. 52-79.
94. Vardharajula S. et al. Functionalized carbon nanotubes: biomedical applications //International journal of nanomedicine. – 2012. – V. 7. – P. 5361.
95. Sinha N., Yeow J. T. W. Carbon nanotubes for biomedical applications //IEEE transactions on nanobioscience. – 2005. – V. 4. – №. 2. – P. 180-195.

96. Dias L. D., Mfouo-Tynga I. S. Learning from nature: bioinspired chlorin-based photosensitizers immobilized on carbon materials for combined photodynamic and photothermal therapy //Biomimetics. – 2020. – V. 5. – №. 4. – P. 53.
97. Sundaram P., Abrahamse H. Effective photodynamic therapy for colon cancer cells using chlorin e6 coated hyaluronic acid-based carbon nanotubes //International journal of molecular sciences. – 2020. – V. 21. – №. 13. – P. 4745.
98. Wang A. et al. Improved solubility and efficient optical limiting for methacrylate-co-porphyrins covalently functionalized single walled carbon nanotube nanohybrids //Dyes and Pigments. – 2019. – V. 161. – P. 155-161.
99. Micheroni D., Lan G., Lin W. Efficient electrocatalytic proton reduction with carbon nanotube-supported metal–organic frameworks //Journal of The American Chemical Society. – 2018. – V. 140. – №. 46. – P. 15591-15595.
100. Eatemadi A. et al. Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications //Nanoscale research letters. – 2014. – V. 9. – №. 1. – P. 1-13.
101. Dadfar S. M., Roemhild K. Drude, Saskia von Stillfried, Ruth Knüchel, Fabian Kiessling, and Twan Lammers Iron Oxide Nanoparticles: Diagnostic, Therapeutic and Theranostic Applications //Adv. Drug Deliv. Rev. – 2019. – V. 138. – P. 302-325.
102. Slowing I. I. et al. Mesoporous silica nanoparticles as controlled release drug delivery and gene transfection carriers //Advanced drug delivery reviews. – 2008. – V. 60. – №. 11. – P. 1278-1288.
103. Li Y. et al. Hollow mesoporous silica nanoparticles with tunable structures for controlled drug delivery //ACS applied materials & interfaces. – 2017. – V. 9. – №. 3. – P. 2123-2129.
104. Wang Y. et al. Mesoporous silica nanoparticles in drug delivery and biomedical applications //Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. – 2015. – V. 11. – №. 2. – P. 313-327.
105. Day C. M., Sweetman M. J., Garg S. Mesoporous silica nanoparticles for drug combination delivery in cancer therapy: Background, current insights, and future perspectives //Nanocarriers for the Delivery of Combination Drugs. – Elsevier, 2021. – P. 119-162.
106. Borzęcka W. et al. Encapsulation of glycosylated porphyrins in silica nanoparticles to enhance the efficacy of cancer photodynamic therapy //Materials Advances. – 2021. – V. 2. – №. 5. – P. 1613-1620.
107. Youssef Z. et al. Titania and silica nanoparticles coupled to Chlorin e6 for anti-cancer photodynamic therapy //Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2018. – V. 22. – P. 115-126.

108. Ferreira L. F. V. et al. Surface photochemical studies of nano-hybrids of A3B porphyrins and Fe₃O₄ silica-coated nanoparticles //Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. – 2020. – V. 387. – P. 112152.
109. Scanone A. C. et al. Photodynamic properties and photoinactivation of microorganisms mediated by 5, 10, 15, 20-tetrakis (4-carboxyphenyl) porphyrin covalently linked to silica-coated magnetite nanoparticles //Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. – 2017. – V. 346. – P. 452-461.
110. Chanhom P. et al. Metalloporphyrins-sensitized titania-silica-iron oxide nanocomposites with high photocatalytic and bactericidal activities under visible light irradiation //Journal of Magnetism and Magnetic Materials. – 2019. – V. 475. – P. 602-610.
111. Jeelani P. G. et al. Multifaceted application of silica nanoparticles. A review //Silicon. – 2020. – V. 12. – №. 6. – P. 1337-1354.
112. Kwon J. Y., Koedrith P., Seo Y. R. Current investigations into the genotoxicity of zinc oxide and silica nanoparticles in mammalian models in vitro and in vivo: carcinogenic/genotoxic potential, relevant mechanisms and biomarkers, artifacts, and limitations //International journal of nanomedicine. – 2014. – V. 9. – №. Suppl 2. – P. 271.
