

На правах рукописи

Зубарева Анастасия Александровна

**РАЗРАБОТКА СИСТЕМ ДОСТАВКИ БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ НА ОСНОВЕ НАНОЧАСТИЦ
ХИТОЗАНА И ЕГО ПРОИЗВОДНЫХ**

Специальность 03.01.06 – Биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2013

Работа выполнена в лаборатории инженерии ферментов ФГБУН Центра «Биоинженерия» РАН и в лаборатории клеточных взаимодействий ФГБУН Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Научные руководители:

кандидат химических наук

Ильина Алла Викторовна

кандидат биологических наук

Свирщевская Елена Викторовна

Официальные оппоненты:

доктор химических наук

Марквичева Елена Арнольдовна

доктор химических наук, проф.,

член-корр. РАН

Северин Евгений Сергеевич

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Защита состоится «19» июня 2013 г в __ часов __ мин. на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук по адресу: 117997, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институте биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Автореферат разослан « » мая 2013

Ученый секретарь Диссертационного совета, доктор физико-математических наук



В.А.Олейников

Характеристика работы

Актуальность проблемы Конец XX – начало XXI века отмечены новым направлением в создании лекарственных препаратов, связанным с разработкой адресных систем доставки лекарств. На протяжении последних десятилетий активно ведутся работы по созданию систем доставки препаратов, позволяющих увеличить время циркуляции лекарства в крови, защитить его от ферментных систем организма, включить молекулы, обеспечивающие целевую доставку, что потенциально приведет к созданию лекарств нового поколения. В качестве матриц для создания таких систем используют различные материалы, главным образом биополимеры небелковой природы, так как они характеризуются низкой иммуногенностью. Одним из перспективных материалов для создания систем доставки лекарств является хитозан – дезацетилированное производное природного полисахарида хитина. Хитозан совместим с тканями млекопитающих, низкотоксичен, деградируется гидролазами организма до олигосахаридов и глюкозамина. Значительным преимуществом хитозана по сравнению с прочими полисахаридами является наличие реакционноспособных (гидроксо - и аминогрупп, что позволяет получать производные с необходимыми характеристиками. В полимерную матрицу на основе хитозана и его производных могут быть включены вещества различной природы - белки, пептиды, нуклеиновые кислоты, витамины, противоопухолевые препараты и др. [De Brito., et al. (2012) Food Hydrocol., Amidi., et al. (2010) Adv. Drug Deliv. Rev., Lee., et al. (2011) Int. J. Cancer, Liang., et al. (2012) Int. J. Pharm.]. Кроме того, в зависимости от молекулярной массы и степени модификации полимера различными заместителями, могут быть получены наночастицы с различным размером и зарядом.

Несмотря на большой потенциал хитозана, как материала для биомедицинского применения, к настоящему времени на мировом фармацевтическом рынке появляются только первые зарегистрированные лекарственные препараты для наружного применения (мази, гели, ранозаживляющие пленки) [Dash et al. (2011) Progr. in Polym. Sci.]. Хитозан активно позиционируется на рынке как пищевая добавка с иммуностимулирующими свойствами. Использование хитозана и частиц на его основе для внутривенного введения находится на стадии исследований [Domb A.J. (2011) John Wiley and Sons Inc., Minami S., et al. (1996) Carbohydr. Polym.]. Для введения в клинику таких систем необходимо исследование их влияния на основные биохимические процессы в организме.

Целью данной работы является получение и характеристика систем доставки биологически активных веществ на основе наночастиц модифицированного хитозана.

Для достижения данной цели нами были определены следующие **основные задачи**:

- 1) синтезировать ацилированные производные хитозана с различными характеристиками;
- 2) получить стабильные наночастицы на основе синтезированных производных и изучить их физико-химические свойства;
- 3) исследовать сорбцию модельных белков и пептидов полученными наночастицами;
- 4) провести анализ токсичности и гемосовместимости полученных частиц;
- 5) разработать систему доставки противоопухолевого препарата доксорубицина на основе наночастиц модифицированного хитозана;
- 6) исследовать биораспределение и противоопухолевую активность доксорубицина в составе наночастиц *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна

Нами получены и исследованы стабильность и физико-химические свойства наночастиц на основе гексаноил-хитозана (ГХ) и сукциноил-хитозана (СХ). С использованием ряда белков и пептидов с разными характеристиками было обнаружено, что основными силами, участвующими в формировании комплекса с хитозаном являются электростатические взаимодействия. Впервые получена и охарактеризована система доставки доксорубицина на основе наночастиц СХ при загрузке препарата в наночастицы путем сорбции, что исключает использование токсичных сшивающих агентов. В тестах *in vitro* показано, что наночастицы хитозана не вызывают гемолиза эритроцитов, не приводят к агрегации и изменениям в морфологии тромбоцитов и лимфоцитов, что указывает на отсутствие острой токсичности носителя для клеток периферической крови. В модели рака молочных желез *in vivo* проверено, что наночастицы хитозана могут вводиться внутривенно. Многократные введения наночастиц не вызывали эмболии мелких сосудов и других побочных эффектов.

В моделях *in vivo* и *in vitro* установлено, что система доставки доксорубицина на основе наночастиц сукциноил-хитозана не меняет свойств антибиотика. Результаты экспериментов по изучению биораспределения полученной системы доставки доксорубицина демонстрируют преимущественное накопление препарата в печени и опухоли. На основании полученных данных, можно сделать вывод о перспективности использования наночастиц сукциноил- хитозана в качестве системы доставки, большая селективность действия которой может быть достигнута при присоединении к системе векторных молекул.

Практическая значимость Результаты, полученные в рамках диссертационного исследования, демонстрируют перспективность применения наночастиц на основе хитозана и его производных в качестве систем доставки биологически активных веществ. Важным является тот факт, что физико-химические свойства носителя, а также диапазон

биологически активных веществ, включенных в полимерный носитель, могут варьировать в зависимости от характеристик исходного хитозана и его производных. При сорбции активной субстанции на носитель необходимо учитывать, что основной вклад в процесс комплексообразования вносят электростатические взаимодействия. Кроме того, наличие реакционноспособной аминогруппы в полимерной цепи хитозана и его производных делает возможным ковалентное присоединение веществ различной природы. Показано, что наночастицы СХ являются стабильными в течение 6 месяцев, а также могут быть лиофилизированы для более длительного хранения. Установлено, что наночастицы на основе хитозана и его производных являются нетоксичными, инертными по отношению к клеткам периферической крови и могут безопасно вводиться внутривенно. Нами показано, что введение доксорубина в систему доставки сохраняет активность антибиотика, оказывая выраженный противоопухолевый эффект.

Получен патент Российской Федерации № 2460532 от 10.09.2012 «Препарат, ускоряющий ранозаживление» авторов Богословской О.А., Рахметовой А.А., Глуценко Н.Н., Овсянниковой М.Н., Ольховской И.П., Варламова В.П., Левова А.Н., Ильиной А.В., Зубаревой А.А.

Связь работы с научными программами Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки в рамках в рамках федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2013 годы», государственный контракт № 12.527.11.0008, а также при поддержке РФФИ (проект № 09-04-00895), ФЦП (ГК № П 730, 14.740.11.0548-0724; 16.512.11.2069; 14.132.21.1671).

Апробация работы и публикации Результаты работы были представлены автором в виде устных докладов на конференциях: X международная конференция «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (Нижний Новгород, 2010), XVI Seminar and Workshop New Aspects of the Chemistry and Applications of Chitin and its Derivatives" (Poland, Zakopane, 2010), XI международная конференция «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана» (Мурманск, 2012). Материалы были также доложены и обсуждены на конференциях: 11th International Conference on Chitin and Chitosan & The 8th Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symposium (Taipei, Taiwan, 2009), Bionano'09 Химическая биология фундаментальные проблемы бионанотехнологии (Новосибирск, Россия, 2009), IV Российский симпозиума Белки и пептиды (Казань, 2009), 14th International Congress of Immunology (Kobe, Japan, 2010), XXIII международная зимняя школа " Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, 2011), 10th International conference of the European chitin society, EUCHIS'11 (Saint-Petersburg, Russia, 2011), V всероссийский симпозиум « Белки и

пептиды» (Петрозаводск, 2011), 2-я Международная школа «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах. Безопасность и наномедицина», (Московская область, 2011), X чтение памяти академика Ю.А.Овчинникова, (Москва, 2011), Colloids and Nanomedicine 2012 (Amsterdam, Netherlands, 2012).

Работа получила премию им. П.П.Шорыгина в 2012 году за лучшие разработки в области хитинологии.

По теме диссертации опубликовано 25 научных работ, среди них 4 статьи, в журналах, рекомендованных ВАК, 1 статья в рецензируемом международном журнале польского хитинового общества, 2 статьи в сборниках Российского хитинового общества, 18 тезисов. Получен 1 патент РФ.

