

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В.ЛОМОНОСОВА  
ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*

**ПОТАПЕНКОВ КИРИЛЛ ВАСИЛЬЕВИЧ**

**НОВЫЕ НАНОКОМПОЗИТНЫЕ МЕМБРАННЫЕ ВЕЗИКУЛЫ И ИХ  
АКТИВАЦИЯ ВНЕШНИМИ ФИЗИЧЕСКИМИ ВОЗДЕЙСТВИЯМИ**

Специальность 03.01.08 – «Биоинженерия»

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:  
доктор физико-математических наук  
Хомутов Геннадий Борисович

Москва-2020

## Оглавление

Термины и сокращения.....	3
Введение .....	4
ГЛАВА 1 .....	14
1.1 Основные подходы к разработке систем управляемой доставки лекарств....	14
1.1.1 Комплексы полимеров и лекарственных молекул .....	14
1.1.2 Дендримеры.....	16
1.1.3 Полимерные микро - и наночастицы (микросферы и наносферы)....	19
1.1.4 Гидрогели .....	22
1.1.5 Полиплексы – комплексы с ДНК .....	25
1.1.6 Системы доставки лекарств на основе вирусов .....	27
1.1.7 Системы доставки лекарств на основе липидных структур: липосомы и мицеллы. ....	28
1.1.8 Амфифильные полимеры и блок-сополимеры для доставки лекарств. ....	32
1.1.9 Полиэлектролитные и нанокompозитные микрокапсулы.....	35
1.1.10 Комплексы коллоидных неорганических наночастиц и молекул лекарств .....	38
1.1.11 Металлорганические комплексы.....	41
1.1.12 Мезопористые материалы (пористый SiO <sub>2</sub> ).....	42
1.1.13 Керамические нанотрубки .....	43
1.1.14 Углеродные материалы (фуллерены, наноалмазы, нанотрубки, графен, углеродные квантовые точки, капсулы с углеродными нанотрубками) .....	44
1.2 Системы доставки лекарств, восприимчивые к внутренним активирующим воздействиям .....	46
1.2.1 Системы доставки лекарств, восприимчивые к изменению рН .....	46
1.2.2 Системы доставки лекарств, чувствительные к окислительно-восстановительным реакциям.....	48
1.2.3 Системы доставки лекарств, активируемые ферментативными реакциями.....	48
1.3 Термочувствительные системы доставки лекарств .....	49
1.4 Системы доставки лекарств, восприимчивые к внешним воздействиям .....	51
1.4.1 Системы доставки лекарств, активируемые магнитным полем .....	51
1.4.2 Внешние электрические поля в доставке лекарств .....	53
1.4.3 Активация носителей лекарств ультразвуком .....	57
1.4.4 Активация носителей лекарств излучением оптического диапазона .....	58
ГЛАВА 2. Материалы и методы .....	59
2.1 Получение функциональных неорганических наночастиц .....	59

2.1.1	Получение наночастиц магнетита ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) .....	59
2.1.2	Гидрофобизация наночастиц магнетита.....	61
2.1.3	Методика синтеза золотых наночастиц с одновременной гидрофобизацией.....	65
2.2	Получение и загрузка липосом .....	70
2.2.1	Липосомы с гидрофобизованными наночастицами магнетита .....	71
2.2.2	Получение липосом с гидрофобизованными наночастицами золота, локализованными в гидрофобной области мембраны .....	74
ГЛАВА 3. Исследование воздействия внешних электрических и магнитных полей на нанокompозитные липосомы .....		75
3.1	Воздействие внешних магнитных полей на липосомы, содержащие в мембранах гидрофобизованные наночастицы магнетита.....	75
3.2	Воздействие импульсных электрических полей на липосомы, содержащие в мембранах золотые наночастицы, эксперимент с раствором NaCl.....	79
3.3	Воздействие импульсных электрических полей на липосомы, содержащие в мембранах золотые наночастицы, эксперимент с доксорубицином .....	81
3.4	Цитотоксичность липосом с локализованными в мембране наночастицами .....	85
ГЛАВА 4. Теоретические оценки наблюдаемых эффектов .....		88
4.1	Механизмы разрушения нанокompозитных липосом во внешнем электрическом поле .....	88
4.2	Липосомы с магнитными наночастицами в мембране: теоретические оценки эффектов .....	97
Заключение.....		114
Выводы .....		114
Список литературы.....		117