113. Chen K. et al. Directional janus metasurface //Advanced Materials. – 2020. – V. 32. – №. 2. – P. 1906352.
114. Feng L., Tianjun L., Li W. Synthesis, Characterization and Cell-uptake of Porphyrin-capped Gold Nanoparticle //7th Asian-Pacific Conference on Medical and Biological Engineering. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2008. – P. 186-189.
115. Grigore M. E. et al. Tailored porphyrin–gold nanoparticles for biomedical applications //PORPHYRIN SCIENCE BY WOMEN: In 3 Volumes. – 2019. – P. 85-99.
116. Zeng J. et al. Porphyrin derivative conjugated with gold nanoparticles for dual-modality photodynamic and photothermal therapies in vitro //ACS Biomaterials Science & Engineering. – 2018. – V. 4. – №. 3. – P. 963-972.
117. Paul W., Sharma C. P. Inorganic nanoparticles for targeted drug delivery //Biointegration of medical implant materials. – 2020. – P. 333-373.
118. Dadfar S. M., Roemhild K. Drude, Saskia von Stillfried, Ruth Knüchel, Fabian Kiessling, and Twan Lammers Iron Oxide Nanoparticles: Diagnostic, Therapeutic and Theranostic Applications //Adv. Drug Deliv. Rev. – 2019. – V. 138. – P. 302-325.
119. Fakayode O. J. et al. Photodynamic therapy evaluation of methoxypolyethyleneglycol-thiol-SPIONs-gold-meso-tetrakis (4-hydroxyphenyl) porphyrin conjugate against breast cancer cells //Materials Science and Engineering: C. – 2018. – V. 92. – P. 737-744.

120. Amirshaghghi A. et al. Chlorin e6-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticle (SPION) nanoclusters as a theranostic agent for dual-mode imaging and photodynamic therapy //Scientific reports. – 2019. – V. 9. – №. 1. – P. 1-9.
121. Zhang P. et al. Iron oxide nanoparticles as nanocarriers to improve chlorin e6-based sonosensitivity in sonodynamic therapy //Drug Design, Development and Therapy. – 2018. – V. 12. – P. 4207.
122. Ansari M. O. et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles based cancer theranostics: A double edge sword to fight against cancer //Journal of Drug Delivery Science and Technology. – 2018. – V. 45. – P. 177-183.
123. Chenthamara D. et al. Therapeutic efficacy of nanoparticles and routes of administration //Biomaterials research. – 2019. – V. 23. – №. 1. – P. 1-29.
124. Bamrungsap S. et al. Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system //Nanomedicine. – 2012. – V. 7. – №. 8. – P. 1253-1271.
125. Wang X. et al. Advances of cancer therapy by nanotechnology //Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association. – 2009. – V. 41. – №. 1. – P. 1.
126. Zhu Y., Liao L. Applications of nanoparticles for anticancer drug delivery: a review //Journal of nanoscience and nanotechnology. – 2015. – V. 15. – №. 7. – P. 4753-4773.
127. Hu C. M. J., Aryal S., Zhang L. Nanoparticle-assisted combination therapies for effective cancer treatment //Therapeutic delivery. – 2010. – V. 1. – №. 2. – P. 323-334.
128. Wang M. et al. Mitochondria-modulating porous Se@ SiO₂ nanoparticles provide resistance to oxidative injury in airway epithelial cells: Implications for acute lung injury //International journal of nanomedicine. – 2020. – V. 15. – P. 2287.
129. Deirram N. et al. pH-responsive polymer nanoparticles for drug delivery //Macromolecular rapid communications. – 2019. – V. 40. – №. 10. – P. 1800917.
130. Huang X. et al. Combined photothermal-immunotherapy via poly-tannic acid coated PLGA nanoparticles for cancer treatment //Biomaterials Science. – 2021. – V. 9. – №. 18. – P. 6282-6294.
131. Jamali Z. et al. Evaluation of targeted curcumin (CUR) loaded PLGA nanoparticles for in vitro photodynamic therapy on human glioblastoma cell line //Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. – 2018. – V. 23. – P. 190-201.
132. Xu L. Q. et al. Pegylated metalloporphyrin nanoparticles as a promising catalyst for the heterogeneous oxidation of cyclohexene in water //Macromolecular Chemistry and Physics. – 2015. – V. 216. – №. 4. – P. 417-426.