Личный вклад автора заключается в проведении экспериментальных и теоретических исследований. Основные результаты работы получены лично автором при его непосредственном участии в планировании и проведении экспериментов.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из следующих разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты собственных исследований», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Список цитируемой литературы». Работа изложена на ___ страницах, содержит ___ рисунков и ___ таблиц. Список литературы включает ___ ссылок на литературные источники.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Результаты исследований

1. Модификация хитозана ангидридами карбоновых кислот

С целью повышения гидрофобности хитозановой матрицы был получен ряд производных с различными ацильными заместителями (ацетил -, пропаноил -, бутаноил -, гексаноил-хитозан). Синтез осуществляли в гомогенных условиях с использованием ангидридов соответствующих карбоновых кислот, выход продукта реакции составлял 80-85 %. Такой подход способствовал стабилизации получаемых частиц, а также увеличения эффективной сорбции БАВ, имеющих гидрофобную природу.

В качестве полимеров, имеющих в своей структуре карбоксильные группы, были синтезированы сукциноильные производные с различной степенью замещения (СЗ) 6, 13 и 80%. Введение отрицательно заряженных групп в хитозановую молекулу позволило существенно увеличить растворимость хитозана при рН близком к нейтральному. Использование таких производных хитозана способствовало более эффективной сорбции БАВ, имеющих положительный заряд. Степень замещения ацильными остатками определяли с помощью ¹H - ЯМР

спектроскопии. Сигнал, соответствующий N-ацильным группам, регистрировали при 0,52-2,5 м.д.

2. Получение наночастиц на основе хитозана и его производных

На основе полученных производных были сформированы наночастицы (НЧ). В случае хитозана и его гидрофобных ацилированных производных, а также СХ со СЗ 6 и 13% использовали метод ионотропного гелеобразования, заключающийся во взаимодействии протонированной аминогруппы молекулы хитозана с полианионом триполифосфатом. Для получения НЧ из СХ (СЗ 80%) использовали метод солевого осаждения с CaCl_2 . Основными критериями, определяющими возможность использования частиц для создания систем доставки БАВ, были размер и дзета-потенциал частиц, измеренные методом динамического светорассеяния (ДСР). В **таблице 1** приведены физико-химические параметры наночастиц, полученных из гидрофобно-модифицированных производных хитозана. Данные по размеру получены в мультимодальном режиме, что позволило выявить две фракции с различными размерами частиц.

Таблица 1 – Физико-химические параметры наночастиц, полученных из ацилированных производных хитозана.

N-ацил хитозан	Степень замещения	Степень деацетилирования	Размер (ДСР)		ζ-потенциал, мВ
			нм	%	
Исходный*	0	0,85	—	—	—
Ацетил	0,37	0,48	163/1270**	6/94**	45
Пропаноил	0,14	0,71	267/1640	8/92	48
Бутаноил	0,12	0,73	1280	100	48
Гексаноил	0,1	0,75	150/830	80/20	42

* Хитозан ММ 200 кДа, СА 0,15

**Размер частиц и доля частиц с разным размером в 1 и во 2 фракциях.

В ходе эксперимента было установлено, что при использовании в качестве исходного материала для формирования частиц ацетил-, пропаноил- и бутаноил-хитозана в полученной суспензии преобладала доля частиц микронного размера, следовательно в последующих экспериментах стабильные и положительно заряженные наночастицы получали из гексаноил-хитозана (НЧГХ).

С целью оптимизации размерных характеристик НЧГХ получали частицы из хитозана с различными ММ и СЗ. Для этого использовали хитозан с ММ 10 кДа, СД 98 % и ММ 200 кДа, СД 86 %.

Из хитозана с ММ 10 кДа были получены наночастицы с размером 90 ± 40 нм, однако выход частиц составил только 5 %. Отмечалось, что коллоидная стабильность частиц зависит в большей мере от СЗ, чем от ММ. С увеличением СЗ до 20-22% возрастали размер и доля агрегатов в суспензии, что может быть связано с ухудшением растворимости полимера ввиду усиления его гидрофобных свойств. В проведенных исследованиях оптимальной для формирования частиц из ГХ являлась СЗ 10 %.

С целью получения стабильных наночастиц из сукциноил-хитозана было изучено влияние степени замещения в молекуле биополимера на физико-химические характеристики. Суспензии НЧСХ с низкой степенью замещения (6 и 13 %) преимущественно состояла из частиц микронного размера (1380 нм) с дзета-потенциалом 10 мВ. Тенденция к увеличению размера таких частиц может объясняться процессом самосборки частиц из-за недостаточного электростатического отталкивания частиц, препятствующего образованию агрегатов. Полученные частицы на основе СХ с низкой степенью замещения не использовались по причине плохой стабильности суспензии. Стабильные наночастицы получали из СХ с высоким содержанием карбоксильных групп в полимерной цепи (СЗ 80 %). Такие НЧ имели отрицательный дзета-потенциал 20 - 25 мВ и размер 200 - 250 нм.

3. Физико-химическая характеристика НЧГХ и НЧСХ

Физико-химические характеристики наночастиц (размер, дзета-потенциал) играют ключевую роль для применения в качестве наноразмерных систем доставки, поскольку именно эти характеристики определяют поведение системы *in vivo*, оказывая влияние на её биораспределение и выведение. Для характеристики наночастиц, помимо используемого выше метода ДСР, были также использованы конфокальная, атомно-силовая микроскопия и метод анализа траектории наночастиц (АТН).

При анализе диаметра НЧСХ И НЧГХ методом ДСР в мультимодальном режиме было выявлено бимодальное распределение по размеру (**рисунок 1**). Первый пик соответствовал индивидуальным частицам, второй – их агрегатам. Основную фракцию составлял пул индивидуальных частиц (**рисунок 1 А и Б**) размером 120-190 нм для ГХ и 160-250 нм для СХ. При анализе по интенсивности значительная доля сигнала распределялась на агрегаты (**рисунок 1 В и Г**). В отличие от метода ДСР, рассчитывающего коэффициент диффузии для группы частиц по автокорреляционной функции, АТН позволяет регистрировать коэффициент диффузии для каждой индивидуальной частицы, что дает более реальную картину распределения частиц по размеру в полидисперсных образцах. Согласно данным, полученным

при анализе методом АТН, суспензия НЧГХ является полидисперсной, но преимущественную долю составляют частицы, имеющие размер от 120 до 190 нм. В случае НЧСХ наблюдали узкое распределение с максимумом около 100 нм, доля объектов с размером 300 нм составляла около 5% (**рисунок 2 А, Б**).

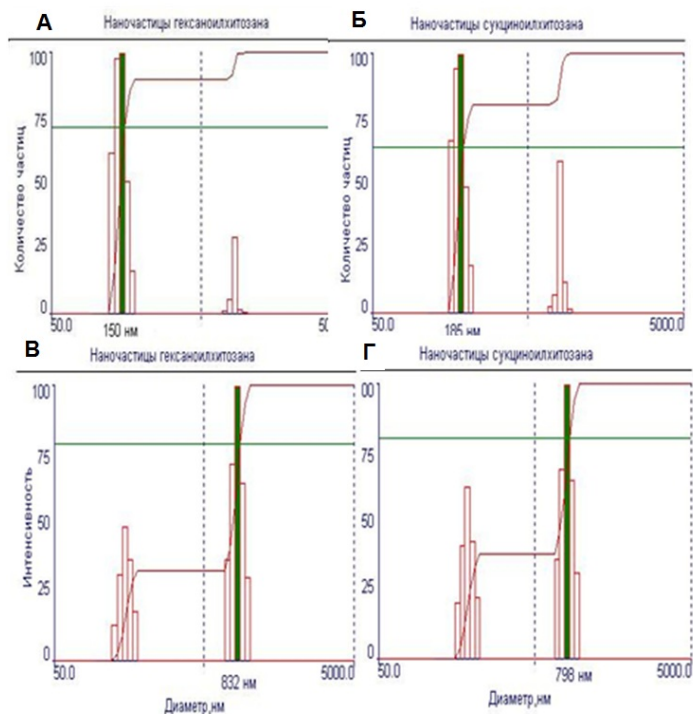


Рисунок 1 – Распределение частиц гексаноил- хитозана (А, В) и сукциноил-хитозана (Б, Г) по размеру методом динамического светорассеяния. Измерения регистрировали по числу объектов (А-В) и интенсивности (Г - Е).

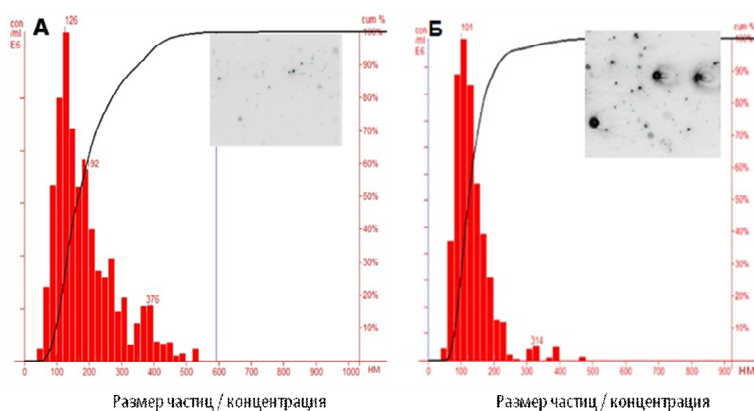


Рисунок 2 – Распределение частиц гексаноил-хитозана (А) и сукциноил-хитозана (Б) по размеру, измеренное методом АТН. В правом верхнем углу - картина рассеяния излучения на индивидуальных наночастицах (один кадр видеозаписи).

