

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки

ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ

им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

Российской академии наук

на правах рукописи

Демина Полина Андреевна

КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕР-МОДИФИЦИРОВАННЫХ
НАНОЧАСТИЦ С АНТИСТОКСОВОЙ ФОТОЛЮМИНЕСЦЕНЦИЕЙ ДЛЯ
ПРИМЕНЕНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ

Специальность 1.5.6. – Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:

доктор химических наук

Генералова Алла Николаевна

Москва-2024

Оглавление

| | |
|--|----|
| Список основных сокращений | 5 |
| Введение | 7 |
| Глава 1. Обзор литературы | 13 |
| 1.1. Наночастицы с антистоксовой фотолюминесценцией (АН) | 14 |
| 1.1.1. Состав и свойства апконвертирующих наночастиц | 14 |
| 1.1.2. Синтез апконвертирующих наночастиц | 16 |
| 1.2. Модификация поверхности апконвертирующих наночастиц | 18 |
| 1.2.1. Гидрофилизация поверхности апконвертирующих наночастиц | 19 |
| 1.2.1.1. Гидрофилизация с заменой лиганда-стабилизатора | 20 |
| 1.2.1.2. Гидрофилизация без удаления лиганда-стабилизатора | 21 |
| 1.2.1.3. Включение в полимерные частицы | 24 |
| 1.2.2. Функционализация поверхности наночастиц | 24 |
| 1.2.2.1. Синтетические полимеры | 25 |
| 1.2.2.2. Природные полимеры | 27 |
| 1.2.3. Гидрогели, содержащие наночастицы | 31 |
| 1.2.3.1. Получение нанокомпозитных гидрогелей | 31 |
| 1.3. Применение наночастиц в биомедицине | 34 |
| 1.3.1. Визуализация | 34 |
| 1.3.2. Терапия | 36 |
| 1.3.3. Тканевая инженерия | 38 |
| Глава 2. Материалы и методы | 40 |
| Глава 3. Результаты и их обсуждение | 54 |
| 3.1. Создание биосовместимых полимер-модифицированных наноконструкций на основе АН | 55 |
| 3.1.1. Синтез АН | 56 |
| 3.1.1.2. Фотолюминесцентные свойства АН | 57 |
| 3.1.2. Первый этап создания биосовместимых АН: гидрофилизация поверхности | 58 |

| | |
|--|----|
| 3.1.2.1. Гидрофилизация АН при участии гидроксида тетраметиламмония (ТМАГ) | 59 |
| 3.1.2.2. Гидрофилизация АН полиэтиленгликолем (ПЭГ) | 60 |
| 3.1.2.3. Гидрофилизация АН сополимером малеинового ангидрида с октадецеином (СМАО) | 63 |
| 3.1.3. Второй этап создания биосовместимых АН: модификация гидрофилизированных АН биосовместимыми полимерами | 66 |
| 3.1.3.1. Модификация АН полиэтиленгликолем (ПЭГ) | 67 |
| 3.1.3.2. Модификация АН эндогенным полимером - колониновой кислотой (КолК) | 69 |
| 3.1.3.3. Модификация АН стимул-чувствительным полимером - поли-N-винилкапролактамом (ПВК) | 73 |
| 3.1.4. Получение полимер-модифицированных АН в процессе радикальной ИК-индуцированной полимеризации | 75 |
| 3.1.4.1. Модификация АН с помощью ИК-индуцируемой полимеризации ПЭГ-ДА у поверхности наночастиц | 76 |
| 3.1.4.2. Создание системы для инициирования ИК-полимеризации в объеме на основе наноконструкции АН-фотоинициатор | 79 |
| 3.2. Биомедицинское применение наноконструкций на основе АН | 83 |
| 3.2.1. Наноконструкции АН-КолК для визуализации патологически измененных тканей | 83 |
| 3.2.1.1. Исследование свойств АН-КолК в условиях <i>in vitro</i> | 84 |
| 3.2.1.2. АН-КолК для визуализации солидной опухоли и области воспаления в условиях <i>in vivo</i> | 88 |
| 3.2.2. Наноконструкции АН-СМАО-ПВК для визуализации и терапии солидных опухолей | 92 |
| 3.2.2.1. Терапевтическая функциональность АН-СМАО-ПВК | 93 |
| 3.2.2.2. Исследование конструкций АН-СМАО-ПВК <i>in vitro</i> | 96 |
| 3.2.2.3. Исследование конструкций АН-СМАО-ПВК <i>in vivo</i> | 98 |

| | |
|---|-----|
| 3.2.3. Формирование полимерных структур с микроархитектурой для тканевой инженерии методом ИК-индуцированной реакции полимеризации..... | 102 |
| 3.2.3.1. Получение однослойных и многослойных полимерных конструкций..... | 102 |
| 3.2.3.2. Морфология поверхности полимерных конструкций | 104 |
| 3.2.3.3. Исследование полимерных структур <i>in vitro</i> | 106 |
| 3.2.3.4. Фотоотверждаемые композиции, содержащие природные полимеры | 108 |
| Глава 4. Выводы | 111 |
| Благодарности..... | 112 |
| Список использованной литературы | 113 |

Список основных сокращений

- АН – наночастицы с антистоксовой фотолюминесценцией или апконвертирующие наночастицы
- ИК – инфракрасный спектральный диапазон
- УФ – ультрафиолетовый спектральный диапазон
- ПАВ – поверхностно-активное вещество
- ОМ – олеиламин
- ТОФО – триоктилфосфин оксид
- ОД – 1-октадецен
- ТЭОС – тетраэтоксисилан
- МРТ – магнитно-резонансная томография
- КТ – рентгеновская компьютерная томография
- ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография
- ОФЭКТ – однофотонная эмиссионная компьютерная томография
- ПЭГ – полиэтиленгликоль
- ОК – олеиновая кислота
- ТМАГ – гидроксид тетраметиламмония
- ПЭИ – полиэтиленимин
- СМАО – сополимер малеинового ангидрида и октадецена
- ПЭГ-ДГЭ – диглицидиловый эфир полиэтиленгликоля
- ПЭГ-ДА – диакрилат полиэтиленгликоля
- КолК – коломиновая кислота
- EDC – N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимид
- ПВК – поли-N-винилкапролактам
- НКТР – нижняя критическая температура растворения
- ФОК – фотоотверждаемая композиция
- ФМН – флавиномононуклеотид
- ТЭОА – триэтаноламин
- ЭДА – этилендиамин
- ГМА – глицидилметакрилат
- FDA - Food and Drug Administration (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США)
- LAP – фенил-2,4,6-триметилбензоилфосфинат лития
- Irgacure 369 – 2-бензил-2-(диметиламино)-1-[4-(морфолинил)фенил]-1-бутанон
- ФИ – фотоинициатор

ДФПГ – дифенилпикрилгидразил

LRET – люминесцентный резонансный перенос энергии

FRET – ферстеровский резонансный перенос энергии

ЭПР-эффект – эффект повышенной проницаемости и удерживания

Докс – доксорубицин

Ag НЧ – наночастицы серебра

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

крио-ПЭМ – криоэлектронная просвечивающая микроскопия

ГК – гиалуроновая кислота

Жел – желатин

Актуальность исследования

Активное развитие бионанотехнологии привело к разработке наноматериалов с заданными свойствами, которые имеют большой потенциал для применения в различных областях биомедицины, а именно в диагностике и терапии социально значимых заболеваний, восстановлении утраченных тканей с использованием методов тканевой инженерии. Особое место среди широкого класса наноматериалов занимают флуоресцентные неорганические наночастицы благодаря возможности проводить высокочувствительный и специфичный анализ с использованием биосенсоров, высококонтрастную визуализацию клеток и биологических тканей, инициировать фотохимические реакции, локализуемые в целевой области, под действием света. Однако их успешное применение существенно зависит не только от материала наночастиц, но и от физико-химических свойств (размера частиц, поверхностного заряда, коллоидной стабильности), что определяет их взаимодействие с биологическими структурами, биораспределение и эффективность использования. Поэтому ключевым фактором является модификация поверхности наночастиц биосовместимыми соединениями, что позволяет получать конструкции, сочетающие свойства исходных наночастиц и материалов-модификаторов для применения в биомедицине.

Особое место занимают наночастицы с антистоксовой фотолюминесценцией (АН), у которых длина волны возбуждения лежит в ближнем ИК-диапазоне спектра и попадает в, так называемое, «окно прозрачности» биоткани. Уникальные оптические свойства, химическая и фото- стабильность, отсутствие автофлуоресценции и цитотоксичности АН определяют возможность создания multifunctionальных конструкций, имеющих большой потенциал для визуализации и терапии солидных опухолей в условиях *in vivo*, а наличие линий фотолюминесценции в УФ- и видимом диапазоне спектра позволяет активировать фотоинициаторы, запускающие радикальный процесс сшивки макромономеров для формирования полимерных конструкций, востребованных в тканевой инженерии. Несмотря на все преимущества АН, особенности их синтеза определяют необходимость проведения функционализации поверхности биосовместимыми соединениями. В качестве модификаторов поверхности хорошо себя зарекомендовали полимеры, которые не только предохраняют фотолюминесцентные свойства наночастиц от действия окружающей среды, но и предоставляют возможность предсказать биораспределение модифицированных наночастиц в организме, обеспечить дополнительную функциональность, например, для введения фармпрепаратов или фоточувствительных компонентов, для реакции на внешние стимулы и т.д.

Поэтому актуальной задачей является получение мультифункциональных конструкций на основе одного типа наночастиц для решения проблем визуализации, терапии и тканевой инженерии. Единый метод синтеза и приборный парк для характеристики, фотовозбуждения и детектирования наночастиц, схожие условия и подходы к их модификации и биофункционализации открывают возможность постановки новых научных задач, значительно упрощают и повышают эффективность работы.

Цель исследования

Создание конструкций на основе полимер-модифицированных наночастиц с антистоксовой фотолюминесценцией для визуализации, терапии и тканевой инженерии.

Задачи исследования:

1. Разработать подходы к гидрофилизации поверхности наночастиц со структурой активное кристаллическое ядро/инертная кристаллическая оболочка β - $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}\text{Tm}^{3+}/\text{NaYF}_4$, необходимые для получения коллоидно-устойчивых дисперсий функционализированных наночастиц, что позволит проводить модификацию биосовместимыми полимерами.

2. Модифицировать поверхность АН коломиновой кислотой для получения наноконструкций, способных длительное время циркулировать в кровотоке и, как следствие, эффективно накапливаться в патологически измененных тканях.

3. Разработать подходы к получению многофункциональных конструкций на основе агрегатов полимерных мицелл с включенными наночастицами для одновременной визуализации, химио- и фототермической терапии солидных опухолей.

4. Разработать систему на основе АН для инициирования реакции радикальной полимеризации диакрилата полиэтиленгликоля и реакции сшивки винилсодержащих гиалуроновой кислоты/желатина под действием света ближнего ИК-диапазона спектра.

5. Провести *in vitro* и *in vivo* исследования разработанных конструкций для подтверждения их функциональности в задачах визуализации, терапии и тканевой инженерии.

Научная новизна исследования:

В рамках настоящей работы были продемонстрированы подходы к гидрофилизации поверхности АН β - $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}\text{Tm}^{3+}/\text{NaYF}_4$, исходно стабилизированных олеиновой кислотой, для получения агрегативно-устойчивых дисперсий. Это определило возможность получения различных мультифункциональных конструкций на основе одного типа наночастиц для решения проблем визуализации, терапии и тканевой инженерии.

Поверхность гидрофильных наночастиц была функционализована коломиновой кислотой как за счет ковалентных, так и нековалентных взаимодействий. Такой подход позволил получить новые биосовместимые конструкции, способные в 3 раза дольше циркулировать в кровотоке по сравнению, наночастицами, модифицированными полиэтиленгликолем, наиболее успешно используемым полимером-модификатором поверхности наноагентов для биомедицинских применений.

Разработаны подходы к получению новых многофункциональных конструкции на основе агрегатов полимерных мицелл с АН. Конструкции содержали лекарственный препарат доксорубин и были модифицированы термочувствительным полимером (поли-N-винилкапролактамом), что обеспечило условия для управляемого высвобождения фармпрепарата под действием внешнего светового стимула. Для эффективности терапевтического действия поверхность конструкций были декорирована наночастицами серебра *in situ*. Перитуморальное введение разработанных конструкций с последующим однократным облучением светом с длиной волны 975 нм обеспечило торможение роста ксенографта аденокарциномы молочной железы SK-BR-3.

Показано, что под действием света ближнего ИК-диапазона спектра возможно инициирование реакции полимеризации диакрилата полиэтиленгликоля как у поверхности АН, так и в объеме фотоотверждаемой композиции, содержащей АН. Для реализации фотоиндуцируемой реакции сшивки модифицированной гиалуроновой кислоты и желатина была разработана новая фотоиницирующая система на основе АН, растворимого или нерастворимого в воде фотоинициатора и диакрилата полиэтиленгликоля. Диакрилат полиэтиленгликоля выступает в качестве адаптера для повышения совместимости всех компонентов инициирующей системы, позволяет включать гидрофобные наночастицы, растворимые/нерастворимые в воде фотоинициаторы, что значительно расширяет возможности полимеризации под действием ближнего ИК-света, востребованной в тканевой инженерии.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Полученные конструкции на основе АН и биосовместимых полимеров являются нетоксичными и имеют значительный потенциал для применения в диагностике патологически измененных тканей. Модификация поверхности наночастиц коломиновой кислотой приводит к трехкратному увеличению времени циркуляции в кровотоке при системном введении, по сравнению с временем циркуляции АН, модифицированных полиэтиленгликолем, и определяет их повышенное накопление за счет пассивного механизма доставки в таких патологически измененных тканях, как солидная опухоль и воспаление. Созданные наноконструкции являются универсальным инструментом для

оценки эффективности накопления нанопрепаратов в системе микроциркуляции, проникновения через капилляры в окружающие ткани, скорости кровотока в режиме реального времени, что может быть использовано в качестве независимого маркера, определяющего течение заболевания.

Одновременная реализация диагностической и химио-/фототермической терапевтической функций в конструкциях на основе агрегатов полимерных мицелл с АН позволяет рассматривать их в качестве противоопухолевого нанопрепарата, активируемого излучением из «окна прозрачности» биологической ткани. Использование разработанных конструкций может потенциально снизить устойчивость к противораковым препаратам и системную токсичность за счет местного действия.

Разработанная система для инициирования полимеризации значительно увеличивает количество доступных комбинаций фотоинициаторов и мономеров, фотоотверждаемых под действием ближнего ИК-излучения. С использованием новой фотоиницирующей системы может быть реализовано фотоотверждение под действием света из «окна прозрачности» биологической ткани, что исключает фотоповреждение живых клеток и позволяет формировать трехмерные гидрогелевые структуры в условиях *in situ*. Кроме того, полученные результаты позволяют сформулировать требования к системе наночастица/молекула фотоинициатора, что определяет скорость полимеризации и пространственное разрешение технологии ИК-индуцированной полимеризации с использованием АН.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Для модификации поверхности гидрофобных АН коломиновой кислотой использован двухстадийный подход, включающий гидрофилизацию при участии полиэтиленimina и функционализацию коломиновой кислотой как за счет ковалентных, так и нековалентных взаимодействий. Этот подход обеспечивает получение наноконструкций, способных к длительной циркуляции в кровотоке.

2. Агрегаты полимерных мицелл с АН, покрытые термочувствительным полимером (поли-N-винилкапролактамом), наполненные доксорубицином и декорированные наночастицами серебра, могут быть использованы для флуоресцентной визуализации, комбинированной химио- и фототермической терапии солидной опухоли при активации светом ближнего ИК-диапазона спектра.

3. В зависимости от состава фотоотверждаемой композиции, содержащей АН, могут быть получены наноконструкции, на поверхности которых сформировано полимерное покрытие контролируемой толщины из диакрилата полиэтиленгликоля, либо

получены трехмерные полимерные конструкции из того же олигомера в процессе полимеризации под действием света ближнего ИК-диапазона спектра.

4. Конструкции на основе винилсодержащих гиалуроновой кислоты и желатина получены в реакции сшивки под действием ближнего ИК-излучения с использованием иницирующей системы, состоящей из гидрофобных АН, растворимого или нерастворимого в воде фотоинициатора и диакрилата полиэтиленгликоля.

Личный вклад автора

Автор принимал активное участие в постановке задач и планировании, разработке наноконструкций на основе АН и коломиновой кислоты для биовизуализации, а также конструкций для одновременной визуализации и совмещенной химио- и фототермической терапии солидной опухоли на основе агрегатов полимерных мицелл с АН, наполненных доксорубицином, покрытых термочувствительным полимером (поли-N-винилкапролактамом) и наночастицами серебра. Разработал систему фотоиницирования для полимеризации под действием света из ближнего ИК-диапазона спектра на основе АН, диакрилата полиэтиленгликоля и фотоинициатора и исследовал свойства разработанных конструкций, а так же полимерных конструкций, полученных при лазерной 3D печати, как из синтетического полимера диакрилата полиэтиленгликоля, так и из модифицированных природных полимеров – гиалуроновой кислоты и желатина, Получал характеристики разработанных конструкций с использованием широкого спектра физико-химических методов, участвовал в *in vitro* и *in vivo* исследованиях, а также в обсуждении и оформлении полученных результатов.

Апробация работы

Результаты диссертации получили квалифицированную апробацию на всероссийских и международных конференциях: XXIX, XXX, XXXI, XXXII Зимней молодежной научной школе «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2017, 2018, 2019, 2020), международной конференции Sechenov International Biomedical Summit (Москва, 2018), 43-й международной конференции FEBS Congress, Biochemistry Forever (Прага, 2018), 13-й международной конференции HBSM-2018 «Hole Burning, Single Molecule, and Related Spectroscopies: Science and Applications» (Суздаль, 2018), международной конференции S3IC 2019, 2020 «Single Molecule Sensors and NanoSystems International Conference (Мюнхен, 2019, Барселона, 2020), 19-й международной конференции ICLO-2020 «International Conference Laser Optics» (Санкт-Петербург, 2020), 8-й всероссийской Каргинской конференции «Полимеры-2020», 8-й и 9-й международной конференции Saint Peterburg OPEN

International School and Conference on Optoelectronics, Photonics, Engineering and Nanostructures (Санкт-Петербург, 2021, 2022).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 10 научных статей в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, 13 тезисов к докладам на российских и международных конференциях.

Объем и структура работы

Диссертационная работа изложена на 127 страницах, содержит 51 рисунок, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 185 источников.

Глава 1. Обзор литературы

Быстрое развитие нанотехнологии привело к значительным успехам в области использования неорганических наночастиц в биомедицине. Наночастицы находят широкое применение для выявления и терапии раковых опухолей, [1] сердечно-сосудистых заболеваний, [2] антимикробной терапии, [3] тканевой инженерии [4] и др. Преимущество использования наночастиц заключается в простоте настройки их параметров на этапе синтеза, разнообразии материалов, структуры, формы и размеров, а также в возможности сочетать несколько функциональностей. [5] Все это совместно с развитой площадью поверхности и многообразием подходов к их биофункционализации, делает неорганические наночастицы уникальной наноплатформой для повышения диагностической и терапевтической эффективности, снижения побочных эффектов за счет накопления непосредственно в патологических тканях. [6]

Флуоресцентные методы исследования биологических систем обладают определенными преимуществами по сравнению с другими подходами: это универсальный, бесконтактный метод, позволяющий селективно подобрать длины волн эмиссии и возбуждения в зависимости от задачи, проводить измерения с высокой чувствительностью, специфичностью и пространственно-временным разрешением. [7] Поэтому среди большого разнообразия наночастиц особое внимание уделяют именно флуоресцентным наночастицам.

Однако применение в биомедицине большинства флуоресцентных наночастиц имеет ряд ограничений. В качестве источника возбуждения таких наночастиц чаще всего используют ультрафиолетовый (УФ) и видимый свет высокой интенсивности с небольшой глубиной проникновения в биологические ткани. Кроме того, длительное воздействие УФ-излучения может вызывать серьезное фотоповреждение клеток, [8] а фоновый сигнал, связанный с флуоресценцией самих биологических тканей (автофлуоресценцией) затрудняет анализ локализации наночастиц.

Переход к наночастицам, возбуждаемым светом из “окна прозрачности” биоткани (650-1100 нм), позволяет значительно снизить фототоксичность и увеличить глубину проникновения возбуждающего излучения в биологические ткани. Особый интерес представляют наночастицы с антистоксовой фотолуминесценцией или апконвертирующие наночастицы (АН), способные конвертировать свет ближнего инфракрасного (ИК) диапазона спектра в УФ- и видимое излучение. Наноконструкции на основе АН могут быть использованы для решения широкого спектра задач биомедицины. Флуоресцентная визуализация с использованием АН позволяет получать информацию о накоплении в целевых тканях, распределении по сосудам или интернализации в клетках с

высоким пространственно-временным разрешением. [9] Наночастицы, как носители лекарственных препаратов, благодаря развитой площади поверхности обладают большой емкостью, защищают препарат от деградации, облегчают интернализацию в клетки, а также могут контролироваться, под действием внешних стимулов, высвобождать лекарственный препарат в целевой области, значительно снижая его побочное действие на организм. [10] АН с контролируемым размером и морфологией могут быть доставлены в область патологии для инициирования фотохимических реакций и проведения фотодинамической [11] или фототермической [12] терапии, что в сочетании с оптическим мониторингом биораспределения наночастиц в организме позволяет комплексно оценить эффективность терапии. [13] Кроме того, в настоящее время для изготовления тканеинженерных конструкций активно используют полимерные композиции с флуоресцентными наночастицами, что позволяет под действием низкоэнергетического света из красного диапазона спектра инициировать фотореакции в условиях биологического окружения. [14]

1.1. Наночастицы с антистоксовой фотолюминесценцией (АН)

Наночастицы с антистоксовой фотолюминесценцией или апконвертирующие наночастицы (АН) находят широкое применение в области визуализации, терапии, тканевой инженерии, аналитических методах исследования и т.д. [15] Уникальные оптические свойства наряду с наноразмером и возможностью модифицировать свойства поверхности для создания биосовместимых нанореагентов делают их перспективными материалами для решения задач биомедицины. Для АН характерно длительное время жизни фотолюминесценции, большой антистоксовый сдвиг, фотостабильность, а также возбуждение и эмиссия в спектрально выгодном для биоприменения диапазоне спектра, что отличает их от традиционных флуоресцентных меток. [16] Переход от УФ- и видимого возбуждающего излучения к ближнему ИК, попадающему в “окно прозрачности” биологической ткани устраняет такие недостатки, как недостаточная глубина проникновения в ткани и фотоповреждение клеток. Уникальное свойство преобразовывать свет ближнего инфракрасного диапазона в УФ- и видимое излучение позволяет осуществлять анализ или инициировать фотохимические процессы в глубине биологической ткани с минимальным поглощением, рассеянием и исключает автофлуоресценцию.

1.1.1. Состав и свойства апконвертирующих наночастиц

Апконверсия - процесс преобразования нескольких фотонов низкой энергии в один фотон более высокой энергии. За последние годы этот процесс превратился из явления, представляющего фундаментальный интерес, в полноценную технологию,

применяемую для разработки новых люминесцентных материалов. [16] Механизм апконверсии был теоретически описан Н. Бломбергенем [17] и экспериментально обнаружен в объемных кристаллах независимо В.В. Овсянкиным с П.П. Феофиловым [18] и Ф. Аузелем. [19] Успешный синтез таких кристаллов в наноразмерном диапазоне послужил их активному внедрению в нанотехнологии. [20]

Апконвертирующие наночастицы, легированные ионами редкоземельных элементов, обычно состоят из трех основных компонентов: кристаллической матрицы, ионов-активаторов и ионов-сенсбилизаторов. Ионы, поглощающие фотоны, называются сенсбилизаторами, а ионы, излучающие свет – активаторами. Сенсбилизатор эффективно поглощает в ближней ИК - области спектра, переходя из основного в возбужденное метастабильное состояние. После чего реализуется безызлучательный резонансный перенос энергии от сенсбилизатора к ионам – активаторам. [21] Эффективность процесса апконверсии определяется комбинацией и соотношением легирующих ионов, а также типом кристаллической матрицы (Рис. 1.1).

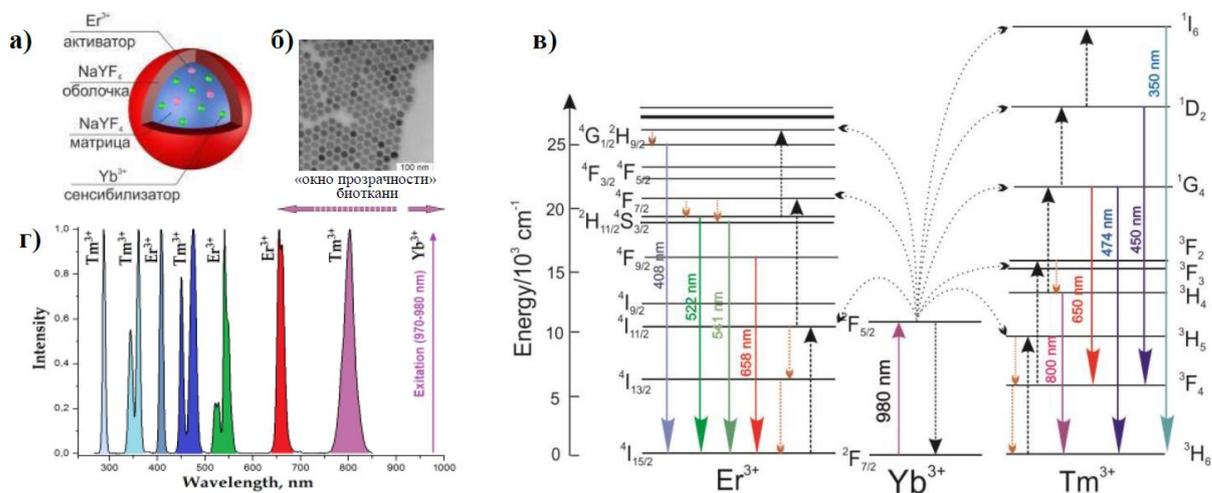


Рисунок 1.1. а) Схематическое изображение структуры АН; б) ПЭМ изображение АН; в) Схема возбуждения люминесценции АН; г) Линии излучения в спектрах АН $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ и $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$. [21]

В качестве ионов-сенсбилизаторов наиболее часто используют Yb^{3+} , поглощающий свет с длиной волны 970-980 нм, благодаря большому сечению поглощения. При этом концентрация Yb^{3+} обычно составляет 20-30%, поскольку существует единственный возбужденный энергетический уровень ($^2\text{F}_{5/2}$), обеспечивающий эффективную передачу энергии соседним ионам. Ионы-активаторы с лестнично-расположенными энергетическими уровнями (Er^{3+} , Tm^{3+} , Ho^{3+} , Nd^{3+}) используются наиболее часто, при этом их концентрация составляет <2%, что снижает вероятность

процесса кросс-релаксации. Стоит отметить, что эффективность эмиссии сильно зависит от расстояния между ионами, которое определяется их концентрацией. [22]

Что касается кристаллической матрицы, то ее выбор влияет на квантовый выход фотолюминесценции и соотношение интенсивностей излучения на различных длинах волн. Она должна удовлетворять определенным требованиям: быть химически и термически стабильной, оптически прозрачной для возбуждающего и испускаемого излучения, обладать высокой изоморфной емкостью по отношению к ионам-активаторам, низкой симметрией решетки кристаллической матрицы и обеспечивать локальную симметрию активных центров в ней и их пространственное положение в кристаллической структуре, а также иметь низкие энергии фононов. [20–23] Фторидные материалы, такие как LaF_4 , YF_4 , NaYF_4 , BaYF_4 , широко используются в качестве кристаллических матриц. При этом наиболее эффективной матрицей для эмиссии в видимой области считается гексагональная β -фаза тетрафтороиттриата натрия ($\beta\text{-NaYF}_4$). [22]

На интенсивность фотолюминесценции апконвертирующих наночастиц также большое влияние оказывают свойства поверхности нанокристаллов – поверхностные дефекты, деформация решетки, выбор лиганда-стабилизатора и растворитель, которые могут снижать квантовый выход процесса. [21] Для устранения действия тушащих факторов поверхность апконвертирующих наночастиц покрывают пассивной неорганической оболочкой из того же материала, что и кристаллическая матрица, формируя структуру “ядро-инертная оболочка”. [24] Кроме того, наночастицы могут быть покрыты активной оболочкой, содержащей ионы-активаторы (Yb^{3+}), что обеспечивает разделение областей поглощения, перехода и излучения в наночастице и позволяет контролировать эффекты концентрационного тушения и/или взаимного релаксационного взаимодействия. [21,23,25]

На сегодняшний день для использования в биомедицинских приложениях наиболее перспективными наночастицами являются АН $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}\text{Er}^{3+}/\text{NaYF}_4$ или $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}\text{Tm}^{3+}/\text{NaYF}_4$ со структурой “ядро-оболочка” с высоким квантовым выходом (до 10% для наночастиц с размером 100-150 нм) [26] преобразования ближнего ИК-излучения в УФ- и видимый свет.

1.1.2. Синтез апконвертирующих наночастиц

Решающее значение для применения апконвертирующих наночастиц в биомедицине имеет разработка методов синтеза с контролируемым составом, размером, кристаллической фазой, спектральными характеристиками и квантовым выходом. [20] В настоящее время разработаны различные подходы к синтезу АН, такие, как соосаждение, [27] сольво/гидротермальный метод, [28] термическое разложение, [29] микроволновый

синтез, [30] которые приводят к получению монодисперсных наночастиц с настраиваемыми фото-физическими характеристиками. Среди перечисленных подходов выделяют термическое разложение и сольво/гидротермальный методы, поскольку они являются наиболее простыми для получения наночастиц с контролируемым размером и морфологией, а также с высоким квантовым выходом, для биологических исследований. [22]

Метод термического разложения

При получении АН методом термического разложения в качестве прекурсоров используют металлоорганические соединения, разлагающиеся в органических растворителях с высокой температурой кипения в присутствии поверхностно-активных соединений. В качестве прекурсоров используют соли трифторацетатов лантаноидов, полученные растворением оксидов соответствующих металлов в водном растворе трифторуксусной кислоты. Поверхностно-активные вещества (ПАВ) содержат функциональную группу, способную координироваться с ионами металлов на поверхности растущих наночастиц, и гидрофобный фрагмент, обеспечивающий коллоидную стабильность наночастиц в неполярных растворителях. Наибольшее распространение получили такие ПАВ, как олеиновая кислота (ОК), олеиламин (ОМ) и триоктилфосфин оксид (ТОФО). Варьируя параметры процесса (температуру, время реакции) и концентрации реагентов, можно получить АН с узким распределением по размерам, определенной формы и морфологии. Однако токсичные продукты реакции (фтор- и оксофторсодержащие соединения) и крайняя чувствительность к температурным изменениям может приводить к формированию многочисленных дефектов, снижающих эффективность апконверсии. [20,31]

Сольво/гидротермальный метод

Сольво/гидротермальный метод синтеза АН основан на реакциях, проходящих при высокой температуре и давлении в изолированной системе (обычно, в автоклаве). Это увеличивает растворимость и реакционную способность неорганических веществ. В качестве прекурсоров обычно используют соли лантаноидов (хлориды, нитриды или сульфаты), а в качестве ПАВ – полиэтиленмин, этилендиаминтетрауксусную кислоту, цетилтриметиламмоний бромид или олеиновую кислоту, которые также выступают в качестве хелатирующих агентов, регулирующих концентрацию катионов металлов, и позволяют контролировать размер, морфологию и кристаллическую фазу. [32] К преимуществам такого подхода относят возможность получения наночастиц с высококристаллической фазой при достаточно низких температурах. К недостаткам –

необходимость использования специальных реакционных сосудов и невозможность визуально наблюдать за процессом синтеза. [31]

1.2. Модификация поверхности апконвертирующих наночастиц

В процессе синтеза АН стабилизируют гидрофобными лигандами, такими как олеиновая кислота (ОК), 1-октадецен (ОД) и др., что помогает контролировать рост наночастиц за счет координации стабилизаторов на поверхности, а также предотвращать их агрегацию. Однако наличие гидрофобных стабилизаторов на поверхности АН не позволяет их диспергировать в водных растворах или биологических буферах и, следовательно, использовать в биомедицине. [33] Поэтому необходима модификация поверхности АН, направленная на гидрофилизацию и придание дополнительных биологических, химических или физических функциональностей для использования их в биологических системах (Рис.1.2). [34]

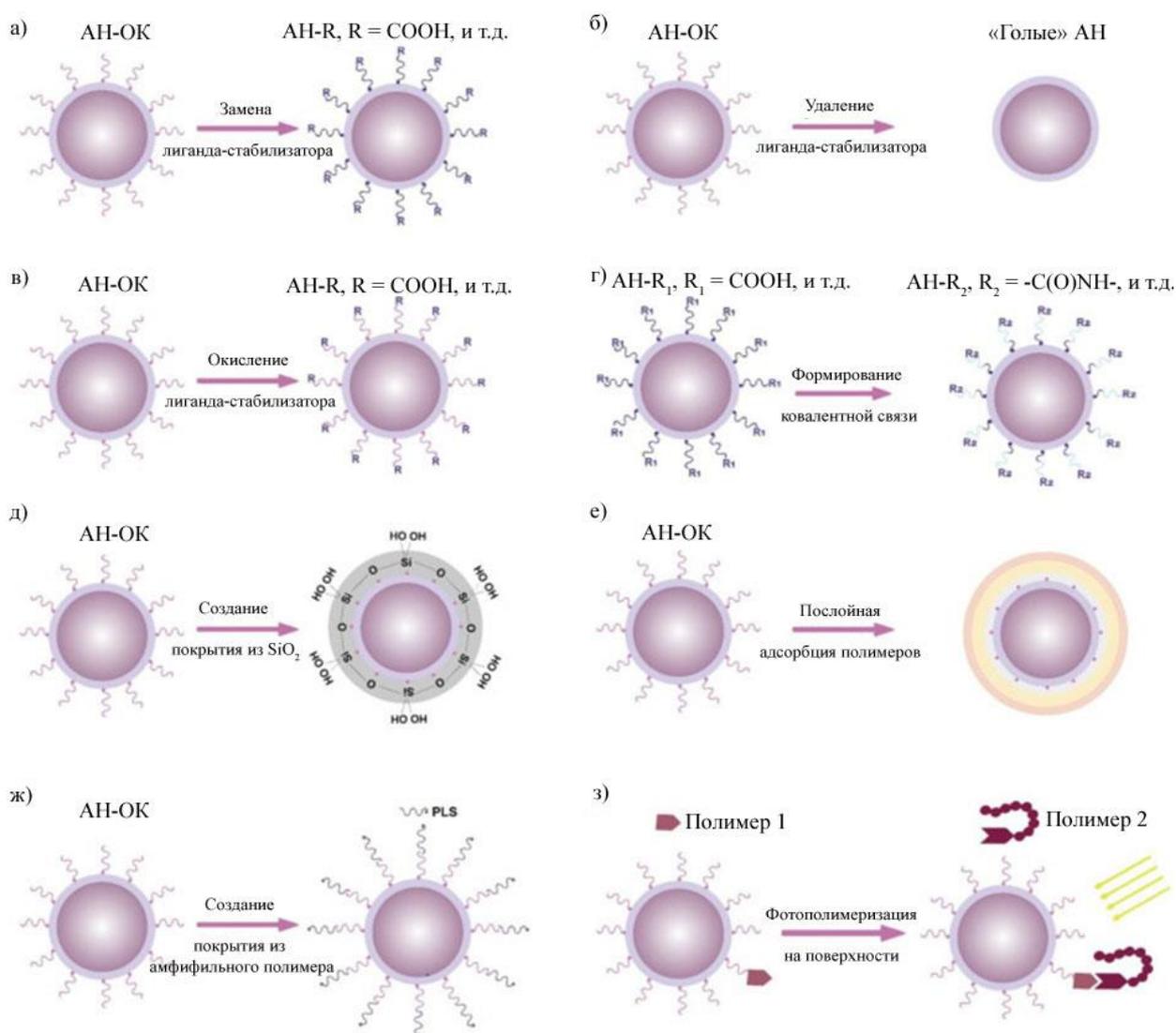


Рисунок 1.2. Иллюстрация общих подходов к модификации поверхности АН. [35]

С этой целью обычно проводят двухступенчатую модификацию поверхности АН: (i) гидрофилизацию и (ii) функционализацию биосовместимыми полимерами или биологически активными соединениями. Гидрофилизацию поверхности АН осуществляют с использованием различных методов, таких как замена, удаление или окисление лиганда-стабилизатора, создание покрытия из диоксида кремния, модификация амфифильными полимерами, фотополимеризация на поверхности. [36,37] Функционализацию поверхности АН, которую в некоторых случаях удается реализовать на стадии гидрофилизации, проводят для придания коллоидной стабильности, биосовместимости, введения дополнительных модальностей (чувствительности к температуре, рН, направленности к определенным антигенам), а также «скрытию» наночастиц от клеток иммунной системы для длительной циркуляции и эффективного накопления в целевой области. [38] Таким образом, тщательный выбор стратегии модификации поверхности АН определяет их эффективное использование в диагностике, терапии, доставке лекарств и т.д.

1.2.1. Гидрофилизация поверхности апконвертирующих наночастиц

При проведении гидрофилизации поверхности АН необходимо обеспечить коллоидную и химическую стабильность водных дисперсий АН без изменения фотофизических свойств наночастиц, защитить кристаллическую матрицу от воздействия окружающей среды, а также получить на поверхности функциональные группы, экспонированные в водную фазу, что открывает возможность для дальнейшей функционализации АН биосовместимыми агентами. При этом снижение поверхностной энергии наночастиц является ключевым фактором, определяющим коллоидную устойчивость дисперсий наночастиц. Согласно теории Дерягина-Ландау-Фервея-Овербека (ДЛФО) при сближении наночастиц всегда существует слабый вторичный минимум энергии (лежащий в масштабе размера наночастиц), который определяет обратимую агрегацию частиц (Рис. 1.3). Дальнейшее уменьшение расстояния между частицами может привести к необратимой агрегации при снижении потенциальной энергии до первичного минимума. Препятствием для их сближения является потенциальный барьер, которым можно управлять путем модификации поверхности наночастиц.

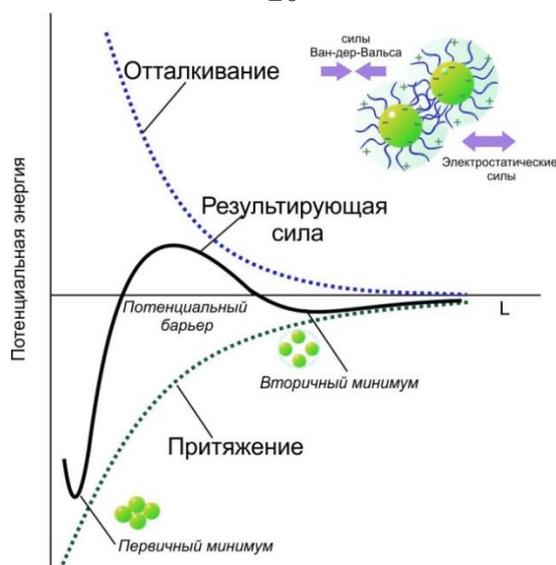


Рисунок 1.3. Схематическое изображение энергии взаимодействия двух наночастиц согласно теории ДЛФО. [39]

При переводе из неполярного растворителя, где между частицами в основном действуют силы Ван-дер-Ваальса и проявляется стерический эффект, в полярный, где преимущественно будут электростатические взаимодействия наряду с гидратацией, образованием водородных связей, гидрофобных взаимодействий, взаимодействий диполей и также стерических эффектов, правильный выбор гидрофилизующего агента позволит повысить потенциальный барьер и обеспечить агрегативную устойчивость наночастиц. [39] Методы гидрофизации разделяют на три основных подхода: (i) с заменой лиганда-стабилизатора; (ii) без удаления лиганда-стабилизатора; или (iii) путем включения в органические или неорганические частицы.

1.2.1.1. Гидрофизация с заменой лиганда-стабилизатора

Частичная замена лиганда-стабилизатора

Частичная замена гидрофобного лиганда-стабилизатора гидрофильными агентами представляет собой наиболее распространенный подход к гидрофизации поверхности АН, который не влияет на оптические свойства наночастиц и позволяет получать коллоидно-стабильные водные дисперсии АН с функциональными группами. Движущей силой реакции является большая координационная способность ионов лантаноидов на поверхности АН к гидрофильному лиганду-стабилизатору в сравнении с исходным гидрофобным. [40] В зависимости от условий (избыток или недостаток гидрофильного лиганда-стабилизатора, температура, растворитель) возможно осуществление как частичной, так и полной замены.

В литературе приведены примеры успешной гидрофизации поверхности АН цитратом натрия, производными полиэтиленгликоля, полиэтиленимином, производными

полиакриловой кислоты, меркаптопропионовой кислотой и др. [31] Стоит отметить, что замена лиганда-стабилизатора открывает возможность дальнейшей модификации поверхности биосовместимыми соединениями за счет получения функциональных групп (-NH₂, -COOH, -SH).

Удаление лиганда-стабилизатора

Удаление лиганда-стабилизатора с поверхности АН методом ультразвуковой обработки в присутствии соляной кислоты впервые было описано исследовательской группой John A. Carobianco [41] и до сих пор широко используется. При ультразвуковом диспергировании апконвертирующих наночастиц в кислой среде (рН ≈ 2–4) происходит постепенное протонирование карбоксильных групп олеиновой кислоты, стабилизирующей АН, и распад координационной связи. Свободную олеиновую кислоту можно удалить из дисперсии экстракцией диэтиловым эфиром. Поскольку ионы металлов на поверхности наночастиц обладают сильной координационной способностью, можно осуществлять прямое конъюгирование АН с биосовместимыми молекулами, имеющими такие функциональные группы, как -COOH, -NH₂, -OH, -SH. К недостаткам такого подхода относят небольшой (~30-35%) выход коллоидно-устойчивых наночастиц, [42] возможное травление кристаллической оболочки АН, сопровождающееся увеличением количества поверхностных дефектов. [43] Использование соляной кислоты для удаления стабилизатора с поверхности АН может приводить к частичному растворению наночастиц, а прямой доступ к поверхности молекул воды - к тушению фотолюминесценции АН. [44]

1.2.1.2. Гидрофилизация без удаления лиганда-стабилизатора

Окисление лиганда-стабилизатора

Окисление лиганда-стабилизатора на поверхности АН основано на селективном окислении двойных связей и получении концевых карбоксильных, альдегидных и эпоксидных групп. [45] Стоит отметить ограничения, связанные с небольшим количеством лигандов-стабилизаторов, содержащих двойные связи, а также недостаточной коллоидной стабильностью получаемых дисперсий АН в воде, что связано с ограниченным выбором функциональных групп. Кроме того, существуют сложности, связанные с удалением побочных продуктов реакции окисления, например, MnO₂, образующегося при окислении олеиновой кислоты с помощью реагента Лемье-фон-Рудлоффа. [46]

Послойная адсорбция полимеров

Послойная адсорбция полимеров на поверхности АН осуществляется за счет электростатического притяжения противоположно заряженных полиэлектролитов (англ.

layer-by-layer). [47] К преимуществам данного метода относят возможность формирования наноагентов с контролируемой толщиной полимерного покрытия, требуемым знаком и величиной поверхностного заряда, функциональными группами на поверхности. Например, нанесение чередующихся слоев полиаллиламина и полистиролсульфата натрия позволяет получать АН с аминогруппами на поверхности. [48] Метод послойной адсорбции полимеров на поверхности наночастиц часто используется для создания биосовместимых реагентов в биомедицине, например, биосенсоров.