133. Pandey G. et al. Fluorescent biocompatible platinum-porphyrin-doped polymeric hybrid particles for oxygen and glucose biosensing //Scientific reports. – 2019. – V. 9. – №. 1. – P. 1-12.
134. Tabatabaei Mirakabad F. S. et al. PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems //Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. – 2014. – V. 15. – №. 2. – P. 517-535.
135. Zhang Y., Chan H. F., Leong K. W. Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future //Advanced drug delivery reviews. – 2013. – V. 65. – №. 1. – P. 104-120.
136. Zhu H. et al. Co-delivery of chemotherapeutic drugs with vitamin E TPGS by porous PLGA nanoparticles for enhanced chemotherapy against multi-drug resistance //Biomaterials. – 2014. – V. 35. – №. 7. – P. 2391-2400.
137. Hines D. J., Kaplan D. L. Poly (lactic-co-glycolic) acid- controlled-release systems: experimental and modeling insights //Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems. – 2013. – V. 30. – №. 3.
138. Han F. Y. et al. Bioerodable PLGA-based microparticles for producing sustained-release drug formulations and strategies for improving drug loading //Frontiers in pharmacology. – 2016. – V. 7. – P. 185.
139. Vlachopoulos A. et al. Poly (Lactic Acid)-Based Microparticles for Drug Delivery Applications: An Overview of Recent Advances //Pharmaceutics. – 2022. – V. 14. – №. 2. – P. 359.
140. Danhier F. et al. PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications //Journal of controlled release. – 2012. – V. 161. – №. 2. – P. 505-522.
141. Stephen B. J. et al. A comprehensive study to fabricate NAC loaded PLGA nanoparticles for drug delivery //Materials Today: Proceedings. – 2021. – V. 43. – P. 3268-3271.
142. Kamaly N. et al. Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: mechanisms of controlling drug release //Chemical reviews. – 2016. – V. 116. – №. 4. – P. 2602-2663.
143. Mansor M. H. et al. Development of a non-toxic and non-denaturing formulation process for encapsulation of SDF-1 α into PLGA/PEG-PLGA nanoparticles to achieve sustained release //European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2018. – V. 125. – P. 38-50.
144. Dikpati A. et al. Residual solvents in nanomedicine and lipid-based drug delivery systems: A case study to better understand processes //Pharmaceutical research. – 2020. – V. 37. – №. 8. – P. 1-11.
145. Masood F. Polymeric nanoparticles for targeted drug delivery system for cancer therapy //Materials Science and Engineering: C. – 2016. – V. 60. – P. 569-578.

146. Mendoza-Muñoz N., Alcalá-Alcala S., Quintanar-Guerrero D. preparation of polymer nanoparticles by the emulsification-solvent evaporation method: from vanderhoff's pioneer approach to recent adaptations //Polymer Nanoparticles for Nanomedicines. – Springer, Cham, 2016. – P. 87-121.
147. Pérez A., Mijangos C., Hernández R. Preparation of Hybrid Fe₃O₄/Poly (lactic-co-glycolic acid)(PLGA) Particles by Emulsion and Evaporation Method. Optimization of the Experimental Parameters //Macromolecular Symposia. – 2014. – V. 335. – №. 1. – P. 62-69.
148. Tabatabaei Mirakabad F. S. et al. PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems //Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. – 2014. – V. 15. – №. 2. – P. 517-535.
149. Mir M., Ahmed N., ur Rehman A. Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2017. – V. 159. – P. 217-231.
150. Dinarvand R. et al. Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents //International journal of nanomedicine. – 2011. – V. 6. – P. 877.
151. Li X., Jiang X. Microfluidics for producing poly (lactic-co-glycolic acid)-based pharmaceutical nanoparticles //Advanced drug delivery reviews. – 2018. – V. 128. – P. 101-114.
152. Box G. E. P. et al. Statistics for experimenters: design, innovation, and discovery. – New York : Wiley-Interscience, 2005. – V. 2.
153. Box G. E. P., Behnken D. W. Some new three level designs for the study of quantitative variables //Technometrics. – 1960. – V. 2. – №. 4. – P. 455-475.
154. Ferreira S. L. C. et al. Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods //Analytica chimica acta. – 2007. – V. 597. – №. 2. – P. 179-186.
155. Adena S. K. R. et al. Gold nanoparticles for sustained antileukemia drug release: development, optimization and evaluation by quality-by-design approach //Nanomedicine. – 2019. – V. 14. – №. 7. – P. 851.