Для изучения размера и морфологии наночастиц НЧГХ и НЧСХ были также использованы методы конфокальной и атомно-силовой микроскопии. Было установлено, что в поле зрения имеются как одиночные частицы, имеющие форму, близкую к сферической (размер частиц варьировал в пределах 300-400 нм), так и их агрегаты (около 1 мкм и выше) (**рисунок 3**). Эти результаты отличаются от полученных при использовании метода ДСР в среднем на 100 нм, что, возможно, связано с дифракцией света на частицах.

Далее размер и форму частиц анализировали методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). В ходе исследования установили, что размер частиц ГХ и СХ составляет 20 - 100 нм,

при этом в смеси также имеются агрегаты частиц большего размера. Различия в размере частиц, определяемых методом АСМ, связаны, в первую очередь, с удалением растворителя в ходе подготовки пробы.

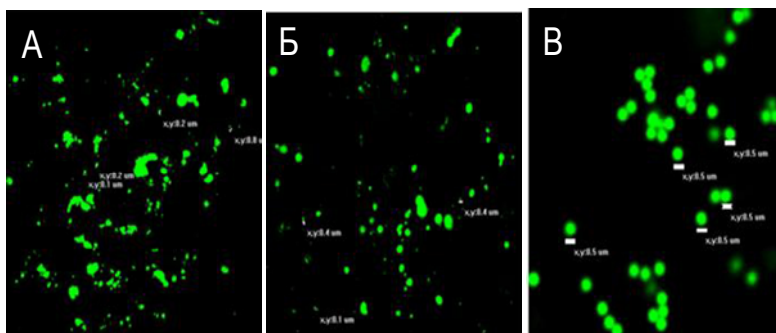


Рисунок 3 – Конфокальная микроскопия ФИТЦ - меченных наночастиц гексаноил-хитозана (А), сукциноил-хитозана (Б) и полистирола (В). Увеличение $\times 1000$. Линейными отрезками приведены размеры объектов, оцениваемые с помощью встроенной линейки на конфокальном микроскопе.

На **рисунке 4** представлены результаты сканирования образцов наночастиц ГХ и СХ, а также полистирольных частиц размера 500 нм. В случае с полистирольными частицами результаты измерений АСМ и ДСР совпадают с погрешностью до нескольких нанометров несмотря на то, что измерения этими двумя методами проводятся в совершенно разных условиях. Сопоставление результатов измерений полистирольных частиц и наноструктур на основе модифицированного хитозана методами АСМ и ДСР свидетельствует о том, что в случае механически прочных полистирольных наночастиц оба метода равноправны, однако в случае наночастиц на основе модифицированного хитозана АСМ измерения после высушивания образца не отображают реальные параметры наноструктур в жидкости.

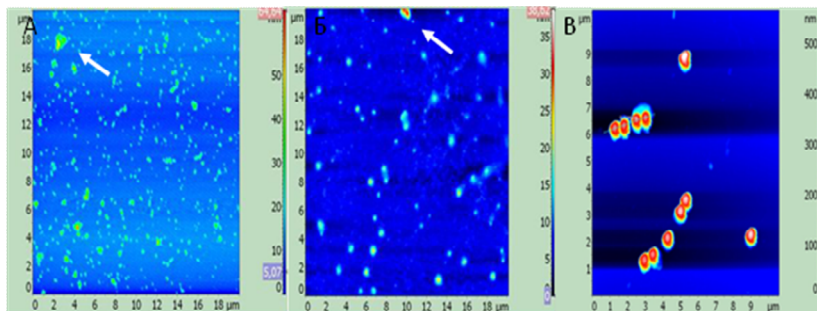


Рисунок – 4 Атомно-силовая микроскопия наночастиц гексаноил-хитозана (А), сукциноил-хитозана (Б) и полистирола (В). Стрелками обозначены образующиеся агрегаты; Размер частиц по высоте указан цветовой шкалой с правой стороны рисунков.

4. Стабильность наночастиц

Стабильность наноструктур является ключевым параметром, особенно важным при разработке наносистем доставки для клинического применения. Наличие агрегатов в системе доставки нежелательно в случае их дальнейшего использования *in vivo*. Попадание крупных частиц в капилляры может вызывать эмболию сосудов. Разрушение агрегатов обычно проводят с помощью физических методов: ультразвуковой обработки, центрифугирования, филь-

рации или с помощью введения противоионов. Ни один из методов обработки не устранял полидисперсности частиц хитозана (**таблица 2**). Вероятно, процесс образования агрегатов в суспензии наночастиц является быстрым, поскольку измерения размера частиц проводили непосредственно после обработки ультразвуком или фильтрации. При хранении суспензии НЧ в бидистиллированной воде в течение месяца не наблюдалось увеличения размера агрегатов частиц, но возрастала их доля.

Таблица 2 – Влияние ультразвука, фильтрации и лиофильного высушивания на размеры частиц ГХ и СХ

	Наночастицы ГХ		Наночастицы СХ	
	D1*, нм	D2, нм	D1, нм	D2, нм
Необработанные	152 ± 53	670 ± 55	180±39	700±80
Фильтрация, 0,22 мкм	190 ± 58	750 ± 93	190±52	670±40
Лиофилизация	175 ± 33	720 ± 45	200±55	790±80
Ультразвук, 2 мин, 37 кГц	158 ± 48	730 ± 65	220±59	650±103
Хранение в течение 1 месяца, +4°C	220 ± 53	800 ± 60	330±50	870±30

*D1 и D2 соответствует размеру 1 и 2 фракции частиц.

5. Взаимодействие НЧ с белками плазмы крови

В кровотоке наночастицы контактируют как с белками плазмы, так и с клетками крови и могут вызывать нарушения их функции. Известно, что внутривенное введение хитозана является небезопасным и может вызывать агрегацию тромбоцитов и эритроцитов [Y. Okamoto и др. (2003) Carbohydr. Polym.]. С целью изучения взаимодействия с кровью НЧГХ инкубировали с плазмой в течение 1 часа. При двукратном избытке (объемном) плазмы размер частиц увеличивался в 1,5 – 2 раза, при этом наблюдали снижение дзета - потенциала до нуля (**Таблица 3**). В других объёмных соотношениях размер частиц существенно не изменялся, в то время как значение дзета-потенциала снижалось и изменялось на противоположный знак с увеличением объема плазмы. Такие изменения физико-химических параметров наночастиц связаны, прежде всего, с сорбцией на их поверхности белков плазмы, преимущественным из которых является отрицательно заряженный альбумин.

Для измерения размера и визуализации частиц после инкубации их с плазмой крови также применяли метод конфокальной микроскопии. В экспериментах использовали НЧГХ и НЧСХ, меченные коммерческим флуоресцентными красителями, производимые фирмой (Innova Biosciences, UK). В ходе исследований обнаружили сборку частиц в крупные ассоциаты

размером до 5 мкм (**рисунок 5 А-Г**). Теоретически такие агрегаты могут быть опасными при внутривенном введении. Учитывая то, что эксперимент *in vitro* проводился в статических условиях, существует вероятность быстрого разрушения таких комплексов в условиях *in vivo* в кровяном русле. Качественный и количественный состав белков плазмы, сорбированных на наночастицы определяли, используя метод электрофореза в 12 % ПААГ (**рисунок 5 Д**).

Таблица 3 – Физико-химические характеристики частиц после инкубации с плазмой крови

Соотношение: НЧГХ: плазма (об /об)	Размер частиц		Дзета – потенциал, мВ
	D1*, нм	D2, нм	
1:0	162 ± 35	1022 ± 50	30 ± 3
1:4	145 ± 40	923 ± 45	-17 ± 2
1:2	247 ± 43	1030 ± 63	5 ± 2
1:1	125 ± 32	793 ± 53	21 ± 2
2:1	140 ± 30	840 ± 47	25 ± 5
4:1	209 ± 50	1118 ± 45	31 ± 2

*D1 и D2 - гидродинамический диаметр частиц I и II пиков, определенный методом ДСР.

Было показано, что белком, преимущественно сорбирующимся на НЧГХ и НЧСХ, является сывороточный альбумин (СА), который составляет 50-60 % от общего содержания белков в плазме крови.