Гидрофилизация с использованием амфифильных полимеров

Гидрофилизация поверхности АН амфифильными полимерами осуществляется за счет гидрофобных взаимодействий между лигандом-стабилизатором и полимером-модификатором, у которого гидрофильная часть молекулы экспонирована в воду. Использование амфифильных полимеров приводит к гидрофобным взаимодействиям лиганда-стабилизатора и полимера и формированию полимерного покрытия на поверхности АН. [45] К преимуществам такого метода гидрофилизации относится получение коллоидно-устойчивых водных дисперсий наночастиц с функциональными группами на поверхности, а также эффективная защита кристаллической матрицы от взаимодействия с молекулами воды и, следовательно, исключение тушения фотолюминесценции АН за счет высокочастотных колебаний ОН-групп, способствующих многофононной релаксации. [49] В качестве амфифильных полимеров наиболее часто используют сополимер малеинового ангидрида с октадецином, полиэтиленимин, блок-сополимер полиэтиленгликоля и полимолочной кислоты, фосфолипиды, полиакриловую кислоту, модифицированную длинными алкильными цепями и т.д. [31]

Создание покрытия из диоксида кремния

Создание покрытия из диоксида кремния на поверхности АН – распространенный метод получения гидрофильных, коллоидно-устойчивых водных дисперсий наночастиц, сохраняющих оптические свойства. К преимуществам метода относится возможность контролировать толщину покрытия и одновременно получать функциональные группы (например, $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{SH}$ и т.д.), экспонированные в водную среду для дальнейшей модификации биосовместимыми агентами. [50] Как правило, слой диоксида кремния на поверхности АН получают либо в микроэмульсии типа «вода в масле» для формирования SiO_2 на поверхности гидрофобных АН, [51] либо методом Штобера, при условии, что поверхность АН уже обладает гидрофильными свойствами. [50] Последнему уделяют особое внимание благодаря простоте в подборе концентраций реагентов и получению слоя SiO_2 контролируемой толщины. Кратко, АН@ SiO_2 получают, смешивая гидрофильные АН с водным раствором аммиака и добавляя тетраэтоксисилан (ТЭОС),

после чего происходит гидролиз и конденсация ТЭОС у поверхности «зародышей» АН. Изменение концентрации прекурсоров (тетраэтоксисилана, 3-аминопропилтриметоксисилана и др.) и времени реакции позволяет точно контролировать толщину оболочки, что определяет адсорбционную емкость наноносителей при включении лекарственных препаратов, а также эффективность передачи энергии на фоточувствительные молекулы, введенные в состав наноконструкции для проведения фотохимических реакций в биологических системах. [52,53] Функционализация поверхности amino-, карбокси- и тиольными группами во время формирования оболочки из диоксида кремния проводят для получения конъюгатов с биологически активными соединениями. Например, для получения $-NH_2$ групп в качестве прекурсора выступает 3-аминопропил триметоксисилан, для $-COOH$ групп карбоксиэтилсилантриол и $-SH$ групп 3-меркаптопропил триметоксисилан. [33]

***In situ* фотополимеризация на поверхности наночастиц**

Оптические свойства АН могут быть использованы для инициирования фотополимеризации мономеров, олигомеров или макромономеров от поверхности наночастиц. Способность АН преобразовывать свет ближнего ИК - диапазона спектра в видимое и УФ-излучение приводит к возбуждению фотоинициатора, инициированию фотополимеризации и росту полимерной цепи от поверхности. Для этого необходима иммобилизация на поверхности АН фотоинициаторов, поглощающих на длинах волн эмиссии АН и генерирующих радикалы, которые, в свою очередь, ведут полимеризацию. Такой подход позволяет получать полимерный слой из большого числа мономеров, например, глицидилметакрилата, пропаргилакриламида, N-акрилоилпаминобензамидина, 2-карбоксиэтилакрилата, 2-гидроэтилметакрилата на поверхности наночастиц, что свидетельствует об универсальности метода. К недостаткам относят невозможность контролировать молекулярную массу, толщину и плотность полимерного слоя. [54] Однако кинетику полимеризации, плотность прививки и упаковки связанных с поверхностью полимерных цепей можно регулировать при проведении контролируемой радикальной RAFT-полимеризации (RAFT (*англ.*) – reversible addition-fragmentation chain transfer или полимеризация с передачей цепи по механизму присоединения-фрагментации) от поверхности АН. Например, водные дисперсии АН, сохраняющие свои оптические свойства, были получены методом контролируемой радикальной RAFT-полимеризации с помощью видимого света ($\lambda_{max} = 635$ нм). При этом толщину полимерного слоя контролировали дозой возбуждающего излучения. [36]

1.2.1.3. Включение в полимерные частицы

Перспективным подходом, позволяющим получать гидрофильные АН, сохраняющие свои оптические свойства, является включение их в полимерные частицы. В этом случае, АН, стабилизированные олеиновой кислотой, могут быть солюбилизованы в гидрофобную область полимерных частиц, что исключает возможность взаимодействия молекул воды с кристаллической матрицей и тушение фотолюминесценции АН. Гидрофобные наночастицы могут быть встроены в полимерные мицеллы за счет гидрофобных взаимодействий лиганда-стабилизатора с блоком, образующим ядро мицеллы. Способность диспергироваться в воде в этом случае будет обеспечиваться гидрофильной частью блок-сополимера. [54] Примечательно, что на этапе получения гидрофильных АН возможно также включение гидрофобных лекарственных препаратов. [22] К преимуществам метода следует отнести широкий выбор блок-сополимеров для получения функциональных групп на поверхности частиц для дальнейшей функционализации или являющихся, например, УФ-чувствительными. [55]

Таким образом, разработано множество методов получения гидрофильных наночастиц, сохраняющих свои оптические свойства. Для формирования наночастиц, которые могут быть использованы в биомедицинских приложениях, предпочтение отдают методам, которые в дальнейшем позволяют проводить функционализацию поверхности биосовместимыми соединениями.

1.2.2. Функционализация поверхности наночастиц

Использование наночастиц в биомедицине накладывает определенные требования к свойствам поверхности. На этапе функционализации необходимо подобрать полимерное покрытие, обеспечивающее биосовместимость, неиммуногенность, коллоидную стабильность, а также низкую неспецифическую адсорбцию белков плазмы крови для продолжительной циркуляции в кровотоке и эффективного накопления в области патологически измененной ткани. Для модификации АН используют синтетические и природные полимеры. Для синтетических полимеров характерно большое разнообразие: возможность получения в широком диапазоне молекулярных масс с различными функциональными группами и большими вариациями в физико-химических свойствах. Кроме того, отличительной особенностью некоторых синтетических полимеров является способность изменять физико-химические свойства под действием внешнего стимула (света, температуры, магнитного поля и т.д.). [56] Биополимерам свойственна биоразлагаемость и низкая иммуногенность. Важным отличием от синтетических полимеров является способность метаболизироваться до нетоксичных соединений под действием ферментов. [57] Модификация поверхности наноносителей природными

полимерами придает им свойства гидрофильности и способности предотвращать адсорбцию белков плазмы крови, что продлевает время их циркуляции в кровотоке.

1.2.2.1. Синтетические полимеры

Химические, физические и биологические свойства синтетических полимеров можно настраивать на этапе синтеза. Это касается, например, введения функциональных групп для получения конъюгатов с биомолекулами, варьирования молекулярной массы или возможности получения сополимеров. Для применения в биомедицине предпочтительно использование биоразлагаемых полимеров, выполняющих свою функцию и постепенно деградирующих в организме. [58] Кроме того, синтетические гидролитически разлагаемые полимеры предпочтительны для многих применений, поскольку их деградация протекает по схожим механизмам и не зависит от индивидуальных особенностей пациента в отличие от природных полимеров. [59] К наиболее часто используемым для модификации поверхности наночастиц синтетическим полимерам относятся полиэтиленгликоль, полилактид, полигликолид, поликапролактон и т.д.

Синтетические полимеры могут придавать поверхности наночастиц свойства биосовместимости, а также эти соединения способны изменять свою конформацию, полярность, химический состав в ответ на внешние стимулы, [60] что широко используется для создания систем доставки лекарств с контролируемым высвобождением.

Поли-N-винил капролактам

Поли-N-винилкапролактам (ПВК) представляет собой термочувствительный полимер, для которого характерны такие свойства, как биосовместимость, отсутствие токсичности и низкая критическая температура растворения (НКТР), близкая к физиологической [61] (32-37°C). В отличие от широко используемого поли-N-изопропилакриламида, мономеры которого проявляют системную токсичность, гидролиз ПВК (Рис. 1.4) не приводит к образованию токсичных продуктов. [62] Это определяет перспективность его применения в качестве термочувствительного полимера-модификатора поверхности.

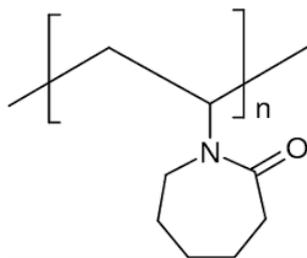


Рисунок 1.4. Структурная формула поли-N-винилкапролактама.

Использование термочувствительных полимеров для модификации поверхности АН решает не только задачу биоадаптации наночастиц, но и контролируемого высвобождения загруженного лекарственного препарата в ответ на локальное повышение температуры. [63]

Полиэтиленгликоль (ПЭГ)

Полиэтиленгликоль (ПЭГ) синтетический полимер, хорошо зарекомендовавший себя как полимер-модификатор поверхности наночастиц для создания биосовместимых наноносителей. ПЭГ (Рис. 1.5) представляет собой гидрофильный, водорастворимый, биосовместимый полимер со слабо выраженными иммуногенными свойствами, нетоксичный при молекулярной массе выше 400 Да, легко выводятся почками. [64] ПЭГ широко используется при модификации поверхности наноносителей для доставки лекарственных препаратов, поскольку он одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) для клинических приложений. [64]

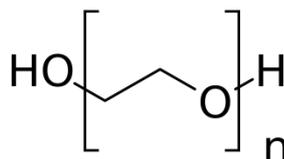


Рисунок 1.5. Структурная формула полиэтиленгликоля.

Для ряда применений поверхность наночастиц должна быть высокогидрофильной и способной предотвращать адсорбцию белков, обеспечивая значительное время циркуляции наночастиц в кровотоке при внутривенном введении. Модификация поверхности АН ПЭГ приводит к снижению поглощения наноносителей макрофагами, продлевает период полувыведения из кровотока и уменьшает накопление в печени и селезенке. Эффективность ПЭГ-полимерного покрытия определяется его молекулярной массой. [65] Высокомолекулярный ПЭГ демонстрирует большее время циркуляции в кровотоке по сравнению с низкомолекулярным: при увеличении молекулярной массы с 6 кДа до 190 кДа период его полувыведения увеличивается с 18 минут до 48 часов, соответственно. Однако модификация поверхности АН полиэтиленгликолем не лишена определенных недостатков, ограничивающих ее широкое распространение на практике. Прежде всего, ПЭГ формирует стерический барьер вокруг наноносителя за счет формирования ассоциатов с водой, что приводит к подавлению взаимодействия наночастиц с клетками. [66] Во-вторых, повторное введение наноконструкций, модифицированных ПЭГ, приводит к их ускоренному выведению. Это связано с активным продуцированием анти-ПЭГ IgM, опосредующих активацию системы

комплемента. [67] Кроме того, ПЭГ метаболизируется до токсичных продуктов при окислении цитохромом P450, которые накапливаются в тканях и могут приводить к ацидозу. [68] Еще одним недостатком ПЭГ, как полимера-модификатора поверхности, является отсутствие реакционноспособных групп на поверхности пегилированных носителей, [69] что осложняет конъюгацию с нацеливающими молекулами.

1.2.2.2. Природные полимеры

Полимеры природного происхождения характеризуются биосовместимостью, неиммуногенностью, способностью к биоразложению под действием ферментов организма до нетоксичных продуктов. Поскольку модификация поверхности наноносителей синтетическими полимерами имеет ряд недостатков, было выдвинуто предположение, что использование полимеров природного происхождения значительно расширит возможности создания конъюгатов с другими молекулами, а также положительно скажется на биомиметических свойствах наноконструкций. [10]

Большой интерес вызывает разработка подходов к модификации поверхности наночастиц полисахаридами, которые представляют собой длинные углеводные молекулы, состоящие из повторяющихся моносахаридных единиц, соединенных гликозидными связями. Полисахариды - одни из основных компонентов гликокаликса и внеклеточного матрикса. [57] Полисахариды очень стабильны, биосовместимы и биоразлагаемы, [57] кроме того, они могут проявлять таргетные свойства, т.к. специфичны к рецепторам некоторых клеток и тканей, обладают антибактериальными, противоопухолевыми свойствами, [10] а также участвуют в механизмах клеточного узнавания, транспорта и межклеточной адгезии. [70] Биологические свойства и активность связаны с различной химической структурой. Примеры полисахаридов приведены на рисунке 1.6.

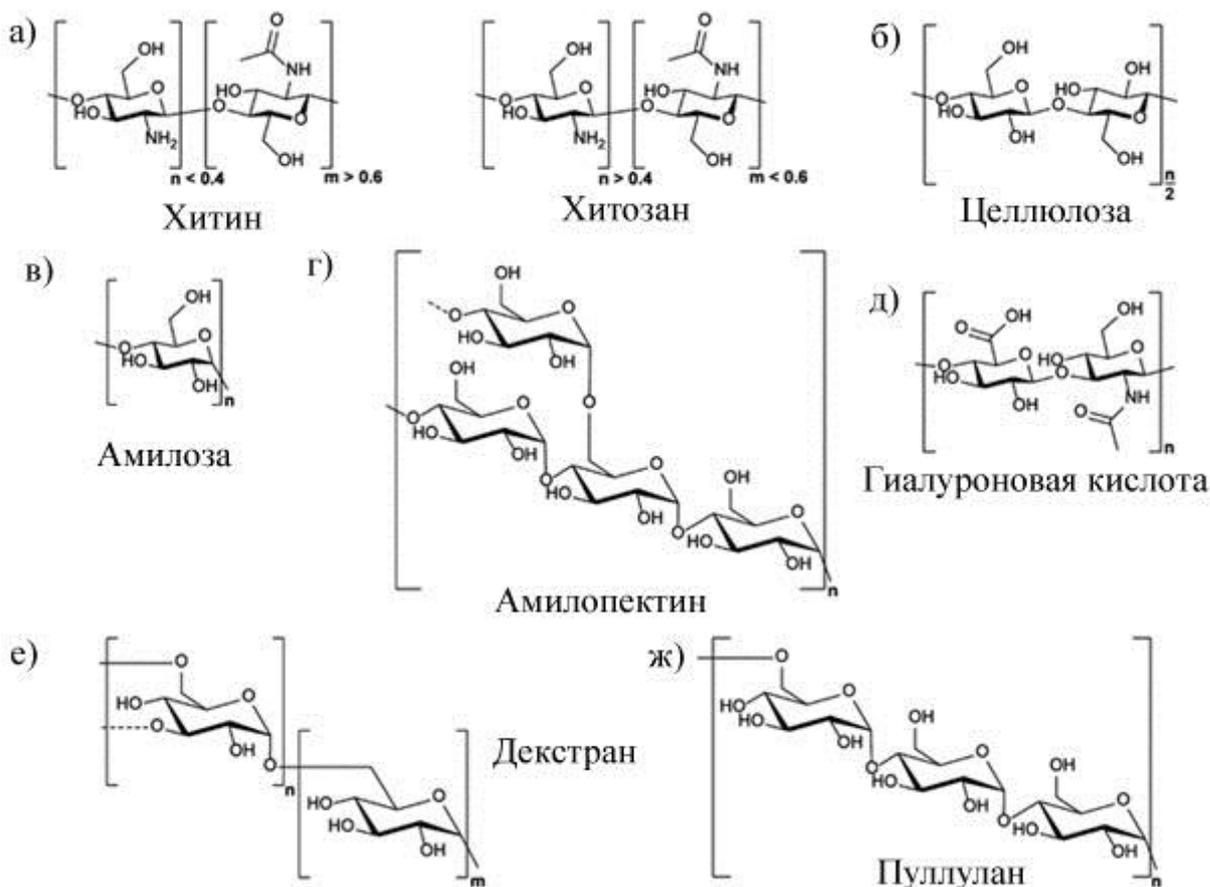


Рисунок 1.6. Структурные формулы полисахаридов: а) хитин и его производное N-деацетилированный хитозан, б) целлюлоза, в) амилоза и г) амилопектин, д) гиалуроновая кислота, е) декстран, ж) пуллулан. [71]

Наличие реакционноспособных групп в составе полисахаридов позволяет легко проводить их химическую или биохимическую модификацию. Природные полисахариды содержат гидроксильные, карбоксильные или аминогруппы, которые определяют заряд полимера и могут вступать в реакцию с функциональными молекулами. Они часто используются в качестве полимеров-модификаторов белковых препаратов, [72] наномедицинских препаратов, [73] неорганических наночастиц, [74] поскольку продлевают время жизни наноагента в кровотоке, сохраняя его целостность и функциональность, придают адсорбционные свойства, позволяя вводить дополнительные компоненты в состав наноконструкта, а также могут обеспечивать нацеливание. [71]

Коломиновая (полисиаловая) кислота

Коломиновая (полисиаловая) кислота представляет собой высокогидрофильный, линейный, отрицательно заряженный полисахарид, состоящий из звеньев α -2,8-связанной N-ацетилнейраминовой кислоты (Рис. 1.7). Это эндогенное соединение, для которого характерна биосовместимость, отсутствие иммуногенности, биоразлагаемость. Использование коломиновой кислоты в качестве полимера-модификатора придает

поверхности наноагентов биомиметические свойства, [70] определяющие длительное время их циркуляции в кровотоке. Это выражается в формировании у поверхности АН ассоциатов с водой, препятствующих нежелательным клеточным взаимодействиям и “узлаванию” ретикулоэндотелиальной системой. Десиалилирование поверхности, наблюдаемое в живых системах, может приводить к немедленному и массовому поглощению мононуклеарными фагоцитами. [75] В организме коломиновая кислота деградирует под действием нейраминидаз до нетоксичных CO_2 и воды.

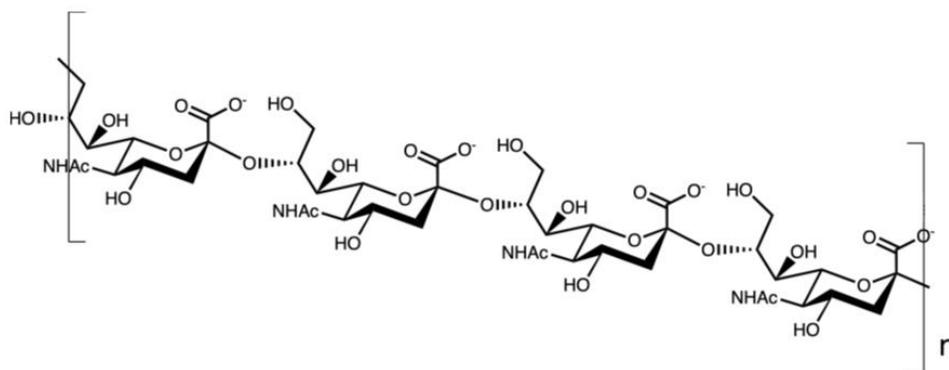


Рисунок 1.7. Структурная формула коломиновой кислоты.

Конъюгация коломиновой кислоты с белковыми молекулами, например, бутирилхолинэстеразой, [76] улучшает фармакокинетику, незначительно снижая активность фермента. Наиболее часто конъюгаты белковых молекул с коломиновой кислотой получают мягким окислением вицинального диола на невосстанавливаемом конце полисахарида с образованием альдегидной группы для прямой реакции с аминогруппой белка или дальнейшей модификации бифункциональными линкерами. [77] Конъюгация коломиновой кислоты, содержащей альдегидную группу, с белками продемонстрирована на примере инсулина, [72] эритропоэтина, дезоксирибонуклеазы I, причем последние два проходили клинические испытания. [78] Стоит отметить, что модификация фрагмента антитела scFv MFE-23 коломиновой кислотой почти в 30 раз увеличила его поглощение опухолевой тканью по сравнению с немодифицированной версией, [79] что свидетельствует о влиянии модификации на тканевую проницаемость. [80] Несмотря на то, что использование коломиновой кислоты в качестве полимера-модификатора поверхности было предложено давно, в литературе отсутствует упоминание о модификации поверхности неорганических наночастиц. Только в 2015 году была предпринята попытка модификации поверхности наночастиц кремния, [81] что позволило получить коллоидно-стабильные нетоксичные наночастицы. Поэтому разработка подходов к модификации поверхности АН коломиновой кислотой остается актуальной задачей.

Гиалуроновая кислота

Гиалуроновая кислота - линейный полисахарид, состоящий из повторяющихся неразветвленных звеньев глюкуроновой кислоты и N-ацетил-D-глюкозамина. Она является основным компонентом внеклеточного матрикса, содержится в соединительной, эпителиальной и нервной ткани. [82] Гиалуроновая кислота широко используется при доставке лекарственных препаратов, модификации поверхности наноносителей, тканевой инженерии благодаря таким свойствам, как биосовместимость, биоразлагаемость, неиммуногенность, отсутствие токсичности и наличие сайтов модификации (карбоксильных и гидроксильных групп). [83] Более того, гиалуроновая кислота может связываться с рецептором CD44, который сверхэкспрессируется во многих типах опухолей, [84] что способствует активному транспорту к опухолевым клеткам.

Однако известно, что период полувыведения нативной гиалуроновой кислоты из плазмы у здоровых людей составляет от 2,5 до 5,5 минут [85] или от нескольких часов до 2–3 дней при введении в ткани, [86] а олигосахариды, образованные в результате метаболизма, могут стимулировать воспаление, индуцировать ангиогенез и инвазию опухоли. [87] Возможным решением является проведение химической модификации гиалуроновой кислоты, направленной на изменение скорости деградации. [88] Так, присоединение аминокислот к карбоксильным или гидроксильным группам гиалуроновой кислоты обеспечивает устойчивость к ферментативному расщеплению, [89] а модификация гидрофобными соединениями в щадящих условиях изменяет скорость деградации и гидрофильные свойства. [88] В частности, был разработан подход к модификации гиалуроновой кислоты глицидилметакрилатом (Рис. 1.8). [90] Такая модификация открыла возможность использовать ее в свободнорадикальных реакциях под действием света, что активно применяется в тканевой инженерии для получения тканеинженерных конструкций.

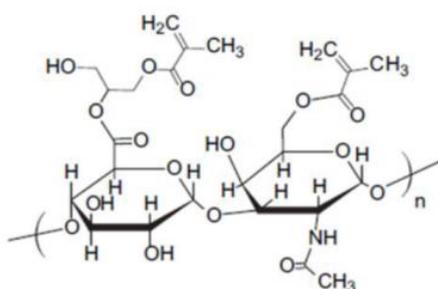


Рисунок 1.8. Структурная формула гиалуроновой кислоты, модифицированной глицидилметакрилатом. [91]

Получение конъюгатов наноагентов и гиалуроновой кислоты было продемонстрировано на примере наночастиц золота, [92] квантовых точек, [93] цисплатина. [94]

1.2.3. Гидрогели, содержащие наночастицы

Наночастицы зарекомендовали себя в качестве систем доставки лекарств, терапевтических или диагностических наноагентов с продолжительной циркуляцией в организме. Разработанные подходы к модификации поверхности природными полимерами позволяют получать наночастицы, проявляющие биомиметические свойства. Наряду с этим все больший интерес представляет создание гибридных материалов на основе включения наночастиц в гидрогели. [95]

Гидрогели обладают исключительной гидрофильностью, биосовместимостью, биоразлагаемостью, обеспечивают физическое сходство с биологическими тканями и инкапсуляцию гидрофильных лекарств. [96,97] Реакция сшивки, приводящая к образованию полимерной сетки, позволяет регулировать механические свойства гидрогеля, а также дает возможность защищать и контролировать высвобождение терапевтических средств. [98] Инкапсуляция наночастиц в матрицу гидрогеля является распространенным подходом к получению полимер-неорганических конструкций для биомедицины. Преимуществами такой стратегии является объединение свойств наночастиц и гидрогелей, что позволяет эффективно использовать их в случаях, когда применение каждого компонента в отдельности не дает требуемого эффекта (Рис. 1.9). [99]

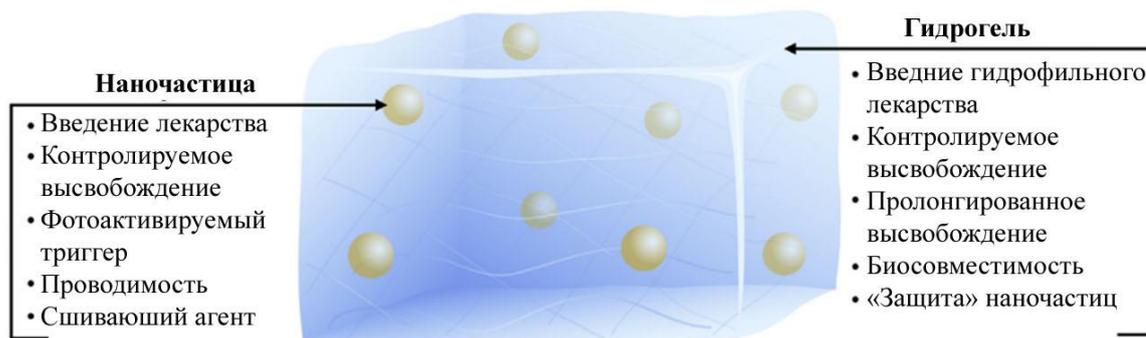


Рисунок 1.9. Конструкции на основе наночастиц и гидрогеля для применения в биомедицине, сочетающие в себе уникальные преимущества входящих в состав компонентов. [99]

1.2.3.1. Получение нанокомпозитных гидрогелей

Различают два уровня конструкций на основе наночастиц и гидрогелей: (i) наногели и гидрогелевые микросферы, содержащие наночастицы и (ii) нанокомпозитные

гидрогели. Формирование на поверхности наночастиц полимерного слоя, способного поглощать и удерживать большое количество воды, широко распространенный подход к получению, так называемых, наногелей. [100] Другим подходом является проведение предварительной реакции сшивки макромолекул [101] для получения гидрогелевых микросфер [102] с последующим введением наночастиц. Наноматериалы на основе гидрогелей хорошо зарекомендовали себя в качестве систем доставки лекарств благодаря большой емкости, пористости и постепенной деградации в условиях организма, обеспечивающей высвобождение терапевтического препарата. [103] Введение в состав гидрогеля стимул-чувствительных агентов, как было продемонстрировано на примере покрытия АН из хитозана, отвержденного с использованием фотодegradируемого агента, [104] позволило дополнительно контролировать высвобождение включенного препарата.

Для получения нанокомпозитных гидрогелей существует несколько стратегий: (i) наночастицы могут быть встроены в гидрогелевую сетку путем смешивания с раствором мономера с последующим гелеобразованием, (ii) включены в состав после образования гидрогеля, или (iii) получены непосредственно в объеме гидрогелевой матрицы. [95] Нанокомпозитные гидрогели, содержащие частицы, позволяют локализовать наноагенты в области патологии и способствовать их постепенному высвобождению, снижая системную токсичность на организм. [95] Включение наночастиц в гидрогели может значительно улучшить механические и биологические свойства полимерных конструкций, используемых в регенеративной медицине. Например, практически отсутствует адгезия клеток на поверхности гидрогелевых структур из ПЭГ, который является одним из активно используемых материалов для тканевой инженерии. Введение наночастиц в состав таких гидрогелей решает эту проблему. [105]

Выделяют две стратегии формирования гидрогелей: (i) получение нековалентно и (ii) ковалентно сшитых гидрогелей. [99] Нековалентно сшитые гидрогели образуются за счет водородных, ионных, гидрофобных или Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий компонентов (полимеров, наночастиц), что не требует дополнительных сшивающих агентов и, благодаря этому, снижает токсичность. Более того, введение наночастиц в составе гидрогеля часто используемый подход для инициирования деградации гидрогеля и высвобождения лекарственного препарата под действием определенного стимула (рН, температуры, УФ-излучения). [106] Главный недостаток такого подхода – недостаточная стабильность нековалентно сшитых гидрогелей в условиях биологического окружения, поскольку изменение параметров среды (рН, температуры) может приводить к разрушению полимерной сетки. Ковалентно сшитые гидрогели получают при проведении химических реакций сшивки, например, ферментативных реакций, реакций

присоединения по Михаэлю, через образование основания Шиффа, в процессе различных видов полимеризации. [99] По сравнению с нековалентно сшитыми гидрогели, полученные химической реакцией сшивки, демонстрируют повышенную стабильность *in vivo*, хорошие механические свойства, а скорость их деградации регулируется изменением концентрации сшивающего агента. В настоящее время одним из наиболее быстроразвивающихся подходов к получению ковалентно сшитых гидрогелей является свободнорадикальная полимеризация, индуцируемая светом.

Фотоиндуцированная реакция сшивки

Формирование гидрогеля в процессе полимеризации, индуцируемой светом, имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами химической сшивки: мягкие условия реакции, пространственно-временной контроль и возможность осуществлять процесс *in situ*. [107] Ключевыми компонентами фотоотверждаемой композиции (ФОК) в таком подходе являются макромономеры, содержащие винильные группы и фотоинициаторы. Наибольшее распространение получили биосовместимые метакрилированные производные ПЭГ, которые характеризуются низкой иммуногенностью [108,109] и метакрилированные природные макромономеры, такие как гиалуроновая кислота [90] и желатин [110] благодаря свойствам биосовместимости и способности к деградации в условиях биологического окружения. Как правило, в качестве возбуждающего излучения используется свет УФ- и видимого диапазона спектра, что накладывает ограничения на глубину, на которую распространяется процесс фотоотверждения, возможность проводить полимеризацию в сильно рассеивающих средах, а также может приводить к фотоповреждению биологической ткани при условии проведения реакции *in situ*. Решением проблемы является подход, в котором для инициирования полимеризации используют свет ближнего инфракрасного диапазона спектра из, так называемого, «окна прозрачности» биоткани (650-1100 нм).

Включение в состав фотокомпозиции АН не только изменяет свойства гидрогеля, но и открывает возможность формирования полимерной конструкции под действием ближнего ИК-излучения благодаря уникальным оптическим свойствам наночастиц. Процесс апконверсии реализуется через реальные метастабильные уровни энергии, поэтому требуются низкоэнергетические источники возбуждающего излучения. [15] Кроме того, возбуждение АН попадает в «окно прозрачности» биологической ткани (650-1100 нм), поэтому процесс фотоотверждения может быть осуществлен с минимальным поглощением и рассеянием непосредственно в области дефекта *in situ*.

Система фотоиницирования АН-инициатор

В случае использования АН, как источников возбуждающего излучения, ключевым компонентом ФОК будет система фотоиницирования АН-фотоинициатор. Настройка на этапе синтеза длин волн эмиссии АН позволяет выбрать подходящий коммерчески доступный фотоинициатор, поглощающий в УФ- и видимом диапазоне спектра и способный генерировать свободные радикалы при возбуждении излучением от наночастиц. Перекрывание длин волн эмиссии наночастиц и поглощения фотоинициатора, эффективность передачи энергии в паре, а также способность фотоинициатора инициировать полимеризацию являются условиями проведения полимеризации.

Фотоинициаторы, активируемые УФ- и видимым светом, разделяют на два типа: инициаторы I типа образуют радикалы в процессе гомолитической диссоциации, а к инициаторам II типа относятся системы, состоящие из пары фотоинициатор и соинициатор. В случае инициаторов II типа генерация радикалов реализуется по более сложному механизму: возбуждение молекулы светом запускает процесс гомолитического распада двойной связи или отщепления атома водорода, приводящий к образованию соответствующих радикалов. [111] В системе иницирования АН-фотоинициатор представлены фотоинициаторы как I, так и II типа, однако для использования *in situ* наибольшее внимание уделено инициаторам I типа, поскольку реализуется более простой механизм образования радикала. Например, с использованием ИК-индуцированной полимеризации при участии апконвертирующих наночастиц и эозина Y (II тип) были получены гидрогелевые микросферы из диакрилата полиэтиленгликоля (ПЭГ-ДА). [112] Макрополимерные структуры из ПЭГ-ДА были получены с использованием систем АН-Irgacure-819 (I тип), [113] АН-Irgacure 784 (I тип), [114] а гидрогидрогели из метакрилизованного желатина, имеющие большой потенциал для тканевой инженерии, формировали с использованием системы АН - LAP (I тип). [115]

1.3. Применение наночастиц в биомедицине

АН находят применение в решении задач биомедицины: биовизуализации, [116] разработке систем доставки лекарств, [22] фототермической [117] и фотодинамической терапии, [118] тканевой инженерии. [115]

1.3.1. Визуализация

Флуоресцентная визуализация активно используется в ранней диагностике тяжелых заболеваний. Высокое пространственно-временное разрешение, чувствительность в сочетании с широким выбором флуоресцентных меток позволяет проводить исследование как на молекулярном уровне, так и в масштабе целого организма. Отличительной особенностью является относительно низкая стоимость исследования,

малая инвазивность и возможность сочетать оптическую визуализацию с другими методами. [119] При этом визуализация в ближнем инфракрасном диапазоне спектра – относительно новый метод биомедицинской визуализации, который позволяет проводить исследование в глубине биологической ткани, что обусловлено попаданием возбуждающего и испускаемого флуоресцентными метками излучения в “окно прозрачности” биоткани (650-1100 нм) и снижению рассеяния, фототоксичности и исключению автофлуоресценции. [120]

Использование химически и оптически стабильных, биосовместимых АН для визуализации отдельных клеток и лимфатических сосудов было продемонстрировано на примере подкожного введения АН, модифицированных фосфатидилхолином и цианиновым красителем Cy-7, усиливающим фотолюминесцентный сигнал от наночастиц. [121] Что касается визуализации раковых опухолей при системном введении визуализирующих агентов на основе наночастиц, к последним предъявляется ряд дополнительных требований. Прежде всего, АН, поверхность которых модифицирована биосовместимыми полимерами, должны оставаться неузнанными иммунной системой организма и не подвергаться ферментативному расщеплению. Для повышения эффективности их накопления в целевой области необходимо минимизировать попадание флуоресцентных меток в нецелевые органы (печень, почки, селезенку, легкие).

Различают два механизма доставки наночастиц в опухолевые ткани: пассивный и активный. Пассивный механизм доставки основан на эффекте повышенной проницаемости и удерживания (EPR-эффект, EPR- enhanced permeability and retention»), связанном с аномальным ангиогенезом, неконтролируемой гиперваскуляризацией и нарушением лимфатической дренажной системы. [122] Например, АН, модифицированные олигонуклеотидами для иммунотерапии раковой опухоли, были доставлены в целевую область за счет EPR-эффекта, что позволило значительно снизить системную токсичность и контролировать иммуномодулирующую активность с высокой пространственно-временной точностью. [123] Для увеличения избирательности внутриклеточного накопления и времени удержания используют, так называемый, активный механизм доставки наночастиц. Он основан на создании конъюгатов наночастиц с белковыми молекулами, способными избирательно связываться с определенным типом рецепторов, сверхэкспрессируемых на поверхности опухолевых клеток. [124] Такой подход к доставке АН, конъюгированных с фолиевой кислотой, был продемонстрирован на примере опухоли на основе клеток линии HeLa, гиперэкспрессирующих фолатные рецепторы. [125]

Несмотря на впечатляющие достижения, оптическая визуализация по-прежнему имеет ограничения по разрешению и трехмерной реконструкции. Повысить эффективность исследований возможно путем сочетания оптических с другими методами, такими как магнитно-резонансная томография (МРТ), рентгеновская компьютерная томография (КТ), позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ), однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ) и фотоакустическая визуализация. [15,126] Например, были разработаны мультимодальные наночастицы для визуализации опухолевого ангиогенеза на основе АН состава $\text{NaLuF}_4:\text{Yb,Tm}@ \text{NaGdF}_4:^{153}\text{Sm}$, где Lu использовался для компьютерной томографии, Tm для флуоресцентной визуализации, Gd для МРТ, а радиоизотоп ^{153}Sm для ОФЭКТ (Рис. 1.10). [127]

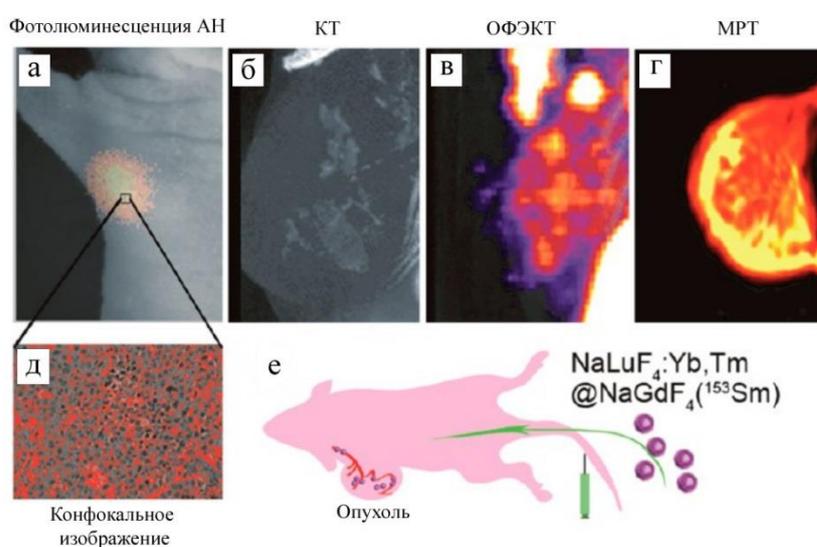


Рисунок 1.10. Четырехмодальная визуализация раковой опухоли у мыши через 1 час после внутривенной инъекции дисперсии наночастиц $\text{NaLuF}_4:\text{Yb,Tm}@ \text{NaGdF}_4:^{153}\text{Sm}$. [127]

1.3.2. Терапия

Модификация поверхности АН открывает широкий спектр возможностей их использования как терапевтической наноплатформы. Они могут быть использованы в качестве носителей лекарственных препаратов с контролируемым высвобождением и непрерывным мониторингом распределения в организме, агентов фототермической или фотодинамической терапии и т.д.

Доставка лекарств

Одним из перспективных направлений развития современной наномедицины является разработка систем доставки лекарств с контролируемым высвобождением. При этом особое внимание уделяется наноплатформам, реагирующим на стимул, что позволяет точно регулировать время, место и дозу препарата. [128] Среди ряда стимулов

(рН, температура, магнитное поле и т.д.) предпочтение отдается свету, как внешнему триггеру с пространственно-временной настройкой. [22]

Источники излучения ближнего ИК-диапазона спектра не оказывают отрицательного воздействия на физиологические функции биологической ткани и могут инициировать процесс на значительной глубине в отличие от УФ- и видимого света. [129,130] Поэтому АН, эффективно преобразующие ближнее ИК-излучение в УФ- и видимый свет, являются идеальной наноплатформой для разработки систем доставки лекарств, позволяющей отслеживать и контролировать количественное высвобождение в режиме реального времени за счет изменения интенсивности антистоксовой эмиссии. [131] Для них характерна возможность возбуждения флуоресценции на глубине биоткани, отсутствие фотоповреждения возбуждающим излучением, фотостабильность, биосовместимость, и отсутствие токсичности. [132]

Были разработаны различные подходы для включения фармацевтических препаратов в состав систем доставки на основе АН за счет формирования ковалентных связей или физической адсорбции. Например, АН, модифицированные диоксидом кремния, были использованы для доставки ибупрофена и контроля его высвобождения по тушению флуоресценции наночастиц. [133] В другой работе было показано высвобождение красителя нильского красного при УФ-индуцированной диссоциации полимерного покрытия (блок сополимера полиэтиленоксида и поли(4,5-диметокси-2-нитробензилметакрилата) после облучения АН светом из ближнего ИК-диапазона. [134] Кроме того, Fedoryshin L.L. и соавторы продемонстрировали создание фотодegradуемого конъюгата АН с химиотерапевтическим препаратом 5-фторурацила. Поверхность АН была модифицирована о-фосфорилэтаноламином для формирования ковалентной связи с нитробензильной производной 5-фторурацила. Возбуждение наночастиц ближним ИК-излучением и эмиссия в УФ- и видимом диапазоне спектра приводила к фотораспаду нитробензильных звеньев и высвобождению лекарственного препарата. [135]

Фототермическая терапия

Фототермическая терапия – эффективный подход к неинвазивной терапии, основанный на повышении температуры опухолевой ткани под воздействием внешнего света. Для этого обычно используют органические или неорганические наноагенты, преобразующие световую энергию в тепловую. [136] При этом переход к ближнему ИК-излучению повышает эффективность терапии благодаря большей глубине воздействия.

АН могут выступать в качестве фототермических агентов благодаря присутствию в составе иона Yb^{3+} с большим сечением поглощения света. [137] Накопление наночастиц

в опухолевой ткани и последующее воздействие излучения на длине волны 970-980 нм вызывает локальную гипертермию биологической ткани (T выше 42°C), приводящую к ингибированию раковой опухоли и гибели патогенных клеток с минимальным побочным действием на нормальные клетки. [138] Фототермические свойства АН можно усилить за счет комплексообразования с наночастицами, имеющими большое сечение поглощения (золото, серебро, углерод и др.). [126] Например, объединение АН и наноточек Ag_2Se привело к получению многофункциональных композитов для фототермической терапии и визуализации раковых опухолей. [139] В другом исследовании была продемонстрирована эффективная терапия солидной опухоли под действием ближнего ИК-излучения с использованием АН, декорированных наночастицами золота. [140]

1.3.3. Тканевая инженерия

Создание имплантируемых материалов методами тканевой инженерии широко распространенная практика, позволяющая одновременно решать такие задачи, как диагностика и терапия сердечно-сосудистых, [141] неврологических [142] и ортопедических [142] заболеваний наряду с восстановлением поврежденных тканей или целых органов. Поскольку хирургическое вмешательство при имплантации биоматериалов крайне травматично и может вызывать осложнения и развитие инфекционных заболеваний, [143] остро стоит вопрос о разработке методов получения тканеинженерных конструкций *in situ*. На сегодняшний день используют методы 3D-печати, основанные на фотоотверждении жидкой композиции под действием УФ-света, что позволяет получать материалы быстро, экономично и с высокой точностью. Однако недостаточная глубина проникновения в ткани и фототоксичность для клеток ставят вопрос о переходе к более спектрально выгодным источникам излучения из ближней ИК-области спектра. [144]

Разработка фотоотверждаемых композиций, содержащих АН, открывает возможность формирования полимерной конструкции под действием ближнего ИК-излучения. Преимуществом такого подхода является использование низкоэнергетических источников и попадание возбуждающего ИК-излучения в “окно прозрачности” биоткани, что обеспечивает более глубокое проникновение света, не приводит к фотоповреждению клеток и открывает возможность проведения реакции *in situ*. [145] Например, недавно была продемонстрирована малоинвазивная 3D-печать тканеинженерных конструкций *in vivo*. [115] Фотоотверждаемая композиция на основе метакрилированного желатина, АН и хондроцитов была введена подкожно. Обработка ближним ИК-излучением позволила сформировать конструкцию сложной геометрии (в форме человеческого уха) непосредственно в требуемой области, не приводя при этом к гибели клеток. В другой

работе был продемонстрирован схожий подход к получению фотоотверждаемой композиции на основе производных желатина, содержащих винильные группы, и акрилатов для восстановления критического костного дефекта. Имплантаты индивидуальной формы были получены при облучении фотокомпозиции с АН по программно заданной траектории лазерного луча в месте перелома *in situ* (Рис. 1.11). [145]

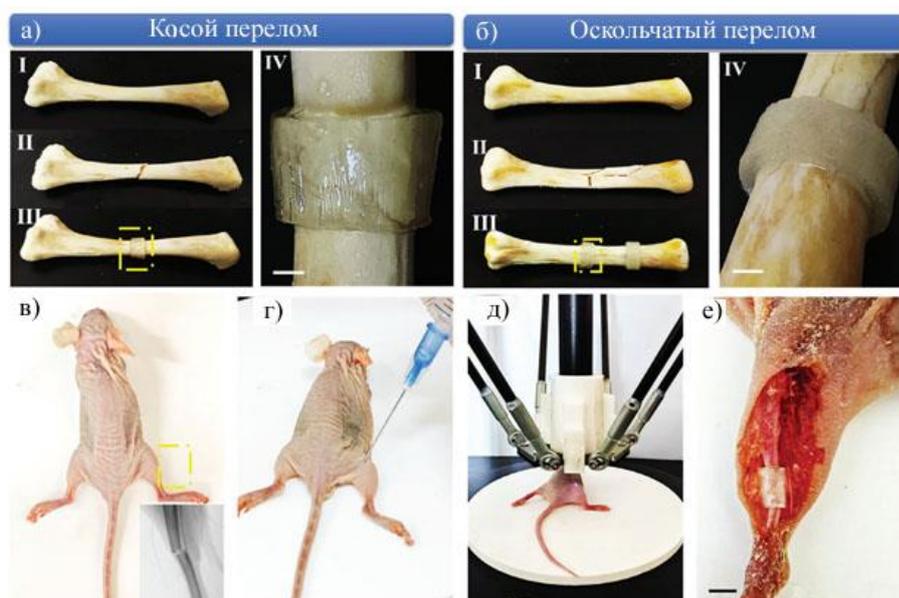


Рисунок 1.11. Неинвазивная технология 3D-биопечати с использованием АН для фиксации переломов. [145]

В литературном обзоре продемонстрированы основные свойства апконвертирующих наночастиц, подходов к их модификации и функционализации поверхности биосовместимыми полимерам, а также приведены примеры применения АН в биомедицине. Показано, что, несмотря на большое разнообразие методов, получение биосовместимых наноконструкций с длительным временем циркуляции в кровотоке все еще остается нерешенной задачей. Актуальной остается разработка подходов к созданию наноконструкций сочетанного действия для мультимодальной терапии и визуализации. Большой потенциал имеет полимеризация под действием света ближнего ИК-диапазона спектра, которая может быть реализована благодаря уникальным свойствам АН, что позволит получать полимерные структуры как на основе синтетических, так и природных полимеров для решения задач тканевой инженерии. В диссертационной работе представлены подходы для решения данных актуальных задач с использованием единой платформы в виде АН.