156. Liu J. et al. A multi-parameter optimization model for the evaluation of shale gas recovery enhancement //Energies. – 2018. – V. 11. – №. 3. – P. 654.
157. Chakraborty R. et al. Prediction of optimal conditions in the methanolysis of mustard oil for biodiesel production using cost-effective mg-solid catalysts //Industrial & Engineering Chemistry Research. – 2014. – V. 53. – №. 51. – P. 19681-19689.
158. Li H. et al. Optimization of on-chip bacterial culture conditions using the Box-Behnken design response surface methodology for faster drug susceptibility screening //Talanta. – 2019. – V. 194. – P. 627-633.
159. Pishgar-Komleh S. H. et al. Application of response surface methodology for //Iranica Journal of Energy & Environment. – 2012. – V. 3. – №. 2. – P. 134-142.

160. Alam P. et al. Box–Behnken Design (BBD)-Based Optimization of Microwave-Assisted Extraction of Parthenolide from the Stems of *Tarconanthus camphoratus* and Cytotoxic Analysis // *Molecules*. – 2021. – V. 26. – №. 7. – P. 1876.
161. Зубрилина Е. М. и др. Метод обобщенной оценки при выборе факторов и уровней их варьирования в многофакторном исследовании высевяющих аппаратов // *Сельскохозяйственные машины и технологии*. – 2019. – Т. 13. – №. 4. – С. 65-70.
162. Igder A. et al. Box-Behnken Design of Experiments Investigation for Adsorption of Cd²⁺ onto carboxymethyl Chitosan Magnetic Nanoparticles // *Journal of Mining and Environment*. – 2012. – V. 3. – №. 1. – P. 51-59.
163. Shaikh M. V., Kala M., Nivsarkar M. Formulation and optimization of doxorubicin loaded polymeric nanoparticles using Box-Behnken design: ex-vivo stability and in-vitro activity // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2017. – V. 100. – P. 262-272.
164. K Sah A., K Suresh P. Loteprednol etabonate nanoparticles: optimization via Box-Behnken design response surface methodology and physicochemical characterization // *Current drug delivery*. – 2017. – V. 14. – №. 5. – P. 676-689.
165. Gidwani B., Vyas A. Preparation, characterization, and optimization of altretamine-loaded solid lipid nanoparticles using Box-Behnken design and response surface methodology // *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology*. – 2016. – V. 44. – №. 2. – P. 571-580.
166. Wang R., Yu Z. Validity and reliability of Benesi-Hildebrand method // *Acta Physico-Chimica Sinica*. – 2007. – V. 23. – №. 9. – P. 1353-1359.
167. Аликберова Л.Ю., Рукк Н.Р. Под общей редакцией профессора Михайлова В.А. Учебно-методическое пособие МИТХТ. – Москва, 2012 г.
168. Gans P., Sabatini A., Vacca A. Investigation of equilibria in solution. Determination of equilibrium constants with the HYPERQUAD suite of programs // *Talanta*. – 1996. – V. 43. – №. 10. – P. 1739-1753.
169. Shah A. et al. Electrochemical and spectroscopic investigations of protonated ferrocene-DNA intercalation // *Analytical Sciences*. – 2008. – V. 24. – №. 11. – P. 1437-1441.
170. Hackley V. A., Clogston J. D. Measuring the hydrodynamic size of nanoparticles in aqueous media using batch-mode dynamic light scattering // *Characterization of nanoparticles intended for drug delivery*. – Humana Press, 2011. – P. 35-52.
171. Жильцова Е. П. и др. Полифункциональные наносистемы на амфифильной и гибридной платформе: самоорганизация, мезогенные свойства, практическое применение // *Жидкие кристаллы и их практическое использование*. – 2020. – Т. 20. – №. 3. – С. 5-25.
172. Практикум по колебательной спектроскопии: учебное пособие / В.Н. Носенко, В.Е. Ситникова, И.Е. Стрельникова, М.И. Фокина. – СПб: Университет ИТМО, 2021. – 173 С.

173. Inkson B. J. Scanning electron microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM) for materials characterization //Materials characterization using nondestructive evaluation (NDE) methods. – Woodhead Publishing, 2016. – P. 17-43.
174. Barzegar-Jalali M. Kinetic analysis of drug release from nanoparticles //Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences. – 2008. – V. 11. – №. 1. – P. 167-177.