## Термины и сокращения

**ФХ**-фосфатидилхолин

**ОДТ, ODT** – октадецилтиол

**НЧ** – наночастицы

**ПЭМ** – просвечивающая электронная микроскопия

**АСМ** – атомно-силовая микроскопия

**Трис, Tris** - трис(гидроксиметил)аминометан, буфер

**ЭПР** – электронный парамагнитный резонанс

**МРТ** - магнитно-резонансная томография

**EPR** – эффект повышенной проницаемости и удержания

**FDA** – Food and Drug Administration – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США

**ЕМА** – Европейское агентство лекарственных средств.

**ВСК** – вытянутые сфероидальные координаты

**ССК** – сплюснутые сфероидальные координаты

**DMEM** - Dulbecco's Modified Eagle's Medium, среда для культивирования клеток

**МТТ** - 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид

**polyHPMA** - N-(2-гидроксипропил) метакриламид

**PEG, ПЭГ** - полиэтиленгликоль

**СМС** – critical micellization concentration, критическая концентрация мицеллообразования

**МОФ** – металлоорганический комплекс

**SPR** – поверхностный плазмонный резонанс

## Введение

**Актуальность.** Везикулы на основе биогенных липидов (липосомы) являются важным биомиметическим объектом фундаментальных биофизических исследований, а также прикладных биомедицинских и нанотехнологических разработок. Методы получения липосом относительно просты и в настоящее время хорошо отработаны. Липосомы являются простейшим аналогом мембран природных клеток, биосовместимы и нетоксичны, поэтому находят широкое применение в качестве модельных систем в фундаментальных биофизических исследованиях и используются в современной клинической практике для капсулирования ряда лекарств.

Одной из наиболее актуальных и важных научных проблем на стыке биофизики, нано-биоинженерии, биологии и медицины в настоящее время является проблема создания эффективных средств капсулирования, адресной доставки и управляемого высвобождения в целевой области биологически активных веществ и лекарственных препаратов, в том числе *in vivo*. Создание технологий управляемой доставки лекарств может значительно повысить эффективность лекарственной терапии ряда заболеваний, включая онкологические; минимизировать токсические и побочные эффекты применяемых препаратов, значительно повысить концентрацию препарата непосредственно в очаге заболевания. Свидетельством актуальности данной проблемы является растущее из года в год количество публикаций по данной теме в научной литературе.

Среди работ, посвященных доставке лекарственных препаратов *in vivo* (т.н. «drug delivery» в англоязычной научной литературе), значительный процент приходится на работы, в которых в качестве средства доставки используются именно липосомы – бислойные мембранные везикулы на основе природных липидов. Ряд лекарственных форм, в которых действующее вещество загружено внутрь липосом (Doxil, Daunoxome) уже одобрен американским управлением по контролю за лекарствами и пищевыми продуктами (FDA) и коммерчески доступен. Липосомы обладают рядом достоинств: липиды, используемые для получения липосом, являются основным структурным компонентом мем-

бран биологических клеток, а потому они биосовместимы, и побочные токсические эффекты липосом минимальны или вовсе исключены. Широкий спектр простых и доступных методик позволяет получать липосомы различных размеров, оптимальные для каждого конкретного биомедицинского и биоинженерного применения.

Уже упоминавшиеся липосомальные лекарственные формы - препараты «Doxil» и «Daunoxome», содержащие капсулированный доксорубин, не имеют функциональных компонентов в мембранах липосом. Накопление таких липосом в опухоли происходит за счет т.н. эффекта повышенной проницаемости и удержания, обусловленного особенностями строения стенок сосудов опухолей. Липосомальные лекарственные препараты показали большую терапевтическую эффективность в сравнении со свободным состоянием действующего вещества в жидких биологических средах. Дополнительные функциональные компоненты липосом-носителей могут еще более повысить эффективность применения загруженных в липосомы лекарств, во-первых, за счет специфического связывания и избирательной локализации носителей лекарств в целевой области организма и, во-вторых, за счет управляемого высвобождения капсулированных веществ из носителей. В частности, функционализация липосом может обеспечить их восприимчивость к внешним физическим и химическим активирующим воздействиям, приводящим к управляемому высвобождению лекарственного препарата из капсулы-носителя в нужном месте в нужное время и в нужном количестве (так называемое пространственно-временное сопряжение адресной доставки лекарства). В качестве активирующих физических воздействий в настоящее время используются электромагнитные воздействия, в том числе свет, внешние электрические и магнитные поля, температурные воздействия, ультразвук.

Неорганические магнитные наночастицы оксида железа - один из интереснейших объектов биофизических исследований. Так, суперпарамагнитные и однодоменные ферромагнитные наночастицы магнетита обнаруживаются в ряде живых систем. Именно они обеспечивают магнитное ориентирование птиц,

рыб, насекомых и бактерий в магнитном поле Земли [1]. Магнитные наночастицы также найдены в мозге пациентов с нейродегенеративными заболеваниями (болезнью Альцгеймера, Паркинсона и пр.) [2], что может, в том числе, выступать диагностическим критерием ряда нейродегенеративных нарушений. Магнитные наночастицы магнетита дают характерный «широкий» сигнал ЭПР, могут быть использованы в качестве контрастирующего агента для МРТ; используются в разработках методов магнитной гипертермии опухолей. Кроме того, наночастицы магнетита и внешнее неоднородное магнитное поле могут обеспечить направленное избирательное аккумуляирование магнитного носителя лекарств непосредственно в очаге заболевания, например в опухоли. Включение наночастиц магнетита в мембраны липосом может обеспечить как управляемую доставку лекарств, так и их высвобождение из липосом в очаге заболевания.