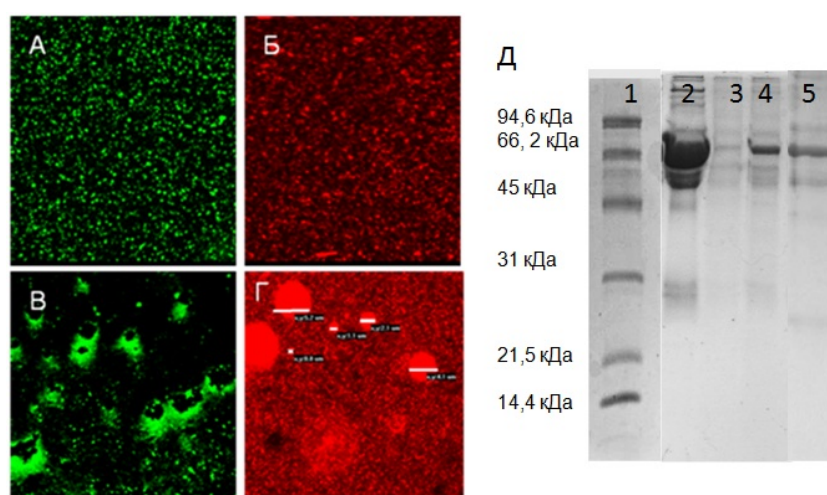


Рисунок 5 – Определение размера и морфологии частиц после инкубации с плазмой крови методом конфокальной микроскопии (А-Г) А-контроль НЧСХ ($\lambda = 488$ нм) , Б - контроль НЧГХ ($\lambda = 547$ нм), В - НЧСХ после инкубации с плазмой, Г-НЧГХ после инкубации с плазмой. Увеличение $\times 200$; Д- Электрофорез в денатурирующих условиях в 12 % ПААГ: 1- мар-

кер молекулярных масс 2-плазма, разведенная в 15 раз; 3- 0,1 М фосфатный буфер+плазма, 4- НЧСХ+плазма; 5 – НЧГХ+плазма.

6. Взаимодействие НЧ с эритроцитами и лимфоцитами периферической крови человека

Для оценки гемосовместимости наночастиц провели тест на гемолиз эритроцитов. В качестве положительного контроля использовали дистиллированную воду, в качестве отрицательного - 0,1 М фосфатный буфер с добавлением 0,9 % NaCl. Было установлено, что наночастицы как хитозана, так и его производных не вызывали гемолиза эритроцитов при соотношении суспензия эритроцитов: наночастицы 3:1 об/об.

После инкубации лимфоцитов периферической крови доноров с НЧСХ не наблюдали агрегации и изменений в морфологии клеток, что указывает на отсутствие острой токсичности носителя для клеток (**рисунок 6 Б, В**).

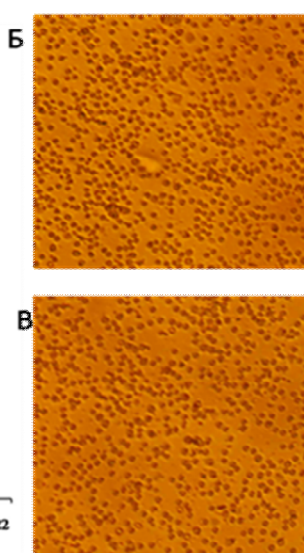
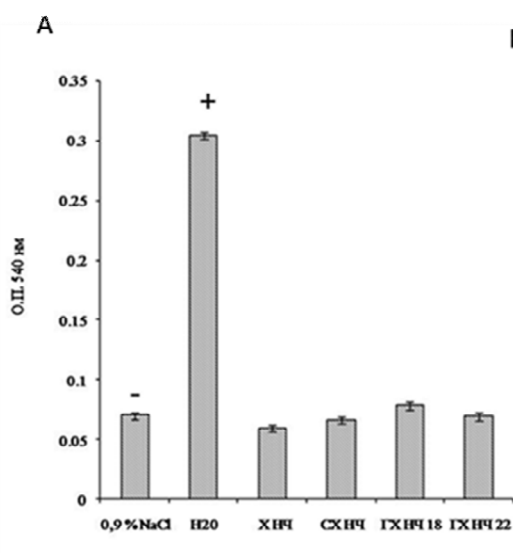


Рисунок 6 – Взаимодействие НЧ с клетками периферической крови А) гемолиз эритроцитов; Б) световая микроскопия лимфоцитов (контроль), увеличение x200; В) световая микроскопия лимфоцитов после обработки НЧСХ, увеличение x200

7. Сорбция модельных белков на НЧГХ и НЧСХ

Исследование взаимодействия белков с полимерными материалами, в том числе и наночастицами, является важной задачей. На основе полимерных материалов с сорбированным белком могут быть получены разнообразные системы доставки терапевтически значимых препаратов. Например, пленки с сорбированными ферментами как ранозаживляющие средства, а также вакцины на основе нано - и микрочастиц и др. Для понимания того, какие силы взаимодействия являются основными при сорбции различных белков на НЧГХ и НЧСХ, использовали ряд белков с различным зарядом (**таблица 4**). Расчет заряда проводили, основываясь на определении количества положительно и отрицательно заряженных аминокислот в аминокислотной последовательности белков.

Таблица 4. – Физико-химические характеристики используемых белков

Белок	pI	Суммарный заряд*	ζ потенциал, мВ	ММ, кДа
Бычий альбумин (БСА)	4,8-5,8	-14	-28	66
Asp f 2	-	-16	-28	37
Инсулин	5,4	-4	-9	5
Миоглобин кита	7,7-8,5	+2	+5	17
Лизоцим	>11	+14	+12	14

*Суммарный заряд подсчитывали по сумме отрицательно и положительно заряженных аминокислот в последовательностях белков.

Сорбцию белков на НЧГХ и НЧСХ проводили в бидистиллированной воде при рН 5,5-6, при этом соотношения белок: НЧ варьировали от 1:2 до 3:1. В результате проведенного эксперимента показали, что оптимальным является соотношение 1:2. Полученные композиты отделяли центрифугированием и измеряли остаточное количество белка в супернатантах методом Брэдфорд. Из полученных результатов (**таблица 5**) следовало, что для большинства белков свойственна зависимость сорбции от величины зарядов белков и НЧ. Исключение составляет БСА, одинаково хорошо сорбирующийся на НЧГХ и НЧСХ, что, вероятно, связано со сложной пространственной структурой и наличием гидрофобных доменов, отвечающих за взаимодействие.

Таблица 5 – Эффективность сорбции белков (%) и дзета- потенциал НЧСХ и НЧГХ с сорбированным белком

Белок (ζ, мВ)	ζ, mV после сорбции		Эффективность сорбции, %	
	НЧГХ	НЧСХ	НЧГХ	НЧСХ
контроль	+27 ± 5	-27 ± 5	0	0
БСА (-28)	+14 ± 2	-23 ± 5	46 ± 5	47 ± 8
Asp f 2 (-28)	+15 ± 2	-21 ± 2	23 ± 3	0 ± 3
Инсулин (-9)	+9 ± 3	-21 ± 3	42 ± 7	0 ± 3
Миоглобин кита (+5)	+26 ± 5	-16 ± 3	10 ± 2	36 ± 5
Лизоцим (+12)	+26 ± 5	0 ± 2	6 ± 3	43 ± 2

Сорбцию белков наночастицами хитозана визуализировали методом электрофореза в 10 % ПААГ (**рисунок 7**). Показали, что в исследуемых условиях НЧГХ способны более эф-

эффективно сорбировать БСА и Af2, а НЧСХ - лизоцим и инсулин (**рисунок 7**), что коррелирует с результатами, полученными по определению белка в супернатантах методом Брэдфорд. Аналогичную зависимость обнаружили при исследовании сорбции из смеси белков, что является важным при изучении взаимодействия с биологическими жидкостями, являющимися многокомпонентными системами (**рисунок 7**, дорожки 9,10).

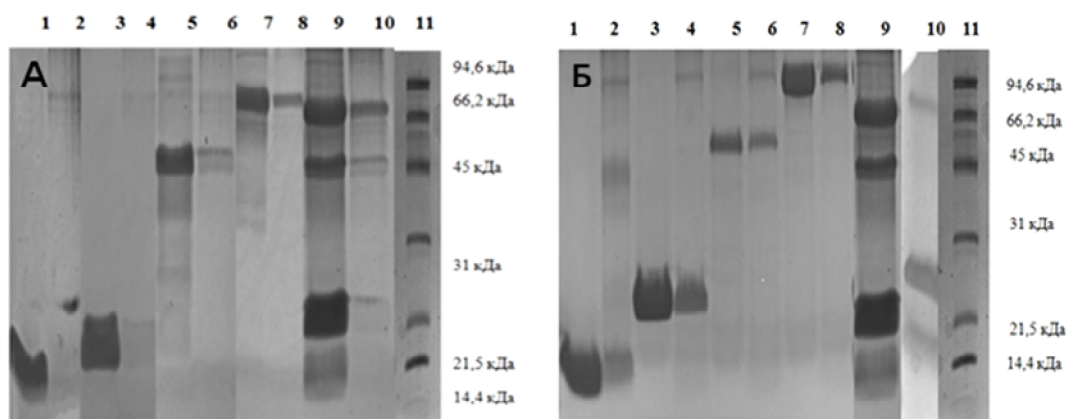


Рисунок 7 – А) Электрофореграмма белков, сорбированных на НЧГХ (А) и НЧСХ (Б) : 1-инсулин, 2-инсулин+НЧ, 3 –лизоцим ,4 – лизоцим+НЧ , 5-Af2, 6- Af2+НЧ,7- БСА, 8- БСА+НЧ, 9- смесь белков (БСА, Af2, лизоцим, инсулин),10- смесь белков + НЧ, 11-маркеры.