175. Maheshwari R. et al. Micromeritics in pharmaceutical product development //Dosage form design considerations. – Academic Press, 2018. – P. 599-635.
176. Jahromi L. P. et al. A comparison of models for the analysis of the kinetics of drug release from PLGA-based nanoparticles //Heliyon. – 2020. – V. 6. – №. 2. – P. e03451.
177. Bhatt Y. A., Shah D. A. Effect of processing variables in formulation and development of biodegradable microparticles //International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. – 2011. – V. 3. – №. 4. – P. 234-239.
178. Vichai V., Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening //Nature protocols. – 2006. – V. 1. – №. 3. – P. 1112-1116.
179. Eruslanov E., Kusmartsev S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry //Advanced protocols in oxidative stress II. – Humana Press, Totowa, NJ, 2010. – P. 57-72.
180. Roelofs B. A. et al. Low micromolar concentrations of the superoxide probe MitoSOX uncouple neural mitochondria and inhibit complex IV //Free Radical Biology and Medicine. – 2015. – V. 86. – P. 250-258.
181. Prajitha N., Mohanan P. V. Cellular and Immunological Response of THP-1 Cells in Response to Lipopolysaccharides and Lipoteichoic Acid Exposure //Biomedical Research and Therapy. – 2021. – V. 8. – №. 9. – P. 4562-4582.
182. Sharma R. et al. Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay using bench top flow cytometer for evaluation of sperm DNA fragmentation in fertility laboratories: protocol, reference values, and quality control //Journal of assisted reproduction and genetics. – 2016. – V. 33. – P. 291-300.
183. Akbari-Alavijeh S., Shaddel R., Jafari S. M. In vivo assays for evaluating the release of nanoencapsulated food ingredients //Release and Bioavailability of Nanoencapsulated Food Ingredients. – Academic Press, 2020. – P. 179-207.
184. Li M. et al. Physiologically based pharmacokinetic modeling of PLGA nanoparticles with varied mPEG content //International journal of nanomedicine. – 2012. – V. 7. – P. 1345.
185. Tekuri S. K. et al. Determination of median lethal dose of zinc chloride in wistar rat //Adv. Anim. Vet. Sci. – 2021. – V. 9. – №. 3. – P. 393-399.

186. Xiong L. et al. Resveratrol and its Nanoparticle suppress Doxorubicin/Docetaxel-resistant anaplastic Thyroid Cancer Cells in vitro and in vivo //Nanotheranostics. – 2021. – V. 5. – №. 2. – P. 143.
187. Hrbáč J. et al. Nitric oxide sensor based on carbon fiber covered with nickel porphyrin layer deposited using optimized electropolymerization procedure //Bioelectrochemistry. – 2007. – V. 71. – №. 1. – P. 46-53.
188. Sharma N., Madan P., Lin S. Effect of process and formulation variables on the preparation of parenteral paclitaxel-loaded biodegradable polymeric nanoparticles: A co-surfactant study //Asian journal of pharmaceutical sciences. – 2016. – V. 11. – №. 3. – P. 404-416.
189. Pimple S. et al. PLGA nanoparticles loaded with etoposide and quercetin dihydrate individually: in vitro cell line study to ensure advantage of combination therapy //Cancer nanotechnology. – 2012. – V. 3. – №. 1. – P. 25-36.
190. Sathyamoorthy N. et al. Optimization of paclitaxel loaded poly (ϵ -caprolactone) nanoparticles using Box Behnken design //Beni-Suef University journal of basic and applied sciences. – 2017. – V. 6. – №. 4. – P. 362-373.
191. Faustova M. et al. High-effective reactive oxygen species inducer based on Mn-tetraphenylporphyrin loaded PLGA nanoparticles in binary catalyst therapy //Free Radical Biology and Medicine. – 2019. – V. 143. – P. 522-533.
192. Pramual S. et al. Polymer-lipid-PEG hybrid nanoparticles as photosensitizer carrier for photodynamic therapy //Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. – 2017. – V. 173. – P. 12-22.
193. Burnham B. F., Zuckerman J. J. Complex formation between porphyrins and metal ions //Journal of the American Chemical Society. – 1970. – V. 92. – №. 6. – P. 1547-1550.
194. Bouriche S. et al. Optimization of preparation method by W/O/W emulsion for entrapping metformin hydrochloride into poly (lactic acid) microparticles using Box-Behnken design //Journal of Drug Delivery Science and Technology. – 2019. – V. 51. – P. 419-429.