Глава 2. Материалы и методы

2.1. Материалы

Полиэтиленимин (ПЭИ, $M_n = 25$ кДа), N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимид (EDC), олеиновая кислота (ОК), 1-октадецен (ОД), натриевая соль гиалуроновой кислоты (ГК, $M_n \approx 100$ кДа), желатин (Жел), гидроксид тетраметиламмония (ТМАГ), этилендиамин (ЭДА), глицидилметакрилат (ГМА), триэтиламин (ТЭА), триэтаноламин (ТЭОА), сополимер малеинового ангидрида и октадецена (СМАО, $M_n 30$ кДа), поли-N-винилкапролактан (ПВК, $M_n 30$ кДа), танин, нитриат серебра ($AgNO_3$), тетрагидроборат натрия ($NaBH_4$), гексаметилендиамин, диакрилат полиэтиленгликоля ($M_n 575, 700$ Да), фенил-2,4,6-триметилбензоилфосфинат лития (LAP), 2-бензил-2-(диметиламино)-1-[4-(морфолинил)фенил]-1-бутанон (Irgacure 369), родамин Б фирмы Merck и коломиновую кислоту (КолК, $M_n 30$ кДа) фирмы GERBU использовали без предварительной очистки. Ацетон, хлороформ, гексан, диметилсульфоксид (ДМСО), диметилформамид (ДМФА), изопропиловый спирт, этанол, бромид калия (KBr) компании Химмед (Россия) использовали без предварительной очистки. 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил (ДФПГ, 97%) был приобретен в Hangzhou Dingyan Chem Co., Ltd (Китай). Доксорубин из препарата «Доксорубин-Эбеве» производства Ebewe Pharma GmbH Nfg.KG (Австрия). Флавинмоноклеотид (ФМН) из препарата «Рибофлавин-моноклеотид» производства Фармстандарт, амфотерицин В производства ОАО Синтез. Клеточную среду Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) или RPMI 1640, дополненную 10% фетальной бычьей сывороткой и пенициллин-стрептомицином (5000 ед/мл пенициллина G и 5000 мкг/мл стрептомицина). Физиологический раствор (0,9% NaCl) или солевой натрий-фосфатный буфер (PBS, pH 7.2), краситель МТТ (3-(4,5-диметилазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид) (ПанЭко, Россия).

2.2. Методы

2.2.1. Синтез АН

Апконвертирующие наночастицы $NaYF_4:Yb^{3+}/Tm^{3+}$ структуры ядро/оболочка, стабилизированные олеиновой кислотой, были синтезированы совместно с Николаевой М.Е., ООО «Синтол», Москва.

Смесь оксидов редкоземельных элементов: Y_2O_3 (310 мг), Yb_2O_3 (140 мг) и Tm_2O_3 (4 мг), а также 3 мл трифторуксусной кислоты и 1 мл воды помещали в треххлорловую колбу и выдерживали при нагревании до полного растворения оксидов. Затем смесь высушивали на роторном испарителе при $50^\circ C$.

К полученным трифторацетатам добавляли трифторацетат натрия (780 мг), 15 мл 1-октадецена и 15 мл олеиновой кислоты. Раствор нагревали до 100°C и перемешивали под вакуумом в течение 40 мин для дегазации и удаления воды. Затем смесь постепенно нагревали до 340°C в сплаве Розе и выдерживали при этой температуре 30 мин в атмосфере аргона. Затем смесь охлаждали добавлением 15 мл 1-октадецена. После охлаждения до комнатной температуры добавляли 15 мл изопропанола и центрифугировали при 6000 об/мин в течение 20 мин. Полученные наночастицы дважды промывали изопропанолом.

На второй стадии синтеза наночастицы покрывали инертной оболочкой. Для этого в колбу помещали трифторацетат натрия (234 мг), трифторацетат иттрия (650 мг), 15 мл олеиновой кислоты, 15 мл 1-октадецена и дисперсию полученных наночастиц. Полученную смесь нагревали до 100°C и перемешивали под вакуумом для удаления легколетучих растворителей в течение 40 мин. Затем смесь нагревали до 340°C, выдерживали 30 мин в сплаве Вуда в атмосфере аргона и охлаждали до комнатной температуры. Полученные наночастицы со структурой ядро/оболочка центрифугировали при 6000 об/мин в течение 20 мин.

2.2.2. Гидрофилизация АН

2.2.2.1. АН-ТМАГ

Дисперсию АН в хлороформе (40 мкл, 20 мг/мл) добавляли к 1 мл водному раствору ТМАГ (3 мг/мл), перемешивали и озвучивали до полного испарения хлороформа. Полученные наночастицы были трижды отмыты путем осаждения на центрифуге (13400 об/мин, 10 минут) и замены надосадочной жидкости на дистиллированную воду.

2.2.2.2. АН-ПЭИ

К 40 мкл дисперсии АН в хлороформе (20 мг/мл) добавляли 90 мкл раствора ПЭИ в хлороформе (16 мг/мл). Смесь перемешивали, озвучивали и инкубировали при постоянном перемешивании при комнатной температуре в течение 60 минут. Затем смесь по каплям переводили в 1 мл воды, озвучивали до полного испарения хлороформа. Полученные пробы были трижды отмыты путем осаждения на центрифуге (13400 об/мин, 10 минут) и замены надосадочной жидкости на дистиллированную воду.

2.2.2.3. АН-СМАО

К 40 мкл дисперсии АН, имеющих средний размер 90 нм, в хлороформе (20 мг/мл) добавляли 130 мкл раствора СМАО в хлороформе (8 мг/мл). Соотношение концентрации наночастиц и СМАО подбирали таким образом, чтобы гидрофилизирующий агент покрыл всю поверхность одиночных наночастиц, т.е.

гидрофилизацию проводили в избытке СМАО. Смесь перемешивали, озвучивали и инкубировали при постоянном перемешивании при комнатной температуре в течение 60 минут. К полученной дисперсии добавляли 2 мкл раствора гексаметилендиамина в хлороформе (2 мг/мл) и инкубировали при постоянном перемешивании еще 60 минут. Затем смесь по каплям переводили в 1 мл воды, озвучивали до полного испарения хлороформа. Полученные пробы были трижды отмыты путем осаждения на центрифуге (13400 об/мин, 10 минут) и замены надосадочной жидкости на дистиллированную воду.

2.2.2.4. Получение агрегатов полимерных мицелл СМАО с АН

К 40 мкл дисперсии АН, имеющих средний размер 28 нм, в хлороформе (20 мг/мл) добавляли 130 мкл раствора СМАО в хлороформе (8 мг/мл). Соотношение концентрации наночастиц и СМАО подбирали таким образом, чтобы гидрофилизирующий агент был в недостаточном количестве для покрытия всей поверхности наночастиц, гидрофилизация происходила после формирования полимерных мицелл СМАО, путем включения в них гидрофобных АН. Смесь перемешивали, озвучивали и инкубировали при постоянном перемешивании при комнатной температуре в течение 60 минут. К полученной дисперсии добавляли 2 мкл раствора гексаметилендиамина в хлороформе (2 мг/мл) и инкубировали при постоянном перемешивании еще 60 минут. Затем смесь по каплям переводили в 1 мл воды, озвучивали до полного испарения хлороформа. Полученные пробы были трижды отмыты путем осаждения на центрифуге (13400 об/мин в течение 10 минут) и замены надосадочной жидкости на дистиллированную воду.

2.2.3. Получение конструкций, модифицированных биосовместимыми полимерами

2.2.3.1. Модификация АН ПЭГ-ДГЭ

Полученные в 2.2.2.4 АН-СМАО (1 мл, 0.8 мг/мл) осаждали на центрифуге (13400 об/мин, 10 минут), надосадочную жидкость заменяли водным диглицидилового эфира полиэтиленгликоля (ПЭГ-ДГЭ, 1 мл, 0.3 мг/мл). Смесь инкубировали при комнатной температуре при постоянном перемешивании в течение 24 ч. Полученные образцы отмывали от непрореагировавшего полимера путем центрифугирования (13400 об/мин, 10 минут) с последующей заменой надосадочной жидкости солевым натрий-фосфатным буфером (PBS, 1 мл, pH 7.2).

2.2.3.2. Модификация АН КолК-СНО

Альдегидное производное коломиновой кислоты (КолК-СНО) было синтезировано в лаборатории Углеводов под руководством д.х.н. Бовина Н.В. ИБХ РАН.

Полученные в 2.2.2.3 АН-ПЭИ (1 мл, 0.8 мг/мл) осаждали на центрифуге (13400 об/мин, 10 минут), надосадочную жидкость заменяли к раствором КолК-СНО (0.2 мл, 7 мг/мл) в боратном буфере (рН 8.4). Смесь инкубировали при 4°C в течение 24ч. Полученные образцы отмывали от непрореагировавшего полимера путем центрифугирования (13400 об/мин, 10 минут) с последующей заменой надосадочной жидкости солевым натрий-фосфатным буфером (PBS, 1мл, рН 7.2).

2.2.3.3. Модификация АН КолК (+/-)

Полученные в 2.2.2.3 АН-ПЭИ (1 мл, 0.8 мг/мл) осаждали на центрифуге (13400 об/мин, 10 минут), надосадочную жидкость заменяли водным раствором коломиновой кислоты (КолК, 1 мл, 7 мг/мл). Смесь инкубировали при комнатной температуре при постоянном перемешивании в течение 1 ч. Полученные образцы отмывали от непрореагировавшего полимера путем центрифугирования (13400 об/мин, 10 минут) с последующей заменой надосадочной жидкости солевым натрий-фосфатным буфером (PBS, 1мл, рН 7.2).

2.2.3.4. Модификация АН КолК-КДИ

Модификацию АН КолК-КДИ проводили в две стадии. На первом этапе проводили карбодиимидную активацию КолК: к раствору КолК (0.2 мл, 7 мг/мл) в буфере MES (2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота, рН 6.2) добавляли N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDC, 1 мг) и выдерживали 15 минут при 0°C, после чего отмывали КолК-КДИ от побочных продуктов центрифугированием с помощью центрифужных фильтров Amicon Ultra (Millipore). На втором этапе к активированному сложному эфиру (КолК-КДИ) добавляли полученные в 2.2.2.3 АН-ПЭИ (1 мл, 0.8 мг/мл) в солевом натрий-фосфатным буфере (PBS, 1мл, рН 7.2) и инкубировали в течение 24 ч при 4°C. Полученные образцы отмывали от непрореагировавшего полимера путем центрифугирования (13400 об/мин, 10 минут) с последующей заменой надосадочной жидкости солевым натрий-фосфатным буфером (PBS, 1мл, рН 7.2).

2.2.3.5. Включение флуоресцентной метки (Родамина Б) в АН-КолК

Включение флуоресцентной метки (флуоресцентного красителя родамина Б) проводили путем адсорбции красителя на АН-КолК и АН ПЭГ-ДГЭ. К водным дисперсиям АН-КолК и АН-ПЭГ-ДГЭ (1 мл, 0.8 мг/мл) добавляли водный раствор красителя (100 мкл, 5мг/мл) и инкубировали при постоянном перемешивании в течение 30 минут при комнатной температуре. Для удаления свободного красителя полученные образцы отмывали центрифугированием (13400 об/мин, 10 минут) с последующей заменой надосадочной жидкости дистиллированной водой. Процедуру удаления свободного родамина Б повторяли трижды.

Для определения количества родамина Б, включенного в наноконструкции, проводили спектрофотометрическое измерение разницы между концентрацией добавленного и непрореагировавшего красителя в надосадочной жидкости после удаления наночастиц центрифугированием (13400 об/мин, 10 минут). Измерение поглощения проводили на длине волны 550 нм. Концентрация родамина Б в наноконструкции АН-КолК(+/-) составила 0.29 мг/мл или ~1100 молекул красителя на одну наночастицу. В случае АН-КолК-КДИ концентрация родамина Б составила 0.31 мг/мл или ~1200 молекул красителя на одну наночастицу.

2.2.3.6. Модификация АН-СМАО термочувствительным полимером ПВК

Полученные в 2.2.2.5 агрегаты мицелл СМАО с включенными АН (1 мл, 0.8 мг/мл) осаждали на центрифуге (13400 об/мин, 10 минут), надосадочную жидкость заменяли водным раствором поли(N-винилкапролактама) (ПВК, 1 мл, 4 мг/мл). Смесь инкубировали при комнатной температуре при постоянном перемешивании в течение 1 ч, затем добавляли 0,002 мг танина в качестве сшивающего агента и перемешивали еще 10 мин. Полученные образцы отмывали от непрореагировавшего полимера путем центрифугирования (13400 об/мин, 10 минут) с последующей заменой надосадочной жидкости дистиллированной водой.

2.2.3.7. Введение доксорубина в АН-СМАО-ПВК

Для введения цитостатического препарата, доксорубина в состав наноконструкций АН-СМАО-ПВК, полученных как описано в 2.2.3.6, к дисперсии наночастиц в солевом натрий-фосфатном буфере (1 мл, 0.8 мг/мл, рН 7.2) добавляли раствор доксорубина (200 мкл, 2 мг/мл) и инкубировали в течение 30 минут при постоянном перемешивании. Для удаления свободного доксорубина полученные образцы отмывали центрифугированием (13400 об/мин, 10 минут) с последующей заменой надосадочной жидкости солевым натрий-фосфатным буфером (PBS, 1 мл, рН 7.2). Процедуру удаления свободного доксорубина повторяли трижды.

2.2.3.8. Декорирование АН-ПМАО-ПВК наночастицами серебра

Для формирования наночастиц серебра на поверхности наноконструкций к дисперсии АН-СМАО-ПВК в воде (1 мл, 0.8 мг/мл) в присутствии аммиака (5 мкл, 0,1 М) добавляли нитрат серебра (AgNO_3 , 160 мкл, 2,5 мг/мл) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Для удаления свободных ионов серебра, не адсорбированных на поверхности АН-СМАО-ПВК, образцы центрифугировали (13400 об/мин, 10 минут), а надосадочную жидкость заменяли дистиллированной водой. Затем к дисперсии наноконструкций в воде добавляли восстановитель боргидрид натрия (20 мкл, 1 мг/мл) и инкубировали в течение 24 ч при комнатной температуре. Полученные образцы отмывали

центрифугированием (13400 об/мин, 10 минут) с последующей заменой надосадочной жидкости солевым натрий-фосфатным буфером (PBS, 1мл, pH 7.2). Успешное декорирование поверхности АН-ПМАО-ПВК наночастицами серебра было подтверждено с использованием просвечивающей электронной микроскопии и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии.

2.2.3.9. Исследование высвобождения доксорубина из АН-ПМАО-ПВК

Определение степени высвобождения доксорубина из наноконструкций АН-СМАО-ПВК проводили спектрофотометрически путем измерения оптического поглощения свободного доксорубина в надосадочной жидкости в диапазоне длин волн 300-700 нм после удаления наночастиц центрифугированием (13400 об/мин, 10 минут). Концентрацию рассчитывали по калибровочному графику, как разницу между концентрацией введенного и высвобожденного доксорубина.

2.2.3.10. Получение наноконструкции АН-ФМН

Наноконструкции АН-ФМН получали в несколько этапов. Полученные в 2.2.2.1 АН-ТМАГ (1 мл, 0.8 мг/мл) осаждали на центрифуге (13400 об/мин, 10 минут), надосадочную жидкость заменяли водным раствором этилендиамина (ЭДА, 1 мл, 3 мг/мл) и инкубировали в течение 24 ч. Полученные образцы отмывали от непрореагировавшего ЭДА путем центрифугирования (13400 об/мин, 10 минут) с последующей заменой надосадочной жидкости водным раствором флавинмононуклеотида (ФМН, 1 мл, 10 мг/мл) и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Избыток ФМН удаляли центрифугированием (13400 об/мин, 10 минут) с последующей заменой надосадочной жидкости водой. Процедуру повторяли трижды.

2.2.3.11. Получение наноконструкции АН-ФМН-ГМА

Полученные в 2.2.3.9 наноконструкции АН-ФМН (1 мл, 0.8 мг/мл) осаждали на центрифуге (13400 об/мин, 10 минут), надосадочную жидкость заменяли диметилсульфоксидом (ДМСО), добавляли ГМА (20 мкл) и инкубировали в течение 24 ч. Иммуобилизация ГМА на поверхности АН проходила по реакции между эпоксидной группой ГМА и аминогруппой ЭДА.

2.2.3.12. Модификация АН ПЭГ-ДА методом ИК-индуцированной полимеризации

К наноконструкциям АН-ФМН-ГМА (1 мл, 0.8 мг/мл) добавляли диакрилат полиэтиленгликоля (ПЭГ-ДА (575 Да, 60, 80, 100 или 120 мкМ) и триэтанолламин (ТЭОА, 2 мкл, 1 мг/мл) и тщательно перемешивали. Фотоолимеризацию проводили в сканирующем режиме облучения при мощности лазера 20 Вт/см² в течение 45 мин. Полученные образцы отмывали от непрореагировавшего олигомера путем

центрифугирования (13400 об/мин, 10 минут) с последующей заменой надосадочной жидкости водой.

2.2.4. Формирование системы на основе наноконструкции АН-фотоинициатор для инициирования реакции ИК-полимеризации в объеме

2.2.4.1. Фотоотверждаемая композиция на основе АН, ПЭГ-ДА и фотоинициатора, растворимого в воде (LAP)

Для получения системы инициирования реакции ИК-полимеризации в объеме, 210 мкл ПЭГ-ДА (Мм 700 Да) добавляли к 6 мг гидрофобных АН, диспергированных в гексане (20 мкл), обрабатывали ультразвуком и перемешивали до получения гомогенной дисперсии. Полученную дисперсию смешивали с предварительно растворенным в воде фотоинициатором (LAP, 2.4 мг, 90 мкл H₂O) до объединения компонентов и получения прозрачной дисперсии.

2.2.4.2. Фотоотверждаемая композиция на основе АН, ПЭГ-ДА и фотоинициатора, нерастворимого в воде

Для получения системы инициирования реакции ИК-полимеризации в объеме, 210 мкл ПЭГ-ДА (Мм 700 Да) добавляли к 6 мг гидрофобных АН, диспергированных в гексане (20 мкл), и 0.6 мл фотоинициатора (Irgacure 369), обрабатывали ультразвуком и перемешивали до получения гомогенной дисперсии. К полученной дисперсии добавляли 90 мкл H₂O), озвучивали и перемешивали до объединения компонентов и получения прозрачной дисперсии.

2.2.4.3. Модификация гиалуроновой кислоты (ГК) глицидилметакрилатом (ГМА)

Для введения в ГК звеньев с винильными групп проводили полимераналогичную реакцию с ГМА, при которой происходило взаимодействие карбоксильной и гидроксильной групп ГК с эпоксигруппой ГМА. Навеску гиалуроновой кислоты (ГК) 1 мг растворяли в 100 мл деионизированной воды. К водному раствору ГК добавляли 0.5 мл пенициллин-стрептомицина и 0.125 мл амфотерицина В. Для формирования водно-органической реакционной среды к водному раствору ГК добавляли 50 мл ДМФА. После тщательного перемешивания в реакционную смесь вводили 18 мл ГМА. Полученную смесь оставляли при постоянном перемешивании на 48 часов при 30°C. Для остановки реакции и выделения конечного продукта модифицированную ГМА ГК (ГК-ГМА) осаждали в 7-кратном избытке ацетона и смеси этилацетата (в объемном соотношении 5:2 соответственно). Полученный осадок растворяли в дистиллированной воде и диализовали против 15-кратного избытка дистиллированной воды в течение четырех дней с ежедневной сменой воды. После очистки ГК-ГМА лиофилизовали до полного удаления

воды. Степень замещения определяли по ранее разработанному методу с использованием KMnO_4 . [91]

2.2.4.4. Модификация желатина (Жел) глицидилметакрилатом (ГМА)

Модификацию желатина (Жел) ГМА проводили аналогично модификации гиалуроновой кислоты ГМА (2.2.4.3) с некоторыми изменениями. Навеску Жел 2.5 мг растворяли в 100 мл деионизированной воды. К водному раствору ГК добавляли 0.5 мл пенициллин-стрептомицина и 0.125 мл амфотерицина В. После полного растворения Жел добавляли 60 мл ДМФА для формирования водно-органической реакционной среды. После тщательного перемешивания добавляли 30 мл ГМА. Полученную смесь оставляли на 72 часа при 40°C и постоянном перемешивании. Для остановки реакции и выделения конечного продукта модифицированный ГМА Жел (Жел-ГМА) осаждали в 7.5-кратном избытке изопропилового спирта и смеси ацетона (в объемном соотношении 2:1 соответственно). Полученный осадок растворяли в дистиллированной воде и диализовали против 15-кратного избытка дистиллированной воды в течение четырех дней с ежедневной сменой воды. После очистки ГК-ГМА лиофилизировали до полного удаления воды.

2.2.4.5. Фотоотверждаемая композиция на основе АН, ПЭГ-ДА, нерастворимого в воде фотоинициатора (Irgacure 369) и ГК-ГМА

Для получения композиции для ИК-индуцированной полимеризации использовали систему фотоиницирования на основе АН, ПЭГ-ДА и фотоинициатора не растворимого в воде (Irgacure 369), полученную в 2.2.4.2. К 125 мкл ПЭГ-ДА добавляли 12 мг АН, диспергированных в минимальном объеме гексана (20 мкл) и обрабатывали ультразвуком, до тех пор, пока дисперсия не становилась однородной. Затем к дисперсии добавляли 1.4 мг Irgacure 369 и перемешивали до полного растворения фотоинициатора. К полученной смеси добавляли 390 мкл 10% водного раствора ГК-ГМА, обрабатывали ультразвуком и перемешивали, пока фотоотверждаемая композиция не становилась однородной.

2.2.4.6. Фотоотверждаемая композиция на основе АН, ПЭГ-ДА, растворимого в воде фотоинициатора (LAP) и Жел-ГМА

Для получения композиции для ИК-индуцированной полимеризации использовали систему фотоиницирования на основе АН, ПЭГ-ДА и растворимого в воде фотоинициатора (LAP), полученную в 2.2.4.1. К 125 мкл ПЭГ-ДА добавляли 20 мг АН, диспергированных в минимальном объеме гексана (20 мкл) и обрабатывали ультразвуком, до тех пор, пока дисперсия не становилась однородной. Затем к дисперсии добавляли 3.4 мг LAP, растворенного в 100 мкл воды и перемешивали до объединения компонентов. К

полученной смеси добавляли 390 мкл 14% водного раствора Жел-ГМА, обрабатывали ультразвуком и перемешивали, пока фотоотверждаемая композиция не становилась однородной.

2.2.4.7. Фотоотверждение композиций в объеме

На предметный столик помещали предметное стекло с силиконовым молдом, заполненный фотоотверждаемой композицией (ФОК). Схема установки была разработана во ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН. Объем ФОК сканировали по заданной траектории сфокусированным лучом полупроводникового лазера непрерывного действия с длиной волны 975 нм (АТС-SD, Россия) с помощью X-Y сканатора (Атеко, Россия). Программно-управляемая система сканирования определяла область и путь сканирования. Скорость сканирования варьировалась в диапазоне 1-100 мм/с. Плотность мощности ближнего ИК-излучения в сфокусированном лазерном пучке находилась в пределах 200–2500 Вт/см². Лазерный луч фокусировался в ФОК с помощью объектива 20x с числовой апертурой 0.60. Фокус перемещался вдоль оси Z с помощью моторизованного микрометрического ползунка (Thorlabs). Визуальный контроль фотоотверждения ФОК осуществляли с помощью CMOS камеры.

2.2.5. Детектирование свободных радикалов с использованием ДФПГ

Эффективность наработки радикалов была оценена с использованием 2,2-дифенил-1-пикрилгидразина (ДФПГ). ДФПГ представляет собой стабильный радикал с поглощением на длине волны 525 нм. При взаимодействии ДФПГ со свободными радикалами в системе по реакции:



Для этого к водно-спиртовым растворам фотоинициаторов (LAP – 40.8 μМ и Irgacure 369 – 8.2 μМ) добавляли водно-спиртовой раствор ДФПГ (63.4 μМ) и многократно облучали двумя источниками излучения 345 и 360 нм. После каждого этапа облучения снимали спектр поглощения образцов. Контроль генерации радикалов осуществляли по падению интенсивности поглощения ДФПГ на длине волны 520 нм, что происходило при взаимодействии ДФПГ со свободными радикалами, появляющимися в системе. Количество непрореагировавшего ДФПГ рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ непрореагировавшего ДФПГ} = A_i \div A_0 \times 100\%,$$

где A_0 и A_i соответствуют оптическому поглощению ДФПГ на длине волны 520 нм в исходном и облученном образцах соответственно.

2.2.6. Исследование кинетики фотолюминесценции наноконструкций АН-фотоинициатор

Для регистрации спектров фотолюминесценции и кинетики наночастиц использовали флуорометр Fluorolog-3 (НЮ, Франция), оснащенный фотоумножителем Hamamatsu R929P (Hamamatsu Photonics, Япония). Сигнал ФЭУ регистрировался высокоскоростным осциллографом Waveraner 9104R (LeCroy, США). Образцы, содержащие АН и фотоинициатор, в кварцевой кювете размером 10×5 мм помещали в измерительный отсек флуорометра. В качестве источника возбуждения использовался полупроводниковый лазер с длиной волны 975 нм. Возбуждающее излучение лазера проводилось по оптоволокну и фокусировалось линзой на образце. В исследовании использовались импульсы возбуждения длительностью 1 мс и с постоянной частотой следования 50 Гц.

2.2.7. ИК-Фурье спектроскопия

Наноконструкции на основе АН и полимеров, предварительно высушенные, тщательно перетирали в ступке, смешивали с КВг и прессовали до формирования тонкой прозрачной пластинки. ИК-Фурье спектры записывали с использованием ИК-Фурье спектрофотометра (Varian 3100, Пало-Альто, Калифорния, США).

2.2.8. Измерение гидродинамического размера частиц

Гидродинамический диаметр наноконструкций определяли с использованием Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Малверн, Великобритания) по методике производителя. Проба для анализа представляла собой водную дисперсию наночастиц, в концентрации 0.04 мг/мл.

2.2.8.1. Измерение гидродинамического размера АН-СМАО-ПВК с изменением температуры

Гидродинамические диаметры конструкции АН-СМАО-ПВК определяли с использованием Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Малверн, Великобритания) в диапазоне температур 28–42°C с шагом 2°C. Дисперсию разбавляли водой до концентрации, необходимой для экспериментов по светорассеянию согласно методике производителя, а затем помещали в кювету. Измерение проводили через 15 мин после установления необходимой температуры в каждой температурной точке.

2.2.9. Исследование образцов с использованием Крио-ПЭМ

Медные сетки с углеродной подложкой были обработаны воздушной плазмой для придания поверхности гидрофильных свойств. На обработанную сетку помещали 3 мкл образца. Избыток образца удаляли промокиванием сетки фильтровальной бумагой и сразу погружали в жидкий этан (автоматическая система погружения, Vitrobot FEI, США). В

результате образец был заморожен в слое аморфного льда. Затем сетку с образцом переносили в жидком азоте на ПЭМ (Просвечивающий электронный микроскоп Теспаи G²12 SPIRIT, FEI, США). Размер полученных наноконструкций и толщину полимерного покрытия анализировали по полученным крио-ПЭМ изображениям.

2.2.10. Определение белков в надосадочной жидкости

Дисперсии наноконструкций АН-ПЭИ, АН-КолК(+/-), АН-КолК-КДИ и АН-СМАО-ПЭГ (100 мкл, 0.8 мг/мл) добавляли к разведенной в солевом натрий-фосфатном буфере (PBS, pH 7.2) сыворотке крови мыши (250 мкл, 50%), тщательно перемешивали и инкубировали в течение 1 ч при 37°C и постоянном перемешивании. После инкубации, образцы центрифугировали (13400 об/мин, 10 минут) для удаления наночастиц и связавшихся с поверхностью белков. Концентрацию неадсорбированных белков в надосадочной жидкости определяли по методу Брэдфорда [146] спектрофотометрически на длине волны 595 нм. В качестве контроля использовали разведенную сыворотку крови мыши (250 мкл, 50%) в 100 мкл солевого натрий-фосфатного буфера (PBS, pH 7.2).

2.2.11. Визуализация захвата клетками поверхностно-модифицированных АН.

In vitro исследования выполнены совместно с с.н.с. лаборатории лазерной биомедицины ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН Акасовым Р.А.

Мышиные макрофаги RAW 264.7, клетки аденокарциномы легкого человека А-549 высевали в 96-луночный планшет (около 10 000 клеток на лунку) и инкубировали в течение 12 ч. Меченные родамином образцы АН-КолК ресуспендировали (1:20) в полной среде RPMI и добавляли к клеткам. Клетки инкубировали с АН-КолК в течение 5 минут, 30 минут и 1 часа. После инкубации клетки трижды промывали солевым натрий-фосфатным буфером (PBS, pH 7.2) для удаления несвязавшихся частиц. Дополнительно клетки окрашивали красителями Hoechst 33342 и Calcein AM в течение 10 мин для визуализации клеточных ядер и цитоплазмы, соответственно. Оптические изображения и данные об интенсивности флуоресценции получали с использованием программного обеспечения InCell Analyser 6000 и In Cell Analyser Workstation v.3.7.3 (GE Healthcare, США).

2.2.12. Анализ цитотоксичности АН-КолК, меченных родамином, методом проточной цитометрии

Мышиные макрофаги RAW 264.7, моноциты человека THP-1 или клетки аденокарциномы легкого человека А-549 собирали и помещали в пробирки для проточной цитометрии (200 000 клеток на каждую пробирку). Меченные родамином образцы АН-КолК ресуспендировали (1:20) в полной среде RPMI и добавляли к клеткам и инкубировали в течение 1 ч. После инкубации клетки центрифугировали (1500 g, 5 мин)

для удаления несвязавшихся АН-КолК и ресуспендировали в солевом натрий-фосфатном буфере (PBS, pH 7.2) для проточной цитометрии. Флуоресценцию родамина измеряли на проточном цитометре NovoCyte 2000R (ACEA Biosciences, США), поглощение анализировали с помощью программного обеспечения NovoExpress v.1.2.4.

2.2.13. Определение цитотоксичности поверхностно-модифицированных АН в МТТ-тесте.

Клетки выращивали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 мМ L-глутамин, 10 ед/мл пенициллина и 0,1 мг/мл стрептомицина при 37°C в 5-% CO₂. Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста путем постоянного пересева культуры через 3–4 дня. Затем клетки высевали в лунки планшета и добавляли наноконструкции в концентрации 0,4 мг/мл в первую лунку, титровали и инкубировали в течение 24 ч для выявления острой цитотоксичности и 72 ч для выявления отложенной цитотоксичности. За 4 часа до окончания инкубации добавляли раствор МТТ [(3-4,5-диметилтриазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий бромид) (Sigma-Aldrich) для получения нерастворимых кристаллов формазана фиолетового цвета под действием митохондриальной сукцинатдегидрогеназы жизнеспособных клеток. Затем кристаллы формазана элюировали диметилсульфоксидом. Оптическую плотность полученного раствора красителя измеряли при длине волны 570 нм с помощью считывателя Varioskan Flash (Thermo Scientific, США). Жизнеспособность клеток выражали в % по отношению к контролю (интактные клетки, инкубированные в тех же условиях). Эксперимент проводился в трех повторах.

2.2.14. Визуализация патологически измененных тканей с АН-КолК *in vivo*

Исследование биораспределения наноконструкций АН-КолК после внутривенной инъекции через ретроорбитальный синус мышам линии Balb/c (вес ~ 30 г) проводили в пяти повторах. Мышей содержали в контролируемых условиях (постоянная температура, влажность, 12-часовой цикл света и темноты) со свободным доступом к воде и пище. Все процедуры на животных проводились в соответствии с европейскими и российскими национальными рекомендациями по уходу и использованию лабораторных животных и одобрены местной комиссией по экспертизе животных и этики ФГБНУ «Н.Н. Блохина» Россия, Москва, регистрационный номер 2017-034. Животных анестезировали внутрибрюшинным введением смеси Золетила (0.2–0.3 мл на животное, 5.0 мг/кг) и раствора Рометара (10 мкл, 2%). Спинную шерсть мышей убирали, чтобы уменьшить рассеяние фотолюминесценции и максимально точно локализовать ее. Наноконструкции АН-КолК (150 мкл, 0.8 мг/мл, в PBS, pH 7.2) вводили каждой мышке через

ретроорбитальный синус. Острых аллергических реакций и гибели мышей на этом этапе не наблюдалось.

Исследование проводили на оптической визуализирующей системе, созданной для исследования распределения флуоресцентного сигнала в малых животных при внутривенном введении флуоресцентных меток в лаборатории лазерной биомедицины под рук. Хайдукова Е.В., ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН. Сразу после инъекции дисперсии АН животных помещали систему эпилюминесцентной оптической визуализации для исследования накопления наноконструкций области патологии. Мышей выводили из эксперимента методом передозировки препарата для анестезии. Участок кожи вокруг индуцированного воспаления частично удаляли для исследования распределения наноконструкций в кровеносных сосудах с помощью антистоксового флуоресцентного микроскопа.

2.2.15. Оценка времени циркуляции наноконструкций АН-КолК в кровотоке

Оценку времени циркуляции в кровотоке мышей Balb/c проводили для АН-КолК(+/-) и АН-КолК-КДИ в сравнении с АН-ПЭГ. Для этого дисперсии наноконструкций вводили в ретроорбитальный синус, затем через определенные временные промежутки проводили забор образцов крови методом клипирования кончика хвоста мышей. Каплю крови наносили на предметное стекло, делали мазок, который затем накрывали предметным стеклом. Подготовленные таким образом препараты крови исследовались на разработанном во ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН флуоресцентном микроскопе. Возбуждающее излучение из ближней ИК-области спектра и эмиссия, попадающие в «окно прозрачности» биоткани, позволили регистрировать сигнал флуоресценции от отдельных наноконструкций в сильно рассеивающей среде (образцах крови) и подсчитать количество АН в момент отбора пробы.

2.2.16. Фототермическая терапия (ФТТ) солидной опухоли с использованием наноконструкций АН-СМАО-ПВК

Фототермическую терапию с использованием разработанных наноконструкций проводили совместно с лабораторией биохимических основ фармакологии и опухолевых моделей под рук. д.м.н. Покровского В.С. РОНЦ им. Н.Н. Блохина.

Для изучения противоопухолевой активности мыши Balb/c Nude (возраст 6–8 недель, средняя масса тела 20–22 г) были получены из НИИ им. Н.Н. Блохина. Оптическая визуализация опухоли *in vivo* с использованием наноконструкций на основе АН была продемонстрирована на модели подкожного ксенотрансплантата с использованием клеточной линии рака молочной железы человека SK-BR-3; Клетки ($\sim 3,5 \cdot 10^6$) суспендировали в 0.2 мл DMEM (Gibco) и трансплантировали подкожно в правый бок

мышей. Как только средний объем опухоли достигал $\sim 70 \text{ мм}^3$, животных случайным образом распределяли на 5 групп, по 5 мышей в каждой группе. В терапевтических группах мышам однократно перитуморально вводили 50 мкл АН (0.8 мг/мл в PBS, pH 7.2), модифицированных СМАО-ПВК, СМАО-ПВК-Докс, СМАО-ПВК-АгНЧ и СМАО-ПВК-Докс-Аг НЧ, дополнительно группе из 5 мышей вводили 50 мкл свободного Докс (2 мкг/мл). Мышей содержали в свободной от патогенов среде при контролируемых условиях освещенности и влажности со свободным доступом к воде и пище. ФТТ проводили через 24 ч после инъекции. В качестве контроля использовали ближнее ИК-излучение без введения наноконструкций. Температуру тела мышей измеряли камерой Xenics Gobi-384-GigE-7098 в режиме реального времени. Мышей обрабатывали импульсным ближним ИК-излучением (мощность 225 мВт, интенсивность 0.45 Вт/см^2) в среднем в течение 3 минут до тех пор, пока разница температур между необработанным участком и обработанной опухолью не достигала 4°C . Диаметры опухолей измеряли дважды в неделю. Относительный объем опухоли рассчитывали по следующей формуле: относительный объем опухоли = (объем опухоли в день измерения)/(объем опухоли в день 0). На 29 день коэффициент ингибирования роста опухоли (%) рассчитывали по следующей формуле: коэффициент ингибирования роста опухоли (%) = $[1 - (\text{относительный объем опухоли после ФТТ})/(\text{относительный объем опухоли контрольной группы})] * 100\%$. Переносимость терапии определяли путем измерения массы тела, ежедневного наблюдения за внешним видом и результатами аутопсии.

2.2.17. Гистологические исследования

Гистологические исследования проводили совместно с лабораторией биомаркеров и механизмов опухолевого онкогенеза под рук. Хоченкова Д.А. РОНЦ им. Н.Н. Блохина.

После эвтаназии животных с перевитой солидной опухолью из клеток линии SK-BR-3 ингаляцией CO_2 через 48 ч после инъекции биоптаты опухолей фиксировали 10% формалином на 72 ч, заливали в парафиновые блоки и изготавливали гистологические срезы толщиной 4 мкм на микротоме по стандартной методике. Затем срезы окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике. Реакцию в опухоли оценивали в нескольких полях зрения с использованием оптического микроскопа.

Глава 3. Результаты и их обсуждение

В последнее время растет интерес к использованию в биомедицинских приложениях неорганических наночастиц, благодаря их уникальным физико-химическим свойствам. В частности, оптические, магнитные и другие физические свойства, а также инертность, стабильность и простота функционализации делают неорганические наночастицы привлекательной платформой для создания биосовместимых наноконструкций. Апконвертирующие наночастицы (АН), обладающие антистоксовой фотолюминесценцией, рассматриваются как многообещающая наноплатформа для создания многофункциональных наноконструкций для диагностики и терапии. Способность АН поглощать свет ближнего ИК-диапазона спектра и конвертировать его в УФ- и видимое излучение делает их мощным инструментом в *in vitro* и *in vivo* исследованиях. Гидрофобные свойства поверхности АН после синтеза требуют разработки подходов к гидрофилизации и биоадаптации поверхности АН для применения наноконструкций на основе АН в биологических исследованиях.

Существует большое разнообразие методов получения биосовместимых наноконструкций, основанных на модификации поверхности АН полимерами. Поскольку основной целью модификации является использование таких наноконструкций *in vivo*, к ним предъявляется ряд требований. Для визуализации и терапии различных патологий модифицированные АН не должны быстро распознаваться иммунной системой и неспецифически взаимодействовать с компонентами крови, что приводит к быстрому выведению из кровотока и сказывается на эффективности накопления. [147] В настоящее время наиболее перспективной считается модификация поверхности АН полиэтиленгликолем (ПЭГ), который зарекомендовал себя как «золотой стандарт» среди полимеров-модификаторов. ПЭГ является неионогенным гидрофильным полимером, снижающим агрегацию наночастиц за счет стерической стабилизации, однако для ПЭГ-модифицированных наноконструкций характерна иммуногенность, что значительно снижает эффективность применения наночастиц в биомедицине. Поэтому в настоящее время активно ведется поиск альтернативных полимеров для модификации поверхности АН.

Первая часть настоящей работы посвящена разработке новых подходов к модификации поверхности АН биосовместимыми полимерами и получению наноконструкций для визуализации и терапии. Предложен подход к модификации поверхности АН эндогенной колониновой кислотой, что позволило устранить недостатки использования ПЭГ в качестве полимера-модификатора и значительно увеличить время

циркуляции в кровотоке малых животных и эффективность накопления в патологически измененных тканях. Дополнительно были разработаны многофункциональные конструкции на основе агрегатов полимерных мицелл с АН, наполненные доксорубицином, покрытые термочувствительным полимером (поли-N-винилкапролактамом) и наночастицами серебра для визуализации, химио- и фототермической терапии солидной опухоли.

Уникальные оптические свойства АН были заложены в основу создания фотоотверждаемых композиций для новой технологии трехмерного прототипирования под действием ближнего ИК-излучения. [26] Это позволило проводить фотоотверждение в объеме сильно рассеивающих сред за счет повышения глубины проникновения возбуждающего излучения и ускорить процесс получения полимерных структур при использовании недорогих низкоэнергетических источников возбуждающего излучения, не приводящих к фототоксичности в случае биопечати. Однако процесс подготовки фотоотверждаемых композиций осложнен модификацией поверхности АН и подбором пары АН/фотоинициатор для конкретного случая.

Во второй части работы был разработан подход к формированию полимерного слоя в реакции ИК-индуцированной полимеризации. В зависимости от концентрации АН в реакционной смеси для ИК-индуцированной полимеризации возможно получение как одиночных наночастиц, покрытых полимерным слоем контролируемой толщины, так и полимерных структур с микроархитектурой, которые, в свою очередь, могут быть использованы в качестве матрицы для тканевой инженерии. Разработана универсальная система на основе наноконструкции АН-фотоинициатор, позволяющая вводить в состав фотоотверждаемой композиции как гидрофильные, так и гидрофобные компоненты для инициирования реакции ИК-полимеризации в объеме. Продемонстрировано получение полимерных структур из композиций, содержащих биополимеры, гиалуроновую кислоту или желатин с введенными винильными группами, в процессе полимеризации под действием ближнего ИК-излучения.