Золотые наночастицы, локализованные во внутренних гидрофобных областях липидной мембраны, могут быть использованы для разрушения липосом путем воздействия на них внешнего электрического поля. Использование электрического поля для биомедицинских применений, в том числе для вскрытия носителей лекарств или образования пор в клетках посредством эффекта электропорации, сопряжено с потенциальными негативными воздействиями на здоровые клетки и болевыми эффектами для пациента. В настоящей работе показано, что наночастицы золота могут быть использованы для избирательного разрушения липосомальных бислоев, эффективно усиливая локальное электрическое поле, что позволяет использовать для дистанционного вскрытия липосом электрические импульсы наносекундной длительности. Наносекундная длительность импульсов позволяет минимизировать возможные негативные эффекты электрических воздействий на организм. Однако, для реализации эффекта электропорации на липидных мембранах клеток или липосом, необходимо накопление на мембране определенной величины электрического заряда («зарядка мембранного конденсатора»). Носители зарядов в водной среде имеют ионную природу, обуславливающую меньшую величину их подвижности,

по сравнению с электронами в металлах. Ввиду этого, а также значительной емкости липидных мембран, их зарядка до величин, необходимых для реализации эффекта электропорации, требует определенного времени, порядка микросекунд или их десятых долей. Наночастицы, обладающие электронной проводимостью, поляризуются во внешнем электрическом поле на несколько порядков быстрее. Это позволяет обеспечить быструю поляризацию наночастиц в сравнении со временем накопления заряда на клеточных мембранах. Локализация функциональных электропроводящих и магнитных наночастиц непосредственно во внутренней гидрофобной области липидного бислоя липосомальной мембраны обладает рядом преимуществ. Во-первых, исключается контакт наночастиц с водной средой и, тем самым, исключаются возможные токсические эффекты, обусловленные зарядом и химической активностью функциональных неорганических наночастиц. Кроме того, низкая величина диэлектрической проницаемости внутренних гидрофобных областей липидной мембраны оптимальна для восприимчивости поляризующихся электропроводящих наночастиц к воздействиям внешнего электрического поля.

Таким образом, разработка биомиметических нанокомпозитных везикул на основе липосом с гидрофобизованными функциональными наночастицами магнетита и/или золота, локализованными в гидрофобной области липидного бислоя, является актуальной для решения проблем прикладной биофизики и биоинженерии. Данные везикулы обладают значительным потенциалом для модельных биофизических исследований и практических биомедицинских применений.

В настоящей работе получены и охарактеризованы новые мембранные липидные везикулы, функционализированные неорганическими гидрофобизованными наночастицами магнетита и золота. Проведены работы по капсулированию внутри таких липосом модельных соединений - раствора соли NaCl и молекул красителя карбоксифлуоресцеина а также лекарственного препарата доксорубицина. Экспериментально изучены эффекты высвобождения загруженных в липосомы веществ, обусловленные нетермическим воздействием

внешнего импульсного электрического или постоянного магнитного полей. Приводятся теоретические оценки эффектов, которые могут лежать в основе механизмов явлений, наблюдаемых при воздействии внешних электрических и магнитных полей на нанокompозитные липосомы. Результаты работы в перспективе могут быть использованы для создания эффективной биомедицинской платформы, обеспечивающей адресную доставку и управляемое высвобождение биологически активных веществ, в т.ч. лекарств, в живых системах.

**Степень разработанности темы.** Имеется значительное количество научных публикаций по теме адресной доставки и управляемого высвобождения лекарственных препаратов; ряд специализированных научных журналов по данной тематике. Липосомы остаются одним из наиболее популярных средств доставки лекарств *in vivo*, существуют коммерчески доступные препараты, в которых действующее вещество загружено внутрь липосом. В ряде публикаций описана дополнительная функционализация липосом, в том числе включение в липосомы наночастиц магнетита или золота. Воздействие сверхкоротких импульсов электрического поля и магнитного поля на нанокompозитные липосомы с наночастицами не исследовалось.

**Цель диссертационного исследования.** Создать и охарактеризовать новые нанокompозитные мембранные везикулы на основе биогенных липидов и гидрофобизованных неорганических наночастиц магнетита и золота, а также разработать физико-химические подходы к применению таких везикул для капсулирования и управляемого высвобождения из них модельных соединений и лекарственного препарата доксорубицина под действием внешних магнитных и импульсных электрических полей.