195. Abouelmagd S. A. et al. Release kinetics study of poorly water-soluble drugs from nanoparticles: are we doing it right? //Molecular pharmaceutics. – 2015. – V. 12. – №. 3. – P. 997-1003.
196. Evans M. K. et al. Mn porphyrin in combination with ascorbate acts as a pro-oxidant and mediates caspase-independent cancer cell death //Free Radical Biology and Medicine. – 2014. – V. 68. – P. 302-314.

197. Derman S. et al. Antioxidant activity and hemocompatibility study of quercetin loaded plga nanoparticles //Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR. – 2020. – V. 19. – №. 1. – P. 424.
198. Mollaev M. et al. Type of pH sensitive linker reveals different time-dependent intracellular localization, in vitro and in vivo efficiency in alpha-fetoprotein receptor targeted doxorubicin conjugate //International Journal of Pharmaceutics. – 2019. – V. 559. – P. 138-146.
199. Mollaeva M. R. et al. Oxidative Damage Induced by Phototoxic Pheophorbide a 17-Diethylene Glycol Ester Encapsulated in PLGA Nanoparticles //Antioxidants. – 2021. – V. 10. – №. 12. – P. 1985.
200. Ma X., Deng D., Chen W. Inhibitors and Activators of SOD, GSH-Px, and CAT //Enzyme inhibitors and activators. – 2017. – V. 29. – P. 207-224.
201. Moßhammer M. et al. Extracellular hydrogen peroxide measurements using a flow injection system in combination with microdialysis probes—Potential and challenges //Free Radical Biology and Medicine. – 2018. – V. 128. – P. 111-123.
202. Kalinina E. V. et al. Changes in expression of genes encoding antioxidant enzymes, heme oxygenase-1, Bcl-2, and Bcl-xl and in level of reactive oxygen species in tumor cells resistant to doxorubicin //Biochemistry (Moscow). – 2006. – V. 71. – №. 11. – P. 1200-1206.
203. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / А.Н. Миронов, Н.Д. Бунатян, А.Н. Васильев; под ред. А.Н. Миронова. – Москва: Гриф и К, 2012. – 15-17 С.
204. Chen H. et al. Preparation and characterization of paclitaxel palmitate albumin nanoparticles with high loading efficacy: an in vitro and in vivo anti-tumor study in mouse models //Drug Delivery. – 2021. – V. 28. – №. 1. – P. 1067-1079.
205. Акатов В.С., Ворожцов Г.Н., Каляя О.Л., Корыстов Ю.Н., Лукьянец Е.А., Панкратов А.А., Чиссов В.И., Якубовская Р.И. Способ подавления опухолевого роста // Патент RU 2255742 С2 от 22.09.2003.
206. Khabriev R. U. et al. Guidelines for experimental (preclinical) study of new pharmacological substances //Moscow: Medicine. – 2005. – P. 832.
207. Трещалина, Е.М. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. В Кн: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Е.М. Трещалина, О.С. Жукова, Г.К. Герасимова и др. - Москва: Медицина, 2005. – 637–651 С.
208. Дружкова И. Н. и др. Динамика биораспределения L-борфенилаланина в органах мыши с подкожным ксенографтом опухоли—модель оценки эффективности нейтронных

- источников для бор-нейтронозахватной терапии //Современные технологии в медицине. – 2023. – Т. 15. – №. 6. – С. 14-21.
209. Liao L. et al. Facile fabrication of iron porphyrin-based porous organic polymer with excellent oxidase-like activity for colorimetric detection of sulfide //Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2022. – V. 651. – P. 129727.
210. Hrbáč J. et al. Nitric oxide sensor based on carbon fiber covered with nickel porphyrin layer deposited using optimized electropolymerization procedure //Bioelectrochemistry. – 2007. – V. 71. – №. 1. – P. 46-53.
211. Chen Q. et al. The unpaved journey of vitamin C in cancer treatment //Canadian journal of physiology and pharmacology. – 2015. – V. 93. – №. 12. – P. 1055-1063.
212. Rozanova N., Zhang J.Z., Heck D.E. Catalytic therapy of cancer with porphyrins and ascorbate //Cancer letters. – 2007. – V. 252. – №. 2. – P. 216-224.