3.1. Создание биосовместимых полимер-модифицированных наноконструкций на основе АН

При разработке подходов к получению полимер-модифицированных наноконструкций для биомедицинских приложений необходимо учитывать, что АН синтезируют в высококипящих органических растворителях в присутствии гидрофобных стабилизаторов, таких как олеиновая кислота или октадецен. В результате АН возможно диспергировать только в неполярных органических растворителях, что существенно ограничивает их применение *in vivo*. Поэтому при подготовке биосовместимых АН

необходима их предварительная гидрофилизация для обеспечения коллоидной стабильности в водной среде в широком диапазоне рН при различных концентрациях буферных солей. [21] Тщательный подбор соединений на этапе гидрофилизации позволяет регулировать такие свойства поверхности, как дзета-потенциал, биофункциональность, а также толщину полимерного слоя. Это, в свою очередь, облегчает их последующую модификацию полимерами для придания свойств биосовместимости, [15] направленности действия или контролируемого высвобождения лекарственных препаратов.

3.1.1. Синтез АН

Выбор простой стратегии синтеза высококачественных АН с контролируемым составом, размером и фазой имеет решающее значение для управления фотолюминесцентными свойствами для дальнейшего применения АН в биомедицине.

Одним из ключевых параметров, обеспечивающих эффективное использование биосовместимых АН, является высокий квантовый выход фотолюминесценции. Основным условием для реализации эффективной апконверсии в АН является низкая симметрия решетки матрицы и локальная симметрия активных центров в ней. Для увеличения вероятности 4f–4f-переходов ионов Tm^{3+} наиболее подходящей является β -фаза $NaYF_4$ с локальной симметрией оптических центров C_{3h} . [20] Кроме того, для улучшения фотолюминесцентных свойств синтезированных АН необходимо сформировать инертную оболочку $NaYF_4$ на поверхности наночастиц. [31]

АН были получены методом термического разложения трифторацетатов иттрия, иттербия и тулия, образованных при растворении соответствующих оксидов в разбавленной трифторуксусной кислоте. Термическое разложение было осуществлено в присутствии 1-октадецена и стабилизатора олеиновой кислоты (ОК), содержащей карбоксильную группу для координации с ионами редкоземельных элементов на поверхности сформированных наночастиц и углеводородную цепь для обеспечения коллоидной стабильности в неполярных растворителях. ОК эффективно пассивирует поверхность АН, замедляя рост наночастиц и обеспечивая узкое распределение по размерам. [20] На следующем этапе АН покрывали инертной кристаллической оболочкой $NaYF_4$ для улучшения фотолюминесцентных свойств. АН $\beta-NaYF_4:Yb^{3+}Tm^{3+}$ диспергировали в смеси 1-октадецен/олеиновая кислота, добавляли трифторацетат натрия и нагревали в атмосфере аргона до 340°C. В результате были получены АН $\beta-NaYF_4:Yb^{3+}Tm^{3+}/NaYF_4$ со структурой ядро/инертная оболочка с высокой квантовой эффективностью, которая обеспечивается сведением к минимуму влияния поверхностных

дефектов наночастиц. Элементный состав синтезированных АН подтвержден методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) (Рис. 3.1).

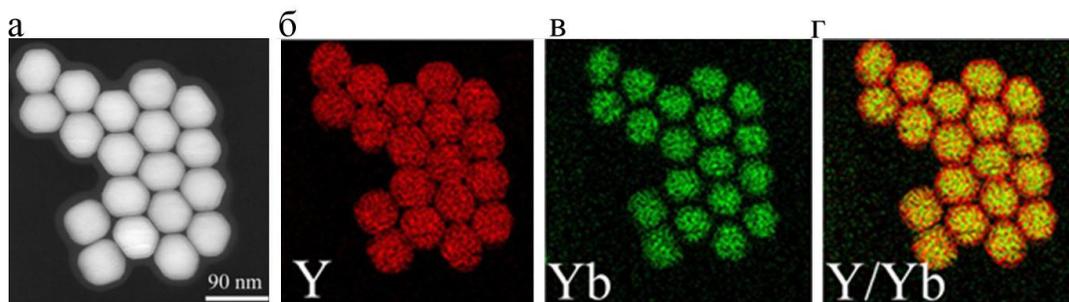


Рисунок 3.1. а) Темнопольное ПЭМ изображение $\beta\text{-NaYF}_4\text{:Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}\text{@NaYF}_4$ со структурой ядро/оболочка. Элементное распределение б) Y, в) Yb и Y/Yb в АН.

Были синтезированы монодисперсные наночастицы различного размера (28, 60 и 90 нм), имеющие гексагональную структуру, которая становится более выраженной с увеличением размера (Рис. 3.2).

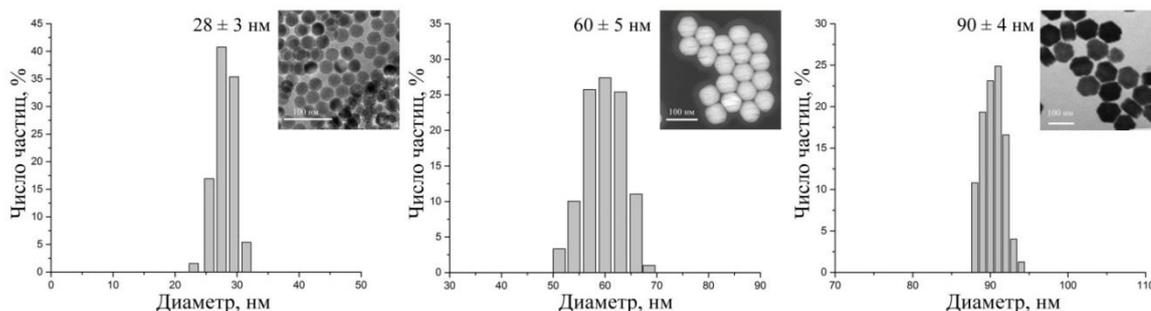


Рисунок 3.2. Гистограмма распределения АН $\beta\text{-NaYF}_4\text{:Yb}^{3+}\text{Tm}^{3+}/\text{NaYF}_4$ по размерам, ПЭМ-изображения АН (на вставке).

В результате были получены наночастицы $\beta\text{-NaYF}_4\text{:Yb}^{3+}\text{Tm}^{3+}/\text{NaYF}_4$ со структурой ядро/оболочка, способные формировать устойчивые коллоидные дисперсии в неполярных растворителях, таких как гексан и хлороформ.

3.1.1.2. Фотолюминесцентные свойства АН

Апконвертирующие наночастицы состоят из кристаллической матрицы NaYF_4 , легированной ионами редкоземельных элементов: иттербия (Yb^{3+}), выполняющего роль сенсibilизатора, и тулия (Tm^{3+}) - активатора. Ион-сенсibilизатор эффективно поглощает фотон с длиной волны 975 нм и переходит из основного в метастабильное состояние. Между возбужденным ионом-сенсibilизатором и ионом-активатором осуществляется безызлучательный резонансный перенос энергии, приводящий к переходу ионов-активаторов в метастабильное состояние (Рис. 3.3.а). Ион Yb^{3+} один из наиболее эффективных сенсibilизаторов, поглощающих излучение на длине волны 975 нм. Ион-

активатор Tm^{3+} обеспечивает фотолюминесценцию на длине волны 345, 360, 450, 475, 645, и 800 нм (Рис. 3.3.б), что определяет широкий спектр применения $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}\text{Tm}^{3+}$ в биомедицине.

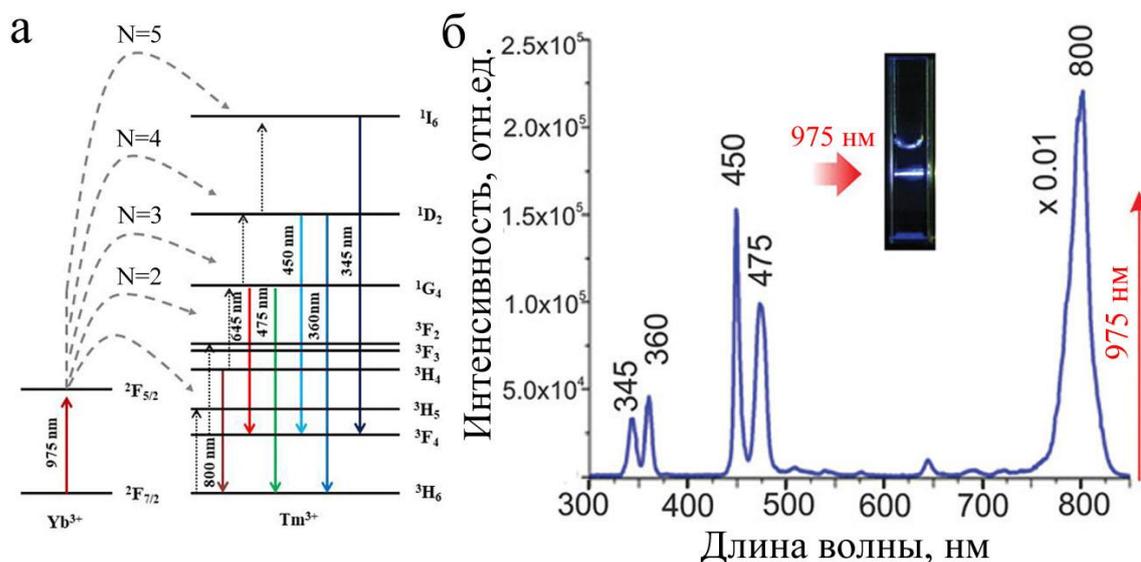


Рисунок 3.3. а) Энергетическая диаграмма $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}\text{Tm}^{3+}/\text{NaYF}_4$. б) Спектр фотолюминесценции АН при возбуждении на длине волны 975 нм с плотностью мощности 50 Вт/см^2 .

Синтезированные АН $\beta\text{-NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}\text{Tm}^{3+}/\text{NaYF}_4$ обладают воспроизводимыми фотолюминесцентными свойствами, необходимыми для дальнейшего применения АН в биомедицинских приложениях.

3.1.2. Первый этап создания биосовместимых АН: гидрофилизация поверхности

АН, полученные методом высокотемпературного разложения трифторацетатов, являются гидрофобными за счет стабилизации олеиновой кислотой. Их применение в биомедицинских приложениях ограничено, поскольку они могут быть диспергированы только в неполярных органических растворителях. Поэтому на первом этапе создания биосовместимых наноконструкций на основе АН необходимо гидрофилизировать поверхность АН для получения вододиспергируемых, биосовместимых наноконструкций с функциональными группами, экспонированными в водную фазу. В работе использовали два стандартных подхода к гидрофилизации поверхности АН, хорошо описанных в литературе: 1) путем частичной замены лиганда-стабилизатора на бифункциональные молекулы и 2) без удаления лиганда-стабилизатора (олеиновой кислоты). Подходы основаны на методе замены растворителя, осуществляемого без удаления стабилизатора (ОК) с поверхности наночастиц. Для этого АН диспергировали в летучем растворителе (хлороформе) и смешивали с раствором полимера в том же растворителе. Смесь

выдерживали фиксированное время при непрерывной обработке ультразвуком при комнатной температуре для адсорбции полимерных цепей на поверхности АН. Затем смесь частями переводили в воду при постоянном перемешивании и ультразвуковой обработке. После испарения растворителя получали водную дисперсию АН, модифицированных полимером. Схема процесса приведена на рисунке 3.4.

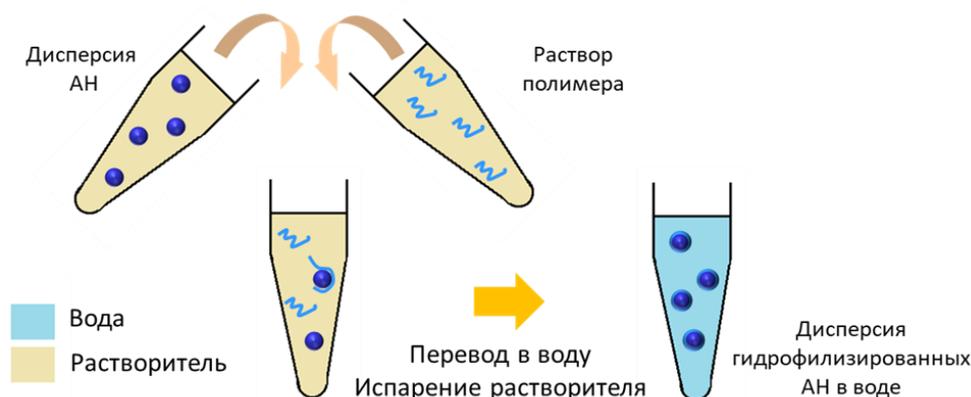


Рисунок 3.4. Схема проведения гидрофилизации поверхности АН методом замены растворителя.

Преимуществом этого метода является простота и отсутствие необходимости использования агрессивных реагентов. В результате формируется полимерное покрытие, которое обеспечивает коллоидную и химическую стабильность водных дисперсий АН без изменения фотофизических свойств, предохраняет от воздействия окружающей среды, а также открывает возможность дальнейшей модификации биосовместимыми полимерами.

3.1.2.1. Гидрофилизация АН при участии гидроксида тетраметиламмония (ТМАГ)

При гидрофилизации поверхности АН методом частичной замены лиганда-стабилизатора впервые использовали низкомолекулярное соединение гидроксид тетраметиламмония (ТМАГ), которое способствует фазовому переходу из органической в водную фазу. [148] Такой подход к гидрофилизации поверхности АН имеет преимущество перед широко распространенным методом удаления стабилизатора с поверхности наночастиц с использованием соляной кислоты. [149] Во время ультразвуковой обработки в среде, содержащей HCl, помимо протонирования олеиновой кислоты и ее диссоциации с поверхности АН, происходит травление кристаллической оболочки АН, что сопровождается увеличением количества поверхностных дефектов. [43] Использование соляной кислоты для удаления стабилизатора с поверхности АН приводит к частичному растворению наночастиц. Этого удастся избежать при использовании разработанного в работе метода гидрофилизации поверхности АН ТМАГ в мягких условиях. ТМАГ

диссоциирует в воде с образованием ионов OH^- и адсорбируется на поверхности АН, частично вытесняя олеиновую кислоту (Рис. 3.5.а). Для гидрофилизации дисперсию АН в хлороформе по каплям переводили в водный раствор ТМАГ с последующим выпариванием растворителя, по методу, описанному в 3.1.2.

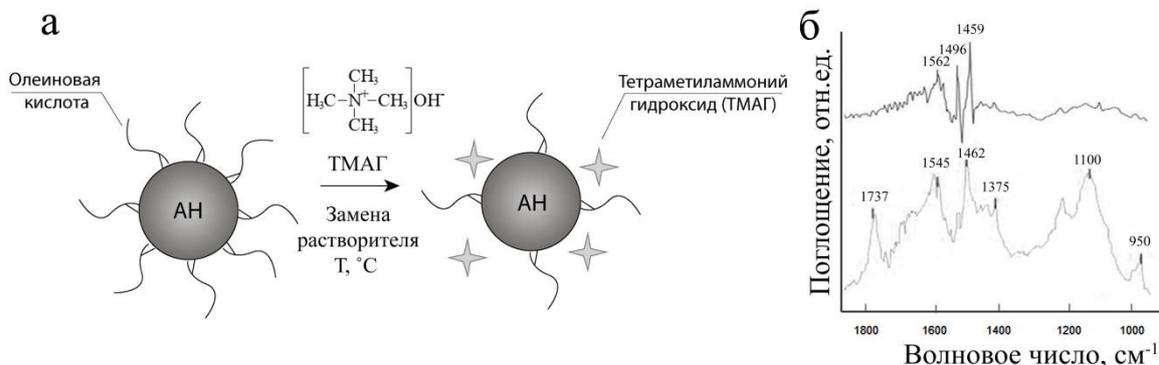


Рисунок 3.5. а) Схема модификации поверхности АН ТМАГ и структурная формула ТМАГ. б) ИК-Фурье спектры образцов АН, гидрофилизованных ТМАГ.

В результате были получены АН-ТМАГ с отрицательным дзета-потенциалом (-12 мВ), который связан с наличием OH^- -групп, экспонированных в водную среду. Гидрофилизация поверхности не приводит к изменению гидродинамического диаметра наночастиц, что связано с малым размером молекулы ТМАГ, а также мягкими условиями проведения гидрофилизации. Полученные ИК-Фурье спектры образца до и после гидрофилизации АН-ТМАГ подтверждают успешную модификацию поверхности, что видно по увеличению интенсивности пика на 1100 и 1375 cm^{-1} , характерных для деформационных колебаний $-\text{OH}$ групп (Рис.3.5.б). В свою очередь, падение интенсивности 1461 и 1545 cm^{-1} , относящихся к ассиметричным и симметричным валентным колебаниям $-\text{COO}^-$ олеиновой кислоты, соответственно, и 1737 cm^{-1} , относящегося к группе $-\text{C}=\text{O}$ на спектре АН-ТМАГ после удаления несвязанной олеиновой кислоты из системы свидетельствует о частичном удалении стабилизатора (ОК) с поверхности АН. Гидрофилизация поверхности АН с использованием ТМАГ позволяет получить коллоидно-устойчивые в воде наночастицы, сохраняющие изначальный размер.

3.1.2.2. Гидрофилизация АН полиэтиленимином (ПЭИ)

Несмотря на эффективность гидрофилизации поверхности АН с использованием низкомолекулярного ТМАГ, такой подход к модификации сказывается на оптических свойствах АН. Частичное удаление олеиновой кислоты открывает доступ молекулам воды к поверхности АН, что приводит к тушению фотолюминесценции АН, связанному с

высокоэнергетическими колебательными уровнями -ОН групп ($3200-3600\text{ см}^{-1}$), которые усиливают безызлучательную релаксацию возбужденных состояний Yb^{3+} . [44]

Гидрофилизация АН без удаления стабилизатора (ОК) позволяет избежать тушения фотолюминесценции благодаря изоляции наночастиц от молекул воды. [31] Кроме того, модификация поверхности высокомолекулярными соединениями приводит к получению коллоидно-устойчивых наноконструкций с функциональными группами, экспонированными в водную фазу, которые определяют возможность дальнейшей модификации биосовместимыми полимерами.

В качестве полимера-модификатора был выбран полиэтиленимин (ПЭИ). ПЭИ является положительно заряженным синтетическим разветвленным полимером, содержащим большое количество первичных, вторичных и третичных аминогрупп. [150] При физиологических значениях рН аминогруппы протонируются, [151] что может быть использовано при последующей модификации АН-ПЭИ биополимерами за счет электростатических взаимодействий. Наличие первичных аминогрупп на поверхности АН после гидрофилизации при участии ПЭИ открывает пути для конъюгации с биосовместимыми полимерными молекулами.

Гидрофилизация поверхности АН с использованием ПЭИ была проведена методом замены растворителя без удаления лиганда-стабилизатора (2.2.2.2, Рис. 3.6.а). Формирование полимерной оболочки из ПЭИ на поверхности АН происходило за счет взаимодействий олеиновой кислоты с гидрофобными фрагментами ПЭИ. Имея около 35% аминогрупп, ПЭИ также может частично замещать ОК и формировать координационную связь с ионами металлов на поверхности АН.

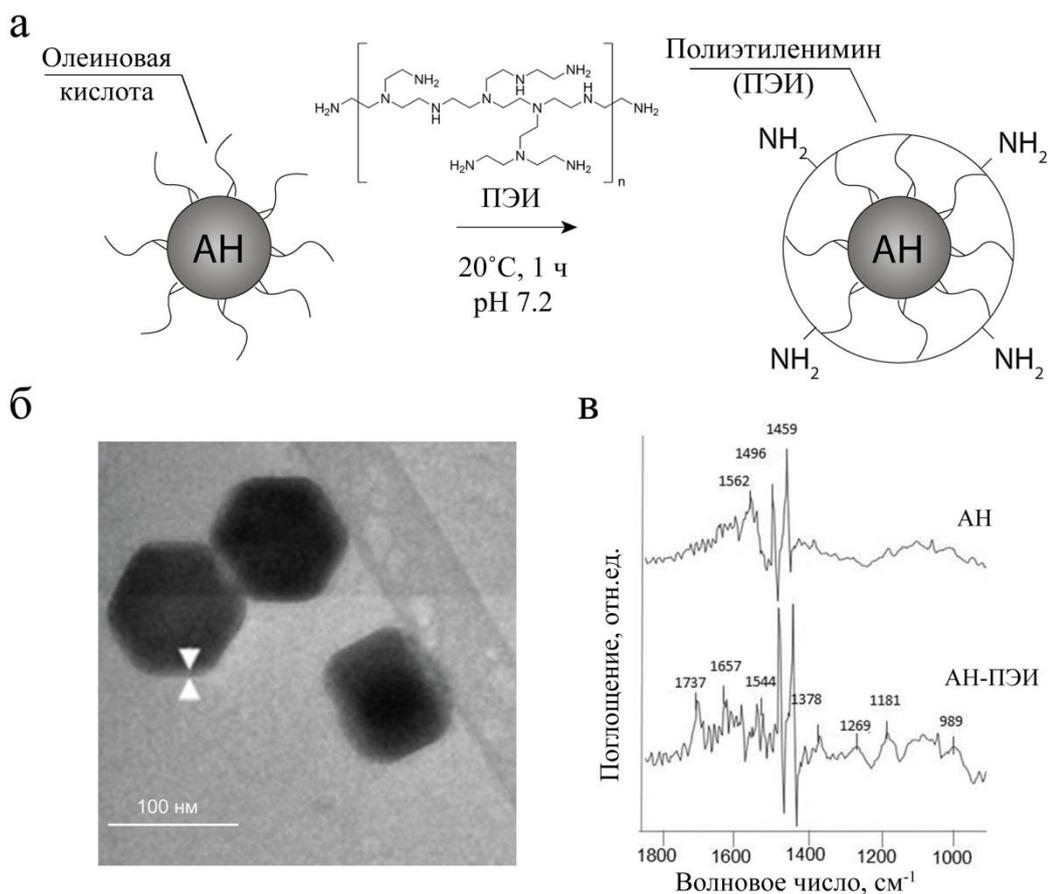


Рисунок 3.6. а) Схема модификации поверхности АН ПЭИ и структурная формула разветвленного ПЭИ. б) крио-ПЭМ изображение АН-ПЭИ. в) ИК Фурье спектры образцов АН до и после гидрофилизации ПЭИ.

Успешная гидрофилизация поверхности АН ПЭИ была подтверждена методом криоэлектронной просвечивающей микроскопии (крио-ПЭМ, Рис. 3.6.б), а также ИК-Фурье спектроскопией (Рис. 3.6.в). За счет появления связей -С-С- и -С-N- цепей ПЭИ увеличивается интенсивность полос на 1496 и 1459 cm^{-1} . Наличие связи -С-N- подтверждается пиком на 1181 cm^{-1} . Полосы на 1657 и 989 cm^{-1} указывают на наличие свободных аминогрупп. Полосу 1544 cm^{-1} можно отнести к протонированной форме аминогруппы, что указывает на образование координационной связи ПЭИ с ионами металлов на поверхности АН. Это приводит к тому, что количество олеиновой кислоты на поверхности АН уменьшается за счет ее частичного вытеснения молекулами ПЭИ. Данный эффект был зарегистрирован по уменьшению пика на 1562 cm^{-1} , характерного для групп -СООН, координированных с редкоземельными металлами на поверхности АН. В гидрофилизованных АН-ПЭИ также появляются полосы на частоте 1737 и 1269 cm^{-1} , относящиеся к -С=О и -ОН⁻, соответственно, что указывает на наличие протонированных групп -СООН и подтверждает разрушение координационных связей и частичное удаление

ОК с поверхности АН. В результате предложенного подхода к гидрофилизации поверхности АН были получены положительно заряженные наноконструкции АН-ПЭИ (дзета-потенциал +42 мВ) с аминогруппами, экспонированными в водную фазу.

3.1.2.3. Гидрофилизация АН сополимером малеинового ангидрида с октадеценом (СМАО)

Гидрофилизация поверхности АН ПЭИ имеет ряд преимуществ, однако использование таких наноконструкций без предварительной модификации биосовместимыми соединениями нежелательно, что связано с цитотоксичностью ПЭИ. [152] Формирование на поверхности АН слоя из полимера, содержащего функциональные группы, несущие отрицательный заряд, позволяет избежать цитотоксичности гидрофилизированных АН. Для этого в работе был использован подход к модификации поверхности АН при участии амфифильного чередующегося сополимера малеинового ангидрида с октадеценом (СМАО), проводимый без удаления лиганда-стабилизатора. Гидрофобные фрагменты СМАО способны формировать гидрофобную связь с ОК на поверхности АН. Были получены два типа наноконструкций: одиночные АН с полимерным покрытием из СМАО на поверхности и агрегаты мицелл СМАО, в которые были включены АН.

Формирование полимерной оболочки из СМАО на поверхности АН

Для формирования полимерной оболочки на поверхности одиночных АН методом замены растворителя использовали наночастицы со средним диаметром 90 нм. АН диспергировали в хлороформе и смешивали с раствором СМАО в хлороформе. Смесь выдерживали 1 ч при непрерывном перемешивании при комнатной температуре для адсорбции полимерных цепей на поверхности АН. Амфифильный СМАО адсорбировался на поверхности АН за счет гидрофобных взаимодействий между ОК и октадеценом СМАО. Затем добавляли сшивающий агент гексаметилендиамин для повышения стабильности полимерного покрытия при хранении. Взаимодействие аминогрупп 1,6-даминогексана с ангидридом СМАО приводило к получению сшитой структуры полимерного слоя. Сшивающий агент был взят в недостатке, чтобы сохранить непрореагировавшие ангидридные группы. Это необходимо для получения карбоксильных групп на поверхности АН, которые являются результатом гидролиза ангидридных групп при переводе в воду. Карбоксильные группы позволяют проводить последующую модификацию биосовместимыми полимерами. Смесь выдерживали при перемешивании 1 час и частями переводили в воду при постоянном перемешивании и ультразвуковой обработке. После испарения растворителя получали водную дисперсию АН, модифицированных СМАО (Рис. 3.7.а).

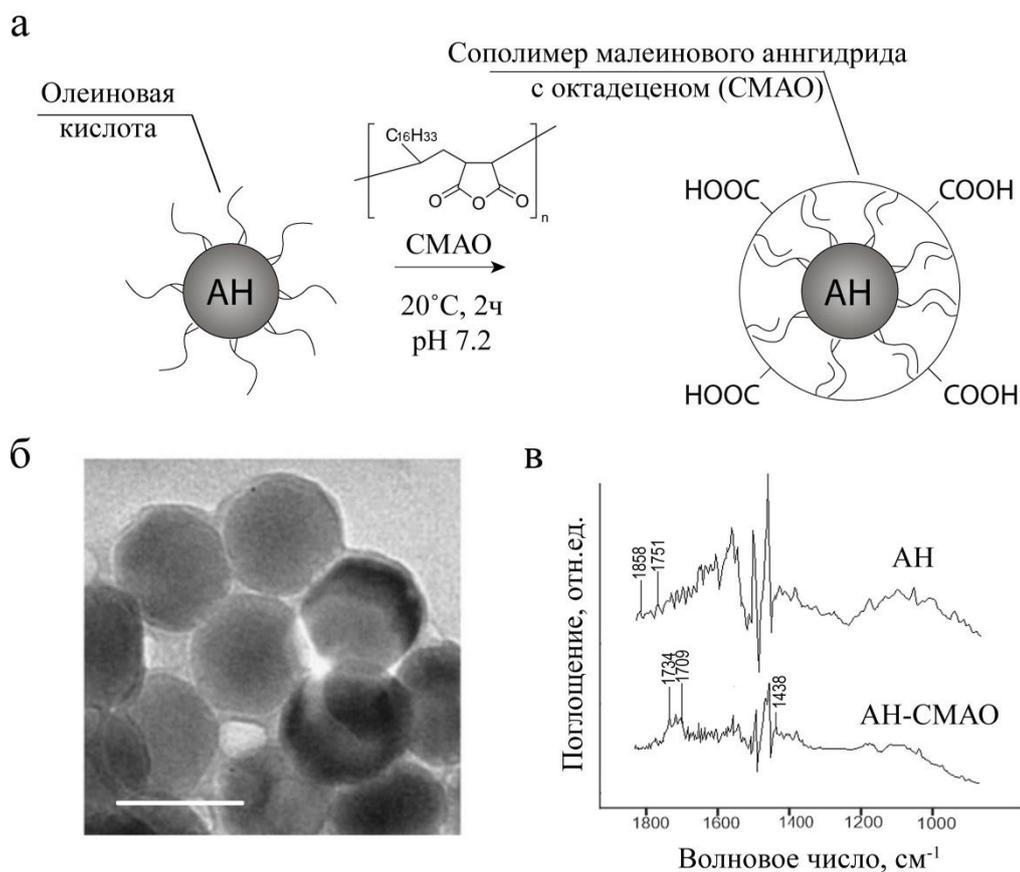


Рисунок 3.7. а) Схема модификации поверхности АН СМАО и структурная формула СМАО. б) ПЭМ-изображение АН-СМАО. в) ИК-Фурье спектры образцов АН до и после гидрофилизации СМАО.

Наличие карбоксильных групп и отрицательный дзета-потенциал поверхности (-42 мВ) гидрофилизированных АН-СМАО определяет стабильность водных дисперсий и их коллоидную устойчивость в течение длительного времени (до 3 месяцев). Результаты исследования АН-СМАО методом ПЭМ (Рис. 3.7.б) и полученные ИК-Фурье спектры образца после гидрофилизации подтверждают успешную модификацию поверхности, что выражается в увеличении интенсивности пика на 1734 см^{-1} , характерного для карбоксильной группы, на 1438 см^{-1} - для гидроксильной и 1079 см^{-1} - для эфирной группы, а также в исчезновении пиков при 1858 и 1781 см^{-1} , характерных для ангидрида (Рис. 3.7.в).

Включение АН в агрегаты мицелл СМАО

Сборка наночастиц в агрегаты, в которых реализуются кооперативные эффекты, позволяют получать наноконструкции со свойствами, отличными от свойств отдельных компонентов, создавая основу для получения гибридных наноконструкций. [153] Сочетание свойств исходных компонентов и их агрегатов значительно расширяет области применения наночастиц. Гидрофилизация с использованием СМАО дает возможность

получить не только одиночные АН с полимерным слоем на поверхности, но и агрегаты мицелл СМАО с включенными в гидрофобное ядро АН. Гидрофилизация путем включения АН в агрегаты мицелл СМАО обеспечивает коллоидную стабильность АН, снижает токсичность, предотвращает удаление полимера с поверхности, создает основу для модификации биополимерами как за счет формирования ковалентной связи, так и за счет электростатических взаимодействий.

При гидрофилизации путем включения наночастиц в агрегаты мицелл СМАО использовали АН со средним размером 28 нм. Подробно метод описан в 2.2.2.4. Кратко, дисперсию АН в хлороформе смешивали с раствором СМАО в хлороформе, выдерживали при постоянном перемешивании при комнатной температуре. В результате происходила самоорганизация амфифильных молекул сополимера и включение АН в ядро мицелл. При постепенном переводе смеси в воду и выпаривании легколетучего растворителя были получены агрегаты мицелл СМАО с включенными в гидрофобное ядро АН и гидрофильными фрагментами, экспонированными в водную фазу (Рис. 3.8.а). Как и в случае одиночных АН-СМАО, к дисперсии агрегатов мицелл был добавлен сшивающий агент гексаметилендиамин для получения сшитой структуры полимерного слоя.

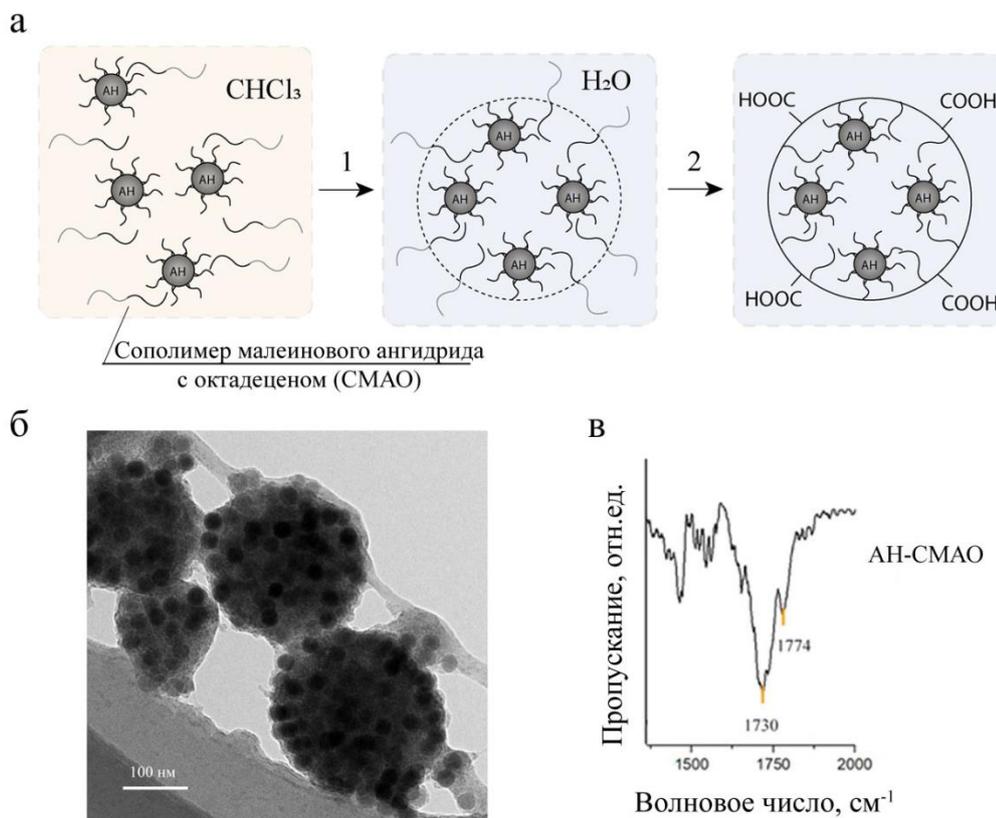


Рисунок 3.8. а) Схематическое изображение включения АН в агрегаты мицелл СМАО. б) ПЭМ-изображение АН-СМАО. в) ИК-Фурье спектры образцов АН, включенных в агрегаты мицелл СМАО.

Наличие реакционноспособных карбоксильных групп на поверхности агрегатов мицелл СМАО и отрицательный заряд (дзета потенциал -33 мВ) обеспечивается спонтанным гидролизом ангидридных групп СМАО, как и в случае одиночных АН. Успешная модификация АН-СМАО была подтверждена методом крио-ПЭМ (Рис. 3.8.б) и ИК-Фурье спектроскопией (Рис.3.8.в). Как видно из спектров, приведенных на рисунке 3.8.в, полученные АН-СМАО характеризуются сильными валентными колебаниями COO^- в области 1730 и 1774 cm^{-1} , что подтверждает наличие карбоксильных групп СМАО, экспонированных в водных фазу.

3.1.3. Второй этап создания биосовместимых АН: модификация гидрофилизированных АН биосовместимыми полимерами

Полученные на первом этапе гидрофилизированные АН обладают функционализированной поверхностью, что выражается в появлении как заряда на поверхности АН (положительного или отрицательного), так и функциональных групп, таких как гидроксильные, амино- и карбоксильные. Это позволяет осуществлять модификацию поверхности за счет ковалентного и нековалентного взаимодействия с биосовместимыми полимерами для дальнейшего использования АН в *in vitro* и *in vivo* приложениях. [154]

Наночастицы для биомедицины должны быть вододиспергируемыми, биосовместимыми и стабильными в физиологических средах. [155] Кроме того, они должны удовлетворять таким специфическим требованиям, как сохранение поверхностных свойств, обеспечивающих длительную циркуляцию в кровотоке и эффективность накопления в целевой области при системном введении. Поэтому на втором этапе необходимо разработать методы модификации поверхности предварительно гидрофилизированных АН таким образом, чтобы пролонгировать их циркуляцию и прогнозировать биораспределение в организме.

Среди биосовместимых полимеров-модификаторов поверхности, как описано в обзоре литературы, обычно выделяют два основных класса: синтетические полимеры и природные полимеры. Синтетические полимеры отличаются большим разнообразием, возможностью управления структурой благодаря широкому набору методов синтеза, легкостью введения дополнительных функциональностей, в том числе связанных с откликом на внешние стимулы. Природные полимеры, к которым относятся полисахариды, белки и нуклеиновые кислоты, обладают такими свойствами, как биосовместимость, биоразлагаемость и низкая иммуногенность. Кроме того, для природных полимеров характерны ферментативные пути метаболизма, что не приводит к накоплению их в организме. [57]

3.1.3.1. Модификация АН полиэтиленгликолем (ПЭГ)

Из литературы известно, что среди всего многообразия полимеров-модификаторов поверхности особое место занимает полиэтиленгликоль, поскольку обеспечивает длительную циркуляцию наноконструкций в организме, что особенно важно для *in vivo* исследований. Полиэтиленгликоль (ПЭГ) является гидрофильным, водорастворимым, биосовместимым полимером, для которого характерны такие свойства, как слабая иммуногенность, отсутствие токсичности при молекулярной массе выше 400 Да и легкость выведения почками. [156] Поскольку он одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) для клинических приложений, ПЭГ широко используется при модификации поверхности наносителей для доставки лекарственных препаратов. [64]

В работе использовали два подхода для получения АН, модифицированных ПЭГ: 1) формирование ковалентной связи между предварительно гидрофилизированными АН-СМАО, содержащими карбоксильные группы на поверхности, и ПЭГ с привитыми группами глицидилового эфира (ПЭГ-ДГЭ) и 2) фотополимеризация диакрилата полиэтиленгликоля (ПЭГ-ДА) в окрестности отдельных наночастиц под действием ближнего ИК-излучения.

Формирование ПЭГ-покрытия при участии ПЭГ-ДГЭ на поверхности АН

Для получения отдельных АН, модифицированных ПЭГ, были использованы АН, предварительно гидрофилизированные СМАО по методу, описанному в 3.1.2.3. Модификацию осуществляли формированием ковалентной связи между АН-СМАО и ПЭГ-ДГЭ (Рис. 3.9.а). Для этого к дисперсии АН-СМАО в воде добавляли водный раствор ПЭГ-ДГЭ и выдерживали в течение часа при постоянном перемешивании и повышенной температуре (90°C). Реакция фрагмента малеинового ангидрида с ПЭГ-ДГЭ представлена на рисунке 3.9.б и состоит из двух стадий: 1) реакция с гидролизированным ПЭГ-ДГЭ (который легко подвергается гидролизу с последующей реакцией расщепления кольца в водной среде), приводящая к образованию карбоксильной группы и сложного эфира и 2) реакция с эпоксидными группами. В результате были получены АН-СМАО-ПЭГ, в которых цепи ПЭГ конъюгированы с СМАО.

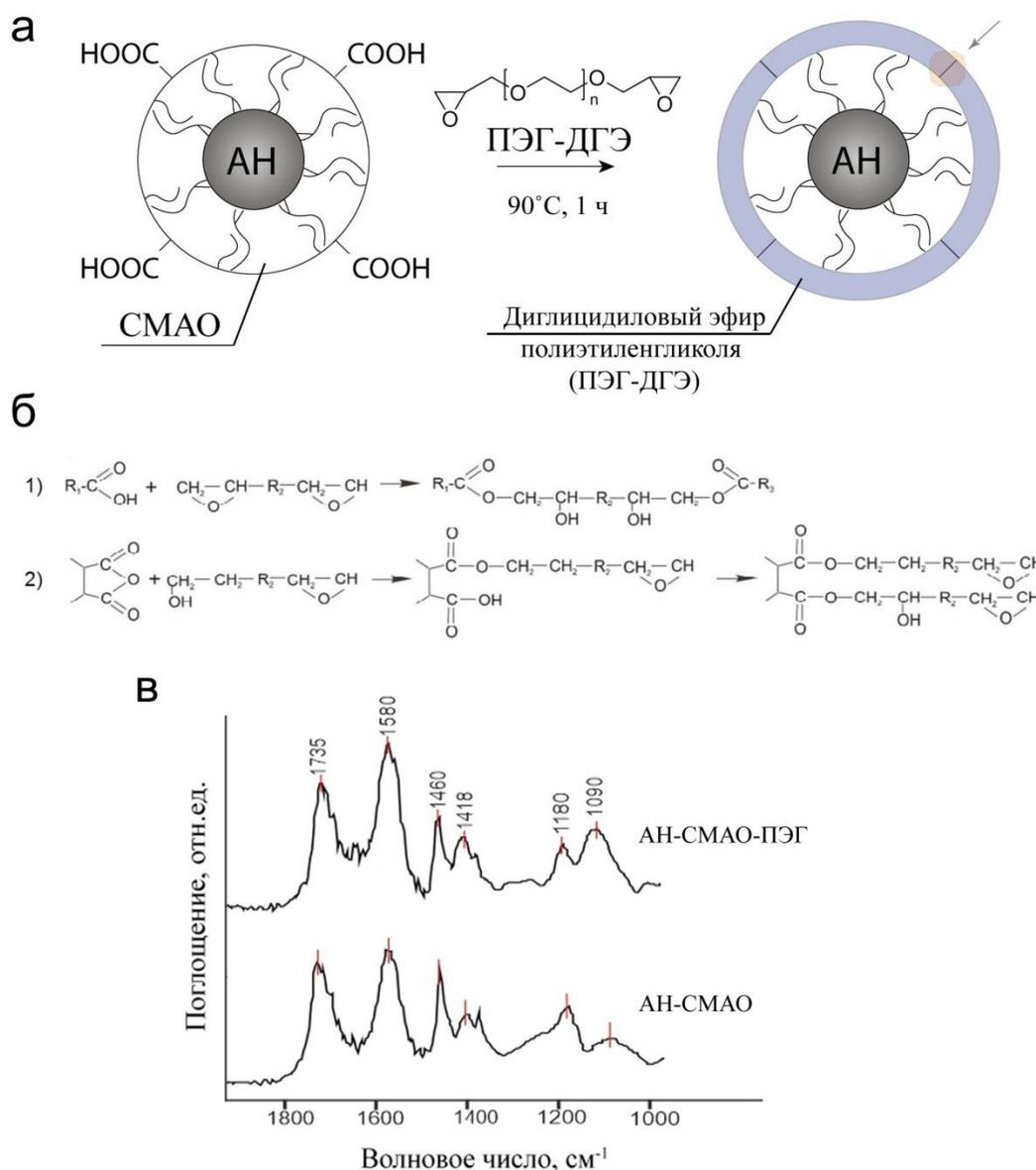


Рисунок 3.9. а) Схема модификации поверхности АН ПЭГ-ДГЭ. Стрелкой указана ковалентная связь между АН-СМАО и ПЭГ-ДГЭ. б) Двухстадийная реакция фрагмента малеинового ангидрида с ПЭГ-ДГЭ. в) ИК-Фурье спектры образцов АН-СМАО, модифицированных ПЭГ-ДГЭ.