**Задачи работы:**

1. Получить стабильные коллоидные растворы гидрофобизованных (с использованием стеариновой кислоты) неорганических наночастиц магнетита ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) и наночастиц золота, гидрофобизованных с использованием дополнительных амфифильных водонерастворимых лигандов (стеариновая кислота, октадецилтиол).

2. Получить новые биомиметические мембранные нанокompозитные везикулы на основе фосфатидилхолина и гидрофобизованных наночастиц золота и магнетита. Исследовать возможность капсулирования в них ряда веществ, в т.ч. раствора соли NaCl, красителя карбоксифлуоресцеина и противоопухолевого препарата доксорубицина.

3. Исследовать воздействия коротких импульсов электрического поля высокой напряженности или внешних магнитных полей на нанокompозитные везикулы, содержащие раствор соли NaCl, карбоксифлуоресцеин или доксорубицин.

4. Построить теоретические модели, описывающие влияние внешних электрических и магнитных полей на нанокompозитные липосомы.

**Объект и предмет исследования.** Объектом исследования являются нанокompозитные везикулы, содержащие в гидрофобных областях мембраны функциональные неорганические наночастицы магнетита и золота. Предметом исследования является высвобождение загруженных веществ из данных везикул под действием внешних физических воздействий.

#### **Научная новизна**

1. Разработана методика синтеза с одновременной гидрофобизацией наночастиц золота, позволяющая варьировать размер получаемых частиц.

2. Впервые получены и охарактеризованы нанокompозитные липосомы, содержащие гидрофобизованные золотые наночастицы, локализованные во внутримембранных гидрофобных областях липосомальных мембран.

3. Впервые экспериментально исследован эффект влияния внешних полей (электрических и магнитных) на нанокompозитные липосомы, содержащие в гидрофобных областях мембран наночастицы магнетита или золота.

4. Сделаны теоретические оценки эффекта изменения формы и проницаемости нанокompозитных магнитных липосом во внешних магнитных полях.

#### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Получены, исследованы и охарактеризованы новые нанокompозитные везикулы на основе фосфолипида фосфатидилхолина и гидрофобизованных на-

ночастиц золота и магнетита. Установлена возможность загрузки в такие нанокompозитные везикулы модельных и биологически активных веществ, а также продемонстрировано управляемое высвобождение инкапсулированных веществ под действием внешнего импульсного электрического поля или внешнего магнитного поля. Сделаны теоретические оценки наблюдаемых эффектов влияния внешних электрических и магнитных полей на нанокompозитные везикулы. Практические и теоретические результаты работы могут быть использованы для разработки перспективных средств капсулирования и управляемой доставки биологически активных веществ и лекарственных препаратов.

**Методология диссертационного исследования.** В работе использовали комплекс современных взаимодополняющих физико-химических методов, таких как спектрофлуориметрия, динамическое светорассеяние, лазерный микроэлектрофорез, просвечивающая электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, ИК-Фурье спектроскопия, кондуктометрия и др.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. Методом разложения гидрофобного прекурсора в хлороформе и варьирования концентрации лигандов (октадецилтиол, стеариновая кислота) получены коллоидные растворы гидрофобизованных наночастиц золота контролируемого размера в хлороформе. Получены коллоидные растворы гидрофобизованных наночастиц магнетита в хлороформе.

2. С использованием комплекса экспериментальных методов получены липидные везикулы, содержащие гидрофобизованные наночастицы магнетита и золота. Нанокompозитные липосомы на основе фосфатидилхолина и гидрофобизованных наночастиц магнетита и золота капсулируют во внутреннем объеме различные вещества включая лекарственные препараты (доксорубицин).

3. С использованием комплекса экспериментальных методов установлено, что короткие импульсы электрического поля высокой напряженности вызывают высвобождение содержимого нанокompозитных липосом во внешнюю водную среду. Под воздействием внешнего магнитного поля происходит изме-

нение формы магнитных липосом и высвобождение капсулированного вещества во внешнюю водную среду.

**Степень достоверности.** Достоверность результатов настоящего исследования подтверждается использованием адекватных экспериментальных методов и согласием с литературными данными.

#### **Личный вклад автора**

Автор лично проводил анализ литературных данных, участвовал в постановке задач и планировании экспериментов. Разработка теоретических моделей, интерпретация результатов эксперимента и написание выводов проведены лично автором или при его непосредственном участии. Автор принимал активное участие в написании публикаций и тезисов конференций по теме диссертационной работы.