213. Wang X.Y. et al. Cobalt (II) and nickel (II) ions as promoters of free radicals in vivo: detected directly using electron spin resonance spectrometry in circulating blood in rats //Archives of biochemistry and biophysics. – 1993. – V. 306. – №. 2. – P. 402-406.
214. El-Hammadi M. M., Arias J. L. Recent Advances in the Surface Functionalization of PLGA-Based Nanomedicines //Nanomaterials. – 2022. – V. 12. – №. 3. – P. 354.
215. Mwiiri F. K., Daniels R. Influence of PVA Molecular Weight and Concentration on Electrospinnability of Birch Bark Extract-Loaded Nanofibrous Scaffolds Intended for Enhanced Wound Healing //Molecules. – 2020. – V. 25. – №. 20. – P. 4799.
216. Rafiei P., Haddadi A. A robust systematic design: optimization and preparation of polymeric nanoparticles of PLGA for docetaxel intravenous delivery //Materials Science and Engineering: C. – 2019. – V. 104. – P. 109950.
217. Escalona-Rayo O. et al. Rapamycin-loaded polysorbate 80-coated PLGA nanoparticles: optimization of formulation variables and in vitro anti-glioma assessment //Journal of Drug Delivery Science and Technology. – 2019. – V. 52. – P. 488-499.
218. Jonderian A., Maalouf R. Formulation and in vitro interaction of rhodamine-B loaded PLGA nanoparticles with cardiac myocytes //Frontiers in pharmacology. – 2016. – V. 7. – P. 458.
219. Snehalatha M., Venugopal K., Saha R. N. Etoposide-loaded PLGA and PCL nanoparticles I: preparation and effect of formulation variables //Drug Delivery. – 2008. – V. 15. – №. 5. – P. 267-275.
220. Rouhani H. et al. Zinc protoporphyrin polymeric nanoparticles: potent heme oxygenase inhibitor for cancer therapy //Pharmaceutical research. – 2014. – V. 31. – №. 8. – P. 2124-2139.
221. Lorenzoni D., Souto C.A.Z., Araujo M.B., de Souza Berger C., da Silva L.C.D., Baratti

- M.O., Ribeiro J.N., Endringer D.C., Guimaraes M.C.C., da Silva A.R. PLGA-PEG nanoparticles containing gallium phthalocyanine: Preparation, optimization and analysis of its photodynamic efficiency on red blood cell and Hepa-1C1C7 //J. Photochem. Photobiol. B Biol. – 2019. V. 198. P. 111582.
222. Maclean A. L. et al. Structural characterization of nickel (II) tetraphenylporphyrin //Australian journal of chemistry. – 1996. – V. 49. – №. 12. – P. 1273-1278.
223. Mahajan N. M., Sakarkar D. M., Manmode A. S. Preparation and characterization of meselamine loaded PLGA nanoparticles //Int. J. Pharm. Pharm. Sci. – 2011. – V. 3. – №. 4.
224. Singh G. et al. Recent biomedical applications and patents on biodegradable polymer-PLGA //Int J Pharmacol Pharm Sci. – 2014. – V. 1. – №. 2. – P. 30-42.
225. Nikolskaya E. et al. The comparative study of influence of lactic and glycolic acids copolymers type on properties of daunorubicin loaded nanoparticles and drug release //Acta of Bioengineering and Biomechanics. – 2018. – V. 20. – №. 1.
226. Zhang M. et al. Influencing factors and strategies of enhancing nanoparticles into tumors in vivo //Acta Pharmaceutica Sinica B. – 2021. – V. 11. – №. 8. – P. 2265-2285.
227. Asadzadeh H., Moosavi A. Investigation of the interactions between Melittin and the PLGA and PLA polymers: molecular dynamic simulation and binding free energy calculation //Materials Research Express. – 2019. – V. 6. – №. 5. – P. 055318.
228. Forrest W. P. et al. USP apparatus 4: a valuable in vitro tool to enable formulation development of long-acting parenteral (LAP) nanosuspension formulations of poorly water-soluble compounds //AAPS PharmSciTech. – 2018. – V. 19. – №. 1. – P. 413-424.
229. RS P. et al. Dual drug delivery of curcumin and niclosamide using PLGA nanoparticles for improved therapeutic effect on breast cancer cells //Journal of Polymer Research. – 2020. – V. 27. – №. 5. – P. 1-13.
230. Shah S. et al. Inhalable linezolid loaded PLGA nanoparticles for treatment of tuberculosis: Design, development and in vitro evaluation //Journal of Drug Delivery Science and Technology. – 2020. – V. 60. – P. 102013.