Для подтверждения формирования оболочки из ПЭГ на поверхности АН-СМАО были получены ИК-Фурье спектры (Рис. 3.9.в). Присутствие $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-$ группы на поверхности АН-СМАО-ПЭГ подтверждается спектральной полосой на 1090 см^{-1} , которая относится к эфирной связи $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ ПЭГ-ДГЭ, а полоса на 1460 см^{-1} относится к $-\text{CH}_2-$. Валентное колебание 1735 см^{-1} было отнесено к карбоксильной группе $-\text{C}=\text{O}$ и не изменялось для образцов до и после модификации ПЭГ. Интенсивность спектральной полосы на 1580 см^{-1} , относящейся к карбоксильной группе $-\text{COO}^-$, и на 1418 см^{-1} , принадлежащей $-\text{OH}$ карбоксильной группы, увеличивается при появлении ПЭГ в

наноконструкции. Пик на 1180 см^{-1} был отнесен к эфирной группе $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$, содержание которой уменьшается в АН-СМАО-ПЭГ. Это объясняется тем, что в реакции формирования ковалентной связи между СМАО и ПЭГ принимают участие не только карбоксильные группы СМАО, но и группы малеинового ангидрида, защищенные гидрофобными фрагментами октадецена от воды.

Таким образом, после модификации АН-СМАО при участии ПЭГ на поверхности остаются карбоксильные группы, не задействованные в реакции, что может быть в дальнейшем использовано для конъюгации наноконструкций с биологически активными молекулами. После получения слоя ПЭГ на поверхности АН-СМАО дзета-потенциал поверхности уменьшается с -31 мВ (АН-СМАО) до -41 мВ (АН-СМАО-ПЭГ), что дополнительно подтверждает описанный механизм формирования ковалентной связи. Полученные АН-СМАО-ПЭГ оставались коллоидно-стабильными в течение нескольких месяцев.

3.1.3.2. Модификация АН эндогенным полимером - коломиновой кислотой (КолК)

Полиэтиленгликоль (ПЭГ) является «золотым стандартом» среди полимеров для биоприложений, однако, в последнее время этот факт активно подвергается критике, поскольку появляется все больше сообщений об антителах против ПЭГ у пациентов, кроме того несколько ПЭГилированных биофармацевтических препаратов получили предупреждения от регулирующих учреждений. [80,147]

В качестве альтернативы ПЭГ, как полимера-модификатора поверхности, могут быть использованы природные полимеры, в частности, эндогенный полисахарид коломиновая кислота (КолК), который является биосовместимым, неиммуногенным, нетоксичным соединением, деградирующим в условиях живого организма до нетоксичных продуктов под действием нейраминидаз.

Для модификации поверхности АН коломиновой кислотой были разработаны подходы, позволяющие получать биосовместимые гидрофильные формы АН. Наноконструкции АН-КолК получали в два этапа. На первом этапе получали АН, функционализированные ПЭИ, как описано в 3.1.2.2. Полученные АН-ПЭИ характеризовались коллоидной устойчивостью, положительным зарядом поверхности (дзета-потенциал $+42\text{ мВ}$), а также содержали на поверхности аминогруппы, экспонированные в водную среду. На втором этапе проводили реакцию с КолК.

На невосстанавливаемом конце коломиновой кислоты находится вицинальный диол, который может быть окислен в мягких условиях [157] с образованием альдегидной группы. Такой подход хорошо описан в литературе для модификации различных белков,

включая инсулин, эритропоэтин (ЭПО) и дезоксирибонуклеазу I. [72,78,158–160] Получение коллоидной кислоты с альдегидной группой на невосстанавливаемом конце (КолК-СНО) позволяет осуществлять прямую конъюгацию с аминогруппами АН-ПЭИ (Рис. 3.10).

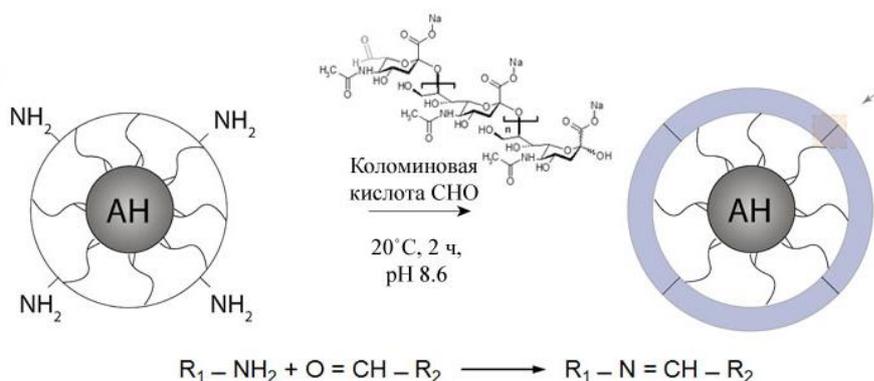


Рисунок 3.10. Схема модификации поверхности АН-ПЭИ КолК-СНО; Стрелкой указана ковалентная связь, сформированная в реакции первичного амина с альдегидной группой в щелочных условиях.

Получены наноконструкции АН-КолК с экспонированными в водную среду углеводными фрагментами. Однако по данным, полученным методом динамического рассеяния света, в результате такого подхода образуется большое количество агрегатов наночастиц. Невысокий отрицательный дзета-потенциал поверхности (-12 мВ) и отсутствие коллоидной стабильности не позволяют на данном этапе использовать полученные наноконструкции для дальнейших исследований *in vitro* и *in vivo*.

Показано, что возможно также создание покрытия из немодифицированной КолК на поверхности АН после их гидрофилизации при участии ПЭИ. Покрытие из КолК получали: 1) за счет электростатических взаимодействий между положительно заряженными АН-ПЭИ и отрицательно заряженной КолК и 2) путем формирования ковалентной связи между аминогруппой ПЭИ и карбоксильными группами КолК методом карбодиимидной активации.

Первый метод является наиболее простым подходом, который основан на адсорбции КолК на поверхности АН за счет электростатических взаимодействий (Рис. 3.11.а).

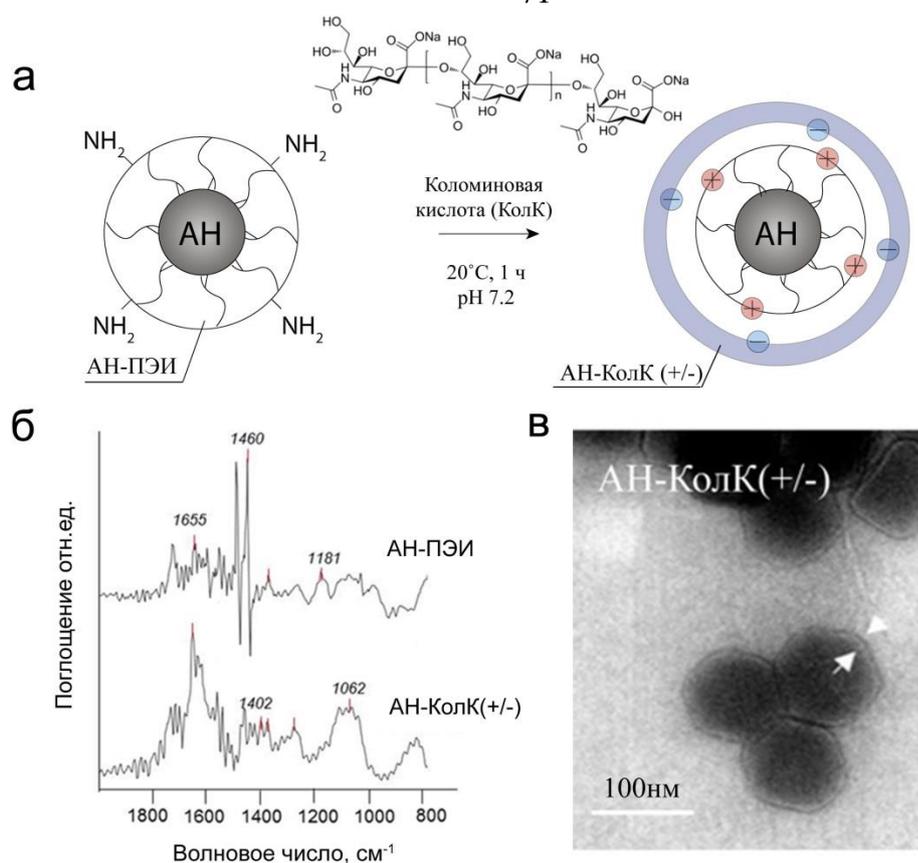


Рисунок 3.11. а) Схема модификации АН-ПЭИ КолК за счет электростатических взаимодействий. Структурная формула КолК б) ИК-Фурье спектры образцов АН-КолК(+/-) и АН-ПЭИ. в) Крио-ПЭМ изображение АН-КолК(+/-).

Полученные АН-КолК(+/-) имели отрицательный дзета-потенциал поверхности (-29 мВ) и характеризовались высокой коллоидной стабильностью. Методом динамического рассеяния света было установлено, что для полученных проб характерно узкое распределение по размерам (108 ± 8 нм). Дополнительным подтверждением успешной модификации поверхности является появление характерных пиков на ИК-Фурье спектрах. Так, появление пика 1655 см^{-1} , характерного для группы COO^- , и 1070 см^{-1} , характерного для эфирной группы КолК, доказывает присутствие КолК на поверхности АН-ПЭИ (Рис. 3.11.б). Кроме того, были получены крио-ПЭМ изображения, на которых видно, что у АН-КолК(+/-) формируется покрытие большей толщины (Рис. 3.11.в) по сравнению с АН-ПЭИ (Рис. 3.6.б).

Вторым подходом к модификации поверхности АН коломиновой кислотой является формирование ковалентной связи между аминогруппами АН-ПЭИ и карбоксильными группами КолК методом карбодиимидной активации (Рис. 3.12.а). Реакция, представленная на рисунке 3.12.а проходила в две стадии. На первом этапе получали сукцинимидиловый эфир в реакции коломиновой кислоты с N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимидом (EDC). На втором этапе полученный

активированный сложный эфир взаимодействовал с первичной аминогруппой ПЭИ с образованием соответствующего амида.

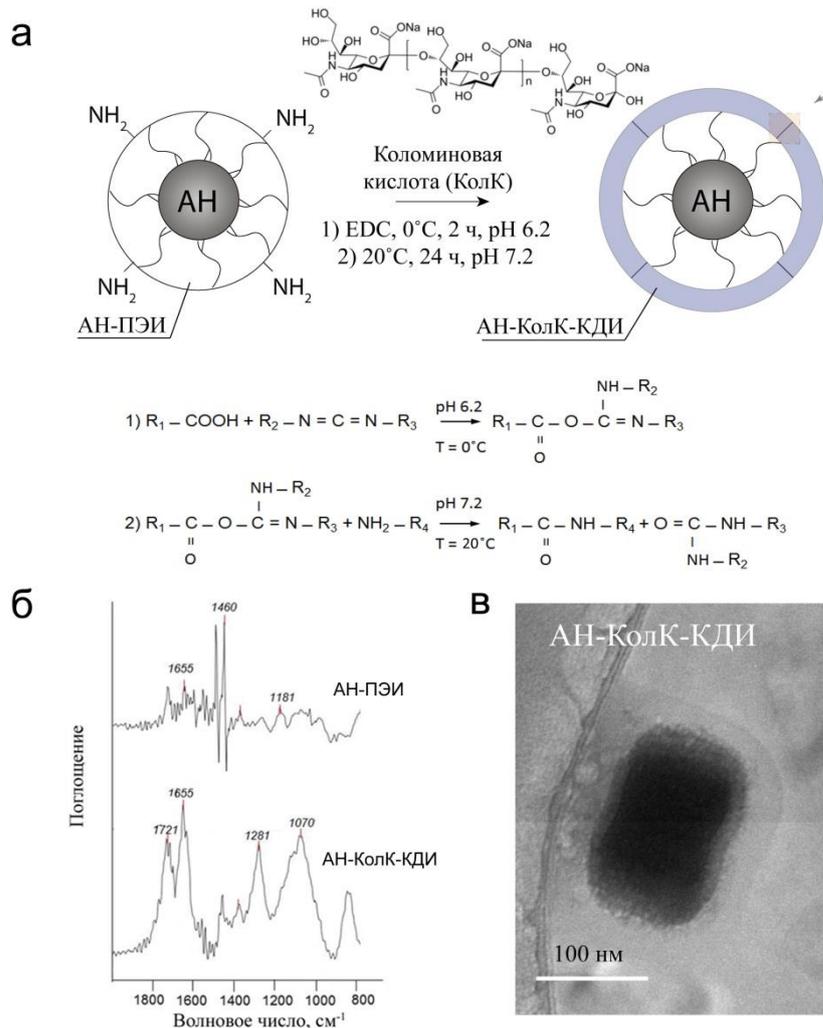


Рисунок 3.12. а) Схема модификации АН-ПЭИ КолК за счет формирования ковалентной связи. Структурная формула КолК. 2 стадии формирования ковалентной связи (указана стрелкой) между АН-ПЭИ и КолК. б) ИК-Фурье спектры образцов АН-КолК-КДИ и АН-ПЭИ. в) Крио-ПЭМ изображение АН-КолК-КДИ.

В результате были получены коллоидно-стабильные наноконструкции, имеющие отрицательный заряд поверхности (-31 мВ), с узким распределением по размерам (122±9 нм). Присутствие КолК на поверхности АН подтверждено ИК-Фурье спектрами (Рис. 3.12.б). Как и в предыдущем случае, появляются пики 1655 см⁻¹ и 1070 см⁻¹, характерные для групп COO⁻ и -C-O-C- коломиновой кислоты, соответственно. Кроме того, пики на 1720 и 1281 см⁻¹ подтверждают наличие групп -C=O и формирование связи C-N в результате ковалентного взаимодействия аминогрупп предварительно гидрофилизированных АН-ПЭИ и карбоксильных групп коломиновой кислоты. Кроме того, были получены крио-ПЭМ изображения, по которым регистрируется прирост

толщины полимерного покрытия для АН-КолК-КДИ по сравнению с АН-ПЭИ (Рис. 3.12.в).

Для исследования интернализации наноконструкций на основе АН и коломиновой кислоты в клетки необходимы источники возбуждающего излучения из ближней ИК-области и одновременной регистрации эмиссии в видимом и красном диапазоне спектра. Для проведения анализа на конфокальном микроскопе и проточном цитофлуориметре, для которых существует ограничение по длине волны источника возбуждения (обычно 405 нм, 488 нм, 543 нм и 640 нм), в состав наноконструкции АН-КолК необходимо было ввести флуоресцентную метку. В качестве флуоресцентной метки использовали флуоресцентный краситель родамин Б, максимум поглощения которого находится на длине волны 545 нм, а эмиссии 565 нм. Включение родамина Б проводили за счет адсорбции красителя на поверхности полимерного покрытия АН-КолК.

Количество родамина Б, включенного в наноконструкции, определяли спектрофотометрически, как разницу между концентрацией добавленного и непрореагировавшего красителя в надосадочной жидкости после удаления наночастиц центрифугированием. Концентрация родамина Б в наноконструкции АН-КолК(+/-) составила 0.29 мг/мл или ~1100 молекул красителя на одну наночастицу. В случае АН-КолК-КДИ концентрация родамина Б составила 0.31 мг/мл или ~1200 молекул красителя на одну наночастицу. Такое количество красителя в составе наноконструкций является достаточным для идентификации интернализации в клетки при проведении исследований на конфокальном микроскопе и цитофлуориметре.

3.1.3.3. Модификация АН стимул-чувствительным полимером - поли-N-винилкапролактамом (ПВК)

Использование синтетических биосовместимых полимеров упрощает процедуру модификации поверхности АН за счет большого разнообразия свойств полимеров и позволяет получать наноконструкции с хорошо настраиваемыми параметрами. Биосовместимость, отсутствие токсичности, большая емкость, легкость наполнения лекарственными препаратами, а также их контролируемое локальное высвобождение в ответ на внешние стимулы – такой комплекс свойств можно придать наноконструкциям, подобрав полимерное покрытие.

В работе был разработан подход к получению биосовместимых конструкций на основе АН и термочувствительного полимера поли-N-винилкапролактама (ПВК), который при повышении температуры до нижней критической температуры растворения (НКТР) 32–34°C способен к обратимому конформационному переходу от клубка к глобуле, что обеспечивает высвобождение лекарства. Конструкции АН-ПВК были получены на основе

АН, включенных в агрегаты мицелл СМАО (3.1.2.3). Формирование комплекса ПВК с АН–СМАО происходило в результате образования водородной связи между С=О амидных групп ПВК и карбоксильными группами СМАО (Рис. 3.13.а). [161]

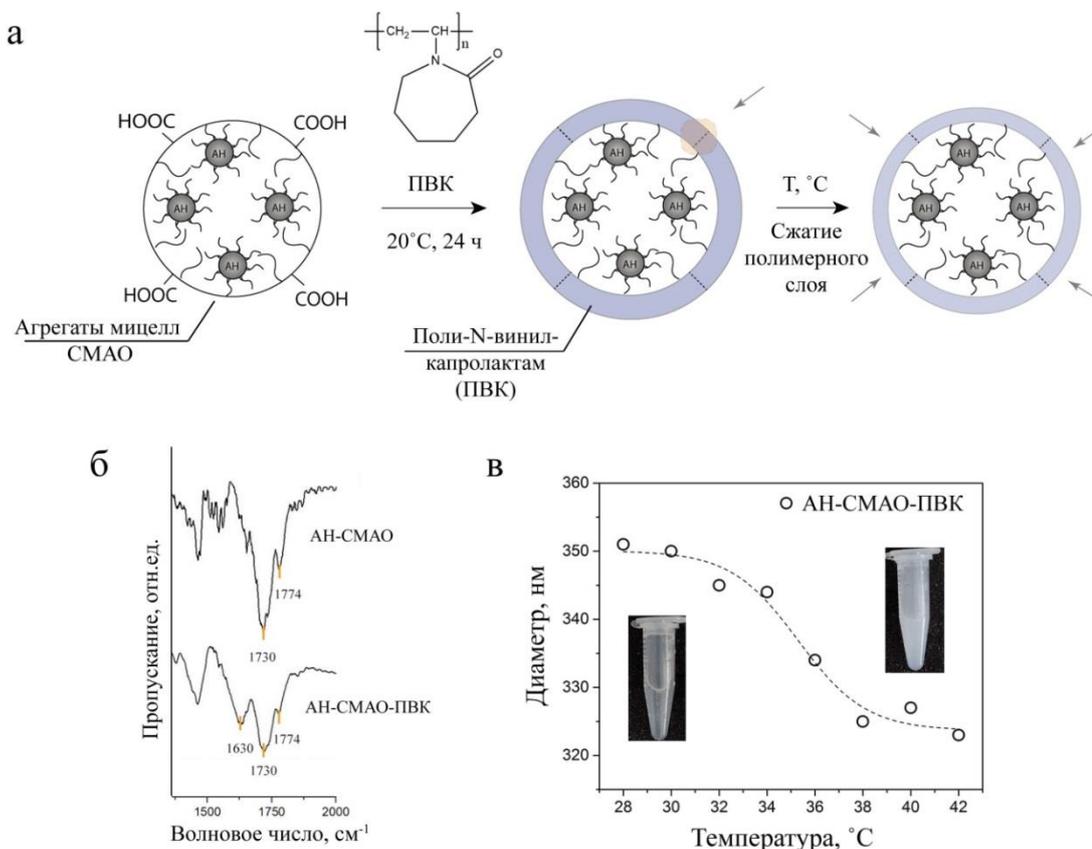


Рисунок 3.13. а) Схематическое изображение модификации АН-СМАО ПВК. Стрелкой указана водородная связь между С=О амидных групп ПВК и карбоксильными группами СМАО. б) ИК-Фурье спектры образцов АН-СМАО и АН-СМАО-ПВК. в) Зависимость гидродинамического диаметра конструкций АН-СМАО-ПВК от температуры, данные получены методом динамического рассеяния света.

Для подтверждения формирования термочувствительного покрытия на АН-СМАО из ПВК были проанализированы ИК-Фурье спектры (Рис. 3.13.б). Сильное валентное колебание $-\text{COO}^-$ в области 1730 и 1774 cm^{-1} относится к карбоксильным группам СМАО, образующимся в результате гидролиза. После модификации АН-СМАО при участии ПВК интенсивность этих колебаний уменьшилась, что указывает на формирование комплекса АН-СМАО-ПВК. Присутствие ПВК на поверхности АН было также подтверждено наличием пика в области 1630 cm^{-1} , характерным для группы $-\text{C}=\text{O}$. Кроме того, изменение дзета-потенциала поверхности конструкций с -33 мВ до -6 мВ свидетельствует об успешной модификации поверхности. Полученные АН-СМАО-ПВК оставались коллоидно-стабильны в течение одной недели.

ПВК обеспечивал контролируемое высвобождение лекарства при изменении температуры выше НКТР, при которой ПВК меняет свою конформацию, что связано с разрушением водородных связей с ассоциированными молекулами воды, и переходит из конформации клубка в конформацию глобулы. На поверхности частиц такое поведение полимера проявляется в виде сжатия полимерного слоя. Этот эффект позволил оценить термочувствительные свойства АН-СМАО-ПВК по измерению гидродинамического диаметра в диапазоне температур 28-42°C методом динамического рассеяния света (Рис. 3.13.в).

При нагревании в диапазоне 32-37°C происходило резкое уменьшение размера конструкций, что связано с упомянутой выше гидратацией-дегидратацией ПВК. Такая зависимость гидродинамического диаметра АН-СМАО-ПВК от температуры свидетельствует о термочувствительности разработанного комплекса. Это позволяет использовать данные конструкции для доставки лекарств с контролируемым высвобождением при повышении температуры.

3.1.4. Получение полимер-модифицированных АН в процессе радикальной ИК-индуцированной полимеризации

Свойство АН конвертировать ближнее ИК-излучение в видимое и ультрафиолетовое позволяет преодолеть многие проблемы, связанные с использованием УФ- и синего света в качестве источника, инициирующего реакцию фотополимеризации. Был разработан подход к формированию полимерного слоя на поверхности апконвертирующих наночастиц методом радикальной ИК-индуцированной реакции полимеризации. Примечательно, что такая стратегия позволила получить полимерные структуры как в микро-, так и в нанометровом масштабе в зависимости от условий проведения реакции и состава реакционной смеси или фотоотверждаемой композиции (ФОК). Реакция фотополимеризации идет от поверхности АН, поэтому концентрация наночастиц в составе ФОК определяет конечный продукт: в случае сильноразбавленных ФОК с концентрацией АН ниже порогового значения, продуктом реакции является дисперсия одиночных наночастиц с полимерной оболочкой. В случае, когда концентрации наночастиц достаточно для формирования связанного полимерного объема, продуктом будет полимерная микроструктура с включенными АН. [26] При этом ключевым этапом подготовки фотоотверждаемой композиции в обоих случаях является создание наноконструкции АН/фотоинициатор.

3.1.4.1. Модификация АН с помощью ИК-индуцируемой полимеризации ПЭГ-ДА у поверхности наночастиц

Формирование полимерного слоя на поверхности АН в процессе ИК-индуцируемой полимеризации открывает новые возможности в области поверхностной модификации наночастиц, что имеет большое значение для использования АН в биомедицинских приложениях. Эта стратегия является перспективным подходом к модификации поверхности АН, поскольку рост полимерной цепи начинается от поверхности наночастиц, реакция протекает быстро, а введение лекарственных препаратов возможно непосредственно на этапе поверхностной модификации.

Был разработан подход к модификации поверхности АН путем проведения фотополимеризации олигомера (ПЭГ-ДА) в окрестности отдельных наночастиц при возбуждении их ближним ИК-светом. Для этого были предварительно подготовлены наноконструкции на основе АН для иммобилизации молекул фотоинициатора и повышения сродства к олигомеру ПЭГ-ДА.

В качестве фотоинициатора было выбрано эндогенное соединение витамин В₂ или рибофлавин в форме хорошо растворимого в воде соединения флавинмононуклеотида (ФМН). [162] ФМН может выступать как фотоинициатор второго типа, т.е. генерировать радикалы в присутствии молекул соинициатора триэтанолamina (ТЭОА) для образования окислительно-восстановительной пары, что хорошо описано в литературе. [163]

Длины волн фотолюминесценции АН 365 и 450 нм перекрываются со спектром поглощения ФМН (Рис. 3.14.а), что делает возможным передачу энергии с АН на ФМН и образование радикалов, инициирующих реакцию полимеризации. Для увеличения сродства между поверхностью АН и фотоинициатором избыток олеиновой кислоты с поверхности АН был удален с помощью ТМАГ (3.1.2.1). Частичное удаление лиганда-стабилизатора с поверхности АН – распространенный подход к созданию наноконструкций на основе АН и малых молекул для реализации процесса переноса энергии от донора к акцептору. Перенос энергии становится возможным благодаря уменьшению толщины слоя стабилизатора (ОК) на поверхности АН, сохранению коллоидной стабильности и контролю свойств поверхности для осуществления адсорбции или формирования ковалентной связи с фоточувствительными молекулами-акцепторами. Так, частичное удаление олеиновой кислоты с поверхности АН с помощью ТМАГ позволило адсорбировать молекулы ФМН за счет координации между ионами редкоземельных элементов АН и PO_4^- группами ФМН. [164] Появление широкой полосы флуоресценции (от 500 до 625 нм) ФМН при возбуждении комплекса АН-ФМН на длине

ПЭГ-ДА. Реакцию радикальной фотополимеризации проводили при облучении реакционной системы светом из ближнего ИК-диапазона спектра на длине волны 975 нм в сканирующем режиме при мощности 10 Вт/см^2 в течение 45 минут. Размеры полученных наноконструкций АН, модифицированных ПЭГ в реакции ИК-индуцированной полимеризации в окрестности отдельных наночастиц (АН-ПЭГ), оценивали методом динамического рассеяния света (Рис. 3.16.а).

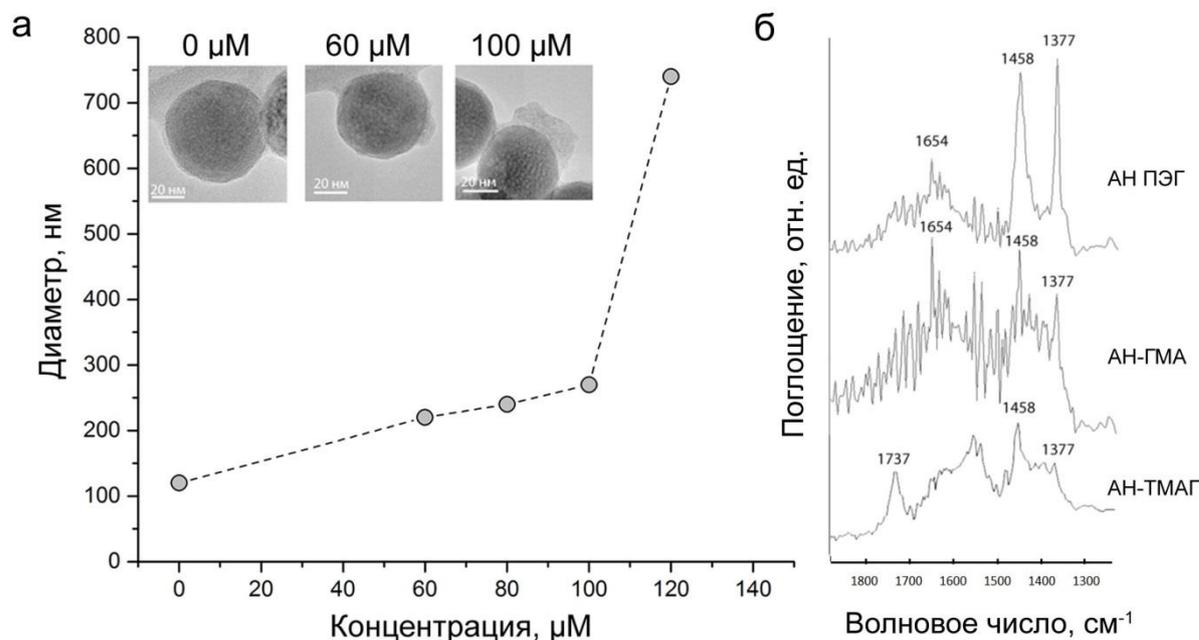


Рисунок 3.16. а) Зависимость гидродинамического диаметра наноструктур АН-ПЭГ от концентрации введенного олигомера (ПЭГ-ДА), полученная методом динамического светорассеивания. На вставке: ПЭМ изображения АН-ГМА, АН-ПЭГ (+60 μM ПЭГ-ДА), АН-ПЭГ (+100 μM ПЭГ-ДА). б) ИК - Фурье спектры образцов АН-ТМАГ, АН-ГМК; АН-ПЭГ после ИК-индуцированной полимеризации. [165]

Продемонстрировано, что при повышении концентрации олигомера (ПЭГ-ДА) в системе происходит увеличение размера АН-ПЭГ от 120 до 270 нм. Однако при максимальной концентрации ПЭГ-ДА (100 μM) наблюдается формирование агрегатов.

Полученные АН-ПЭГ были дополнительно исследованы методом просвечивающей электронной микроскопии. Добавление олигомера в реакционную систему приводит к неравномерному формированию полимерного слоя на поверхности АН (Рис.3.16.а (вставка)), а при увеличении концентрации исходного олигомера полимерный слой на поверхности АН увеличивается. Различие в результатах ПЭМ и динамического светорассеяния можно объяснить гидрофильной природой полимерного покрытия, которое при подготовке образцов для ПЭМ (высушивании) сжимается и концентрируется на отдельных участках поверхности.

Дополнительным подтверждением формирования полимерного слоя из биосовместимого ПЭГ на поверхности АН в процессе ИК-индуцируемой полимеризации в окрестности АН служат ИК-Фурье спектры образцов АН-ТМАГ, АН-ГМК и АН-ПЭГ (Рис.3.16.б). Сильные валентные колебания карбонильной группы $\text{C}=\text{O}$, характерные для олеиновой кислоты, зарегистрированы при 1737 см^{-1} в образце, гидрофилизированном с помощью ТМАГ. Эта полоса практически исчезает в образце АН-ГМК и АН-ПЭГ. Колебание групп -CH и -CH_2 при 1458 и 1377 см^{-1} получено для образца АН-ГМК и увеличивается в образце АН-ПЭГ. Характерный пик при 1654 см^{-1} , относящийся к карбоксильным группам в АН-ГМК, исчезает в АН-ПЭГ после реакции фотополимеризации.

Представленный подход к модификации поверхности АН-ПЭГ в процессе ИК-индуцируемой реакции полимеризации позволяет получать наноконструкции с контролируемой толщиной полимерного слоя на поверхности АН значительно быстрее, чем в случае термоиндуцированной полимеризации, которая протекает, как минимум в течение 6 часов [неопубликованные данные], исключая формирование полимерных частиц в объеме фотокомпозиции. Кроме того, эндогенный фотоинициатор и малая мощность возбуждающего излучения приводят к получению нетоксичных АН-ПЭГ.

3.1.4.2. Создание системы для иницирования ИК-полимеризации в объеме на основе наноконструкции АН-фотоинициатор

Фотоотверждение композиции с высокой концентрацией АН приводит к получению полимерных конструкций, которые находят применение в качестве скаффолдов для решения задач тканевой инженерии. Создание системы фотоиницирования на основе АН, возбуждаемых глубоко проникающим ближним ИК-излучением, значительно упрощает процедуру получения скаффолдов требуемой формы и размера и позволяет осуществлять процесс *in situ*.

Ключевым компонентом фотоотверждаемой композиции является наноконструкция АН/фотоинициатор. Возбуждение АН должно приводить к генерации радикалов, ответственных за иницирование полимеризации. Это становится возможным при выполнении нескольких условий: 1) необходимо подобрать пару АН/фотоинициатор так, чтобы спектр эмиссии АН перекрывался со спектром поглощения фотоинициатора; 2) расстояние между донором энергии и акцептором должно быть минимальным для реализации эффективного переноса энергии. Фотолюминесценция АН в УФ- и видимой области спектра попадает в полосы поглощения растворимого в воде фотоинициатора фенил-2,4,6-триметилбензоилфосфината лития (LAP) (Рис. 3.17.а), и нерастворимого в воде 2-бензил-2-(диметиламино)-1-[4-(морфолинил)фенил]-1-бутанона (Irgacure 369)

(Рис. 3.17.б), что позволяет создать донорно-акцепторную энергетическую пару АН/фотоинициатор, основанную на резонансном переносе энергии.

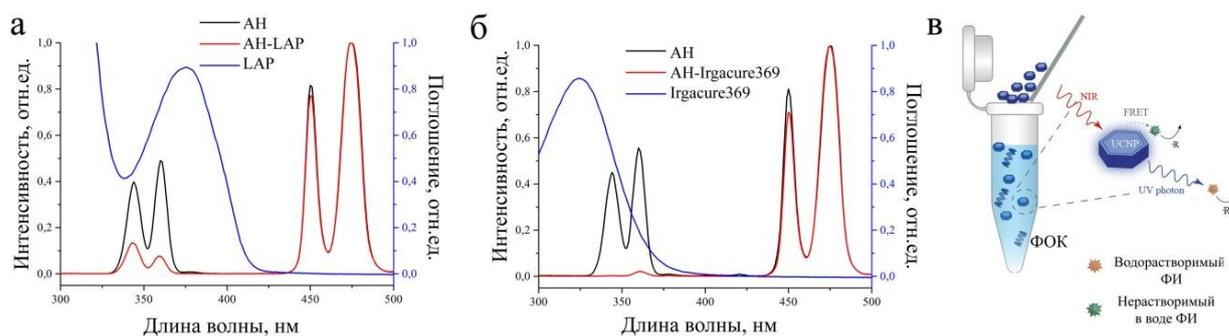


Рисунок 3.17. а) Спектр эмиссии АН (черная линия), наноконструкции АН-ПЭГ-ДА-LAP (красная линия) при возбуждении 975 нм, спектр поглощения LAP (синяя линия). б) Спектр эмиссии АН (черная линия), наноконструкции АН-ПЭГ-ДА-Irgacure369 (красная линия) при возбуждении на длине волны 975 нм, спектр поглощения Irgacure369 (синяя линия). в) Схематическое изображение процесса получения универсальной системы на основе наноконструкции АН-фотоинициатор и ПЭГ-ДА для ИК-полимеризации с использованием как гидрофильных (LAP), так и гидрофобных (Irgacure 369) фотоинициаторов (ФИ). [166]

Перенос энергии с АН на молекулы фотоинициатора приводит к генерации радикалов, способных активировать мономер/макромономер (Рис.3.18). При диссоциации LAP образует два радикала, а их сопряжение с фенильными кольцами делает их более стабильными, [167] следовательно, более долгоживущими, чем в случае Irgacure 369, у одного из радикалов которого отсутствует сопряжение.

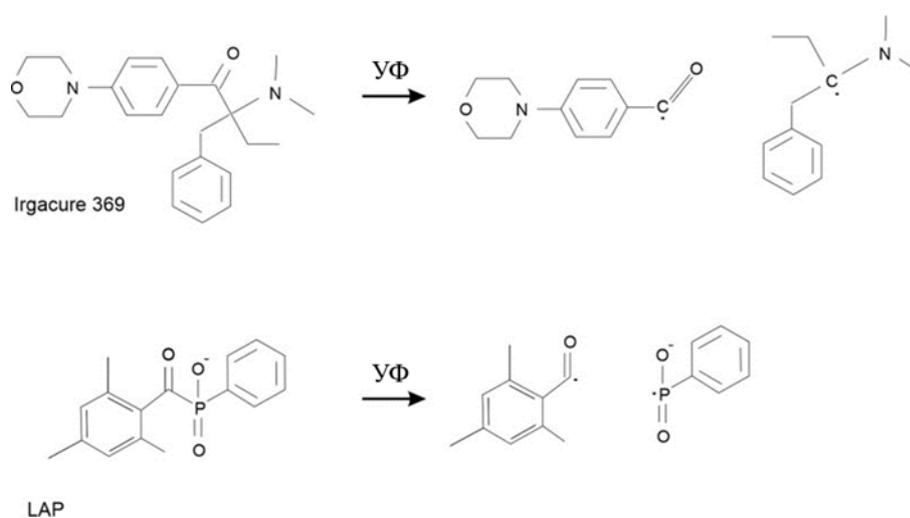


Рисунок 3.18. Схема гомолитической фотодиссоциации Irgacure 369 и LAP и образование свободных радикалов при возбуждении ультрафиолетовым излучением.

Активность радикалов была исследована дезактивацией дифенилпикрилгидразила (ДФПГ) как молекулярного индикатора свободных радикалов (метод 2.2.5).

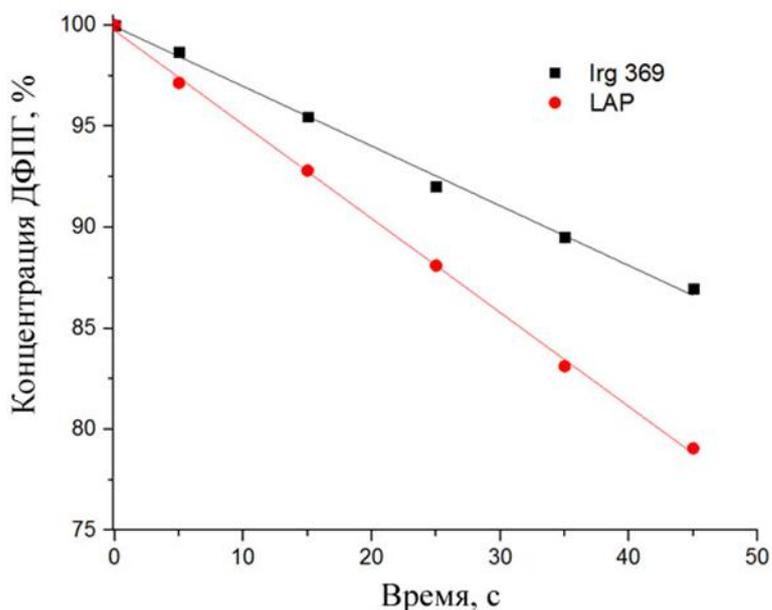


Рисунок 3.19. Концентрация непрореагировавшего ДФПГ после фотодиссоциации Irgacure 369 (черный) и LAP (красный) излучением на длине волны 360 и 345 нм.

Скорость генерации свободных радикалов для Irgacure 369 и LAP очень близки, поскольку изменение концентрации непрореагировавшего ДФПГ во времени отличается в 1.5 раза (Рис. 3.19). Однако LAP диссоциирует с несколько большей скоростью по сравнению с Irgacure 369. Поэтому при разработке системы нанофотоиницирования концентрации фотоинициаторов были подобраны таким образом, чтобы обеспечить начало формирования полимерных структур в одинаковых условиях проведения фотополимеризации для двух систем – с растворимым в воде LAP и нерастворимым Irgacure 369.

Разработанная универсальная система для введения как растворимых, так и нерастворимых в воде соединений включает синтетический олигомер ПЭГ-ДА (Мм 700 Да), смешивающийся как с гидрофильными, так и с гидрофобными компонентами фотоотверждаемой композиции (Рис. 3.17.в). ПЭГ-ДА легко вступает в реакцию радикальной фотополимеризации и может использоваться как основной компонент для формирования полимерного скаффолда. ПЭГ-ДА является адаптером, который повышает аффинность всех компонентов ФОК, позволяя включать в систему гидрофобные АН и водорастворимые/нерастворимые фотоинициаторы, значительно расширяя спектр ФОК для биомедицинских приложений.

ИК-полимеризация возможна при условии резонансного переноса энергии с АН на молекулу фотоинициатора. Для определения механизма резонансного переноса энергии

для двух систем: 1) АН-ПЭГ-ДА-LAP и 2) АН-ПЭГ-ДА-Irgacure 369 было исследовано время жизни фотолюминесценции АН на длине волны 345 и 360 нм. В случае АН-ПЭГ-ДА-LAP не было зарегистрировано каких-либо существенных изменений в кинетике фотолюминесценции, что позволило предположить, что резонансный перенос энергии осуществляется по механизму люминесцентного резонансного переноса энергии (LRET) (Рис. 3.20.а). LRET реализуется за счет включения в комплекс гидрофильного фотоинициатора (LAP), доступ которого к гидрофобной поверхности АН затруднен. Это влияет на расстояние между донором и акцептором, которое оказывается слишком большим для Ферстеровского резонансного переноса энергии (FRET). Однако в случае нерастворимого в воде Irgacure 369 и гидрофобных АН процесс FRET происходит, что подтверждает резкое изменение кинетики фотолюминесценции ионов Tm^{3+} (Рис. 3.20.б). Небольшие молекулы гидрофобного фотоинициатора, вероятно, смогли подойти достаточно близко к гидрофобной поверхности АН (r меньше 10 нм), обеспечивая расстояние, необходимое для эффективного FRET.

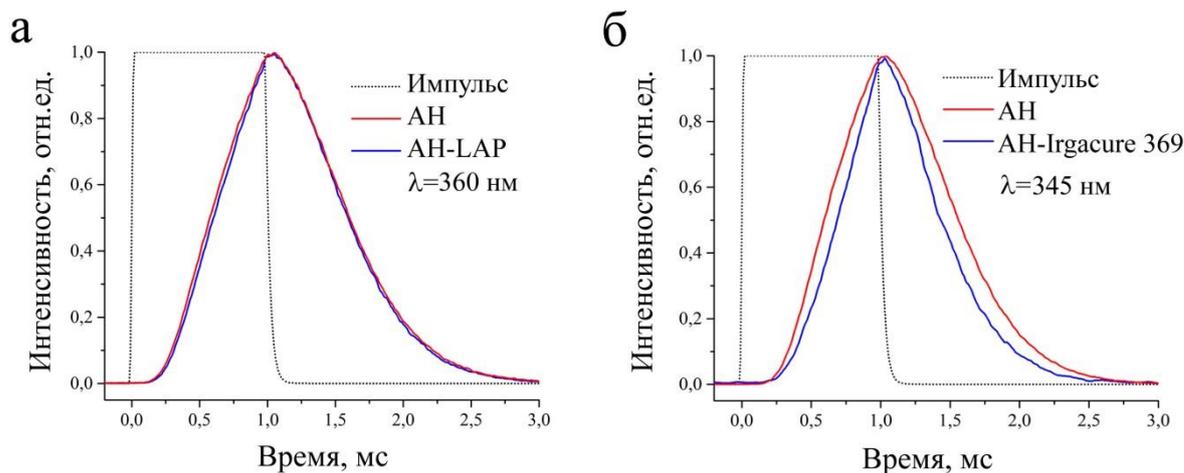


Рисунок 3.20. а) Кинетика фотолюминесценции АН на длине волны 360 нм при импульсном возбуждении в ближнем ИК-диапазоне (красная линия АН, синяя линия АН-LAP). б) Кинетика фотолюминесценции АН на длине волны 345 нм при импульсном возбуждении в ближнем ИК-диапазоне (красная линия АН, синяя линия АН-Irgacure 369). Временной профиль возбуждающих импульсов длительностью 1 мс на длине волны 975 нм показан черными линиями. Спектры нормированы. [166]

Таким образом, была разработана универсальная система на основе АН, фотоинициатора и диакрилата полиэтиленгликоля для инициирования фотополимеризации в объеме под действием света ближнего ИК-диапазона спектра. Определены оптимальные концентрации компонентов, а также механизм резонансного переноса энергии с АН на молекулу фотоинициатора: для АН-ПЭГ-ДА-LAP резонансный

перенос энергии осуществляется по механизму LRET; для АН-ПЭГ-ДА-Irgacure 369 по механизму FRET.

3.2. Биомедицинское применение наноконструкций на основе АН

В настоящее время наибольший интерес представляет разработка многофункциональных наноконструкций на основе единой платформы. В данной работе в качестве такой наноплатформы выступали АН, модифицированные биосовместимыми полимерами, которые участвовали в решении несколько задач: осуществлять визуализацию, терапию и формировать матрицы (так называемые, скаффолды) *in situ*. Биовизуализация патологически измененных тканей, таких, как солидная опухоль и воспаление, системы макро- и микроциркуляции крови, терапия солидной опухоли с использованием разработанных наноконструкций - эти задачи были решены в рамках настоящей работы. Кроме того, разработанные подходы к использованию АН для создания микроструктурированных полимерных конструкций из ПЭГ-ДА и природных полимеров (гиалуроновой кислоты и желатина, содержащих винильные звенья) методом ИК-индуцированной полимеризации расширили спектр возможных фотокомпозиций, а также значительно упростили процедуру получения скаффолда с заданными свойствами для решения задач регенеративной медицины.