**Публикации.** По теме диссертационной работы опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах Web of Science, Scopus и РИНЦ:

1. G. B. Khomutov, V. P. Kim, **K. V. Potapenkov** [et al.] Langmuir monolayers and langmuir-blodgett films of ph-sensitive lipid// Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. — 2017. — Vol. 532. — P. 150–154 (*Импакт-фактор Scopus 2018г. - 3,131; SJR 2018г.- 0,735*)

2. G. B. Khomutov, V. P. Kim, **K. V. Potapenkov** [et al.] Nanocomposite biomimetic vesicles based on interfacial complexes of polyelectrolytes and colloid magnetic nanoparticles // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. — 2017. — Vol. 532. — P. 26–35

*(Импакт-фактор Scopus 2018г. - 3,131; SJR 2018г. - 0,735)*

3. Ю. В. Гуляев, В. А. Черепенин, **К.В. Потапенков** и др. Дистанционная активация с помощью импульсного электрического поля нанокomпозитных микрокапсул на основе комплексов липидов, полимеров и проводящих наночастиц// Журнал радиоэлектроники. — 2014. — № 11. — С. 1–32

*(Импакт-фактор РИНЦ 2018 г. - 0,423)*

4. В. П. Ким, А. В. Ермаков, **К.В. Потапенков** и др. Планарные наносистемы на основе комплексов амфифильного полиамина, наночастиц магнетита и молекул ДНК // Российские нанотехнологии. — 2014. — Т. 9, № 5-6. — С. 42–46 (*Импакт-фактор РИНЦ 2016 г. - 1,094*)

**Апробация работы.** Результаты работы представлены на 14 международных и всероссийских конференциях (23 публикации в сборниках тезисов).

1. XIV международная научная конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2019», Москва, 21.11.2019-24.11.2019

2. VI Съезд биофизиков России, Сочи, 16.09.2019-21.09.2019

3. 3rd International Symposium on “Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine”, Moscow, 14.10.2018-17.10.2018

4. XXV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых ЛОМОНОСОВ – 2018, Москва, 09.04.2018-13.04.2018

5. XXIV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых ЛОМОНОСОВ – 2017, Москва, 20.04.2017

6. VI международная молодежная научная школа-конференция «Современные проблемы физики и технологий», Москва, 17.04.2017-21.04.2017

7. 30th Conference of The European Colloid and Interface Society, Рим, Италия, 04.09.2016-09.09.2016

8. XI Международная научно-техническая конференция «Актуальные вопросы биологической физики и химии» БФФХ - 2016, Севастополь, 25.04.2016-29.04.2016

9. XV Ежегодная молодежная конференция с международным участием ИБХФ РАН-ВУЗы «Биохимическая физика», Москва, 23.11.2015-25.11.2015

10. V Съезд биофизиков России, Ростов-на-Дону, 4.10.2015-10.10.2015

11. 14-th European Conference on Organized films ECOF-14, Генуя, Италия, 29.06.2015 - 2.06.2015

12. XXII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2015", Москва, Россия, 13.04.2015-17.04.2015

13. XII International Conference on Nanostructured Materials (NANO 2014), Москва, 13.07.2014-18.07.2014

14. IV Съезд биофизиков России, Нижний Новгород, 20.08.2012-26.08.2012

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, четырех глав, содержащих обзор литературных данных, изложение и обсуждение результатов, заключения и списка литературы. Работа изложена на 133 страницах, включает 6 таблиц и 35 иллюстраций. Список литературы включает 160 наименований.

## ГЛАВА 1

### 1.1 Основные подходы к разработке систем управляемой доставки лекарств

#### 1.1.1 Комплексы полимеров и лекарственных молекул

Конъюгаты полимеров и лекарственных молекул – одни из важнейших систем доставки лекарств. Первые работы по использованию полимер-лекарственных комплексов в качестве систем доставки лекарств относятся к 1950-60тым годам XX века. [3] К первым работам, в которых предлагается повысить эффективность лекарственной терапии путем связывания лекарственной молекулы с полимерным фрагментом, относятся работы Матэ [4] (1958 год, конъюгация лекарств с иммуноглобулинами) и Рингсдорфа [5] (1975 год, предложил концепт конъюгатов противораковых лекарств и полимеров).

Концепция полимер-лекарственных комплексов подразумевает наличие трех компонентов. Во-первых, используется биологическая либо синтетическая молекула полимера-носителя, как правило, весом  $10^4$ - $10^5$  Да. Полимер-носитель должен быть хорошо охарактеризован, не должен демонстрировать токсичность и антигенность; кроме того, он должен быть биоразлагаемым или же полностью выводиться из организма. В полимер-лекарственных конъюгатах первого поколения, которые проходили клинические испытания, в качестве полимера-носителя использовались N-(2-гидроксипропил) метакриламид (известен под английским названием polyHPMA), [6] полиэтиленгликоль [7], полиглутаминовая кислота [8] а также полистиренмалеиновый ангидрид [9]. Использование биологических полимеров, например пептидов, ДНК, антител, позволяет избежать ряда побочных эффектов конъюгатов. Архитектура полимера, как то: конформация, гибкость, разветвленность и гидродинамический объем оказывают значительное влияние на циркуляцию полимера *in vivo* и его выведение через почки, однако влияние архитектуры полимера на попадание полимерного конъюгата в опухоль невелико. [10]

Во-вторых, полимер-лекарственный конъюгат должен обладать связью между полимерной молекулой и молекулой лекарства [11]. Для обеспечения эффекта избирательности необходимо, чтобы связь была стабильна при распространении конъюгата по кровеносной системе и разрушалась, высвобождая лекарство при попадании непосредственно в опухоль. Участок - сшивка, называемый линкером, может быть биоразлагаемым (например, пептидная связь) или же неразлагаемым (тиоэфирная связь), последнее часто применяется при использовании антител [12].