231. Ćirić A. et al. Study of chitosan/xanthan gum polyelectrolyte complexes formation, solid state and influence on ibuprofen release kinetics //International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – V. 148. – P. 942-955.
232. Ghalekhondabi V., Soleymani M., Fazlali A. Folate-targeted nanomicelles containing silibinin as an active drug delivery system for liver cancer therapy //Journal of Drug Delivery Science and Technology. – 2021. – V. 61. – P. 102157.

233. Heidarian M., Khazaei A., Saien J. Grafting drugs to functionalized single-wall carbon nanotubes as a potential method for drug delivery //Physical Chemistry Research. – 2021. – V. 9. – №. 1. – P. 57-68.
234. Tovmasyan A. et al. Differential coordination demands in Fe versus Mn water-soluble cationic metalloporphyrins translate into remarkably different aqueous redox chemistry and biology //Inorganic chemistry. – 2013. – V. 52. – №. 10. – P. 5677-5691.
235. Lovander M. D. et al. Critical review—electrochemical properties of 13 vitamins: a critical review and assessment //Journal of The Electrochemical Society. – 2018. – V. 165. – №. 2. – P. G18.
236. Courrol L. C. Protoporphyrin IX: An Endogenous Theranostic Compound //2021 SBFoton International Optics and Photonics Conference (SBFoton IOPC). – IEEE, 2021. – P. 1-6.
237. Maiti N. C., Mazumdar S., Periasamy N. J- and H-aggregates of porphyrin– surfactant complexes: time-resolved fluorescence and other spectroscopic studies //The Journal of Physical Chemistry B. – 1998. – V. 102. – №. 9. – P. 1528-1538.
238. Rana A. et al. Shear-dependent platelet aggregation: mechanisms and therapeutic opportunities //Frontiers in cardiovascular medicine. – 2019. – P. 141.
239. Raut S. et al. Reconstituted HDL: drug delivery platform for overcoming biological barriers to cancer therapy //Frontiers in Pharmacology. – 2018. – V. 9. – P. 1154.
240. Libi S. et al. Investigation on hemolytic effect of poly (lactic co-glycolic) acid nanoparticles synthesized using continuous flow and batch processes //Nanotechnology Reviews. – 2017. – V. 6. – №. 2. – P. 209-220.
241. de la Harpe K. M. et al. The hemocompatibility of nanoparticles: a review of cell–nanoparticle interactions and hemostasis //Cells. – 2019. – V. 8. – №. 10. – P. 1209.
242. Scheeren L. E. et al. Transferrin-conjugated doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles with pH-responsive behavior: a synergistic approach for cancer therapy //Journal of Nanoparticle Research. – 2020. – V. 22. – №. 3. – P. 1-18.
243. Riva B. et al. Impact of the strategy adopted for drug loading in nonporous silica nanoparticles on the drug release and cytotoxic activity //Journal of colloid and interface science. – 2018. – V. 519. – P. 18-26.
244. Yadav N., Tripathi A. K., Parveen A. PLGA-Quercetin Nano-Formulation Inhibits Cancer Progression via Mitochondrial Dependent Caspase-3, 7 and Independent FoxO1 Activation with Concomitant PI3K/AKT Suppression //Pharmaceutics. – 2022. – V. 14. – №. 7. – P. 1326.

245. Sarkar R. K. et al. Comprehensive characterization and molecular insights into the salt tolerance of a Cu, Zn-superoxide dismutase from an Indian Mangrove, *Avicennia marina* //Scientific reports. – 2022. – V. 12. – №. 1. – P. 1-15.
246. Savic-Radojevic A. et al. Novel biomarkers of heart failure //Advances in clinical chemistry. – 2017. – V. 79. – P. 93-152.
247. Esworthy R. S., Baker M. A., Chu F. F. Expression of selenium-dependent glutathione peroxidase in human breast tumor cell lines //Cancer research. – 1995. – V. 55. – №. 4. – P. 957-962.
248. Wang H. D. et al. Role of superoxide anion in regulating pressor and vascular hypertrophic response to angiotensin II //American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. – 2002. – V. 282. – №. 5. – P. H1697-H1702.
249. Veselov V. V. et al. Targeted Delivery Methods for Anticancer Drugs //Cancers. – 2022. – V. 14. – №. 3. – P. 622.