8. Сорбция модельных пептидов на НЧГХ и НЧСХ

Эффективную сорбцию пептидов определяли методом ВЭЖХ. Результаты экспериментов по сорбции пептидов с различным зарядом на НЧГХ и НЧСХ приведены в **таблице 6**. И в этом случае ионные взаимодействия определяют эффективность сорбции пептидов на наночастицах хитозана. Подтверждением этого является также отсутствие сорбции пептидов Р 4-6 на заряженные наночастицы.

Следует отметить, что эффективность сорбции пептидов наночастицами не превышает 7%, что является недостаточным при разработке пептидных вакцин и других препаратов, содержащих иммобилизованные на носителе пептиды. Увеличить количество пептида можно только за счет ковалентного присоединения.

Таблица 6 – Эффективность сорбции пептидов НЧСХ и НЧГХ

Пептид	Последовательности пептидов	Заряд	Сорбция, %	
			НЧГХ	НЧСХ
P1	GWVDHFADGYDEVIA	-4	3,8	0
P2	MELPSFGVSGVNESADM	-3	3,7	0
P3	DQGHDTGSASAPAST	-2	1,4	0
P4	VGIDQPPFGIFV	-1	0,8	0
P5	PSNCHTHEGGQLHCT	-1	0	0
P6	<u>C</u> REGEDNS <u>KRN</u>	0	0	0
P7	<u>R</u> MQFSSLTVN <u>V</u> RGSG <u>M</u> R	+3	0	3,8
P8	<u>K</u> HGTFGPVHFRNQV <u>KIR</u>	+3	0	7,0

D – отрицательно заряженные аминокислоты, **R** –положительно заряженные аминокислоты

9. Формирование комплексов НЧСХ и НЧГХ с доксорубицином

Доксорубицин (ДОКС) - антибиотик антрациклинового ряда, широко используемый в противоопухолевой химиотерапии. Несмотря на его терапевтическую активность, препарат имеет существенные недостатки. Ввиду короткого времени циркуляции в плазме в активной форме требуется увеличение терапевтической дозы препарата, что в свою очередь приводит к кардио- и нефротоксичности. Одним из путей решения этой проблемы может быть доставка доксорубицина на полимерных наночастицах.

Для формирования комплексов НЧСХ и НЧГХ с доксорубицином (ДОКС) нами использовался простой, доступный и осуществляемый в мягких условиях метод сорбции. Для этого реализовали два подхода: 1) сорбция ДОКС на сформированные ранее частицы и 2) сорбция ДОКС в процессе формирования частиц. Эффективность загрузки относительно исходного количества ДОКС оценивали спектрофотометрически по количеству препарата, оставшегося в супернатанте после отделения наночастиц центрифугированием. Первоначально в работе использовали положительно заряженные НЧГХ, с различной степенью замещения ($SZ = 5, 10$ и 22%), полагая, что наночастицы могут сорбировать ДОКС и за счет гидрофобных взаимодействий. Эффективность загрузки ДОКС в такие частицы незначительно увеличивалась с ростом степени замещения, но не превышала 10% . Поэтому в последующих экспериментах для сорбции ДОКС использовали сукциноилхитозан со $SZ = 6, 13$ и 80% , содержащий в полимерной цепи отрицательно заряженные

карбоксильные группы. Получение НЧСХ с низкой степенью замещения осуществляли методом ионотропного гелеобразования. Суспензия наночастиц преимущественно состояла из частиц размером свыше 1 микрометра, поэтому полученные частицы на основе СХ с низкой степенью замещения 6 и 13 % в последующих экспериментах по сорбции ДОКС не использовали. Для получения системы доставки использовали СХ (СЗ 80%). Для получения частиц, нагруженных ДОКС, в начальных экспериментах сорбцию препарата осуществляли в процессе формирования наночастиц, в таких условиях эксперимента сорбция ДОКС отсутствовала, что, вероятно, связано с конкуренцией ДОКС с ионами Ca^{2+} . Поэтому последующие эксперименты по сорбции ДОКС осуществляли в два этапа. На первом этапе формировали наночастицы и далее осуществляли сорбцию ДОКС, варьируя концентрацию частиц от 50 до 500 мкг/мл и ДОКС от 10 до 80 мкг/мл. Оптимальный результат по эффективной сорбции препарата составлял 50-60% и имел место при использовании концентрации 30-40 мкг/мл по ДОКС и 200 мкг/мл по наночастицам. Ресуспендирование нагруженных частиц в 0,9% растворе NaCl и последующее термостатирование при 22°C и 37°C приводило к частичной десорбции ДОКС, выход снижался до 30-40% и 20-25% соответственно. В процессе сорбции ДОКС при физиологическом значении pH теряется более 20% его активности. Одним из способов сохранения активности может быть введение ДОКС в комплексе с альбумином [J.Qi., et al. (2010) Int.J.Pharm.]. Для получения комплекса с альбумином был использован БСА. В этих условиях эффективная сорбция ДОКС составляла 60%, ёмкость — 100 мкг доксорубицина на 1 мг наночастиц. Частицы, нагруженные ДОКС, по результатам ДСР имели размер 200-250 нм (**рисунок 8**), дзета-потенциал -20-22 мВ.

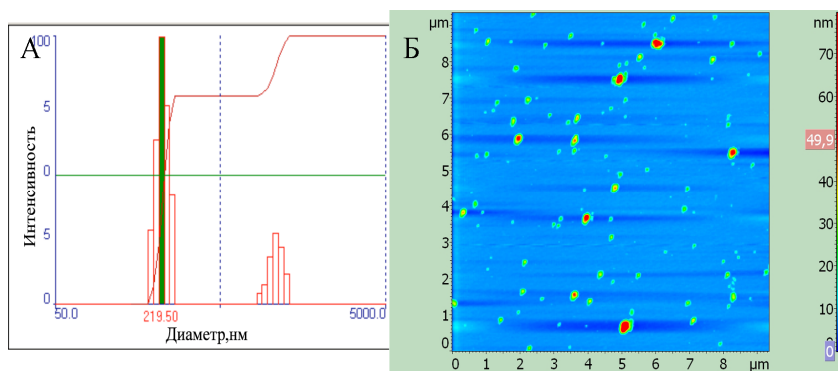


Рисунок 8 – Размер частиц сукциноил-хитозана, нагруженных доксорубицином, измеренный методами: А - динамического светорассеяния, Б - атомно-силовой микроскопии.

Измерение размера наночастиц методом АСМ показало, что исходные частицы СХ имеют размер 40-50 нм; после введения ДОКС в наночастицы, их размер увеличивался до 70-80 нм.

10. Цитотоксическая активность ДОКС в составе НЧСХ

Для определения функциональных свойств доксорубина, включенного в состав наночастиц из СХ, использовали стандартный тест для анализа цитотоксичности с помощью соли тетразолия (МТТ – тест). В качестве клеток-мишеней использовали четыре типа клеток: эпителий почки человека НЕК293, эпителий рака молочной железы ВТ-474, клетки эритромиелолейкоза человека К562 и промоноцитарную линию ТНР-1. Наночастицы вносили в концентрации, эквивалентной ДОКС, что определяли с помощью спектрофотометрии. Инкубация клеток в течение 72 ч показала, что активность ДОКС в составе наночастиц была сравнима с активностью растворенного в воде доксорубина (**рисунок 9**). В качестве контроля использовали наночастицы без ДОКС. На рисунке 9 приведены репрезентативные данные для линии НЕК293. Аналогичные данные получены и для других линий клеток.