В-третьих, молекула лекарственного препарата является основным компонентом полимер-лекарственного конъюгата. Первые полимер-лекарственные конъюгаты, появившиеся в 70-80 годах, использовали наиболее популярные противоопухолевые препараты тех лет, например антибиотики антрациклинового ряда (даунорубицин и доксорубицин), алкилирующие агенты (циклофосфамид и мелфаллан) и антимаболиты (метотрексат и 5-флюороаурацил). Полимерные молекулы-носители являются перспективной платформой для доставки нескольких различных лекарственных молекул одновременно. Подобным образом можно реализовать, например сочетание эндокринной терапии с химиотерапией: эксперименты *in vitro* показали, что конъюгаты, содержащие два лекарства, аминоклутетимид и доксорубицин, демонстрируют значительно увеличенную цитотоксичность, в сравнении с конъюгатами, содержащими только доксорубицин. [11].

Лекарственные молекулы могут быть прикреплены к готовой цепи полимера или же прикреплены к мономерам перед полимеризацией; наконец, молекулы лекарства сами могут выступать мономером [3]. Механизмом, обеспечивающим специфичность лекарственного воздействия при образовании полимер-лекарственного конъюгата, является эффект повышенной проницаемости и удержания, более известный под англоязычным названием Enhanced Permeability and Retention (EPR). Сосудистая система опухоли весьма проницаема, при этом лимфатический дренаж нарушен, что ведет к накоплению в опухоли макромолекул и липосом. Это приводит к увеличению специфичности к

опухоли от 10 и до 100 раз, в сравнении со свободным лекарством, которое, как правило, низкомолекулярно [11]. Помимо противоопухолевой активности, конъюгаты на основе НРМА показали также иммуностимулирующий эффект [13]. Конъюгация с моноклональными антителами может обеспечивать направленность лекарственного воздействия, однако комплексы лекарств и полимеров обладают рядом недостатков, как то: сложность синтеза участков-сшивок и ограниченный выход готового продукта, потенциальная возможность аллергических и токсических эффектов.

В настоящее время Европейским агентством по лекарственным средствам (EMA) или американским управлением по контролю за пищевыми продуктами и лекарствами (FDA) одобрены (и коммерчески доступны) несколько комплексных препаратов, как с полимерами, так и с антителами. В их числе Oncaspar (конъюгат полиэтиленгликоля и аспарагиназы), Neulasta (осуществляет доставку фактора роста гранулоцитов человека) «Kadcyla» (Кадсила, моноклональное антитело трастзумаб+ ингибитор микротрубочек DM-1) и Адцетрис (антитело IgG1 дипептидная сшивка, расщепляемая протеазами и ингибитор микротрубочек монометилауристатин). Учитывая значительное число исследований в данной области, комплексы полимеров и лекарств остаются в числе наиболее популярных подходов к решению проблемы доставки лекарств.

### 1.1.2 Дендримеры

Термин «дендример» происходит от греческого корня, означающего «дерево», и обозначает класс макромолекул, обладающих разветвленной структурой, напоминающей крону дерева. Типовой дендример состоит из трех различных топологических частей. Центральным ядром дендримера называют атом или группу атомов, образующие как минимум две одинаковые химические связи. [14] К ядру прикреплены слои, образованные полимерными ветвями разных поколений, они состоят из повторяющихся мономерных единиц. [15] Терминальные группы расположены на наибольшем удалении от центра, но они играют важнейшую роль в свойствах всей макромолекулы.

Впервые класс сверхразветвленных полимеров был описан в 1978 году под названием «каскадных полимеров» Буляйером, Венером и Фёгтле [16]. Помимо предложенного ими названия и термина «дендримеры», этот класс соединений также называется «арборолы» (arboroles). Дональд Томалия исследовал первое семейство дендримеров на основе полиамидаминов [17] (в англоязычной литературе часто используется аббревиатура РАМАМ). Исследования 80-90-х годов XX века привели к открытию новых классов и методик синтеза дендримеров, но научный интерес к данной области не утихает и сегодня – в некоторых источниках дендримеры называют «полимерами XXI века». [18] Каскадные полимеры обладают рядом интересных свойств, которые могут быть преимуществом для их использования в качестве систем доставки лекарственных препаратов и иных биологически активных веществ, а также в биоинженерии и иных областях химической промышленности.