3.2.1. Наноконструкции АН-КолК для визуализации патологически измененных тканей

Флуоресцентная визуализация с использованием АН имеет большое значение для медико-биологических исследований, поскольку позволяет проводить раннюю малоинвазивную диагностику и терапию патологически измененных тканей. Разработанный подход к модификации поверхности АН эндогенной колониновой кислотой нивелирует иммуногенность наночастиц, предотвращает узнавание ретикулоэндотелиальной системой, снижает взаимодействие с клетками, а также значительно увеличивает время циркуляции АН.

Использование наноконструкций АН-КолК для визуализации солидной опухоли или воспаления *in vivo* возможно при выполнении нескольких условий. Такие наноконструкции должны длительно циркулировать в организме, что определяет эффективность накопления в области патологии. АН-КолК должны оставаться «неузнанными» клетками системы кровообращения, в частности, не должны индуцировать фагоцитарную активность. Кроме того, они не должны снижать жизнеспособность клеток.

Накопление наноконструкций АН-КолК в патологически измененных тканях происходит за счет эффекта повышенной проницаемости и удерживания (EPR-эффекта),

[168] описанного в литературном обзоре. Эффективность накопления АН связана с длительным временем их циркуляции в кровотоке, которое напрямую зависит от низкой адсорбции белков крови на поверхности АН.

3.2.1.1. Исследование свойств АН-КолК в условиях *in vitro*

Для оценки неспецифичной адсорбции белков на поверхности АН-КолК, АН-ПЭГ (образец сравнения) и АН-ПЭИ (исходные наночастицы) инкубировали в разбавленной сыворотке крови, а затем анализировали адсорбцию белков на поверхности наноконструкций, оценивая количество не связавшихся с наночастицами белков по методу Брэдфорда (2.2.10). [169] Показано, что в надосадочной жидкости всех образцов АН-КолК количество белка незначительно меньше (~4%) по сравнению с чистой сывороткой (Рис. 3.21).

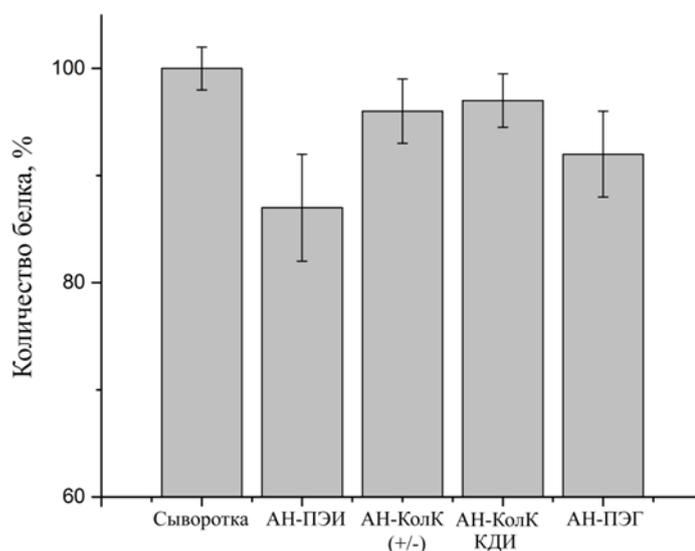


Рисунок 3.21. Количество белка в надосадочной жидкости после инкубации АН-ПЭИ, АН-КолК(+/-), АН-КолК-КДИ и АН-ПЭГ в разбавленной сыворотке крови мыши; контроль – чистая сыворотка крови.

Коломиновая кислота на поверхности АН экранирует первый слой покрытия ПЭИ, что приводит к увеличению почти на 10% количества белка в сыворотке по сравнению с количеством белка после инкубации с АН-ПЭИ. Следует отметить, что количество белка в надосадочной жидкости после инкубации с АН-КолК было выше, чем после инкубации с АН-ПЭГ. Принимая во внимание тот факт, что чем выше концентрация белка в надосадочной жидкости, тем меньше адсорбировано белка на поверхности наноконструкций, можно сделать вывод, что при модификации поверхности АН коломиновой кислотой адсорбция белка незначительна. Это определяет возможность длительной циркуляции АН-КолК в кровотоке.

Исследование накопления наноконструкций АН-КолК в клетках проводили с использованием проточной цитометрии. Для этого был разработан метод включения родамина Б в полимерную оболочку на поверхности АН (метод 2.2.3.5). Это позволило регистрировать накопление АН в клетках при возбуждении стандартным источником излучения (530 нм) по флуоресценции на длине волны 580 нм. Уровень клеточного поглощения АН-КолК оценивали на трех линиях клеток: на макрофагах мыши (RAW 264.7), моноцитах человека (THP-1) в качестве неактивированных макрофагов и клетках аденокарциномы легких человека (A-549). Исследование проводили в сравнении с АН-ПЭГ. Образцы инкубировали с клетками в течение 60 минут, затем исследовали методом проточной цитометрии. На рисунке 3.22 представлены гистограммы накопления в клетках после инкубации с наноконструкциями на основе АН с включенным родамином Б.

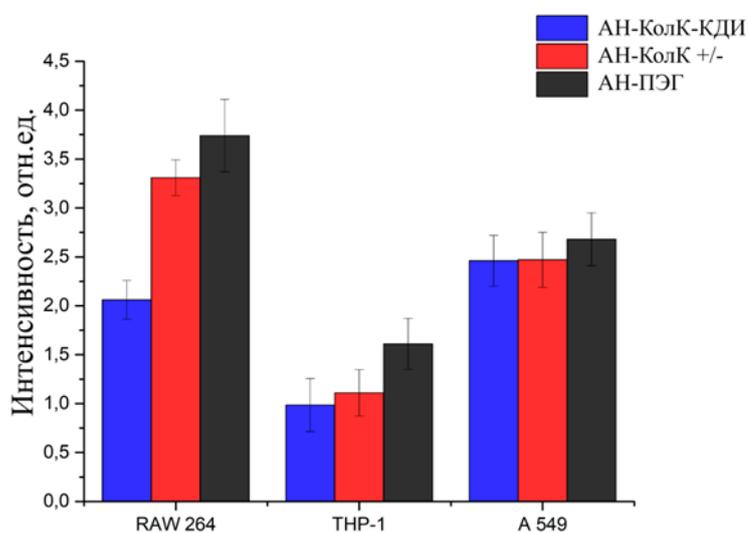


Рисунок 3.22. Нормированный флуоресцентный сигнал от накопленных в клетках наноконструкций АН-КолК (+/-), АН-КолК-КДИ, АН-ПЭГ. Данные получены методом проточной цитометрии для клеточных линий RAW 264.7, THP-1, A549 после их инкубации в течение 60 мин с наноконструкциями, мечеными родамином Б.

Наименьшая степень захвата АН-КолК наблюдалась для клеточной линии THP-1. Стоит отметить, что при сравнении двух подходов к модификации поверхности АН колониновой кислотой АН-КолК (+/-) накапливается в клетках в большей степени, чем АН-КолК-КДИ. Поскольку функции макрофагов RAW 264.7 аналогичны функциям, выполняемым промоноцитами THP-1, степени поглощения наноконструкций близки. Небольшая разница между АН-КолК (+/-) и АН-КолК-КДИ объясняется тем фактом, что колониновая кислота претерпевает конформационные изменения в процессе формирования полиэлектролитного комплекса с ПЭИ (АН-КолК (+/-)), что приводит к повышенному фагоцитозу клетками. Исследование клеточного поглощения на линии клеток аденокарциномы А-549 не выявило заметных различий между АН-КолК (+/-) и

АН-КолК-КДИ. Однако наноконструкции АН-ПЭГ имели большую степень накопления всеми линиями клеток по сравнению с АН-КолК. Эти результаты демонстрируют большой потенциал использования КолК в качестве биосовместимого полимера-модификатора поверхности АН и подтверждают способность коломиновой кислоты «скрывать» АН от поглощения клетками в *in vitro* исследованиях.

Время циркуляции наноконструкций в кровотоке напрямую зависит от их способности к адсорбции на поверхности клеток иммунной системы, что приводит к выведению наночастиц из системы кровообращения и уменьшению степени накопления в целевой области. Сравнение способности АН-КолК и АН-ПЭГ адсорбироваться на поверхности клеток фибробластов кожи человека (VJ-5ta) было проведено с помощью визуализации на конфокальном микроскопе после 72-часовой инкубации с клетками (Рис. 3.23).

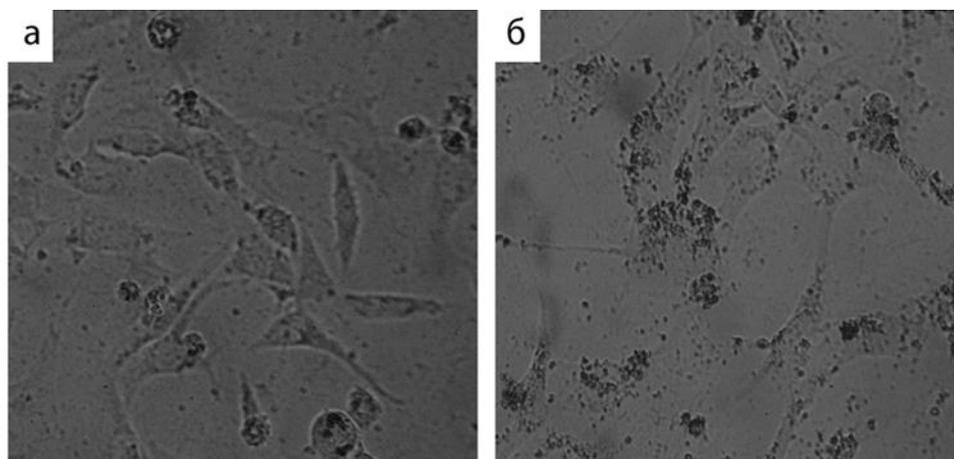


Рисунок 3.23. Оптическое изображение фибробластов линии VJ-5ta (hTERT) после 72-часовой инкубации с наноконструкциями а) АН-КолК-КДИ и б) АН-ПЭГ.

В случае АН-ПЭГ наноконструкции собираются в агрегаты и в значительной степени адсорбируются на поверхности клеток. В случае АН, модифицированных коломиновой кислотой, такой картины не наблюдается, что при использовании *in vivo* позволит им долго циркулировать в кровеносной системе. Это связано с тем, что способность наноконструкций адсорбироваться на клеточной поверхности вносит значительный вклад в скорость выведения АН из кровотока.

Для исследования токсического эффекта АН-КолК была проведена оценка жизнеспособности фибробластов кожи человека VJ-5ta с использованием МТТ-теста (Рис. 3.24). В качестве контроля в тех же условиях инкубировали интактные клетки (без добавления наноконструкций). Оценка жизнеспособности нормальных клеток (фибробластов) после их инкубации с АН-КолК позволяет определить диагностический и

терапевтический потенциал использования наноконструкций при заболеваниях, сопровождающихся воспалением кожных покровов.

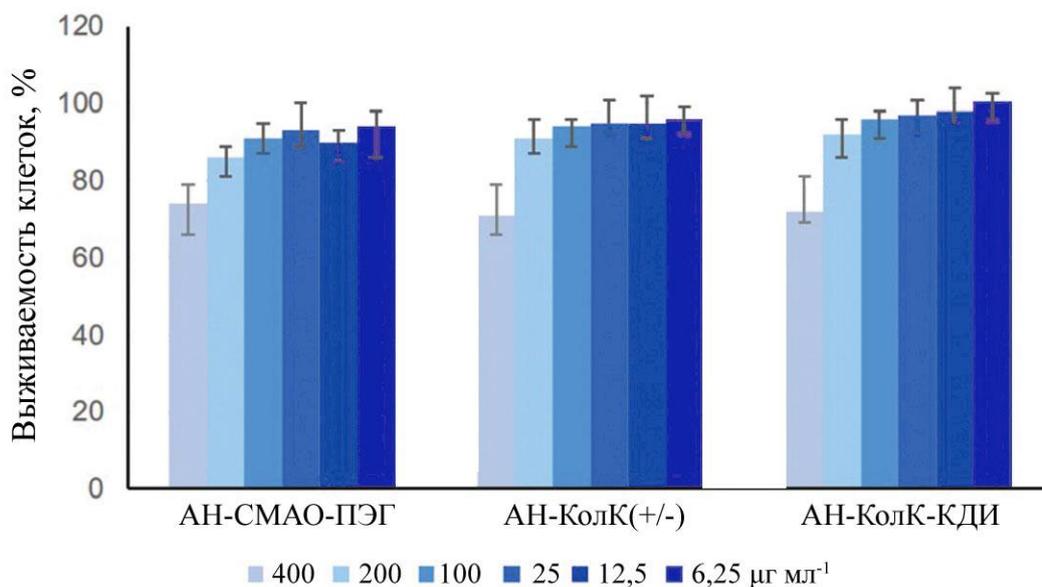


Рисунок 3.24. Жизнеспособность фибробластов BJ-5ta (hTERT) после 24-часовой инкубации с наноконструкциями АН-ПЭГ, АН-КолК(+/-), АН-КолК-КДИ. МТТ-тест.

По полученным данным можно сделать вывод, что несмотря на присутствие в составе наноконструкций ПЭИ, который по литературным данным [170] проявляет цитотоксичность, выживаемость фибробластов после инкубации с АН-КолК(+/-) и АН-КолК-КДИ оценивается на уровне 90-100%. При этом образцы, для функционализации поверхности которых использовали коломиновую кислоту, проявляли меньшую токсичность по сравнению с АН-ПЭГ. В случае максимальной исследованной концентрации нанокристаллов (400 мкг/мл) средняя выживаемость клеток составила 71% для АН-КолК(+/-) и 72% для АН-КолК-КДИ, что свидетельствует о низкой цитотоксичности. В случае наноконструкций, модифицированных ПЭГ, при тех же условиях инкубации с клетками наблюдалась схожая средняя выживаемость фибробластов (74%).

Была также исследована отложенная цитотоксичность полученных наноконструкций на примере АН-КолК-КДИ в условиях *in vitro* (Рис. 3.25). По данным эксперимента выживаемость фибробластов кожи человека после 72-часовой инкубации с наноконструкциями (концентрация ниже 0.1 мг/мл) составила около 100%. Это сравнимо с выживаемостью клеток после инкубации с АН, модифицированными ПЭГ. Полученные результаты подтверждают низкий уровень отложенной цитотоксичности АН-КолК.

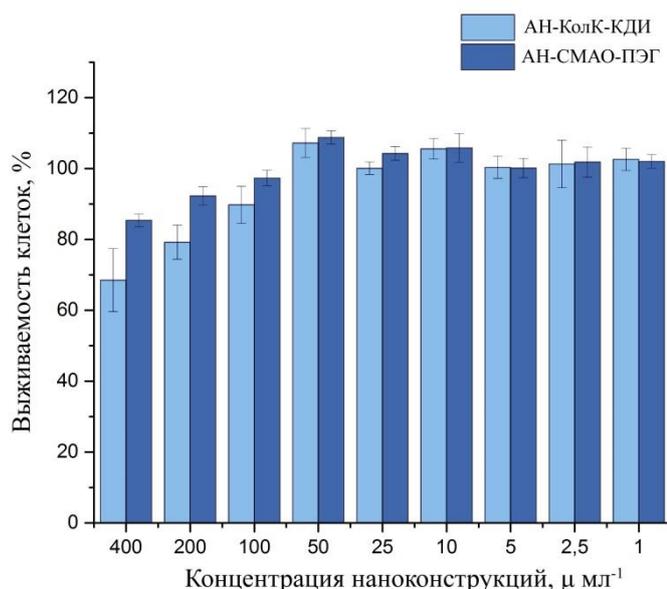


Рисунок 3.25. Выживаемость фибробластов BJ-5ta (hTERT) после 72-часовой инкубации с наноконструкциями АН-КолК-КДИ и АН-ПЭГ. МТТ-тест.

На основании полученных данных был сделан вывод, что наноконструкции АН-КолК нетоксичны, не сорбируют белки плазмы крови, не захватываются клетками иммунной системы, а также не сорбируются на клеточной поверхности и могут быть использованы *in vivo*.

3.2.1.2. АН-КолК для визуализации солидной опухоли и области воспаления в условиях *in vivo*

Время циркуляции наноконструкций на основе АН и коломиновой кислоты в кровотоке определяет степень накопления наноконструкций в патологически измененных тканях за счет EPR-эффекта. Оценку времени циркуляции в кровотоке мышей Balb/c проводили для АН-КолК(+/-) и АН-КолК-КДИ в сравнении с АН-ПЭГ. Для этого дисперсии наноконструкций вводили в ретроорбитальный синус, затем через определенные временные промежутки проводили забор образцов крови методом клипирования кончика хвоста мышей. Количество АН подсчитывали по изображениям, полученным с использованием разработанного во ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» флуоресцентного микроскопа по методике 2.2.15. Возбуждающее излучение из ближней ИК-области спектра и эмиссия, попадающие в «окно прозрачности» биоткани, позволили регистрировать сигнал флуоресценции от отдельных наноконструкций в сильно рассеивающей среде (образцах крови) и подсчитать количество АН в момент отбора пробы (Рис. 3.26.а). На основании полученных данных были построены зависимости количества АН от времени циркуляции (Рис. 3.26.б).

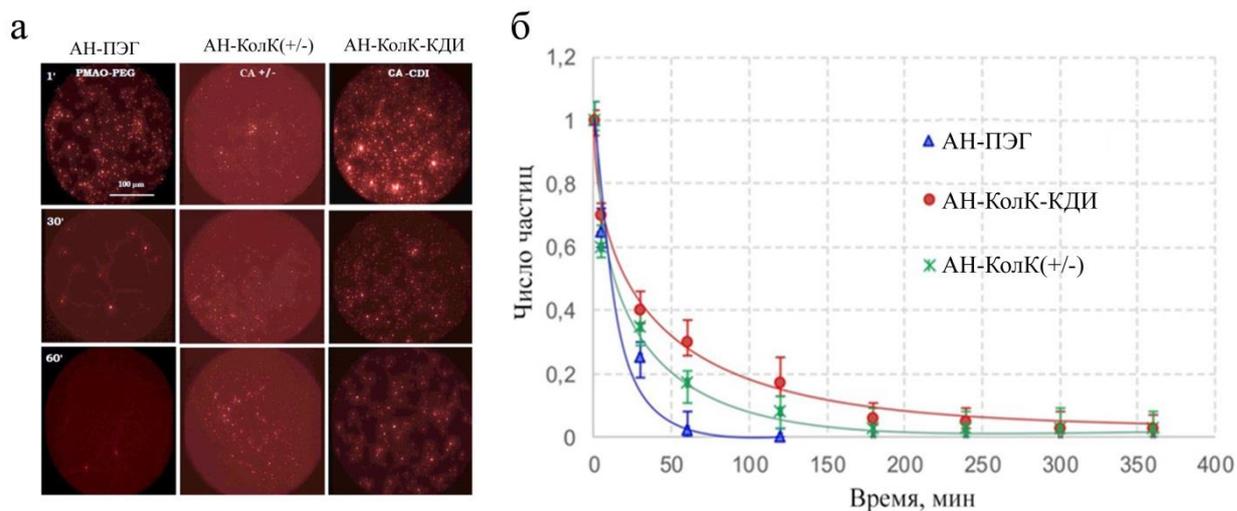


Рисунок 3.26. а) Флуоресцентное изображение АН-КолК (+/-), АН-КолК-КДИ, АН-ПЭГ в образцах крови при возбуждении ближним ИК-излучением с длиной волны 975 нм. б) Нормированная зависимость количества АН-КолК(+/-), АН-КолК-КДИ, АН-ПЭГ от времени циркуляции в кровотоке. [171]

Наноконструкции АН-КолК продемонстрировали длительное время циркуляции в кровотоке малых животных, которое в 3 раза превышало время циркуляции АН-ПЭГ (Рис.3.26.б).

Таким образом, наноконструкции на основе АН и коломиновой кислоты, полученные двумя методами (АН-КолК(+/-) и АН-КолК-КДИ), обладают рядом свойств, необходимых для их успешного использования для биовизуализации таких патологически измененных тканей, как область воспаления или солидные опухоли: низкой адсорбцией белков крови, отсутствием клеточной токсичности и длительным временем циркуляции в кровотоке. Наноконструкции АН-КолК-КДИ продемонстрировали наиболее длительное время циркуляции и были использованы для визуализации патологически измененных тканей.

Накопление наноконструкций на основе АН и коломиновой кислоты в солидной опухоли происходило за счет пассивного механизма доставки, связанного с нарушением сосудистой системы опухоли и отсутствием лимфодренажа. После системного введения дисперсии АН-КолК мыши с перевитой карциномой легкого Льюиса (LLC) изучали распределение сигнала от АН-КолК в масштабе всего организма с использованием разработанной системы визуализации малых животных при возбуждении излучением из ближнего ИК-диапазона спектра в сканирующем режиме (метод 2.2.14). Сигнал фотолуминесценции появлялся в опухоли через 1 минуту после инъекции, а через 4 минуты наблюдалось небольшое ослабление сигнала, что связано с перераспределением

АН-КолК в печень, селезенку, легкие. Максимум сигнала флуоресценции был достигнут через 1 час после введения (Рис. 3.27). Зарегистрировано, что сигнал флуоресценции АН-КолК в опухоли сохранялся в течение 10 дней.

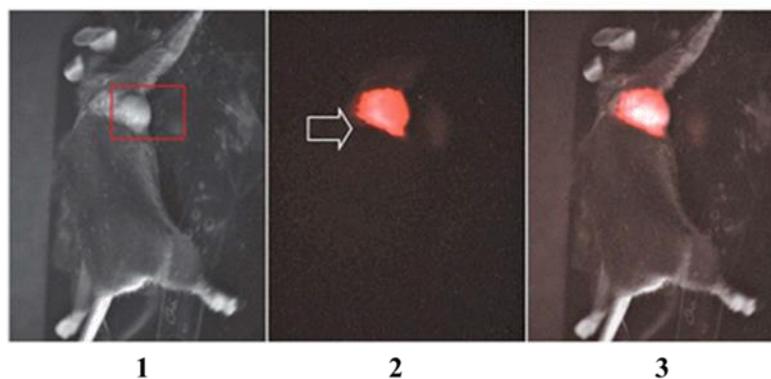


Рисунок 3.27. а) *In vivo* изображения мыши Balb/c с перевитой опухолью карциномы легкого Льюиса (LLC) через 1 час после введения АН-КолК: 1) светлопольное, 2) флуоресцентное и 3) наложение изображений.

Наноконструкции АН-КолК-КДИ были использованы для визуализации области воспаления, которое так же, как и ткани опухоли, имеет нарушенную систему кровеносных сосудов, что позволяет накапливаться АН. Модель воспаления была получена путем подкожной имплантации коллагеновой губки, пропитанной неполным адьювантом Фрейнда, что вызывает неспецифический иммунный ответ и локальное развитие воспаления. Использование этой модели позволяет контролировать объем воспаления, интенсивность и развитие реакции на имплантацию, [172,173] что отличает ее от традиционных моделей, основанных на подкожном или внутримышечном введении спирта, кротонного масла, ксилыла и т. д., приводящих к развитию некроза в месте инъекции. [174] Для визуализации накопления АН-КолК-КДИ в области воспаления использовали специально разработанную во ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН эпилюминесцентную систему (метод 2.2.14). [175] Введение наноконструкций не вызывало острой аллергической или токсической реакции у мышей Balb/c.

После введения дисперсии АН-КолК-КДИ наблюдали быстроисчезающий сигнал фотолюминесценции в месте инъекции. Сигнал распространялся по всему телу в течение 10 минут с наибольшей локализацией в области легких. Через 60 минут максимум интенсивности фотолюминесценции наблюдали в селезенке и печени, а в легких сигнал значительно уменьшался. В отличие от солидной опухоли сигнал в области воспаления отсутствовал в течение первых 60 минут. Однако через 12 часов после инъекции дисперсии АН-КолК-КДИ в области воспаления наблюдали сигнал фотолюминесценции, высококонтрастный по отношению к окружающим тканям (Рис. 3.28.а). После частичного

удаления кожи и вскрытия очага воспаления наблюдали усиление сигнала фотолюминесценции (Рис. 3.28.б). По-видимому, это связано с накоплением наночастиц благодаря воспалительному ангиогенезу и изменениям в микрососудах, аналогично EPR-эффекту в опухоли. [168]

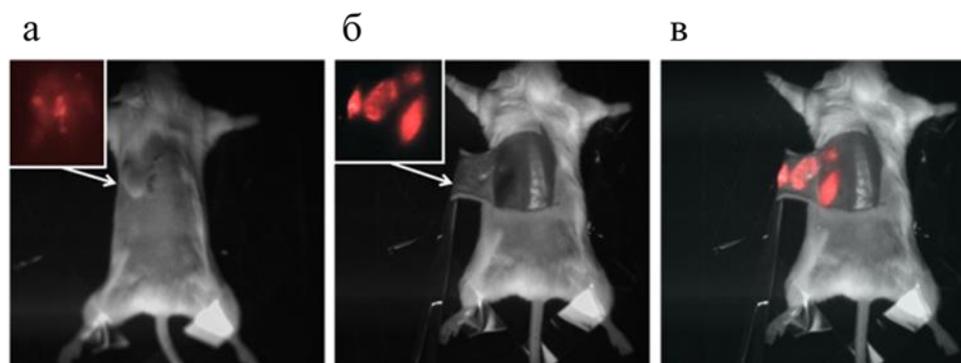


Рисунок 3.28. *In vivo* изображения области воспаления через 12 ч после инъекции АН-КолК: а) светлопольное и эпифлюоресцентное (вставка); б) светлопольное изображение вскрытого очага воспаления и эпифлюоресцентное (вставка); в) наложение изображений.

Несмотря на то, что сосудистая система не является типичным объектом для визуализации, изучение транспорта наноконструкций в кровеносных сосудах имеет большое значение для биоимиджинга *in vivo*. Стенки сосудов могут быть непроницаемыми, что характерно для гематоэнцефалического эндотелия, или могут быть высокопроницаемыми, как в случае опухолей или областей воспаления. Разработка подходов к визуализации сосудистого русла представляет интерес для исследований развития онкологических заболеваний, поскольку рост сосудов в опухолях можно рассматривать как независимый маркер развития заболевания. Кроме того, транспорт наноконструкций может быть значительно затруднен из более крупных сосудов в мелкие. [176] Для увеличения эффективности транспорта наночастиц из крупных сосудов в капилляры, поверхностный слой наноконструкций должен способствовать их движению вдоль стенок сосудов в слое, свободном от эритроцитов, чтобы облегчить выход из крупных в более мелкие сосуды. Таким образом, визуализация наноконструкций в кровеносных сосудах является универсальным инструментом для оценки их распределения в системе микроциркуляции, проникновения из капилляров в окружающие ткани, а также для оценки скорости движения наноконструкций в режиме реального времени.

Исследование распределения АН-КолК-КДИ в сосудистой системе проводили на эпифлюоресцентном микроскопе разработанном во ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН (Рис. 3.29.а). Интенсивный сигнал фотолюминесценции при возбуждении

светом на длине волны 975 нм наблюдался как в больших, так и в малых кровеносных сосудах воспалительной ткани, окружающей коллагеновый матрикс (Рис. 3.29.б,в).

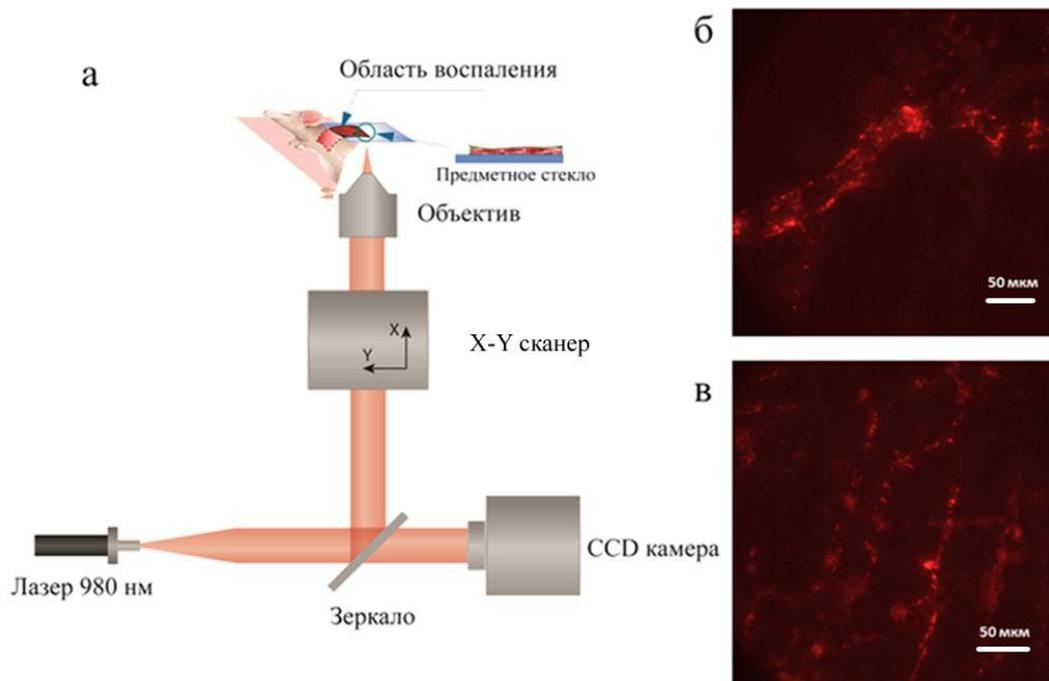


Рисунок 3.29. а) Схема разработанной системы биовизуализации для исследования распределения АН-КолК в кровеносных сосудах. Флуоресцентная визуализация б) макро- и в) микро- кровеносных сосудов в воспалительных тканях с помощью АН при возбуждении ближним ИК-излучением с длиной волны 975 нм.

АН-КолК-КДИ располагались преимущественно вдоль стенок кровеносных сосудов, благодаря чему легко проникали в систему микроциркуляции. АН-КолК равномерно распределялись по всему объему воспалительной ткани, что критически важно для исследования механизма доставки наноконструкций в патологически измененные ткани. Предложенный подход к созданию наноконструкций на основе АН и колониновой кислоты позволяет эффективно доставлять АН в область воспаления и визуализировать систему микроциркуляции.

3.2.2. Наноконструкции АН-СМАО-ПВК для визуализации и терапии солидных опухолей

Многофункциональные флуоресцентные наночастицы с настраиваемыми физико-химическими свойствами находят применение для визуализации и терапии онкологических заболеваний. Наноконструкции на основе агрегатов мицелл СМАО с включенными АН, модифицированные термочувствительным полимером, были использованы как платформа для создания многофункциональных наноагентов, обеспечивающих комплексное противораковое лечение, сочетающее в себе визуализацию,

химио- и фототермическую терапию, возможность наполнения лекарственными препаратами, а также контроль их локализации и высвобождения.

Разработанный подход к созданию термочувствительных наноконструкций на основе АН-СМАО-ПВК, описанный в 3.1.3.3, позволил ввести противораковый цитостатический препарат доксорубин (Докс), а также провести декорирование поверхности наночастицами серебра (Ag НЧ) для повышения коллоидной стабильности и усиления цитотоксического эффекта. Получены биосовместимые наноконструкции, одновременно обладающие четырьмя функциями по отношению к солидной опухоли: диагностической, терапевтической, функцией, связанной с контролируемым высвобождением лекарственного препарата (доксорубин) в ответ на внешний стимул (нагрев под действием ближнего ИК-излучения), а также функцией усиления цитотоксического действия благодаря Ag НЧ.

3.2.2.1. Терапевтическая функциональность АН-СМАО-ПВК

Особенность агрегатов мицелл СМАО с включенными АН связана с наличием областей между наночастицами, в которые могут быть включены различные биологически активные вещества. В работе разработан подход к созданию конструкций АН-СМАО-ПВК, содержащих Докс, исследованы закономерности его введения и высвобождения.

Докс, относящийся к группе антибиотиков антрациклинового ряда, представляет собой гидрофильное соединение, имеющее положительный заряд, которое легко проникает в ПВК-покрытие и в гидрофильную область мицелл, где может электростатически взаимодействовать с карбоксильными группами СМАО (Рис. 3.30.а). Концентрация Докс в составе конструкций на основе АН была определена спектрофотометрически и составила 0.32 мг Докс в расчете на 1 мг АН-СМАО, а концентрация Докс, инкапсулированного в комплекс АН-СМАО-ПВК, была ниже (0.21 мг в расчете на 1 мг наночастиц). Снижение емкости АН-СМАО-ПВК, по-видимому, вызвано уменьшением количества свободных карбоксильных групп СМАО, часть из которых участвует в формировании водородных связей с ПВК, а часть электростатически взаимодействует с Докс. Включение Докс в АН-СМАО-ПВК позволяет снизить системную токсичность лекарства и серьезные побочные эффекты для пациента, такие как кардиотоксичность, а также увеличить местную терапевтическую дозу препарата по сравнению со свободным химиотерапевтическим агентом. [177]

Исследование высвобождения лекарственного средства из комплексов АН-СМАО-ПВК проводили в кислой (рН 5.3) и нейтральной (рН 7.2) средах при 25°C и 37°C (Рис. 3.30.б). Выход Докс из конструкций АН-СМАО-ПВК регистрировали спектрофотометрически в надосадочной жидкости на длине волны поглощения Докс (400-

600 нм) после инкубации в указанных условиях с последующим центрифугированием. Модификация агрегатов мицелл АН-СМАО с помощью ПВК привела к увеличению степени высвобождения Докс при повышении температуры по сравнению с немодифицированными АН-СМАО. Важно отметить, что выход лекарственного препарата из АН-СМАО-ПВК при 37°C в кислой среде (рН 5.3) был почти в 2 раза больше, чем при рН 7.2 и той же температуре (Рис. 3.30.б). Это особенно важно при доставке лекарственного препарата в солидную опухоль, имеющую кислый рН в отличие от нормальной ткани, для которой характерен нейтральный рН. [178] Такая закономерность высвобождения объясняется тем фактом, что при низких значениях рН аминогруппы Докс находятся в протонированном состоянии (pK_b 8.2 [179]), что определяет его положительный заряд, а карбоксильные группы СМАО в этих условиях становятся преимущественно нейтральными. Положительный заряд ослабляет неполярные взаимодействия Докс с ПВК, что сказывается на увеличении степени высвобождения Докс при низких значениях рН. Эти результаты демонстрируют не только термо-, но и рН-зависимый характер высвобождения лекарств из многофункциональных конструкций АН-СМАО-ПВК, что можно использовать для проведения контролируемой местной химиотерапии с минимальными побочными эффектами.

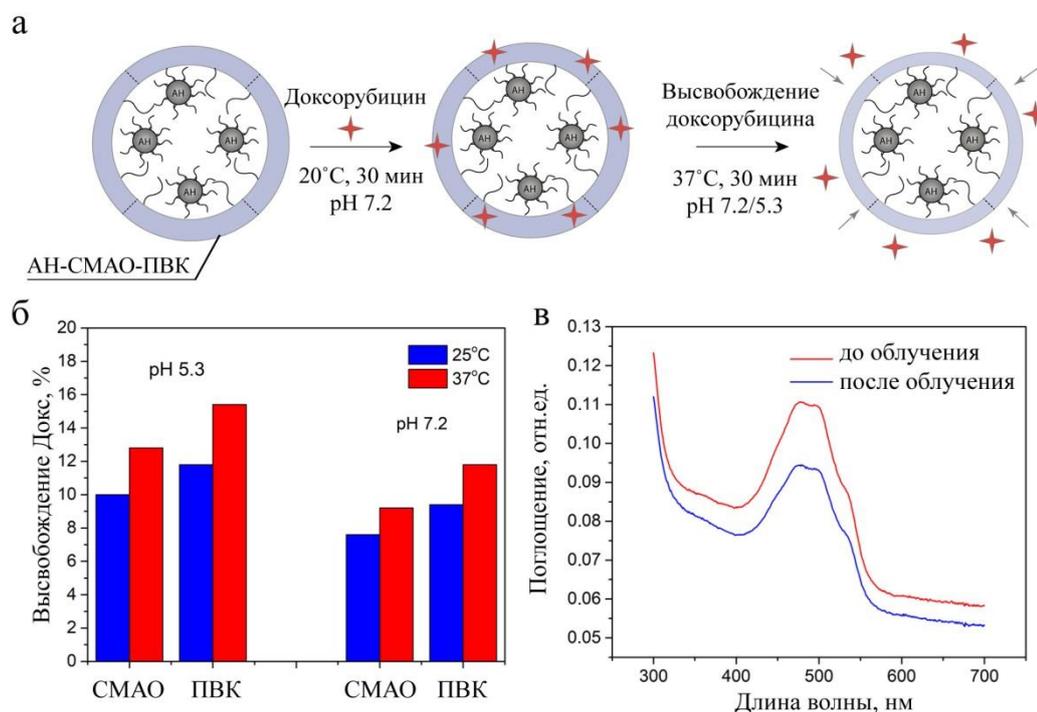


Рисунок 3.30. а) Схематическое изображение включения Докс в АН-СМАО-ПВК и его высвобождения при изменении температуры и рН. б) Высвобождение Докс из АН-СМАО и АН-СМАО-ПВК при различной температуре (25 и 37°C) и значениях рН (5.3 и 7.2). в)

Высвобождение Докс из АН-СМАО-ПВК в ответ на обработку импульсным лазером с длиной волны 975 нм.

При повышении температуры происходит увеличение степени высвобождения Докс из конструкций АН-СМАО-ПВК, что связано с сжатием слоя термочувствительного полимера. При проведении фототермической терапии под действием ближнего ИК-излучения (975 нм) нагрев наноконструкций происходит в результате резонансного поглощения света АН. Сечение поглощения ионов Yb^{3+} достаточно, чтобы вызвать локальный перегрев окружающей среды, что оказывает токсическое действие на клетки и ткани. [137] Для определения высвобождения Докс из АН-СМАО-ПВК измеряли разницу поглощения конструкций до и после воздействия ближним ИК-излучением. Продемонстрировано, что при облучении конструкций ближним ИК-светом (975 нм) наблюдается снижение пика поглощения, что свидетельствует о высвобождении Докс из конструкций АН-СМАО-ПВК (Рис. 3.30.в).

Для увеличения скорости нагрева АН-СМАО-ПВК были декорированы наночастицами серебра (Ag НЧ). Формирование Ag НЧ на поверхности конструкций *in situ* происходило за счет координации ионов серебра с атомами, имеющими неподеленную пару электронов (O, N), и их последующим восстановлением (Рис. 3.31.а). К АН-СМАО-ПВК с адсорбированными на поверхности ионами серебра добавляли восстановитель (боргидрид натрия) для формирования Ag^0 на поверхности конструкций. Для поддержания баланса между скоростью зародышеобразования и ростом Ag НЧ были протестированы различные концентрации соли нитрата серебра и восстановителя и выбраны оптимальные, которые позволяют получить равномерно распределенные по поверхности наноконструкций наночастицы серебра. Успешное декорирование поверхности наночастицами серебра было подтверждено с использованием просвечивающей электронной микроскопии и энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (Рис. 3.31.б,в). Коллоидная стабильность образцов после декорирования возростала, что, вероятно, связано с наличием наночастиц на поверхности, которые выполняют роль стабилизатора, как в случае эмульсий Пикеринга. [180]

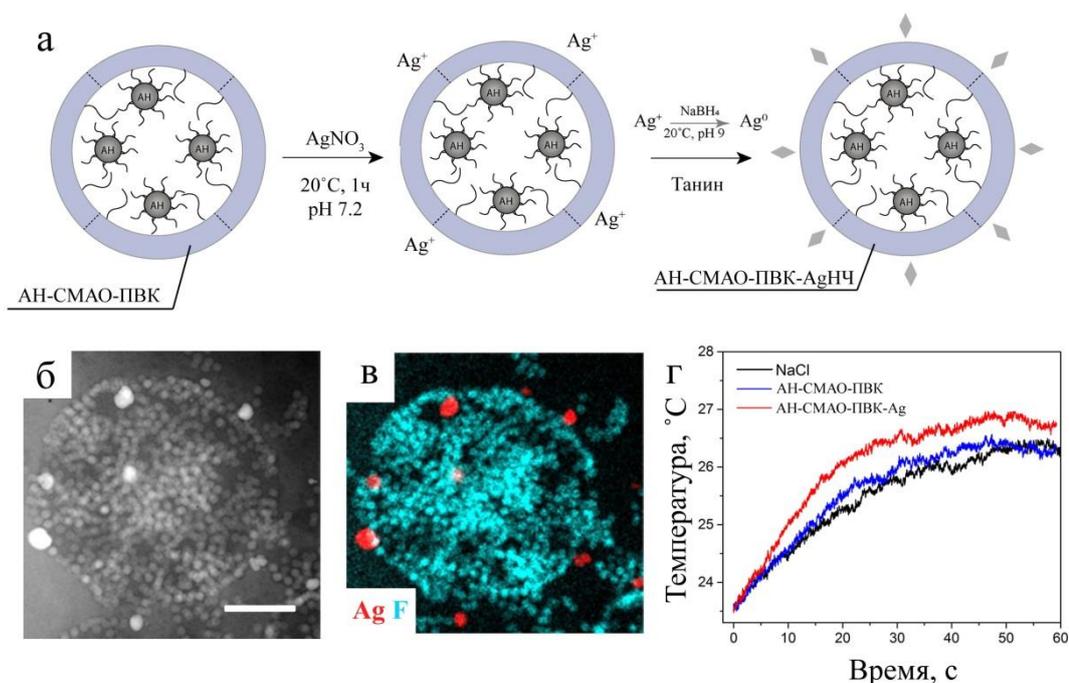


Рисунок 3.31. а) Схематическое изображение формирования наночастиц Ag на поверхности АН-СМАО-ПВК. б) Темнопольное ПЭМ-изображение АН-СМАО-ПВК-AgНЧ и в) элементное распределение Ag и F в образце, масштаб 200 нм. г) Скорость нагрева раствора NaCl, дисперсий АН-СМАО-ПВК и АН-СМАО-ПВК-AgНЧ под действием лазерного излучения с длиной волны 975 нм (интенсивность 0.5 Вт/см^2 , концентрация конструкций 0.4 мг/мл).

Найдено, что под действием ближнего ИК-излучения конструкции, декорированные наночастицами Ag, и конструкции, не содержащие Ag НЧ, имеют разную скорость нагрева. Существенная разница была зарегистрирована в первые 20 с облучения дисперсий частиц светом из ближнего ИК-диапазона спектра (Рис. 3.31.г).

Таким образом, были получены биосовместимые конструкции, содержащие лекарственный препарат, высвобождение которого происходит в ответ на внешние стимулы (повышение температуры при облучении наноконструкций ближним ИК-излучением). Введение наночастиц серебра увеличило коллоидную стабильность АН-СМАО-ПВК и эффективность нагрева дисперсий, содержащих конструкции.

3.2.2.2. Исследование конструкций АН-СМАО-ПВК *in vitro*

Цитотоксическое действие конструкций АН-СМАО-ПВК, а также данных конструкций, содержащих только химиотерапевтический препарат Докс (АН-СМАО-ПВК-Докс), только наночастицы серебра (АН-СМАО-ПВК-AgНЧ) или комбинацию Докс и AgНЧ (АН-СМАО-ПВК-Докс-AgНЧ) было исследовано с помощью МТТ-теста на

линиях клеток аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3 и MDA-MB-231, и фибробластов человека WI-26 после инкубации в течение 24 и 72 ч (Рис. 3.32.а,б,в).