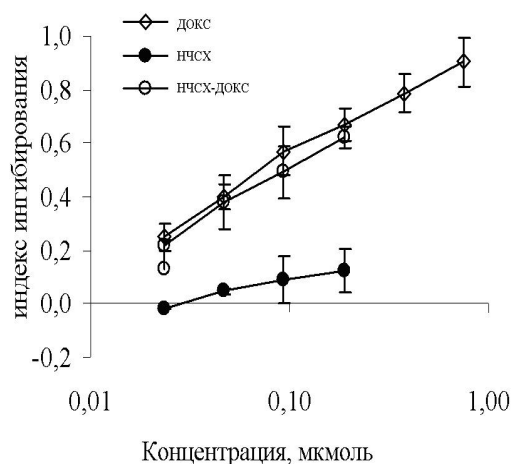


Рисунок 9 – Определение функциональной активности ДОКС и ДОКС, включенного в наночастицы СХ. Клетки НЕК293 инкубировали 72 часа с ДОКС, контрольными частицами НЧСХ и частицами, нагруженными ДОКС (НЧСХ-ДОКС). Токсичность оценивали МТТ методом. По оси абсцисс отложена концентрация образца. Данные выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

11. Эффективность связывания НЧСХ-ДОКС с клетками различных опухолевых линий

Одним из важных аспектов противоопухолевой активности *in vitro* является эффективность связывания и эндоцитоза препаратов опухолевыми клетками. Для количественной оценки этих параметров использовали метод проточной цитометрии, измеряя флуоресценцию клеток после инкубации с ДОКС или НЧСХ-ДОКС. Результаты, полученные в эксперименте, демонстрируют, что проникновение ДОКС в клетки линии К-562 незначительно снижается с включением препарата в НЧСХ (**Рисунок 10, А**), что, вероятно, является следствием более медленного высвобождения ДОКС из носителя по сравнению со свободным лекарством. Накопление ДОКС в клетках зависело от времени. Через 30 мин инкубации регистрировали значительный уровень включения ДОКС в клетки; включение увеличивалось через 20 часов инкубации (**рисунок 10, Б**). Аналогичные данные были получены и для клеточной линии ТНР-1 (данные не приводятся).

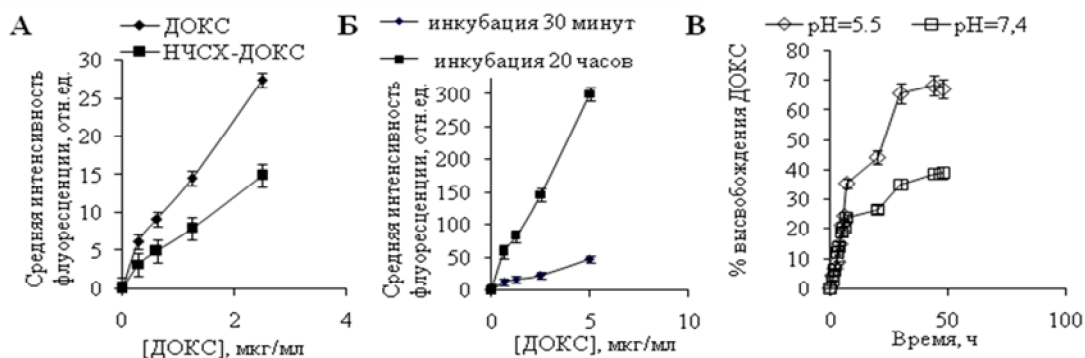


Рисунок 10 – А. Связывание ДОКС и НЧСХ-ДОКС с клетками линии К-562 в течение 1 ч при 37°C. Б. Зависимость связывания НЧСХ-ДОКС с клетками К-562 от времени. В. Высвобождение ДОКС из НЧСХ-ДОКС в буферах с разным рН.

12. Кинетика высвобождения ДОКС в условиях *in vitro*

Кинетику высвобождения ДОКС из НЧСХ изучали методом диализа в фосфатном (рН 7.4) и ацетатном (рН 5.5) буферных растворах (**рисунок 10 В**). Высвобождение ДОКС зависело от рН среды. Так, при рН 5,5 высвобождение происходило значительно быстрее (за 48 часов около 70% лекарства), чем при рН 7,4 (35%). Такое рН-зависимое свойство частиц, нагруженных ДОКС, может быть полезным, поскольку рН опухолевой ткани обычно значительно ниже, чем рН нормальных органов [T.Li., et al (2011) Colloids. and Surf. В]. Кинетические кривые высвобождения лекарства характеризуются быстрым начальным высвобождением в течение первых 8 часов, а далее приобретают линейный характер (**рисунок 10 В**). Подобная динамика, вероятно, связана с разной подвижностью молекул ДОКС, сорбированных на поверхности, а так же внутри полимерной матрицы.

13. Прохождение наночастиц сукциноил-хитозана с доксорубицином в клетки и внутриклеточный трафик

Для визуализации трафика ДОКС в клетках использовали метод конфокальной микроскопии. Частицы, нагруженные ДОКС, инкубировали в течение различных интервалов времени с клетками различных типов. На рисунке 11 приведены результаты эксперимента, в котором инкубировали препараты с клетками К-562 в течение 2 ч. За это время ДОКС (контроль) проходил в ядра клеток (**рисунок 11 А**). Доксорубицин содержит флуоресцентную группу, что позволяет легко проводить контроль его распространения в клетках. Поскольку механизм цитотоксического действия ДОКС заключается в интеркаляции между цепями ДНК, попадание антибиотика в ядро опухолевой клетки является необходимым для подавления ее жизнедеятельности. Частицы СХ не снижали способности ДОКС проникать в клетки (**рисунок 11 Б**). При добавлении к клеткам раствора ДОКС и суспензии НЧСХ-ДОКС в

равной концентрации по антибиотику, препарат с одинаковой скоростью проходил в ядро, интенсивность свечения (оценивали с помощью программы Image J) была сравнимой. Анализ в монослое клеток не может полностью имитировать опухоли *in vivo*, поэтому актуальной задачей является тестирование противоопухолевой активности в трехмерных системах, наиболее приближенных к реальности. Для этой цели использовали мультিকлеточные опухолевые сфероиды, полученные из клеточной линии A431 (**рисунок 11 Г, Д**). Данные, полученные в ходе эксперимента, показывают, что за 2 часа инкубации свободный ДОКС проникает в клетки аналогично монослойной культуре, в то время как НЧСХ - ДОКС преимущественно локализуется в ядрах клеток поверхностного слоя сфероида, а также в цитоплазме клеток. Более медленный трафик НЧСХ-ДОКС по сравнению с контролем связан с более медленным высвобождением антибиотика из полимерной матрицы по сравнению с низкомолекулярным ДОКС, что коррелирует с данными, полученными методом проточной цитометрии.

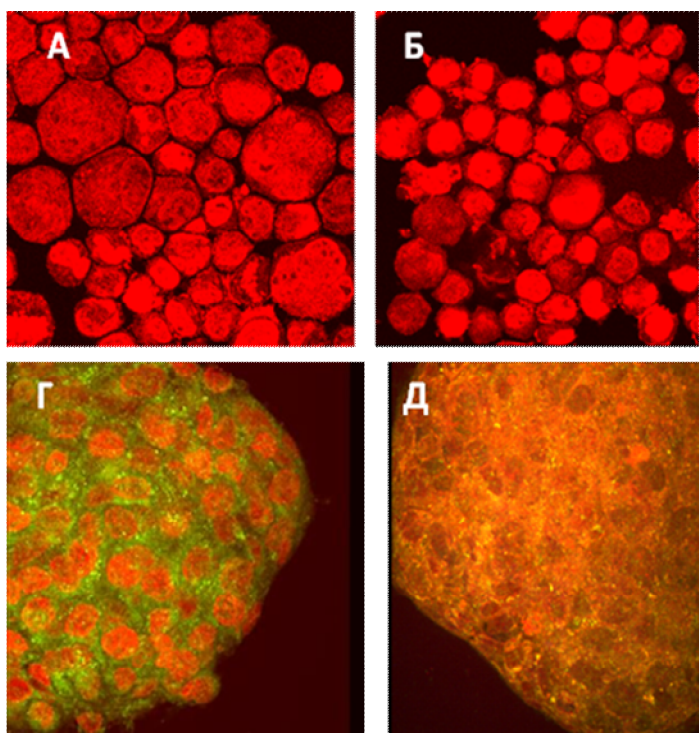


Рисунок 11 – Прохождение ДОКС (А,Г) и НЧСХ-ДОКС (Б,Д) в ядра клеток монослоя клеток линии K562 (А,Б) и 3D культуру клеток линии А-431 (Г, Д) Конфокальное изображение. Увеличение x1000 (А-Б), x600 (В-Г). Цитоплазма мультиклеточных сфероидов (Г,Д) окрашена N-акридиновым оранжевым.

14. Противоопухолевый эффект и биораспределение ДОКС и НЧСХ-ДОКС *in vivo*

Результирующая серия экспериментов была посвящена изучению противоопухолевой активности и биораспределения НЧСХ-ДОКС *in vivo*. Введение 200 мкл частиц ([НЧСХ] 400 мкг/мл, [ДОКС] =8 мкг/мышь/инъекцию) не вызывало эмболии сосудов и гибели мышей, что показывает возможность использования наночастиц хитозана для внутривенного введения.

Было установлено, что как ДОКС, так НЧСХ-ДОКС способствуют замедлению роста опухоли молочной железы, вызванной гиперэкспрессией гена Wnt-1 (**рисунок 12 А**). Достоверного различия по противоопухолевому эффекту между препаратами не было обнаружено. Накопление препарата в опухолевой ткани также анализировали методом конфокальной микроскопии на криосрезях (**рисунок 12 А, Б**). Выявили аналогичную картину распределения ДОКС и НЧСХ-ДОКС, что коррелирует с данными эксперимента *in vivo*.