Как уже говорилось, молекула дендримера обладает ядром, ветвями (поколениями) и терминальными группами. Фокальной точкой [18] называется точка, от которой отходят более двух полимерных ветвей. Поколением дендримера называют число фокальных точек, если идти вдоль ветви от ядра к поверхности дендримера. Дендримеры небольшого, вплоть до второго, поколения, в сравнении с дендримерами более высоких поколений, обладают более асимметричной формой и более открытой структурой. Молекулы арборолов более высоких, начиная с четвертого, поколений, принимают форму глобулы. Периферические ветви дендримеров, становясь плотно упакованными, образуют мембраноподобную структуру; при достижении критического состояния разветвления, макромолекула дендримера перестает расти из-за недостатка места для новых боковых ветвей; в литературе этот эффект носит название эффекта «звездного взрыва» [15]. В зависимости от поколения дендримера, размер его макромолекулы может варьировать от 1 нм (для дендримера нулевого поколения) до 13,5 нм (для дендримера десятого поколения) [14].

Семейство полиаминоамидных дендримеров (РАМАМ) наиболее хорошо изучено и охарактеризовано, поскольку это первый класс дендримеров, ко-

торый был открыт и коммерциализован [19]. Существуют и другие семейства дендримеров, например PAMAMOS (сочетание PAMAM-дендримеров с органическим силиконом), PPI (дендримеры на основе полипропилениминов) [20], хиральные дендримеры [21], жидкокристаллические дендримеры, текто-дендримеры, гибридные дендримеры [22], мицеллярные и амфифильные дендримеры; пептидные дендримеры [23], а также дендримеры Фретчета [24] [25].

Благодаря своему высокому молекулярному весу и разветвленной структуре, дендримеры являются наилучшим классом соединений, биомиметическим для белков [14]. Ряд дендримеров обладает схожими размерами и формой с инсулином (3 нм), цитохромом С (4 нм) и гемоглобином (5,5 нм), соответственно, а также размерами, схожими с толщиной бислоистой мембраны живых клеток (5,5) или толщиной двойной спирали ДНК (2,4 нм) [14]. Глобулярные белки, обладающие четвертичной структурой, являются весьма химически хрупкими соединениями, восприимчивыми к денатурирующим воздействиям, например свету, температуре и рН. Уложенный белок, как правило, обладает плотно упакованной внутренней структурой и наружными доменами, весьма разнородными по гидрофобности, гидрофильности и своему функционалу. Напротив, дендримеры обладают твердой, образованной ковалентными связями, трехмерной структурой. Дендримеры имеют заполненное растворителем, внутреннее ядро-наноконтейнер и гомогенную, обладающую функциональными группами оболочку [14]. Важным преимуществом дендримеров в качестве носителей лекарств является способность контролировать их размер и структуру в широких пределах. При использовании каскадных полимеров для доставки лекарств, возможно две стратегии. Гидрофобные лекарства можно закапсулировать в полости внутреннего объема дендримеров. Кроме того, молекулы лекарств можно закрепить на поверхности дендримера, используя электростатические или же ковалентные связи с терминальными функциональными группами дендримера [26]. В сравнении с другими полимерами, терминальные группы дендримеров показывают большую химическую активность [25]. Дендримеры могут обеспечить регенерацию гидроксиапатита зубной эмали [27], использо-

ваться в терапии опухолей как в качестве ингибитора ангиогенеза [28], так и для доставки противоопухолевых препаратов [29, 30]. Имеется большое количество работ [26], в которых каскадные полимеры предлагается применять для доставки лекарств как внутривенно, так и орально, при кожном введении или для доставки лекарств в глаза. Помимо этого, системы на основе дендримеров могут быть использованы в качестве векторов для доставки ДНК [31], для создания новых вакцин [32] или же в качестве МРТ-контрастирующих веществ [33]. Недостатком дендримеров является их цитотоксичность, которая может выступать значительным побочным эффектом. Было показано, что катионные РАММ дендримеры седьмого поколения, взаимодействуя с билипидным слоем, приводят к образованию в нем пор диаметром от 15 и до 40 нм [34], что, в свою очередь, приводит к гибели клеток [35]. Токсические свойства каскадных полимеров зависят от поколения и размеров макромолекулы, формы ее ветвей, терминальных групп и концентрации макромолекул. Многочисленные исследования показывают, что дендримеры с катионными группами на поверхности обладают значительно большей цитотоксичностью, нежели дендримеры с анионными группами или ПЭГилованные дендримеры [36].