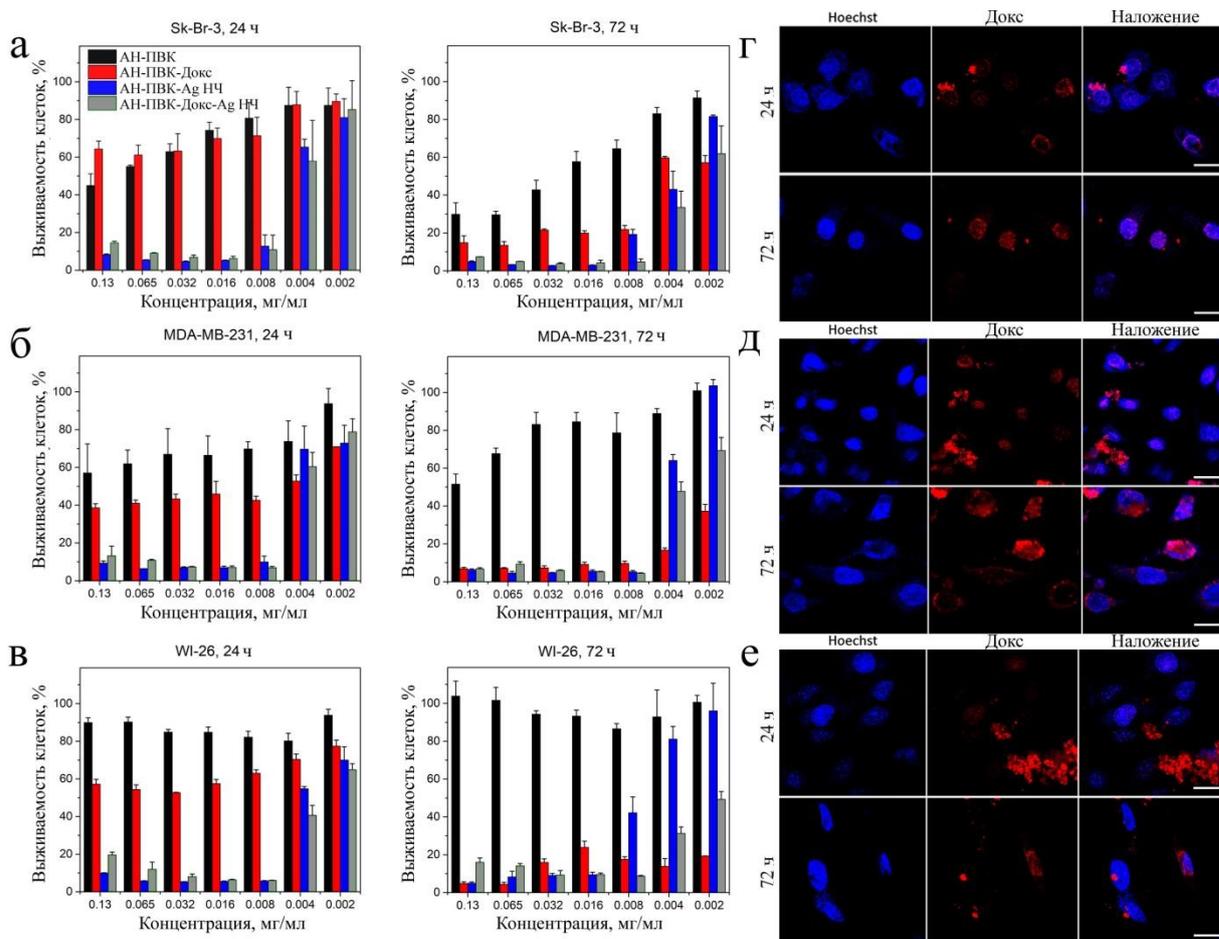


Рисунок 3.32. Выживаемость клеток а) аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3, б) аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231, в) фибробластов WI-26 человека при инкубации с конструкциями АН-ПВК, АН-ПВК-Докс, АН-ПВК-Докс-Аг НЧ в течение 24 и 72 ч, МТТ-тест. Конфокальная микроскопия клеток г) SK-BR-3, д) MDA-MB-231, е) WI-26, инкубированных с конструкциями АН-ПВК-Докс в течение 24 и 72 ч. Синий — Hoechst 33342 (ядра клеток), красный — Докс. Масштабная линейка – 20 мкм. [181]

Было установлено, что АН-СМАО-ПВК обладают низкой токсичностью по отношению ко всем исследуемым линиям клеток, что определяет возможность использования их в исследованиях как *in vitro*, так и *in vivo*. Введение в состав конструкции АН-СМАО-ПВК доxorубицина и/или наночастиц серебра резко повышало токсичность для всех исследованных линий клеток. АН-СМАО-ПВК-Аг и АН-СМАО-ПВК-Докс-Аг были токсичны уже после 24-часов инкубации, что объясняется токсичностью наночастиц серебра. [182] Конструкции АН-СМАО-ПВК-Докс (без Аг НЧ)

проявляли наибольшую токсичность только через 72 ч инкубации с клетками, особенно с линиями клеток WI-26 и MDA-MB-231. Это связано с постепенным высвобождением Докс из конструкций и интеркаляцией в ДНК, приводящей к цитостатическому действию. [183] Необходимо отметить, что после 24-часовой инкубации токсичность АН-СМАО-ПВК-Докс-Аg была выше, чем токсичность АН-СМАО-ПВК-Докс или АН-СМАО-ПВК-Аg для всех клеточных линий. Это позволяет говорить об аддитивном или даже синергическом цитотоксическом эффекте комбинации АgНЧ и доксорубина. [177]

Высвобождение Докс было подтверждено конфокальной микроскопией (Рис.3.32.г,д,е). После 24-часовой инкубации в цитоплазме клетки наблюдались преимущественно яркие точки, которые являются, вероятно, лизосомами, наполненными разработанными конструкциями. Однако после 72 ч инкубации точечная флуоресценция снизилась, что объясняется рН-зависимым характером высвобождения препарата из конструкций в кислой (рН 4.5–5.0) лизосомальной среде с последующим накоплением Докса в ядрах клеток.

3.2.2.3. Исследование конструкций АН-СМАО-ПВК *in vivo*

Разработанные конструкции АН-СМАО-ПВК были исследованы в условиях *in vivo* для проведения одновременной визуализации и терапии солидной опухоли аденокарциномы молочной железы SK-BR-3, перевитой иммунодефицитным мышам Balb/c Nude. Патологически измененные ткани после перитуморального введения конструкций визуализировали с использованием эпилюминесцентной визуализирующей системы при возбуждении светом из ближнего ИК-диапазона спектра и регистрацией сигнала эмиссии АН на длине волны 800 нм (Рис. 3.33.а).

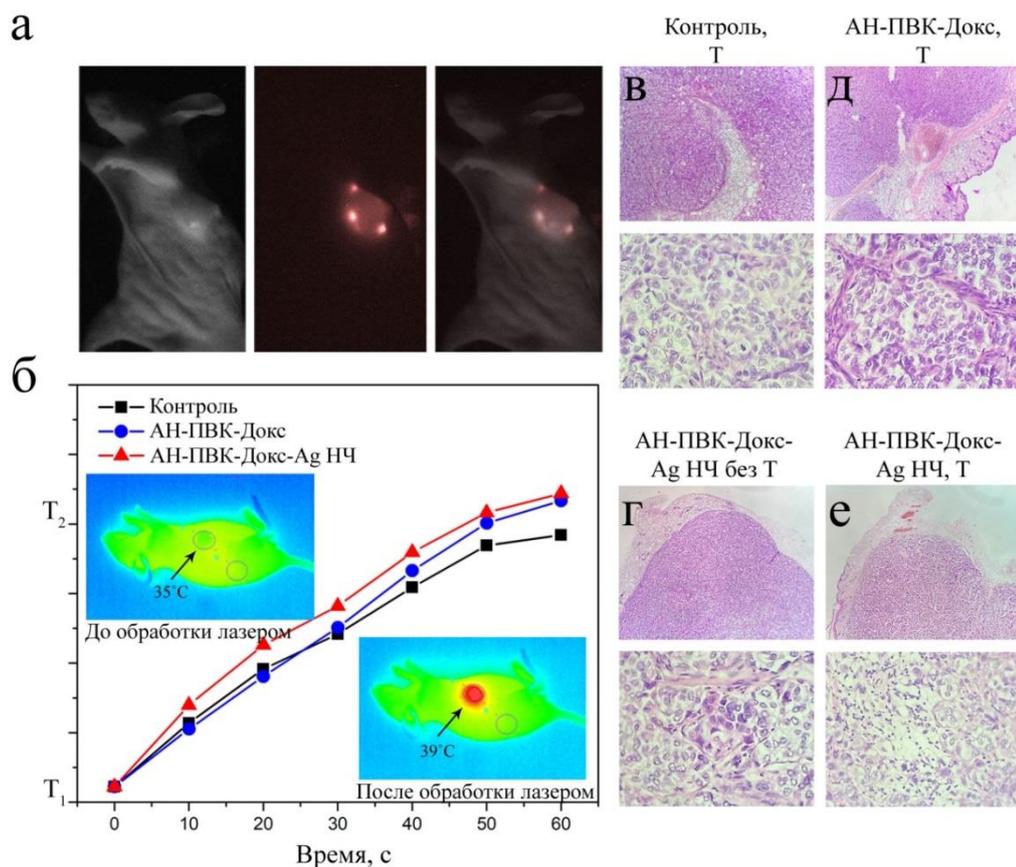


Рисунок 3.33. а) *In vivo* изображения, полученные через 1 час после инъекции конструкций АН-СМАО-ПВК: светлопольное (слева), эпифлюоресцентное (в центре) и наложенное изображения (справа). Масштабная линейка 1 см. б) Скорость нагрева опухоли в зависимости от введенных конструкций; на вставке изображения температурной карты мышей до и после обработки ближним ИК-излучением на длине волны 975 нм, демонстрирующие нагрев опухоли. Гистологические изображения срезов опухолевой ткани, окрашенных гематоксилином и эозином: в) после обработки ближним ИК-излучением, г) после инъекции наноконструкций АН-СМАО-ПВК-Докс с обработкой ближним ИК-излучением, д) после введения конструкций АН-СМАО-ПВК-Докс-Аг НЧ без обработки ближним ИК-излучением и е) после введения конструкций АН-СМАО-ПВК-Докс-Аг НЧ и обработки ближним ИК-излучением. Верхние изображения — увеличение 40х; нижние изображения — увеличение 400х. [181]

Локальный нагрев солидных опухолей излучением с длиной волны 975 нм в сканирующем режиме проводили через 24 ч после перитуморального введения конструкций АН-СМАО-ПВК как свободных, так и содержащих только Докс, AgНЧ или комбинацию Докс и AgНЧ. Отрицательным контролем служили мыши Balb/c Nude с ксенографтом аденокарциномы молочной железы SK-BR-3, которым проводили локальный нагрев области опухоли с использованием ближнего ИК-излучения (975 нм)

без введения конструкций. Температуру нагрева регистрировали с использованием камеры Xenics Gobi-384-GigE-7098 в режиме реального времени. Опухоли обрабатывали импульсным излучением (975 нм) в среднем в течение 3 минут до тех пор, пока разница температуры опухоли и необработанной биоткани не достигала 4°C (Рис. 3.33.б). Стоит отметить, что скорость нагрева биоткани зависела от типа введенных конструкций. В случае АН-СМАО-ПВК температура биоткани в течение первых секунд была сравнима с контрольной группой, однако через 1 минуту воздействия ближним ИК-излучением начинала увеличиваться относительно контрольной. Максимальная скорость нагрева биоткани была зафиксирована для конструкций, содержащих наночастицы серебра (АН-СМАО-ПВК-AgНЧ и АН-СМАО-ПВК-Докс-AgНЧ).

Фототермический эффект через 24 ч после облучения солидных опухолей ближним ИК-излучением оценивали по результатам гистологического исследования образцов биоткани (от 3-х животных из каждой группы). В гистологическом препарате опухолевый узел в контрольной группе соответствовал растущей опухоли (Рис. 3.33.в). Следует отметить, что у группы, которой перитуморально вводили конструкции АН-СМАО-ПВК-Докс-AgНЧ, но не обрабатывали ближним ИК-излучением, не наблюдали каких-либо гистологических отличий от контрольной группы (Рис. 3.33.г.). У групп, которым вводили АН-СМАО-ПВК-Докс и АН-СМАО-ПВК-Докс-AgНЧ, были отмечены значительные изменения гистологической картины: наличие участков некроза и кровоизлияний, умеренная макрофагальная реакция, легкий склеротический процесс (Рис. 3.33.д,е).

Рост опухоли оценивали на протяжении всего периода наблюдения. Эффективность фототермической терапии в условиях *in vivo* подтверждена изменением объема опухоли на протяжении 25 дней. Результаты представлены на рисунке 3.34.



Рисунок 3.34. а) Торможение роста опухоли у иммунодефицитных мышей Balb/c Nude с ксенографтом аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 после введения конструкций АН-СМАО-ПВК-Докс, АН-СМАО-ПВК-Докс-AgНЧ и обработки ближним ИК-

излучением, конструкций АН-СМАО-ПВК-Докс-AgНЧ без обработки ближним ИК-излучением в сравнении с контрольной группой с/без обработки ближним ИК-излучением. б) Серия фотографий области опухоли аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 контрольной и экспериментальной групп. [181]

Продемонстрировано, что обработка ближним ИК-излучением может повысить эффективность терапии с использованием конструкций АН-СМАО-ПВК-Докс и АН-СМАО-ПВК-Докс-AgНЧ. На 25-й день наблюдения объемы подкожного ксенотрансплантата аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 и показатели роста опухоли в группах, которым вводили АН-СМАО-ПВК-Докс и АН-СМАО-ПВК-Докс-AgНЧ, были достоверно ниже соответствующих значений в контроле. В частности, как показано на рисунке 3.34, ингибирование роста опухоли (TGI) на 25-й день наблюдения для конструкции АН-СМАО-ПВК-Докс зарегистрировано на уровне 59% ($p = 0,01$), тогда как для АН-СМАО-ПВК-Докс-AgНЧ оно составило 67% ($p = 0,02$). Однократное введение дисперсии разработанных конструкций, сопровождавшееся обработкой светом из ближнего ИК-диапазона спектра или без него, животные хорошо переносили - потеря массы тела была не более 8% (статистической разницы между контрольной и основной группами нет). Наибольшая эффективность терапии с высоким уровнем торможения роста опухоли была достигнута после облучения ближним ИК-излучением в присутствии конструкций, содержащих либо Докс, либо Докс-AgНЧ. Таким образом, комбинированная химио- и фототермическая терапия с использованием конструкций на основе АН снижала скорость роста опухоли аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 примерно в 5 раз по сравнению с контролем.

Дополнительный контроль роста опухоли после инъекции свободного Докса показан на рисунке 3.35.

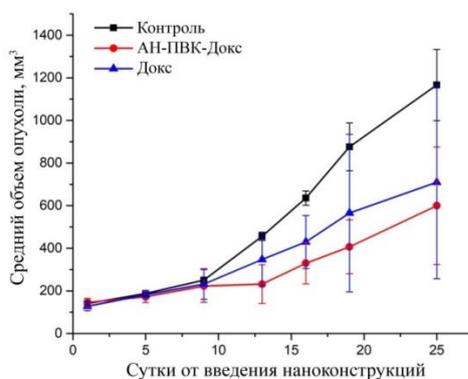


Рисунок 3.35. Торможение роста опухоли у иммунодефицитных мышей Balb/c Nude с ксенотрансплантатом аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 после введения конструкций АН-СМАО-ПВК-Докс и молекулярного Докс в сравнении с контрольной группой.

Таким образом, был продемонстрирован подход к созданию многофункциональных конструкций на основе АН-СМАО-ПВК для одновременной визуализации и химио- и фототермической терапии при облучении светом из ближнего ИК-диапазона (975 нм). Исследования в условиях *in vivo* на модели аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 у мышей Balb/c Nude показали эффективность полученных конструкций на основе АН-СМАО-ПВК для ингибирования роста опухоли. Перитуморальное введение конструкций и поддержание температуры в области опухоли импульсным лазерным излучением с длиной волны 975 нм при непрерывном визуальном контроле обеспечило пятикратное торможение роста опухоли по сравнению с контролем.

3.2.3. Формирование полимерных структур с микроархитектурой для тканевой инженерии методом ИК-индуцированной реакции полимеризации

Трехмерное прототипирование ФОК, содержащих АН, под действием ближнего ИК-излучения – новая технология, основанная на люминесцентных свойствах АН. Этот процесс аналогичен технологии двухфотонной фотополимеризации, но лишен таких его недостатков, как длительное время фотоотверждения и использование дорогостоящих лазеров высокой мощности. Использование ближнего ИК-излучения для инициирования реакции фотополимеризации решает вопрос фотоотверждения непосредственно в объеме сильно рассеивающих свет композиций с высокой скоростью и достаточным пространственным разрешением. Нелинейный характер процесса апконверсии позволяет локализовать область фотолюминесценции в вокселе (трехмерном эквиваленте двумерного пикселя), где происходит процесс фотоотверждения, и облегчает прямую печать сложных трехмерных объектов в режиме непрерывного сканирования. В этом процессе мощности возбуждающего излучения значительно меньше, чем в случае двухфотонной фотополимеризации.

3.2.3.1. Получение однослойных и многослойных полимерных конструкций

Фотоотверждение композиции с высокой концентрацией АН позволяет формировать макрообъекты в виде полимерных конструкций определенной микроархитектуры, которые находят свое применение в качестве гидрогелевых скаффолдов для решения задач тканевой инженерии. Большие перспективы использования гидрогелей в тканевой инженерии связаны с возможностью их рационального дизайна для имитации функций и структур поврежденных или утраченных тканей. Водная среда гидрогелей подобна среде тканей и позволяет внедрять в них клетки, биоактивные компоненты и лекарства, а физико-химические свойства гидрогелей легко настраивать для решения конкретных задач. Для получения полимерных

макроконструкций была разработана специальная экспериментальная установка, представленная на рисунке 3.36.а.

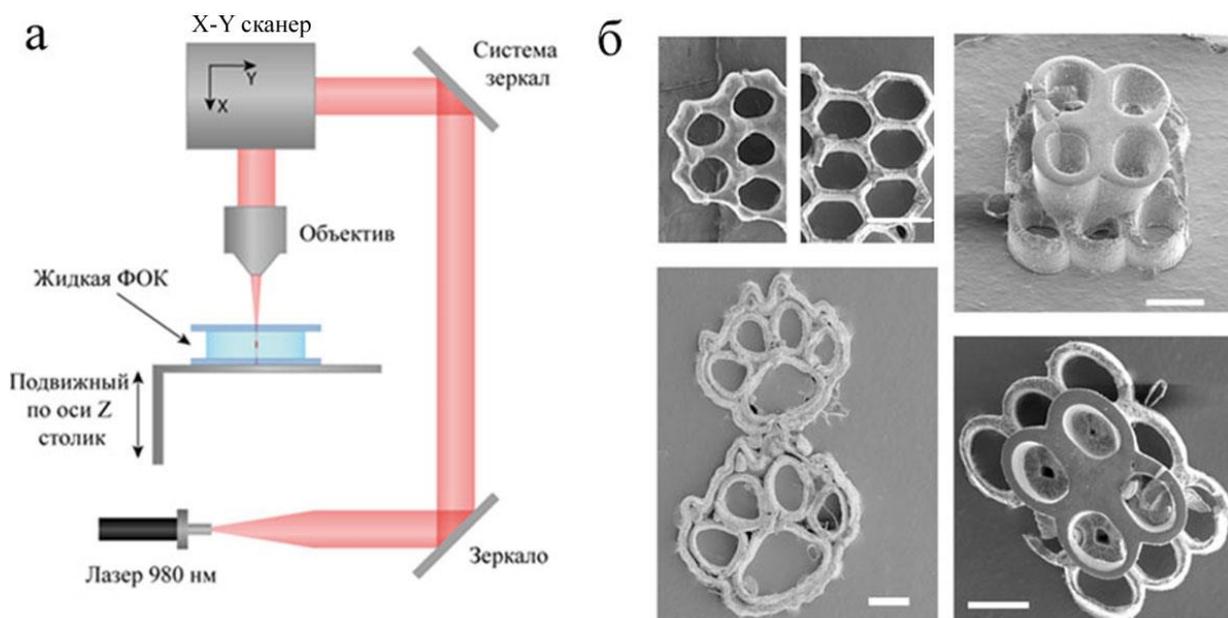


Рисунок 3.36. а) Схематическое изображение экспериментальной установки для формирования полимерных конструкций под действием ИК-излучения. б) СЭМ-изображения полученных полимерных конструкций: однослойные «соты», сформированные при высокой (слева) и низкой дозе облучения (справа), однослойная сложная полимерная конструкция «волчьи следы», многослойная 3D-структура, вид сбоку и сверху. Масштабная линейка 0,5 мм.

С использованием разработанной установки для печати полимерных конструкций с микроархитектурой методом ИК-индуцированной полимеризации были получены однослойные и сложные многослойные полимерные конструкции (Рис. 3.36.б) из ФОК, содержащих как водорастворимый LAP (АН-ПЭГ-ДА-LAP), так и нерастворимый в воде фотоинициатор Irgacur 369 (АН-ПЭГ-ДА-Irgacure369). Метод подготовки ФОК описан в 2.2.4 Процесс прототипирования основан на стереолитографии с перемещением столика по оси Z и векторным сканированием заданной области сфокусированным ближним ИК-излучением. Регулирование скорости сканирования позволяло получать структуры с настраиваемой толщиной стенок, которая изменялась в зависимости от дозы возбуждающего излучения (Рис. 3.36.б). Минимальная толщина стенки составляла ~ 20 мкм. Кроме того, при формировании многослойных конструкций не происходило объединение или «прорастание» двух соседних слоев (Рис. 3.36.б).

Дополнительно было исследовано влияние типа фотоинициатора и механизма резонансного переноса энергии с АН на молекулу фотоинициатора на геометрию

формируемых полимерных конструкций. Для этого ФОК АН-ПЭГ-ДА-LAP (LRET) и АН-ПЭГ-ДА-Irgacure369 (FRET) помещали в силиконовый молд, зажатый с двух сторон покровными стеклами и проводили фотоотверждение в одинаковых условиях. Полученные полимерные конструкции из АН-ПЭГ-ДА-LAP (Рис. 3.37.а) характеризовались большей толщиной стенок (~200 мкм), тогда как конструкции из АН-ПЭГ-ДА-Irgacure369 (Рис. 3.37.б) имели более тонкие стенки и точно повторяли форму траектории сканирования лазерным лучом.

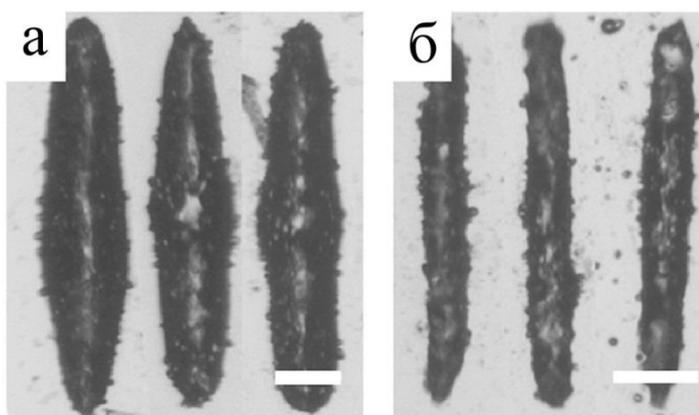


Рисунок 3.37 Оптические микрофотографии полученных полимерных конструкций из: а) ФОК АН-ПЭГ-ДА-LAP и б) ФОК АН-ПЭГ-ДА-Irgacure369. Масштабная линейка 0.2 мм.

Таким образом, разработанный подход для формирования полимерных конструкций из ПЭГ-ДА под действием ближнего ИК-излучения в присутствии АН, представляет собой инструмент для фотопечати хорошо упорядоченных полимерных конструкций требуемой архитектуры и геометрии с высокой точностью.

3.2.3.2. Морфология поверхности полимерных конструкций

Фотоотверждение композиций с различной концентрацией АН (5, 10 и 20 мг/мл), под действием ближнего ИК-излучения привело к формированию полимерных конструкций, отличающихся морфологией поверхности. Морфологию поверхности полимерных конструкций, полученных при одинаковых условиях, исследовали с использованием сканирующей электронной микроскопии (СЭМ, Рис. 3.38).

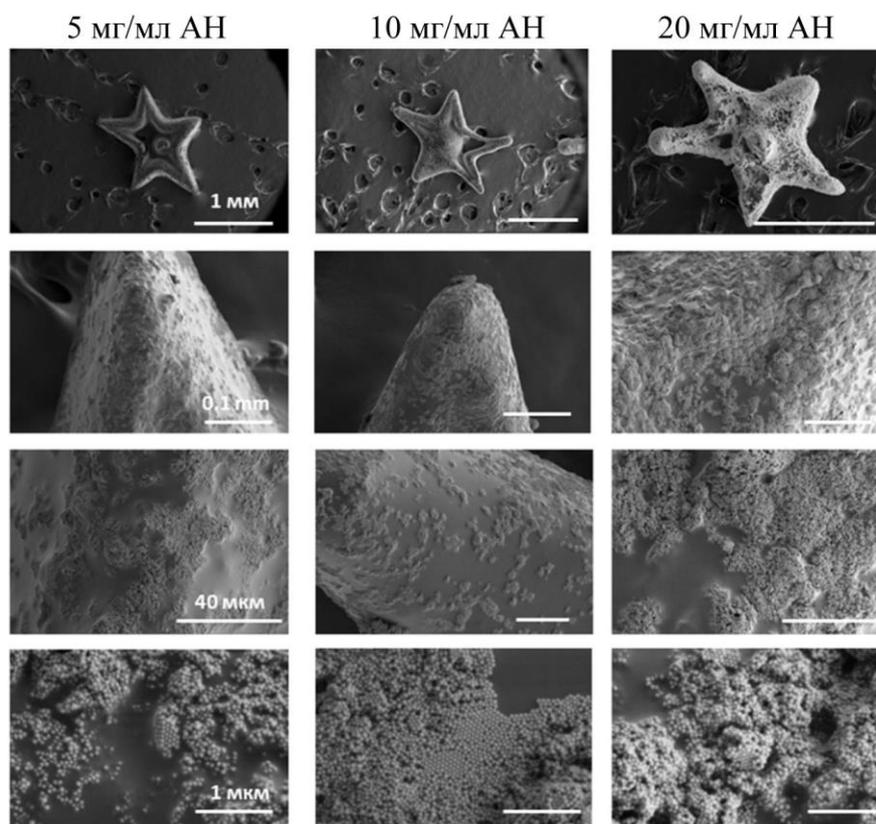


Рисунок 3.38. СЭМ-изображения поверхности полимерных конструкций различной морфологии, полученных из ФОК с концентрацией АН 5, 10 и 20 мг/мл.

ИК-индуцированное фотоотверждение композиций с малой концентрацией нанокристаллов (5 мг/мл) приводило к формированию полимерной конструкции, на поверхности которой представлены агломераты АН в виде сфер и упорядоченных решеток (Рис. 3.37). При фотоотверждении композиции, содержащей 10 мг/мл АН, поверхность полимерной конструкции сглаживалась, количество агломератов АН увеличивалось. Повышение концентрации АН до 20 мг/мл приводило к образованию хаотического многослойного покрытия из агломератов АН на поверхности полимерной конструкции. Формирование агломератов АН на поверхности полимера, вероятно, связано с фотоотверждением композиции по фронтальному механизму. Бегущая волна возникает под действием света в определенной области ФОК на микроуровне и происходит локальное увеличение плотности. Это, в свою очередь, приводит к перераспределению наночастиц в фотоотверждаемой композиции на границе фронта полимеризации и АН формируют плотноупакованные слои, которые оказываются «зафиксированными» в полимерной матрице. Стоит отметить, что этот процесс является случайным и определяется стохастическим распределением АН в объеме композиции.

Таким образом, изменение концентрации АН в ФОК вызывает существенную разницу в шероховатости поверхности полимерной конструкции за счет вытеснения АН на поверхность полимера в процессе ИК-индуцируемой фотополимеризации.

3.2.3.3. Исследование полимерных структур *in vitro*

Сформированные методом ИК-индуцированной полимеризации полимерные конструкции из ПЭГ-ДА и АН обладают рядом свойств, определяющих их применение в качестве скаффолдов в тканевой инженерии. Полученные полимерные конструкции из ПЭГ не цитотоксичны, что было подтверждено методом экстракт-теста, а наличие АН на поверхности способствует адгезии клеток (Рис. 3.39).

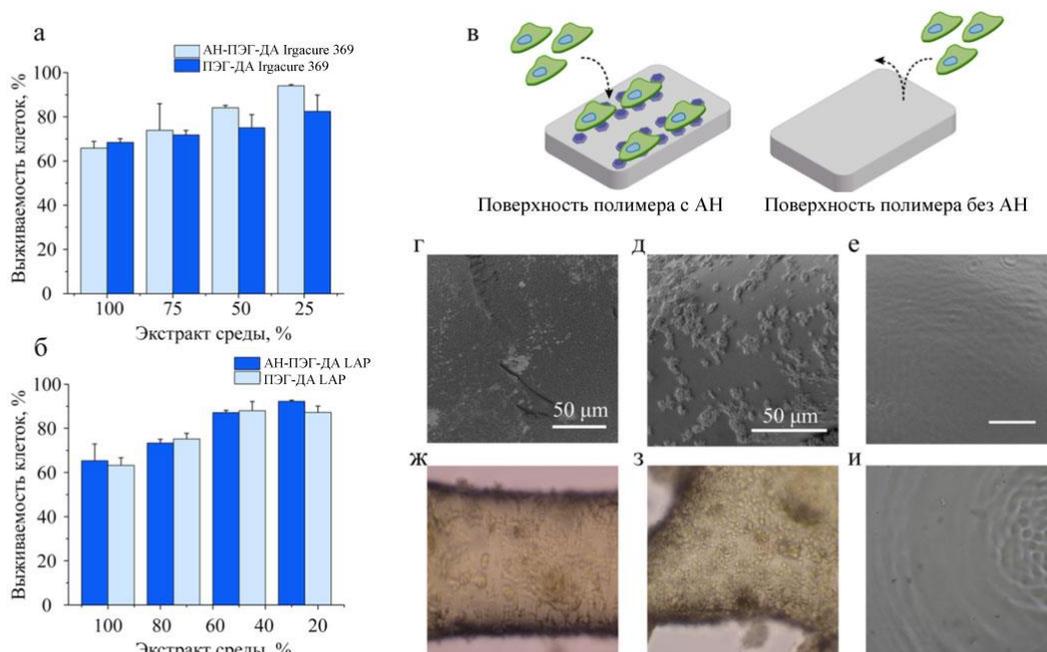


Рисунок 3.39. Исследование полимерных конструкций на цитотоксичность. МТТ-тест для исследования жизнеспособности immortalized human fibroblasts Vj-5ta после 24 ч инкубации со средой, в которой предварительно инкубировали а) АН-ПЭГ-ДА Irgacure 369 и ПЭГ-ДА Irgacure 369 без АН. б) АН-ПЭГ-ДА LAP и ПЭГ-ДА LAP без АН. Адгезия клеток. в) Схематическое изображение адгезии клеток на поверхности, содержащей и не содержащей АН. СЭМ-изображения поверхности полученной полимерной конструкции из ФОК: г) АН-ПЭГ-ДА Irgacure 369, д) АН-ПЭГ-ДА LAP и е) ПЭГ-ДА Irgacure 369 без АН. Оптические изображения полимерных конструкций, заселенных immortalized human fibroblasts Vj-5ta после двухдневной инкубации с ж) АН-ПЭГ-ДА Irgacure 369, з) АН-ПЭГ-ДА LAP, и) ПЭГ-ДА Irgacure без АН (10x увеличение).

Для оценки цитотоксичности были получены экстракты после инкубации в культуральной среде полимерных конструкций двух типов: содержащих АН (полученные в процессе ИК-индуцированной фотополимеризации,) и не содержащих АН (полученные с использованием УФ-инициирующего излучения). Экстракты исследовали методом МТТ-теста на линии клеток immortalized fibroblasts человека Vj-5ta (Рис.3.39.а,б). Неразбавленные экстракты продемонстрировали небольшую токсичность, что, вероятно, связано с неполной конверсией двойных связей в ПЭГ-ДА в процессе фотополимеризации. Разбавление экстрактов приводило к повышению жизнеспособности клеток до 70-90%. Стоит отметить, что выбор фотоинициатора (растворимого в воде LAP или нерастворимого в воде Irgacure 369) не оказывал влияния на токсичность полимерных конструкций. Эти результаты демонстрируют возможность создания нетоксичных полимерных конструкций на основе ПЭГ-ДА и АН для дальнейших исследований *in vitro* и *in vivo*.

Несмотря на все преимущества использования ПЭГ для тканевой инженерии, адгезия клеток на поверхности структур из ПЭГ недостаточна. [108] Для обеспечения клеточных взаимодействий поверхность ПЭГ-конструкций дополнительно модифицируют пептидами, белками, сигнальными молекулами или неорганическими наночастицами. [105,184,185] Формирование полимерных конструкций в процессе полимеризации под действием света из ближнего ИК-диапазона спектра решает проблему клеточной адгезии на ПЭГ благодаря вытеснению АН на поверхность полимера на стадии получения скаффолда.

Для исследования адгезии клеток на поверхности полимерные конструкции, полученные из ФОК АН-ПЭГ-ДА Irgacure 369 и АН-ПЭГ-ДА LAP под действием ближнего ИК-излучения, инкубировали с immortalized fibroblasts человека VJ-5ta в течение двух дней и исследовали методом оптической микроскопии. В качестве сравнения использовали полимерные конструкции из ФОК ПЭГ-ДА Irgacure 369 и ПЭГ-ДА LAP, не содержащие наночастицы и полученные при УФ-отверждении, которые инкубировали с immortalized fibroblasts человека Vj-5ta в тех же условиях (Рис. 3.39.в-и). Как было показано выше, морфология поверхности изменяется под действием фронта полимеризации, что приводит к вытеснению АН на поверхность, делая ее шероховатой и увеличивая адгезивные свойства (Рис. 3.39.г,д). На рисунке 3.39.ж,з показана адгезия клеток на поверхности полимерных конструкций через 2 дня после начала эксперимента. Клетки равномерно покрывают поверхность всех полимерных структур, содержащих АН, независимо от типа фотоинициатора (LAP или Irgacure 369), что свидетельствует об их активной жизнедеятельности и пролиферации. Поверхность

полимерных конструкций, не содержащих АН, была, практически, не заселена клетками (Рис. 3.39.и). Таким образом, разработанный подход к формированию полимерных конструкций в процессе ИК-индуцируемой реакции полимеризации решает проблему клеточной адгезии на поверхности полимерных конструкций, что является важным свойством скаффолдов, используемых в тканевой инженерии.

3.2.3.4. Фотоотверждаемые композиции, содержащие природные полимеры

Для тканевой инженерии особый интерес представляют полимерные конструкции на основе природных полимеров благодаря их высокой биосовместимости, биоразлагаемости, биоактивности и отсутствию токсичности. В работе показано, что в состав ФОК, описанной в 3.1.4.2, можно вводить эндогенные полимеры: гиалуроновую кислоту (ГК) и желатин (Жел). ГК и Жел были предварительно модифицированы глицидилметакрилатом (ГМА) для введения винильных групп в состав полимерной цепи, что позволило провести реакцию радикальной сшивки полимеров (Рис. 3.40.а). [90] Получены две ФОК: АН/ПЭГ-ДА/ LAP/Жел-ГМА и АН/ПЭГ-ДА/ Irgacure369/ГК-ГМА. Присутствие ПЭГ-ДА в составе ФОК обеспечивало возможность фотоотверждения природных полимеров с использованием как растворимого, так и нерастворимого в воде фотоинициатора. АН поглощают ближнее ИК-излучение, происходит их возбуждение и резонансный перенос энергии на фотоинициатор, который, в свою очередь, генерирует радикалы для инициирования реакции радикальной полимеризации. Природный полимер, введенный в ФОК, участвует в радикальном процессе за счет раскрытия двойной связи метакрилатных звеньев, что приводит к образованию сшитой структуры (Рис. 3.40.а). Такой подход значительно упростил процедуру подготовки ФОК, исключив стадию гидрофилизации АН и расширив спектр доступных фотоинициаторов для фотоотверждения предварительно модифицированных природных полимеров. Полимерные конструкции были успешно сформированы в объеме ФОК на экспериментальной установке, описанной ранее.

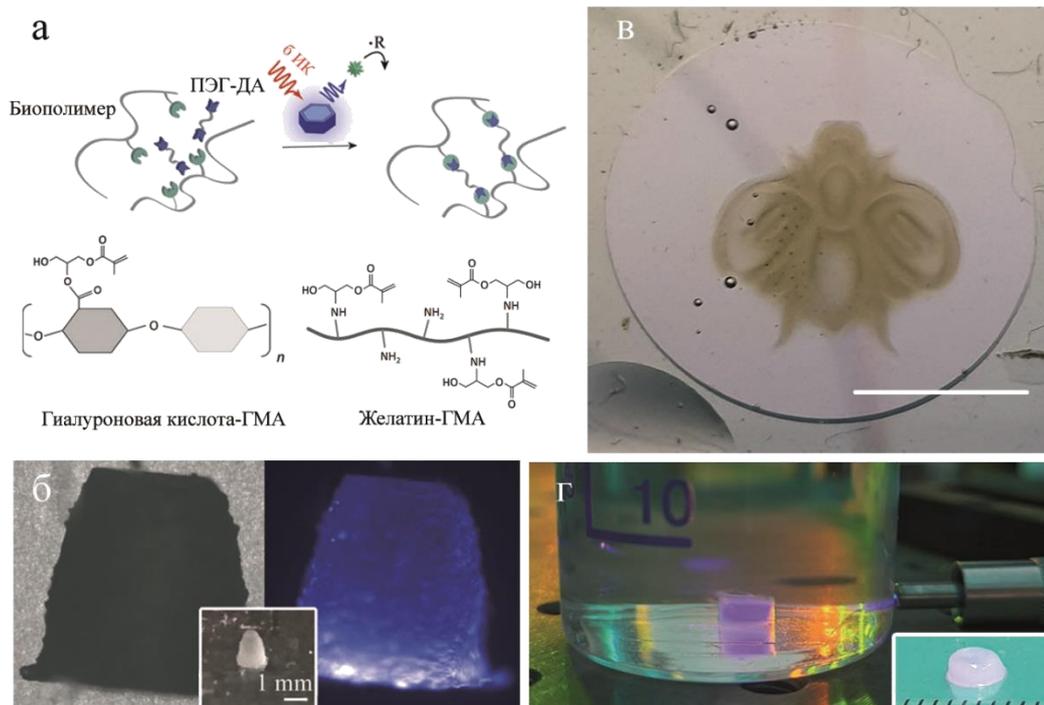


Рисунок 3.40. а) Схематическое изображение реакции сшивки природного полимера в процессе ИК-индуцированной полимеризации. б) Оптическое светлоспольное и флуоресцентное изображение сшитой конструкции ГК-ГМА, полученной при облучении ФОК ИК-излучением. На вставке: макрофотография 3Д-структуры. в) Фотография готовой полимерной конструкции из Жел-ГМА в виде пчелы. Масштабная линейка 5 мм. г) Фотография полимерной конструкции в виде цилиндра из Жел-ГМА в воде при возбуждении ИК-излучением и фотография готовой полимерной конструкции. Масштабная линейка 1 мм. [166]

Полимерные конструкции, представленные на рисунке 3.40.б,в,г, были получены непосредственно в объеме фотоотверждаемой композиции в реакции радикальной ИК-индуцированной сшивки модифицированных природных полимеров. После фотоотверждения полимерные конструкции были тщательно промыты в избытке воды и обладали видимой синей фотолюминесценцией при облучении светом из ближнего ИК-диапазона (Рис. 3.40.б,г). Предложенный подход позволяет изготавливать полимерные конструкции со сложной архитектурой, примеры которых, в виде пчелы и цилиндра, полученные из ФОК АН/ПЭГ-ДА/ LAP/Жел-ГМА, представлены на рисунке 3.40.в,г. Стоит отметить, что скорость формирования полимерных конструкций выше из ФОК, содержащей желатин, чем из ФОК с гиалуроновой кислотой, высокая вязкость которой, вероятно, является причиной более низкой скорости полимеризации.

Формирование сложных полимерных конструкций в процессе ИК-индуцируемой полимеризации ФОК, содержащих АН, решает ряд проблем. Во-первых, использование

АН в ФОК позволяет инициировать реакцию полимеризации под действием низкоэнергетического глубоко проникающего ближнего ИК-излучения. Это увеличивает глубину, на которую распространяется процесс фотоотверждения, и исключает влияние сильно рассеивающей среды. Во-вторых, такой подход обеспечивает быстрое формирование полимерных структур при низкой интенсивности лазерного излучения. Кроме того, возбуждающее излучение из ближнего ИК-диапазона можно использовать для фотоотверждения композиций, содержащих живые клетки, исключая их повреждение благодаря низкой мощности лазера. В-третьих, ФОК АН/ПЭГ-ДА/ -фотоинициатор могут содержать как водорастворимые, так и нерастворимые в воде фотоинициаторы, что значительно расширяет спектр фотоотверждаемых композиций, подходящих для биоприложений. В-четвертых, ПЭГ-ДА в составе наноконструкции для инициирования реакции служит адаптером между гидрофобными наночастицами и остальными компонентами ФОК, что значительно упрощает процесс подготовки ФОК, исключая стадию гидрофилизации АН. В-пятых, наноконструкцию АН/ПЭГ-ДА/ -фотоинициатор можно рассматривать, как инструмент для создания разнообразных ФОК на основе различных полимеров, даже высокогидрофильных, при условии, что возможно проведение полимераналогичной реакции с введением винильной группы.

Глава 4. Выводы

1. Оптимизированы подходы к гидрофилизации поверхности АН, которые позволяют получать мультифункциональные конструкции на основе одного типа наночастиц для решения проблем визуализации, терапии и тканевой инженерии.

2. Предложенные методы модификации поверхности АН колониновой кислотой за счет формирования ковалентной и нековалентной связи позволяют получать коллоидно-устойчивые водные дисперсии АН. Полученные наноконструкции характеризуются низкой неспецифичной адсорбцией белков крови, отсутствием клеточной токсичности и длительным временем циркуляции в кровотоке лабораторных животных (мышей). Показано, что АН-КолК могут быть использованы для прижизненной высококонтрастной визуализации патологически измененных тканей.

3. Конструкции на основе агрегатов мицелл СМАО с АН, модифицированные поли-N-винилкапролактамом и содержащие доксорубин и наночастицы серебра, использованы для одновременной визуализации, химио- и фототермической терапии под действием света ближнего ИК-диапазона спектра. Включение в состав конструкций доксорубина и наночастиц серебра приводит к увеличению цитотоксичности конструкций, что продемонстрировано в условиях *in vitro* на линиях клеток SK-BR-3, MDA-MB-231, WI-26. Перитуморальное введение конструкций АН-СМАО-ПВК-Докс-АгНЧ обеспечивает пятикратное торможение роста опухоли после однократного облучения светом из ближней ИК-области спектра, что продемонстрировано на модели ксенотрансплантата аденокарциномы молочной железы SK-BR-3.

4. Проведение полимеризации под действием света ближнего ИК-диапазона спектра в фотоотверждаемой композиции с низкой концентрацией наночастиц приводит к получению полимерного слоя из полиэтиленгликоля контролируемой толщины на поверхности наночастиц.