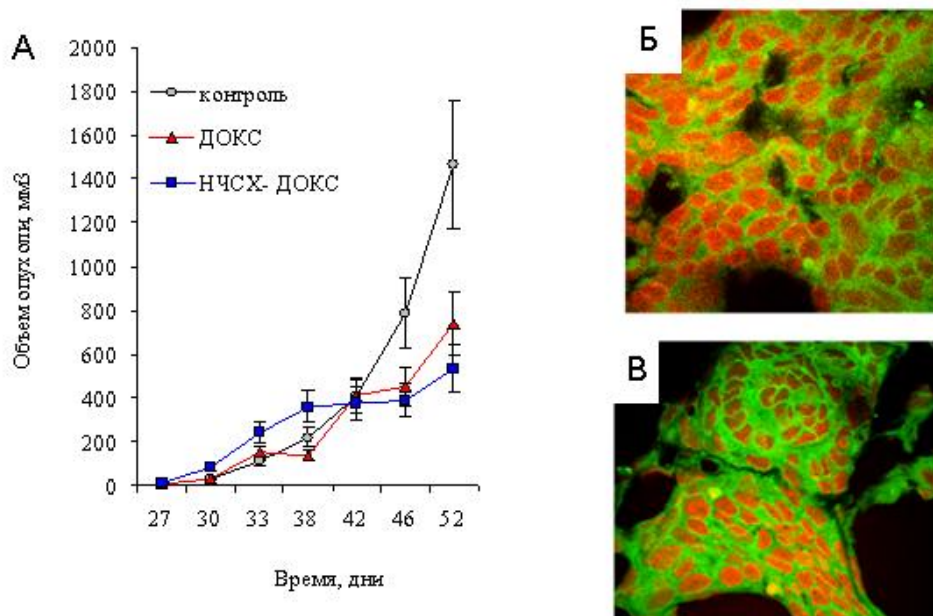


Рисунок 12 – Противоопухолевый эффект, оцениваемый по измерению объема опухоли (А); криосрезы опухолевой ткани при внутривенном введении ДОКС (Б) и НЧСХ-ДОКС (В). Цитоплазма окрашена N-акридиновым оранжевым (увеличение x 3000).

Из литературных данных известно, что противоопухолевые препараты, включенные в полимерные наночастицы, способны избирательно накапливаться в опухоли за счет эффекта повышенной проницаемости сосудов (EPR-эффект) [Torchilin (2011) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, Duncan (1999) *PSTT*]. Существенную роль на биораспределение наночастиц предположительно оказывают размер и заряд частиц. В нашей работе биораспределение анализировали на заключительном этапе эксперимента после последнего введения препаратов. Качественный анализ биораспределения проводили с использованием флуоресцентной аналитической системы iBox (UVP, США). Результаты эксперимента представлены на **рисунке 13 А-В, Г**. Согласно полученным данным, основными очагами накопления ДОКС и НЧСХ-ДОКС являются печень и опухоль. Положительным моментом явилось статистически достоверное увеличение количества цитостатика в опухоли в случае использования наночастиц (**Рисунок 13, Г**).

Для количественного анализа ДОКС экстрагировали из органов кислым этанолом и определяли его содержание в экстрактах методом флуоресцентной спектрофотометрии (**Рисунок 13 Д**). Такой подход выявил распределение препарата в печени, почках, легких, селезенке и опухоли. Несмотря на значительное накопление ДОКС и НЧСХ-ДОКС в печени, значительное количество препарата достигает опухоли, что позволяет говорить о перспективности использования наночастиц сукциноил-хитозана в качестве системы доставки, большая селективность действия которой может быть достигнута при присоединении к системе целевых лигандов.

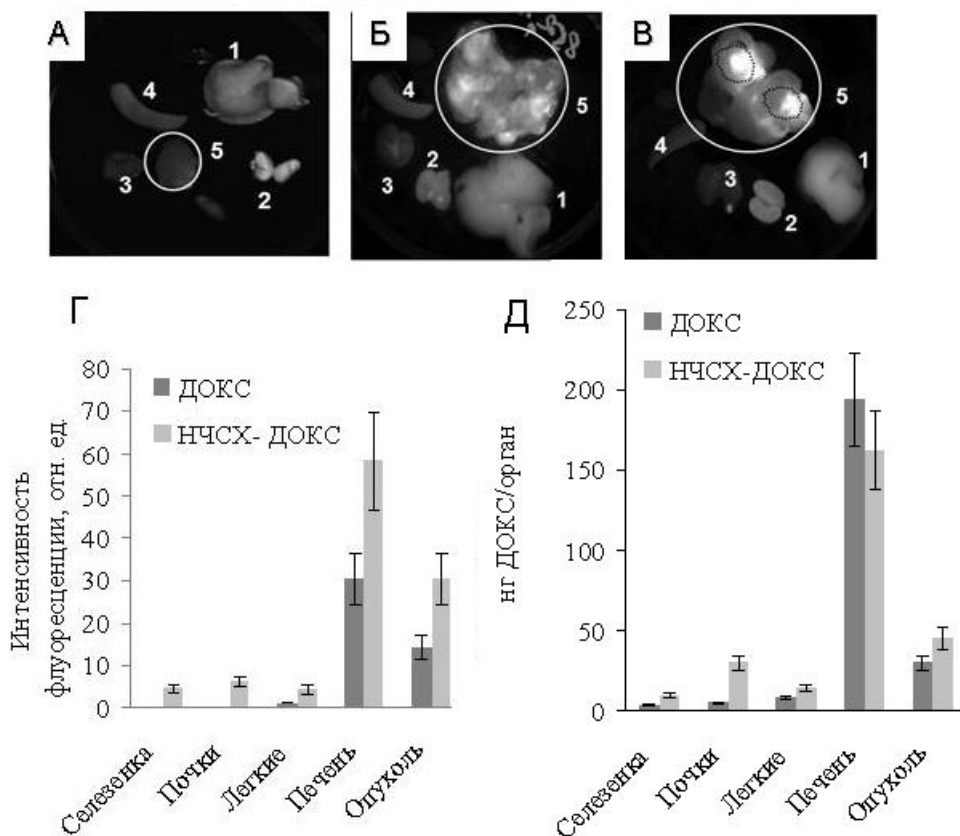


Рисунок 13 – Биораспределение препаратов после внутривенного введения мышам с переви-
тыми опухолями молочных желез. Визуальные изображения органов контрольной мыши с
опухолью (А), мыши, получившей инъекции ДОКС (Б), мыши, получившей инъекции
НЧСХ-ДОКС (В). Цифрами обозначены органы: 1-печень; 2-почки, 3- легкое; 4- селезенка;
5- опухоль. Анализ содержания препаратов в органах, согласно данным полученным с по-
мощью пакета программ Image J (Г) и после анализа флуоресценции в экстрактах органов
(Д).

Выводы

1. Синтезирован и охарактеризован ряд N – ацилированных производных хитозана с различными физико-химическими характеристиками (молекулярной массой, степенью замещения, степенью дезацетилирования).
2. Оптимизированы условия получения стабильных наночастиц на основе синтезированных производных хитозана, имеющих размер от 100 до 400 нм и дзета - потенциал от –25 до +40 мВ.
3. Исследован процесс сорбции белков и пептидов на сформированных наночастицах. Показано, что основной вклад в процесс сорбции вносят электростатические взаимодействия.
4. Изучена токсичность и гемосовместимость полученных частиц *in vitro*. Установлено, что наночастицы на основе хитозана и его производных являются нетоксичными и не вызывают гемолиза эритроцитов и агрегации клеток периферической крови.
5. Впервые получены и охарактеризованы системы доставки доксорубина путем сорбции на наночастицах гексаноил- хитозана и сукциноил-хитозана). Показано *in vitro*, что доксорубин сохраняет токсичность и специфическое накопление в ядрах опухолевых клеток при введении в составе наночастиц хитозана.
6. В ходе исследования *in vivo* получены новые данные, показывающие возможность внутривенного введения наночастиц гексаноил-хитозана и наночастиц сукциноил- хитозана. На модели рака молочных желез Wnt-1 мышей изучены биораспределение и противоопухолевая активность доксорубина, в составе системы доставки на основе наночастиц сукциноил - хитозана. Обнаружено более эффективное накопление наночастиц, нагруженных доксорубином, в опухолевой ткани по сравнению с контролем антибиотика.

Автор выражает искреннюю благодарность научным руководителям к.б.н. Свирцевской Е.В., к.х.н. Ильиной А.В. за ценные советы и помощь в проведении и планировании экспериментов, директору Центра «Биоинженерия» РАН академику Скрыбину К. Г. и д.х.н., профессору Варламову В.П. за предоставленную возможность сделать свои первые шаги в науке, к.х.н. Лопатину С.А, к.х.н. Левову А.Н., к.х.н. Курек Д.В., аспирантам Щербининой Т.С., Прохорову А.В., Зубкову Д.А. за поддержку и оказанное внимание, к.х.н. Сизовой С.В, к.б.н. Никитину Н. А. и аспиранту Трифоновой Е.А. за помощь и предоставленную возможность анализировать размер частиц методами динамического светорассеяния и анализа траектории наночастиц.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. **Zubareva A.A.**, Ilyina A.V., Levov A. N., Zueva V. S., Svirshchevskaya E.V., Varlamov V. P. Protein delivery by nanoparticles formed by chitosan -N-acyl derivatives // Progress in the Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives. 2011. V.XVI.P.61-70.
2. Свирщевская Е.В., **Зубарева А.А.**, Гриневич Р.С., Решетов П.Д., Прохоров А.В., Варламов В.П., Зубов В.П. Характеристика систем доставки вакцин и лекарств на основе наночастиц N - гексаноил-хитозана // Современные вопросы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии.2011 .Т.19.№6. с.21 – 28.
3. Ильина А.В., **Зубарева А.А.**, Курек Д.В., Левов А.Н., Варламов В.П. Наночастицы на основе сукцинилизированного хитозана с доксорубицином: формирование и свойства // Российские нанотехнологии. 2012 .Т.7.№ 1-2 .с.46-51.
4. Свирщевская Е.В., Гриневич Р.С., Решетов П.Д., Зубов В.П., **Зубарева А.А.**, Ильина А.В., Варламов В.П.Наночастицы лекарств на основе хитозана // Биотехносфера. 2012. Т.19. №1.С.13-20.
5. **Зубарева А.А.**, Курек Д.В., Сизова С.В., Свирщевская Е.В., Варламов В.П. Определение физико-химических параметров наночастиц модифицированного хитозана // Российские нанотехнологии. 2012 .Т.7.№ 7-8 .с.102-106.

Патент

6. Патент РФ на изобретение № 2460532 от 23 апреля 2012 года «Препарат ускоряющий ранозаживление» авторов Богословской О.А., Рахметовой А.А., Глущенко Н.Н., Овсянниковой М.Н., Ольховской И.П., Варламова В.П., Левова А.Н., Ильиной А.В., **Зубаревой А.А.**

Тезисы

7. Ilyina A.V., Levov A.N., **Zubareva A.A.**, Svirshchevskaya E.V., Zueva V.S., Tikhonov V.E., Varlamov V.P Protein delivery by nanoparticles formed by chitosan-N-acyl derivatives//Materials of the 11th International Conference on Chitin and Chitosan & The 8th Asia-Pacific Chitin and Chitosan Symposium.Taipei.Taiwan.2009. С.71.
8. Свирщевская Е.В., **Зубарева А.А.**, Ильина А.В. Алексеева Л.Г.Решетов П.Д., Зуева В.С.,Варламов В.П. Доставка белков в клетки наночастицами хитозана//Материалы конференции BioNano'09 Химическая биология фундаментальные проблемы бионанотехнологии. Новосибирск.2009.С.123.
9. **A.A. Zubareva**, A.V. Ilyina, E.V. Svirshchevskaya, L.G. Alekseeva, A.V. Prokhorov, V.P. Varlamov Chitosan nanoparticles form complexes with proteins //European Journal of Immunology. Supplement. 2009.Vol. 39.V. S1. PD 04/11.
10. **Зубарева А.А.**, Ильина А.В., Свирщевская Е.В. ,Алексеева Л.Г., Прохоров А.В.,Варламов В.П.Формирование комплексов белков с наночастицами модифицированного хитозана //Материалы IV Российского симпозиума Белки и пептиды. Казань,23-27 июня 2009 .С.150
11. Zueva V.S., **Zubareva A.**, Zubkov D., Par'igina N., Il'ina A.V., Svirshchevskaya E.V. Chitosan nanoparticles form complexes with proteins via electrostatic interaction. Abstracts of 14th International Congress of Immunology. Kobe. Japan. August 22-27, 2010.
12. **Зубарева А.А.**, Зуева В.С., Парыгина Н.А., Зубков Д.А., Ильина А.В. Свирщевская Е.В. Наночастицы хитозана как перспективный вектор для доставки белков в клетки эпителиальной природы//Материалы Десятой международной конференции Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана РосХит 2010.Нижний Новгород.29 июня-2 июля 2010 года. С.191-195.
13. **Zubareva A.A.** Preparation of N- Hexanoil Chitosan Nanoparticles and Their Interaction With Protein.// Materials of XVI Seminar and Workshop New Aspects of the Chemistry and Applications of Chitin and its Derivatives. Poland. Zakopane. 22-24 September 2010 .P.1-4.
14. **Zubareva A.A.**, Zueva V.S., Parygina N.A., Il'ina A.V., Svirshchevskaya E.V., Varlamov V.P. FITC labeling of proteins increase binding capacity of chitosan nanoparticles. Abstracts of ESF-UB

- Conference: Nanomedicine: Reality Now and Soon. Sant Feliu de Guixols. Spain. 23-28 October 2010.
15. **Зубарева А.А.**, Ильина А.В., Овчинникова Е.В., Свирщевская Е.В., Варламов В.П. Формирование наночастиц хитозана с доксорубицином // Тезисы XXIII международной зимней школы "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии". Москва 7-10 февраля 2011 года. С.146.
 16. Svirshchevskaya E., Alekseeva L., Prokhorov A., Dementieva D., **Zubareva A.**, Brovman G., V.Zubov. Synthetic Peptide Vaccines Combining B-cell Epitopes from the Target Antigen and Universal Human T-cell Epitopes from Enzluenza Virus: Application for Allergy and Autoimmunity// Abstracts of 3 rd Annual World Vaccine Congress (WCV-2011) in Beijing. China .March 23-25. 2011. P.210.
 17. **Zubareva A.A.**, Il'ina A.V., Svirshchevskaya E.V., Varlamov V.P. N-Hexanoyl-chitosan nanoparticles: size analysis // Materials of 10 th International conference of the European chitin society.EUCHIS'11. Saint-Petersburg .Russia. May 20-24.2011. P.169.
 18. Svirshchevskaya E.V., **Zubareva A.A.**, Il'ina A.V., Varlamov V.P. Structure and functions of nanogels based on differently charged chitosan derivatives// Materials of 10 th International conference of the European chitin society.EUCHIS'11. Saint-Petersburg .Russia. May 20-24.2011. P.37.
 19. Прохоров А.В. **Зубарева А.А.**, Свирщевская Е.В. Индукция гуморального ответа к аутоантигену с помощью В-эпитопа аутоантигена и Т-эпитопа чужеродного антигена //Материалы XIV всероссийского научного форума «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге». Санкт-Петербург.23-26 мая 2011.С.331.
 20. **Зубарева А.А.**, Свирщевская Е.В., Парыгина Н.А., Варламов В.П. Исследование взаимодействия наночастиц на основе модифицированного хитозана с белком Asp f2 и его пептидами// Материалы пятого всероссийского симпозиума «Белки и пептиды». Петрозаводск.8-12 августа 2011 года. С. 303.
 21. **Зубарева А.А.**, Овчинникова Е.В., Ильина А.В., Генералов А.А., Зайцев С.Ю., Свирщевская Е.В., Варламов В.П. Разработка систем доставки доксорубицина на основе модифицированных хитозанов // Материалы 2-ой Международной школы «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах. Безопасность и наномедицина». Пансионат «Заря». Московская область. 19-24 сентября, 2011 г., С. 76.
 22. **Зубарева А.А.**, Ильина А.В., Решетов П.Д., Гриневич Р.С., Таций О.А. ,Меерович. И.Г., Свирщевская Е.В. Анализ биораспределения систем доставки доксорубицина на основе модифицированного хитозана // X чтения памяти академика Юрия Анатольевича Овчинникова.14-17 ноября 2011 года. С. 67
 23. **Зубарева А.А.**, А.В. Ильина, Свирщевская Е.В., Варламов В.П. Исследование высвобождения доксорубицина из наночастиц сукциноил-хитозана // Материалы Международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии». Москва. 20 - 22 марта 2012 г.С. 266 – 267.
 24. Varlamov V.P., Il'ina A.V, Lopatin S.A., Levov A.N., Kurek D.V., **Zubareva A.A.** Chitin and chitosan new prospects and old problems // Bionanotox 2012 "Biomaterials and bionanomaterials : recent problems and safety issues». Heraclion. Crete. Greece 6-13 may. 2012. P.24.
 25. **Зубарева А.А.**, Свирщевская Е.В., Меерович И.Г., Ильина А.В., Прохоров А.В., Варламов В. П. Исследование функциональной активности и биораспределения системы доставки доксорубицина на основе наночастиц сукциноил - хитозана // Материалы XI международной конференции "Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана», Мурманск 25-30 июня 2012,С. 332- 339.
 26. **Zubareva A.**, Grinevich R., Il'ina A.V, Svirshchevskaya E.V., Varlamov V.P.Biodegradation and functional activity of doxorubicin loaded on succinoyl chitosan nanoparticles // Colloids and Nanomedicine 2012. Amsterdam.Netherlands.15-17 July 2012. P.125.