5. Полимерные конструкции из диакрилата полиэтиленгликоля получены с использованием иницирующей системы для полимеризации под действием света ближнего ИК-диапазона спектра, состоящей из гидрофобных АН, растворимого или нерастворимого в воде фотоинициатора и диакрилата полиэтиленгликоля. Полученные полимерные конструкции нетоксичны и имеют сложную морфологию поверхности.

6. С использованием разработанной иницирующей системы получены трехмерные полимерные конструкции из винилсодержащих гиалуроновой кислоты и желатина в результате реакции сшивки под действием света из ближнего ИК-диапазона спектра.

Благодарности

Автор выражает огромную благодарность своему научному руководителю д.х.н. Генераловой А.Н. за безграничное терпение, поддержку и помощь на всех этапах работы. Особую благодарность автор выражает д.ф.-м.н. Хайдукову Е.В. за профессиональные советы, планирование и обсуждение результатов. Автор выражает глубокую признательность всему коллективу лаборатории полимеров для биологии ИБХ РАН и лаборатории лазерной биомедицины ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, особенно Хайдукову К.В. за помощь в изучении 3D полимеризации под действием ближнего ИК-излучения, к.х.н. Сочилиной А.В. за модификацию природных полимеров, к.х.н. Акасову Р.А., к.м.н. Шолиной Н.В. и к.б.н. Бабаевой Г. (РОНЦ им. Н.Н. Блохина) за проведение исследований на клеточных культурах и животных, сотрудникам кафедры химии и технологии биологически активных соединений им. Н.А. Преображенского, РТУ МИРЭА к.х.н. Нечаеву А.В. и Николаевой М.Е. за разработку методов синтеза нанокристаллов с антистоксовой фотолюминесценцией, коллективу ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН за помощь в освоении новых методов исследования. Автор выражает безмерную благодарность своим родным и друзьям за каждодневную поддержку, вдохновение и помощь во всех начинаниях.

Список использованной литературы

1. Barenholz Y. Doxil®--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. // *J. Control. release Off. J. Control. Release Soc. Netherlands*, 2012. Vol. 160, № 2. P. 117–134.
2. Banik B. et al. Dual-Targeted Synthetic Nanoparticles for Cardiovascular Diseases // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. American Chemical Society, 2020. Vol. 12, № 6. P. 6852–6862.
3. Sharmin S. et al. Nanoparticles as antimicrobial and antiviral agents: A literature-based perspective study // *Heliyon*. 2021. Vol. 7, № 3. P. e06456.
4. Díez-Pascual A.M., Díez-Vicente A.L. Poly(propylene fumarate)/Polyethylene Glycol-Modified Graphene Oxide Nanocomposites for Tissue Engineering // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. American Chemical Society, 2016. Vol. 8, № 28. P. 17902–17914.
5. Bharathala S., Sharma P. Chapter 8 - Biomedical Applications of Nanoparticles / ed. Maurya P.K., Singh S.B.T.-N. in *M.A.B. Elsevier*, 2019. P. 113–132.
6. Xu H., Li S., Liu Y.-S. Nanoparticles in the diagnosis and treatment of vascular aging and related diseases // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2022. Vol. 7, № 1. P. 231.
7. Algar W.R. et al. Photoluminescent Nanoparticles for Chemical and Biological Analysis and Imaging // *Chem. Rev.* American Chemical Society, 2021. Vol. 121, № 15. P. 9243–9358.
8. Sortino S. Photoactivated nanomaterials for biomedical release applications // *J. Mater. Chem.* The Royal Society of Chemistry, 2012. Vol. 22, № 2. P. 301–318.
9. Li W. et al. Fluorescent Nanoparticles for Super-Resolution Imaging // *Chem. Rev.* American Chemical Society, 2022. Vol. 122, № 15. P. 12495–12543.
10. Lemarchand C., Gref R., Couvreur P. Polysaccharide-decorated nanoparticles // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004. Vol. 58, № 2. P. 327–341.
11. Lucky S.S., Soo K.C., Zhang Y. Nanoparticles in Photodynamic Therapy // *Chem. Rev.* American Chemical Society, 2015. Vol. 115, № 4. P. 1990–2042.
12. Kadkhoda J. et al. Recent advances and trends in nanoparticles based photothermal and photodynamic therapy // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2022. Vol. 37. P. 102697.
13. Ibarra-Ruiz A.M., Rodríguez Burbano D.C., Capobianco J.A. Photoluminescent nanoplatforms in biomedical applications // *Adv. Phys. X.* Taylor & Francis, 2016. Vol. 1, № 2. P. 194–225.
14. Bastani S. et al. Application of Upconversion Nanoparticles in Photochemistry BT - Upconversion Nanoparticles (UCNPs) for Functional Applications / ed. Kumar V. et al. Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. P. 305–338.

15. Generalova A.N., Chichkov B.N., Khaydukov E. V. Multicomponent nanocrystals with anti-Stokes luminescence as contrast agents for modern imaging techniques // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2017. Vol. 245. P. 1–19.
16. Dawson P., Romanowski M. Designing ultraviolet upconversion for photochemistry // *J. Lumin.* 2020. Vol. 222. P. 117143.
17. Bloembergen N. Solid State Infrared Quantum Counters // *Phys. Rev. Lett.* American Physical Society, 1959. Vol. 2, № 3. P. 84–85.
18. Овсянкин В.В., Феофилов П.П. О механизме суммирования электронных возбуждений в активированных кристаллах // *Письма в ЖЭТФ.* 1966. Vol. 3. P. 494.
19. F. Auzel. Upconversion and Anti-Stokes Processes with f and d Ions in Solids // *Compt. Rend. Acad. Sci. Paris B.* 1966. Vol. 263. P. 819.
20. Каримов Д. Н., Демина П. А., Кошелев А. В., Рочева В. В., Соковиков А. В., Генералова А. Н., Зубов В. П., Хайдуков Е. В., Ковальчук М. В. Панченко В.Я.. Апконвертирующие кристаллические наноматериалы: синтез, фотолюминесцентные свойства и применение // *Российские нанотехнологии.* 2020. Vol. 15, № 6. P. 699–724.
21. Генералова А.Н. Мультифункциональные полимерсодержащие дисперсные микро- и наноструктуры для биотехнологии и биомедицины: дис. на соискание уч. ст. д-ра хим. наук: 03.01.06 / Генералова Алла Николаевна. – М., 2019. – С. 247.
22. Bagheri A. et al. Lanthanide-Doped Upconversion Nanoparticles: Emerging Intelligent Light-Activated Drug Delivery Systems. // *Adv. Sci.* (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Ger. Germany, 2016. Vol. 3, № 7. P. 1500437.
23. Хайдуков Е.В. Создание кристаллических наноматериалов с антистоксовой фотолюминесценцией для фотоники и наномедицины: дис. на соискание уч. ст. д-ра физ. - мат. наук: 05.27.03, 03.01.02 / Хайдуков Евгений Валерьевич. – М., 2021. – С. 270.
24. Wang Y. et al. Upconversion Luminescence of β -NaYF₄: Yb³⁺, Er³⁺@ β -NaYF₄ Core/Shell Nanoparticles: Excitation Power Density and Surface Dependence // *J. Phys. Chem. C.* American Chemical Society, 2009. Vol. 113, № 17. P. 7164–7169.
25. Wu X. et al. Dye-Sensitized Core/Active Shell Upconversion Nanoparticles for Optogenetics and Bioimaging Applications. // *ACS Nano.* United States, 2016. Vol. 10, № 1. P. 1060–1066.
26. Rocheva V. V et al. High-resolution 3D photopolymerization assisted by upconversion nanoparticles for rapid prototyping applications. // *Sci. Rep.* England, 2018. Vol. 8, № 1. P. 3663.

27. Lin M. et al. Recent advances in synthesis and surface modification of lanthanide-doped upconversion nanoparticles for biomedical applications // *Biotechnol. Adv.* 2012. Vol. 30, № 6. P. 1551–1561.
28. Rafique R. et al. A facile hydrothermal synthesis of highly luminescent NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺ upconversion nanoparticles and their biomonitoring capability // *Mater. Sci. Eng. C.* 2019. Vol. 99. P. 1067–1074.
29. Andresen E. et al. Assessing the reproducibility and up-scaling of the synthesis of Er,Yb-doped NaYF₄-based upconverting nanoparticles and control of size, morphology, and optical properties // *Sci. Rep.* 2023. Vol. 13, № 1. P. 2288.
30. Wang H.-Q., Nann T. Monodisperse upconverting nanocrystals by microwave-assisted synthesis. // *ACS Nano. United States*, 2009. Vol. 3, № 11. P. 3804–3808.
31. Chen G. et al. Upconversion Nanoparticles: Design, Nanochemistry, and Applications in Theranostics // *Chem. Rev. American Chemical Society*, 2014. Vol. 114, № 10. P. 5161–5214.
32. Li C., Lin J. Rare earth fluoride nano-/microcrystals: synthesis, surface modification and application // *J. Mater. Chem. The Royal Society of Chemistry*, 2010. Vol. 20, № 33. P. 6831–6847.
33. Gee A., Xu X. Surface Functionalisation of Upconversion Nanoparticles with Different Moieties for Biomedical Applications // *Surfaces*. 2018. Vol. 1, № 1. P. 96–121.
34. Thanh N.T.K., Green L.A.W. Functionalisation of nanoparticles for biomedical applications // *Nano Today*. 2010. Vol. 5, № 3. P. 213–230.
35. Zhang H. et al. Preparation and applications of polymer-modified lanthanide-doped upconversion nanoparticles // *Giant*. 2022. Vol. 12. P. 100130.
36. Bagheri A. et al. Controlled Direct Growth of Polymer Shell on Upconversion Nanoparticle Surface via Visible Light Regulated Polymerization // *Macromolecules. American Chemical Society*, 2017. Vol. 50, № 18. P. 7137–7147.
37. Wang F., Liu X. Recent advances in the chemistry of lanthanide-doped upconversion nanocrystals // *Chem. Soc. Rev. The Royal Society of Chemistry*, 2009. Vol. 38, № 4. P. 976–989.
38. Xu G. et al. New Generation Cadmium-Free Quantum Dots for Biophotonics and Nanomedicine // *Chem. Rev. American Chemical Society*, 2016. Vol. 116, № 19. P. 12234–12327.
39. Generalova A.N., Oleinikov V.A., Khaydukov E. V. One-dimensional necklace-like assemblies of inorganic nanoparticles: Recent advances in design, preparation and applications // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2021. Vol. 297. P. 102543.

40. Chen C., Li C., Shi Z. Current Advances in Lanthanide-Doped Upconversion Nanostructures for Detection and Bioapplication // *Adv. Sci.* John Wiley & Sons, Ltd, 2016. Vol. 3, № 10. P. 1600029.
41. Bogdan N. et al. Synthesis of Ligand-Free Colloidally Stable Water Dispersible Brightly Luminescent Lanthanide-Doped Upconverting Nanoparticles // *Nano Lett.* American Chemical Society, 2011. Vol. 11, № 2. P. 835–840.
42. Himmelstoß S.F., Hirsch T. Long-Term Colloidal and Chemical Stability in Aqueous Media of NaYF₄-Type Upconversion Nanoparticles Modified by Ligand-Exchange // *Part. Part. Syst. Charact.* John Wiley & Sons, Ltd, 2019. Vol. 36, № 10. P. 1900235.
43. Kuk S.K. et al. Siloxane-Encapsulated Upconversion Nanoparticle Hybrid Composite with Highly Stable Photoluminescence against Heat and Moisture // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* American Chemical Society, 2019. Vol. 11, № 17. P. 15952–15959.
44. Arppe R. et al. Quenching of the upconversion luminescence of NaYF₄:Yb³⁺{,}Er³⁺ and NaYF₄:Yb³⁺{,}Tm³⁺ nanophosphors by water: the role of the sensitizer Yb³⁺ in non-radiative relaxation // *Nanoscale.* The Royal Society of Chemistry, 2015. Vol. 7, № 27. P. 11746–11757.
45. Muhr V. et al. Upconversion nanoparticles: from hydrophobic to hydrophilic surfaces. // *Acc. Chem. Res.* United States, 2014. Vol. 47, № 12. P. 3481–3493.
46. Chen Z. et al. Versatile Synthesis Strategy for Carboxylic Acid-functionalized Upconverting Nanophosphors as Biological Labels // *J. Am. Chem. Soc.* American Chemical Society, 2008. Vol. 130, № 10. P. 3023–3029.
47. Decher G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites // *Science (80-.).* American Association for the Advancement of Science, 1997. Vol. 277, № 5330. P. 1232–1237.
48. Wang L. et al. Fluorescence Resonant Energy Transfer Biosensor Based on Upconversion-Luminescent Nanoparticles // *Angew. Chemie Int. Ed.* John Wiley & Sons, Ltd, 2005. Vol. 44, № 37. P. 6054–6057.
49. Boyer J.-C. et al. Surface modification of upconverting NaYF₄ nanoparticles with PEG-phosphate ligands for NIR (800 nm) biolabeling within the biological window. // *Langmuir.* United States, 2010. Vol. 26, № 2. P. 1157–1164.
50. Liu J.-N., Bu W.-B., Shi J.-L. Silica Coated Upconversion Nanoparticles: A Versatile Platform for the Development of Efficient Theranostics // *Acc. Chem. Res.* American Chemical Society, 2015. Vol. 48, № 7. P. 1797–1805.

51. Arriagada F.J., Osseo-Asare K. Synthesis of Nanosize Silica in a Nonionic Water-in-Oil Microemulsion: Effects of the Water/Surfactant Molar Ratio and Ammonia Concentration. // *J. Colloid Interface Sci.* United States, 1999. Vol. 211, № 2. P. 210–220.
52. Kostiv U. et al. Phthalocyanine-Conjugated Upconversion NaYF₄:Yb³⁺/Er³⁺@SiO₂ Nanospheres for NIR-Triggered Photodynamic Therapy in a Tumor Mouse Model // *ChemMedChem.* John Wiley & Sons, Ltd, 2017. Vol. 12, № 24. P. 2066–2073.
53. Li N. et al. Yb³⁺-enhanced UCNP@SiO₂ nanocomposites for consecutive imaging, photothermal-controlled drug delivery and cancer therapy // *Opt. Mater. Express.* Optica Publishing Group, 2016. Vol. 6, № 4. P. 1161–1171.
54. Zhang L., Jin D., Stenzel M.H. Polymer-Functionalized Upconversion Nanoparticles for Light/Imaging-Guided Drug Delivery // *Biomacromolecules.* American Chemical Society, 2021. Vol. 22, № 8. P. 3168–3201.
55. Chen G. et al. Neuroendocrine Tumor-Targeted Upconversion Nanoparticle-Based Micelles for Simultaneous NIR-Controlled Combination Chemotherapy and Photodynamic Therapy, and Fluorescence Imaging // *Adv. Funct. Mater.* John Wiley & Sons, Ltd, 2017. Vol. 27, № 8. P. 1604671.
56. Wei M. et al. Stimuli-responsive polymers and their applications // *Polym. Chem.* The Royal Society of Chemistry, 2017. Vol. 8, № 1. P. 127–143.
57. Nitta S.K., Numata K. Biopolymer-Based Nanoparticles for Drug/Gene Delivery and Tissue Engineering // *International Journal of Molecular Sciences.* 2013. Vol. 14, № 1. P. 1629–1654.
58. Tian H. et al. Biodegradable synthetic polymers: Preparation, functionalization and biomedical application // *Prog. Polym. Sci.* 2012. Vol. 37, № 2. P. 237–280.
59. Nair L.S., Laurencin C.T. Biodegradable polymers as biomaterials // *Prog. Polym. Sci.* 2007. Vol. 32, № 8. P. 762–798.
60. Alarcón C. de las H., Pennadam S., Alexander C. Stimuli responsive polymers for biomedical applications // *Chem. Soc. Rev.* The Royal Society of Chemistry, 2005. Vol. 34, № 3. P. 276–285.
61. Indulekha S. et al. Thermoresponsive polymeric gel as an on-demand transdermal drug delivery system for pain management // *Mater. Sci. Eng. C.* 2016. Vol. 62. P. 113–122.
62. Kozlovskaya V., Kharlampieva E. Self-Assemblies of Thermoresponsive Poly(N-vinylcaprolactam) Polymers for Applications in Biomedical Field // *ACS Appl. Polym. Mater.* American Chemical Society, 2020. Vol. 2, № 1. P. 26–39.

63. Ribeiro L.S. et al. Injectable Thermosensitive Nanocomposites Based on Poly(N-vinylcaprolactam) and Silica Particles for Localized Release of Hydrophilic and Hydrophobic Drugs // *Langmuir*. American Chemical Society, 2023. Vol. 39, № 6. P. 2380–2388.
64. Nemir S., Hayenga H.N., West J.L. PEGDA hydrogels with patterned elasticity: Novel tools for the study of cell response to substrate rigidity // *Biotechnol. Bioeng.* John Wiley & Sons, Ltd, 2010. Vol. 105, № 3. P. 636–644.
65. Yamaoka T., Tabata Y., Ikada Y. Distribution and tissue uptake of poly(ethylene glycol) with different molecular weights after intravenous administration to mice. // *J. Pharm. Sci.* United States, 1994. Vol. 83, № 4. P. 601–606.
66. Fang J., Nakamura H., Maeda H. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011. Vol. 63, № 3. P. 136–151.
67. Ishida T. et al. Accelerated blood clearance of PEGylated liposomes following preceding liposome injection: Effects of lipid dose and PEG surface-density and chain length of the first-dose liposomes // *J. Control. Release*. 2005. Vol. 105, № 3. P. 305–317.
68. Webster R. et al. PEGylated proteins: evaluation of their safety in the absence of definitive metabolism studies // *Drug Metab. Dispos.* 2006/10/04. United States, 2007. Vol. 35, № 1. P. 9–16.
69. Stella B. et al. Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting // *J. Pharm. Sci.* John Wiley & Sons, Ltd, 2000. Vol. 89, № 11. P. 1452–1464.
70. Schauer R. Sialic acids and their role as biological masks // *Trends Biochem. Sci.* 1985. Vol. 10, № 9. P. 357–360.
71. Plucinski A., Lyu Z., Schmidt B.V.K.J. Polysaccharide nanoparticles: from fabrication to applications // *J. Mater. Chem. B*. The Royal Society of Chemistry, 2021. Vol. 9, № 35. P. 7030–7062.
72. Jain S. et al. Polysialylated insulin: synthesis, characterization and biological activity in vivo // *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 2003. Vol. 1622, № 1. P. 42–49.
73. Doh K.-O., Yeo Y. Application of polysaccharides for surface modification of nanomedicines // *Ther. Deliv. Future Science*, 2012. Vol. 3, № 12. P. 1447–1456.
74. Zou J. et al. Hyaluronic acid-modified selenium nanoparticles for enhancing the therapeutic efficacy of paclitaxel in lung cancer therapy // *Artif. Cells, Nanomedicine, Biotechnol.* Taylor & Francis, 2019. Vol. 47, № 1. P. 3456–3464.
75. Jancik J.M. et al. Sequestration of neuraminidase-treated erythrocytes // *Cell Tissue Res.* 1978. Vol. 186, № 2. P. 209–226.

76. Ilyushin D.G. et al. Chemical polysialylation of human recombinant butyrylcholinesterase delivers a long-acting bioscavenger for nerve agents in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013. Vol. 110, № 4. P. 1243–1248.
77. Gregoriadis G. et al. Improving the therapeutic efficacy of peptides and proteins: a role for polysialic acids. // *Int. J. Pharm. Netherlands*, 2005. Vol. 300, № 1–2. P. 125–130.
78. Meng H. et al. Clinical Application of Polysialylated Deoxyribonuclease and Erythropoietin // *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*. 2018. Vol. 12, № 3. P. 212–222.
79. Constantinou A. et al. Site-specific polysialylation of an antitumor single-chain Fv fragment. // *Bioconjug. Chem. United States*, 2009. Vol. 20, № 5. P. 924–931.
80. Braatz D. et al. Chemical Approaches to Synthetic Drug Delivery Systems for Systemic Applications. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl. Germany*, 2022. Vol. 61, № 49. P. e202203942.
81. Williams S. et al. Nanoporous silica nanoparticles as biomaterials: evaluation of different strategies for the functionalization with polysialic acid by step-by-step cytocompatibility testing // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2015. Vol. 26, № 3. P. 125.
82. Zhu Z. et al. Hyaluronic acid: a versatile biomaterial in tissue engineering // *Plast. Aesthetic Res.* 2017. Vol. 4. P. 219.
83. Fu C.-P. et al. Hyaluronic Acid-Based Nanocarriers for Anticancer Drug Delivery // *Polymers*. 2023. Vol. 15, № 10.
84. Fan R. et al. Development of a hybrid nanocarrier-recognizing tumor vasculature and penetrating the BBB for glioblastoma multi-targeting therapy // *Nanoscale. The Royal Society of Chemistry*, 2019. Vol. 11, № 23. P. 11285–11304.
85. Fraser J.R. et al. Elimination of hyaluronic acid from the blood stream in the human. // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. Australia*, 1984. Vol. 11, № 1. P. 17–25.
86. Lee J.Y., Spicer A.P. Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2000. Vol. 12, № 5. P. 581–586.
87. Liu D. et al. Expression of hyaluronidase by tumor cells induces angiogenesis in vivo. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. United States*, 1996. Vol. 93, № 15. P. 7832–7837.
88. Tiwari S., Bahadur P. Modified hyaluronic acid based materials for biomedical applications. // *Int. J. Biol. Macromol. Netherlands*, 2019. Vol. 121. P. 556–571.
89. Schanté C. et al. Synthesis of N-alanyl-hyaluronamide with high degree of substitution for enhanced resistance to hyaluronidase-mediated digestion // *Carbohydr. Polym.* 2011. Vol. 86, № 2. P. 747–752.

90. Sochilina A. V et al. Preparing Modified Hyaluronic Acid with Tunable Content of Vinyl Groups for Use in Fabrication of Scaffolds by Photoinduced Crosslinking // *Russ. J. Bioorganic Chem.* 2021. Vol. 47, № 4. P. 828–836.
91. Sochilina A. V et al. Quantitative detection of double bonds in hyaluronic acid derivative via permanganate ion reduction // *Meas. Sci. Technol.* IOP Publishing, 2019. Vol. 30, № 7. P. 75102.
92. Cao F. et al. Photothermally Controlled MHC Class I Restricted CD8+ T-Cell Responses Elicited by Hyaluronic Acid Decorated Gold Nanoparticles as a Vaccine for Cancer Immunotherapy // *Adv. Healthc. Mater.* John Wiley & Sons, Ltd, 2018. Vol. 7, № 10. P. 1701439.
93. Kim K.S. et al. Bioimaging for Targeted Delivery of Hyaluronic Acid Derivatives to the Livers in Cirrhotic Mice Using Quantum Dots // *ACS Nano.* American Chemical Society, 2010. Vol. 4, № 6. P. 3005–3014.
94. Xie Y. et al. Pulmonary delivery of cisplatin-hyaluronan conjugates via endotracheal instillation for the treatment of lung cancer. // *Int. J. Pharm.* Netherlands, 2010. Vol. 392, № 1–2. P. 156–163.
95. Gao W. et al. Nanoparticle-Hydrogel: A Hybrid Biomaterial System for Localized Drug Delivery // *Ann. Biomed. Eng.* 2016. Vol. 44, № 6. P. 2049–2061.
96. Zhu N. et al. Multistructured hydrogel promotes nerve regeneration // *Mater. Today Adv.* 2024. Vol. 21. P. 100465.
97. Kopeček J., Yang J. Hydrogels as smart biomaterials // *Polym. Int.* John Wiley & Sons, Ltd, 2007. Vol. 56, № 9. P. 1078–1098.
98. Li J., Mooney D.J. Designing hydrogels for controlled drug delivery // *Nat. Rev. Mater.* 2016. Vol. 1, № 12. P. 16071.
99. Jiang Y. et al. Nanoparticle–hydrogel superstructures for biomedical applications // *J. Control. Release.* 2020. Vol. 324. P. 505–521.
100. Meesaragandla B., Mahalingam V. Synthesis of Upconverting Hydrogel Nanocomposites Using Thiol-Ene Click Chemistry: Template for the Formation of Dendrimer-Like Gold Nanoparticle Assemblies // *Chem. – A Eur. J.* John Wiley & Sons, Ltd, 2015. Vol. 21, № 47. P. 16811–16817.
101. Li C., Obireddy S.R., Lai W.-F. Preparation and use of nanogels as carriers of drugs // *Drug Deliv.* Taylor & Francis, 2021. Vol. 28, № 1. P. 1594–1602.
102. Daly A.C. et al. Hydrogel microparticles for biomedical applications // *Nat. Rev. Mater.* 2020. Vol. 5, № 1. P. 20–43.

103. Meesaragandla B., Sarkar D., Mahalingam V. Methylene Blue-Loaded Upconverting Hydrogel Nanocomposite: Potential Material for Near-Infrared Light-Triggered Photodynamic Therapy Application // ACS Omega. American Chemical Society, 2019. Vol. 4, № 2. P. 3169–3177.
104. Jalani G. et al. Photocleavable Hydrogel-Coated Upconverting Nanoparticles: A Multifunctional Theranostic Platform for NIR Imaging and On-Demand Macromolecular Delivery // J. Am. Chem. Soc. American Chemical Society, 2016. Vol. 138, № 3. P. 1078–1083.
105. Ren F. et al. Functional PEG-Hydrogels Convey Gold Nanoparticles from Silicon and Aid Cell Adhesion onto the Nanocomposites // Chem. Mater. American Chemical Society, 2017. Vol. 29, № 5. P. 2008–2015.
106. Gaharwar A.K., Peppas N.A., Khademhosseini A. Nanocomposite hydrogels for biomedical applications // Biotechnol. Bioeng. John Wiley & Sons, Ltd, 2014. Vol. 111, № 3. P. 441–453.
107. Samadian H. et al. Natural polymers-based light-induced hydrogels: Promising biomaterials for biomedical applications // Coord. Chem. Rev. 2020. Vol. 420. P. 213432.
108. Zhu J. Bioactive modification of poly(ethylene glycol) hydrogels for tissue engineering. // Biomaterials. Netherlands, 2010. Vol. 31, № 17. P. 4639–4656.
109. Lin C.-C., Anseth K.S. PEG Hydrogels for the Controlled Release of Biomolecules in Regenerative Medicine // Pharm. Res. 2009. Vol. 26, № 3. P. 631–643.
110. Sun M. et al. Synthesis and Properties of Gelatin Methacryloyl (GelMA) Hydrogels and Their Recent Applications in Load-Bearing Tissue // Polymers. 2018. Vol. 10, № 11.
111. A.N.Generalova, P.A.Demina, R.A.Akasov E.V.K. Photopolymerization in 3D printing of tissue-engineered constructs for regenerative medicine // Russ. Chem. Rev. 2023. Vol. 92, № 2. P. RCR5068.
112. Xiao Q. et al. Novel multifunctional NaYF₄:Er³⁺,Yb³⁺/PEGDA hybrid microspheres: NIR-light-activated photopolymerization and drug delivery // Chem. Commun. The Royal Society of Chemistry, 2013. Vol. 49, № 15. P. 1527–1529.
113. Méndez-Ramos J. et al. Infrared-light induced curing of photosensitive resins through photon up-conversion for novel cost-effective luminescent 3D-printing technology // J. Mater. Chem. C. The Royal Society of Chemistry, 2016. Vol. 4, № 4. P. 801–806.
114. Liu R. et al. Extremely deep photopolymerization using upconversion particles as internal lamps // Polym. Chem. The Royal Society of Chemistry, 2016. Vol. 7, № 14. P. 2457–2463.

115. Chen Y. et al. Noninvasive in vivo 3D bioprinting // *Sci. Adv.* American Association for the Advancement of Science, 2024. Vol. 6, № 23. P. eaba7406.
116. Liang G. et al. Recent progress in the development of upconversion nanomaterials in bioimaging and disease treatment // *J. Nanobiotechnology*. 2020. Vol. 18, № 1. P. 154.
117. Jiang X. et al. Lanthanide-Based Nanocomposites for Photothermal Therapy under Near-Infrared Laser: Relationship between Light and Heat, Biostability, and Reaction Temperature // *Langmuir*. American Chemical Society, 2020. Vol. 36, № 15. P. 4033–4043.
118. Wang C., Cheng L., Liu Z. Upconversion nanoparticles for photodynamic therapy and other cancer therapeutics. // *Theranostics*. 2013. Vol. 3, № 5. P. 317–330.
119. Sharma P. et al. Nanoparticles for bioimaging. // *Adv. Colloid Interface Sci.* Netherlands, 2006. Vol. 123–126. P. 471–485.
120. Hong G., Antaris A.L., Dai H. Near-infrared fluorophores for biomedical imaging // *Nat. Biomed. Eng.* 2017. Vol. 1, № 1. P. 10.
121. Zou X. et al. A water-dispersible dye-sensitized upconversion nanocomposite modified with phosphatidylcholine for lymphatic imaging // *Chem. Commun.* The Royal Society of Chemistry, 2016. Vol. 52, № 91. P. 13389–13392.
122. Matsumura Y., Maeda H. A New Concept for Macromolecular Therapeutics in Cancer Chemotherapy: Mechanism of Tumor-tropic Accumulation of Proteins and the Antitumor Agent Smancs // *Cancer Res.* 1986. Vol. 46, № 12 Part 1. P. 6387 LP – 6392.
123. Chu H. et al. NIR-light-mediated spatially selective triggering of anti-tumor immunity via upconversion nanoparticle-based immunodevices // *Nat. Commun.* 2019. Vol. 10, № 1. P. 2839.
124. Deyev S.M., Lebedenko E.N. Targeted Bifunctional Proteins and Hybrid Nanoconstructs for Cancer Diagnostics and Therapies // *Mol. Biol.* 2017. Vol. 51, № 6. P. 788–803.
125. Xiong L.-Q. et al. Synthesis, characterization, and in vivo targeted imaging of amine-functionalized rare-earth up-converting nanophosphors. // *Biomaterials*. Netherlands, 2009. Vol. 30, № 29. P. 5592–5600.
126. Du K. et al. Nanocomposites based on lanthanide-doped upconversion nanoparticles: diverse designs and applications // *Light Sci. Appl.* 2022. Vol. 11, № 1. P. 222.
127. Sun Y. et al. Core–Shell Lanthanide Upconversion Nanophosphors as Four-Modal Probes for Tumor Angiogenesis Imaging // *ACS Nano*. American Chemical Society, 2013. Vol. 7, № 12. P. 11290–11300.

128. Ganta S. et al. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery. // *J. Control. release Off. J. Control. Release Soc. Netherlands*, 2008. Vol. 126, № 3. P. 187–204.
129. Bai X. et al. Upconversion luminescence tracking of gene delivery via multifunctional nanocapsules. // *Talanta. Netherlands*, 2016. Vol. 150. P. 118–124.
130. Bansal A., Zhang Y. Photocontrolled Nanoparticle Delivery Systems for Biomedical Applications // *Acc. Chem. Res. American Chemical Society*, 2014. Vol. 47, № 10. P. 3052–3060.
131. Dai Y. et al. Doxorubicin conjugated NaYF₄:Yb(3+)/Tm(3+) nanoparticles for therapy and sensing of drug delivery by luminescence resonance energy transfer. // *Biomaterials. Netherlands*, 2012. Vol. 33, № 33. P. 8704–8713.
132. Haase M., Schäfer H. Upconverting Nanoparticles // *Angew. Chemie Int. Ed. John Wiley & Sons, Ltd*, 2011. Vol. 50, № 26. P. 5808–5829.
133. Hou Z. et al. Electrospinning Preparation and Drug-Delivery Properties of an Up-conversion Luminescent Porous NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺@Silica Fiber Nanocomposite // *Adv. Funct. Mater. John Wiley & Sons, Ltd*, 2011. Vol. 21, № 12. P. 2356–2365.
134. Yan B. et al. Near-infrared light-triggered dissociation of block copolymer micelles using upconverting nanoparticles. // *J. Am. Chem. Soc. United States*, 2011. Vol. 133, № 49. P. 19714–19717.
135. Fedoryshin L.L. et al. Near-infrared-triggered anticancer drug release from upconverting nanoparticles. // *ACS Appl. Mater. Interfaces. United States*, 2014. Vol. 6, № 16. P. 13600–13606.
136. Choi W. Il et al. Tumor Regression In Vivo by Photothermal Therapy Based on Gold-Nanorod-Loaded, Functional Nanocarriers // *ACS Nano. American Chemical Society*, 2011. Vol. 5, № 3. P. 1995–2003.
137. Krylov I. V et al. Local Overheating of Biotissue Labeled With Upconversion Nanoparticles Under Yb³⁺ Resonance Excitation // *Front. Chem.* 2020. Vol. 8. P. 295.
138. Chen J. et al. Nanomaterials as photothermal therapeutic agents // *Prog. Mater. Sci.* 2019. Vol. 99. P. 1–26.
139. Du K. et al. In situ decorating of ultrasmall Ag₂Se on upconversion nanoparticles as novel nanotheranostic agent for multimodal imaging-guided cancer photothermal therapy // *Appl. Mater. Today.* 2020. Vol. 18. P. 100497.
140. Chen J. et al. Developing a pH-sensitive Al(OH)₃ layer-mediated UCNP@Al(OH)₃/Au nanohybrid for photothermal therapy and fluorescence imaging in vivo // *J. Mater. Chem. B. The Royal Society of Chemistry*, 2018. Vol. 6, № 47. P. 7862–7870.

141. Zhang Z.-Q. et al. Advances in coatings on magnesium alloys for cardiovascular stents – A review // *Bioact. Mater.* 2021. Vol. 6, № 12. P. 4729–4757.
142. Vitek J.L. et al. Subthalamic nucleus deep brain stimulation with a multiple independent constant current-controlled device in Parkinson's disease (INTREPID): a multicentre, double-blind, randomised, sham-controlled study. // *Lancet. Neurol.* England, 2020. Vol. 19, № 6. P. 491–501.
143. Stewart P.S., Bjarnsholt T. Risk factors for chronic biofilm-related infection associated with implanted medical devices. // *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* England, 2020. Vol. 26, № 8. P. 1034–1038.
144. Darani M.K. et al. NIR induced photopolymerization of acrylate-based composite containing upconversion particles as an internal miniaturized UV sources // *Prog. Org. Coatings.* 2017. Vol. 104. P. 97–103.
145. Zhang P. et al. Upconversion 3D Bioprinting for Noninvasive In Vivo Molding // *Adv. Mater.* John Wiley & Sons, Ltd, 2024. Vol. n/a, № n/a. P. 2310617.
146. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* 1976. Vol. 72, № 1. P. 248–254.
147. Knop K. et al. Poly(ethylene glycol) in Drug Delivery: Pros and Cons as Well as Potential Alternatives // *Angew. Chemie Int. Ed.* John Wiley & Sons, Ltd, 2010. Vol. 49, № 36. P. 6288–6308.
148. Generalova A.N. et al. Optical sensing quantum dot-labeled polyacrolein particles prepared by layer-by-layer deposition technique. // *J. Colloid Interface Sci.* United States, 2011. Vol. 357, № 2. P. 265–272.
149. Jurga N. et al. Improvement of ligand-free modification strategy to obtain water-stable up-converting nanoparticles with bright emission and high reaction yield // *Sci. Rep.* 2021. Vol. 11, № 1. P. 18846.
150. Jin J. et al. Polymer-Coated NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺ Upconversion Nanoparticles for Charge-Dependent Cellular Imaging // *ACS Nano.* American Chemical Society, 2011. Vol. 5, № 10. P. 7838–7847.
151. Benoit D.S.W. et al. 4.422 - pH-Responsive Polymers for the Intracellular Delivery of Biomolecular Drugs / ed. Ducheyne P.B.T.-C.B. Oxford: Elsevier, 2011. P. 357–375.
152. Moghimi S.M. et al. A two-stage poly(ethylenimine)-mediated cytotoxicity: implications for gene transfer/therapy // *Mol. Ther.* Elsevier, 2005. Vol. 11, № 6. P. 990–995.

153. Wang J., Li W., Zhu J. Encapsulation of inorganic nanoparticles into block copolymer micellar aggregates: Strategies and precise localization of nanoparticles // *Polymer (Guildf)*. 2014. Vol. 55, № 5. P. 1079–1096.
154. Yang Q. et al. Biopolymer coating for particle surface engineering and their biomedical applications // *Mater. Today Bio*. 2022. Vol. 16. P. 100407.
155. González-Béjar M., Francés-Soriano L., Pérez-Prieto J. Upconversion Nanoparticles for Bioimaging and Regenerative Medicine // *Front. Bioeng. Biotechnol*. 2016. Vol. 4.
156. Harris J.M. Introduction to Biotechnical and Biomedical Applications of Poly(Ethylene Glycol) BT - Poly(Ethylene Glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications / ed. Harris J.M. Boston, MA: Springer US, 1992. P. 1–14.
157. Патент на изобретение RU 2333223 C2. Российская Федерация, C08B 37/00. Альдегидные производные сиаловой кислоты, способы их получения, конъюгаты альдегидных производных сиаловой кислоты и фармацевтическая композиция на их основе: № 2006107546/04, заявл. – 12.08.2004; опубл. 20.09.2007 / Санджай Джаин, Питер Лейнг, Грегори Грегориадис, Дейл Говард Хречук-херст, Иоаннис Папаиоанну.
158. Fernandes A.I., Gregoriadis G. The effect of polysialylation on the immunogenicity and antigenicity of asparaginase: implication in its pharmacokinetics. // *Int. J. Pharm. Netherlands*, 2001. Vol. 217, № 1–2. P. 215–224.
159. Fernandes A.I., Gregoriadis G. Synthesis, characterization and properties of sialylated catalase // *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol*. 1996. Vol. 1293, № 1. P. 90–96.
160. Fernandes A.I., Gregoriadis G. Polysialylated asparaginase: preparation, activity and pharmacokinetics. // *Biochim. Biophys. Acta. Netherlands*, 1997. Vol. 1341, № 1. P. 26–34.
161. A.B.Zezin V.A.K. A New Class of Complex Water-soluble Polyelectrolytes // *Russ. Chem. Rev*. 1982. Vol. 51, № 9. P. 833–855.
162. Khaydukov E. V et al. Riboflavin photoactivation by upconversion nanoparticles for cancer treatment // *Sci. Rep. The Author(s)*, 2016. Vol. 6. P. 35103.
163. Ahmad I. et al. Photoinitiated Polymerization of 2-Hydroxyethyl Methacrylate by Riboflavin/Triethanolamine in Aqueous Solution: A Kinetic Study // *ISRN Pharm.* / ed. Chang F.-R., Veerasamy R., Kuzmich D. Hindawi Publishing Corporation, 2013. Vol. 2013. P. 958712.
164. Jayapaul J. et al. Riboflavin carrier protein-targeted fluorescent USPIO for the assessment of vascular metabolism in tumors. // *Biomaterials. Netherlands*, 2012. Vol. 33, № 34. P. 8822–8829.

165. Demina P. et al. Polymerization Assisted by Upconversion Nanoparticles under NIR Light // *Molecules*. MDPI, 2019. Vol. 24, № 13. P. 2476.
166. Demina P.A. et al. Role of energy transfer in a nanoinitiator complex for upconversion-driven polymerization // *Mater. Today Adv.* 2023. Vol. 19. P. 100388.
167. Fairbanks B.D. et al. Photoinitiated polymerization of PEG-diacrylate with lithium phenyl-2,4,6-trimethylbenzoylphosphinate: polymerization rate and cytocompatibility // *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 2009. Vol. 30, № 35. P. 6702–6707.
168. Kobayashi H., Watanabe R., Choyke P.L. Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; what is the appropriate target? // *Theranostics*. 2013. Vol. 4, № 1. P. 81–89.
169. Generalova A.N. et al. PEG-modified upconversion nanoparticles for in vivo optical imaging of tumors // *RSC Adv.* 2016. Vol. 6, № 36. P. 30089–30097.
170. Guller A.E. et al. Cytotoxicity and non-specific cellular uptake of bare and surface-modified upconversion nanoparticles in human skin cells // *Nano Res.* 2015. Vol. 8, № 5. P. 1546–1562.
171. Demina P.A. et al. A versatile platform for bioimaging based on colominic acid-decorated upconversion nanoparticles // *Biomater. Sci.* The Royal Society of Chemistry, 2020. Vol. 8, № 16. P. 4570–4580.
172. Klebanov G.I. et al. A comparative study of the effects of laser and light-emitting diode irradiation on the wound healing and functional activity of wound exudate leukocytes // *Biofizika*. Russia (Federation), 2005. Vol. 50, № 6. P. 1137–1144.
173. Campo G.M. et al. Hyaluronan reduces inflammation in experimental arthritis by modulating TLR-2 and TLR-4 cartilage expression // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2011. Vol. 1812, № 9. P. 1170–1181.
174. Sun X. et al. Visualization of inflammation in a mouse model based on near-infrared persistent luminescence nanoparticles // *J. Lumin.* 2018. Vol. 204. P. 520–527.
175. Generalova A.N. et al. Submicron polyacrolein particles in situ embedded with upconversion nanoparticles for bioassay // *Nanoscale*. The Royal Society of Chemistry, 2015. Vol. 7, № 5. P. 1709–1717.
176. Decuzzi P. et al. The Effective Dispersion of Nanovectors Within the Tumor Microvasculature // *Ann. Biomed. Eng.* 2006. Vol. 34, № 4. P. 633–641.
177. Hekmat A., Saboury A.A., Divsalar A. The effects of silver nanoparticles and doxorubicin combination on DNA structure and its antiproliferative effect against T47D and MCF7 cell lines. // *J. Biomed. Nanotechnol.* United States, 2012. Vol. 8, № 6. P. 968–982.

178. Justus C.R., Dong L., Yang L. V. Acidic tumor microenvironment and pH-sensing G protein-coupled receptors. // *Front. Physiol. Switzerland*, 2013. Vol. 4. P. 354.
179. Fülöp Z., Gref R., Loftsson T. A permeation method for detection of self-aggregation of doxorubicin in aqueous environment. // *Int. J. Pharm. Netherlands*, 2013. Vol. 454, № 1. P. 559–561.
180. Bains U., Pal R. In-Situ Continuous Monitoring of the Viscosity of Surfactant-Stabilized and Nanoparticles-Stabilized Pickering Emulsions // *Applied Sciences*. 2019. Vol. 9, № 19.
181. Demina P.A. et al. Upconversion Nanoparticles Intercalated in Large Polymer Micelles for Tumor Imaging and Chemo/Photothermal Therapy // *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. Vol. 24, № 13.
182. Devanesan S. et al. Cytotoxic and Antimicrobial Efficacy of Silver Nanoparticles Synthesized Using a Traditional Phytoproduct, Asafoetida Gum // *Int. J. Nanomedicine. New Zealand*, 2020. Vol. 15. P. 4351–4362.
183. Nicoletto R.E., Ofner C.M. 3rd. Cytotoxic mechanisms of doxorubicin at clinically relevant concentrations in breast cancer cells. // *Cancer Chemother. Pharmacol. Germany*, 2022. Vol. 89, № 3. P. 285–311.
184. Gaharwar A.K. et al. Photocrosslinked nanocomposite hydrogels from PEG and silica nanospheres: Structural, mechanical and cell adhesion characteristics // *Mater. Sci. Eng. C*. 2013. Vol. 33, № 3. P. 1800–1807.
185. Yesildag C. et al. Novel Wet Micro-Contact Deprinting Method for Patterning Gold Nanoparticles on PEG-Hydrogels and Thereby Controlling Cell Adhesion // *Polymers* . 2017. Vol. 9, № 5.