### **1.1.3 Полимерные микро - и наночастицы (микросферы и наносферы)**

Помимо уже упоминавшихся полимер-лекарственных конъюгатов и дендримеров, еще одним подходом, основанным на использовании полимеров для доставки лекарственных препаратов, являются полимерные микро- и наночастицы. Итак, твердые (не обязательно полимерные) частицы, имеющие размеры от 1 мкм до 1000 мкм, называют микрочастицами [37], а частицы с размером менее 1 мкм относят к наночастицам. Для рассматриваемых в настоящей работе целей доставки лекарственных препаратов, терапевтическое вещество должно быть равномерно распределено в полимерном матриксе микро/наночастицы или же быть закапсулированным внутри. В первом случае такие частицы относят к микросферам или наносферам, во втором – к микро- или нано-

капсулам [38]. В 1974 году была опубликована одна из первых работ, в которой предлагается использовать микросферы альбумина [39] для доставки противо-ракового препарата меркаптопурина; примерно в это же время начинают появляться работы с использованием полимерных наночастиц в качестве систем доставки лекарственных препаратов [40].

Значительное количество полимеров способно к образованию микросфер и наносфер, которые потенциально могут быть использованы для включения в них терапевтических молекул с целью их адресной доставки и управляемого высвобождения; однако для биомедицинских применений подходят только нетоксичные и биосовместимые полимеры, не вызывающие значительной воспалительной реакции. [41] Для данных целей следует подбирать преимущественно биоразлагаемые полимеры; при этом продукты распада так же должны обладать свойствами нетоксичности и биосовместимости. В качестве материала для микро- и наносфер могут быть использованы как природные, так и синтетические полимеры. Природные полимеры обычно гидрофильны; синтетические полимеры гидрофильны по своей природе [42], кроме того, они, как правило, позволяют получать наночастицы с лучшей воспроизводимостью характеристик, нежели наночастицы на основе натуральных полимеров [38]. Природными полимерами, используемыми для синтеза наносфер, являются белки (например желатин, альбумин, лецитин, леугмин и вицилин) и полисахариды (альгинат, декстран, хитозан и пуллулан). К наиболее часто применяемым синтетическим полимерам относят биоразлагаемые синтетические полимеры, как то: полилактид (ПЛА, PLA), полигликолид (ПГА, PGA), поли-D,L-лактид-гликолид (PLGA). Реже, как правило, для кожной и подкожной доставки лекарств используются не биоразлагаемые полимеры, например полиакрилат [43]. Выбор конкретного полимера для наносфер и микросфер зависит от применяемого лекарственного препарата, его профиля высвобождения. Морфологию, форму и размеры частиц можно в широких пределах варьировать, используя для этого различные методики синтеза, которые можно разделить на две основные большие группы: синтезы «сверху вниз» и «снизу вверх». В первом случае

уже готовые частицы полимера уменьшают до микро-, или, если потребуется, нано-размеров (например методики эмульсификации, экструзии), во втором случае добиваются формирования полимерных частиц требуемых размеров в существующем растворе мономеров (коацервация, нанопреципитация и инклюзивная комплексация). Как правило, именно методики снизу вверх, позволяют более точно управлять размером и формой образующихся частиц. [41].

Использование микросфер и наносфер с целью доставки лекарственных средств обладает рядом преимуществ, как то: соответствующим подбором полимера можно добиться продолжительного поддержания оптимальной терапевтической концентрации в необходимом месте, в отличие от липосом, полимерные частицы обладают значительной стабильностью, как при хранении, так и в биологических растворах, кроме того, они хорошо приспособлены для масштабного производства. Таким образом, наносферы и микросферы являются оптимальной системой доставки для случаев, когда требуется не мгновенное высвобождение лекарства, а поддержание определенной его концентрации на относительно постоянном уровне в течение промежутка времени. Для ряда применений предпочтительным выбором являются именно наносферы, поскольку они легче проникают внутрь мельчайших кровеносных капилляров (3-5 мкм) и клеток. Недостатками микросфер и наносфер являются склонность к образованию кластеров, что может нарушить предполагаемую методику доставки и высвобождения лекарства. Характерная для наноразмерных частиц значительная граничная область частицы может привести к некачественной загрузке лекарственной молекулы или ее повреждению. Проблемой так же может являться попадание микросфер или наносфер с загруженным лекарством в периферический кровоток и связанные с этим побочные эффекты. [38]

Благодаря перечисленным достоинствам, наряду с липосомами, полимерные микрочастицы и наночастицы остаются весьма популярной концепцией для разработки перспективных систем доставки лекарств. Сообщается об эффективной загрузке в наносферы таких веществ как ретинол (витамин А) и Ацикловир (противовирусный препарат) [44], кверцетин (антиоксидант) а так

же плазмидная ДНК и антисенсовые олигонуклеотиды [43]. Коммерчески доступный препарат «Абраксан» представляет собой противоопухолевый препарат паклитаксел, загруженный в наночастицы на основе альбумина [45], помимо этого имеется несколько работ, в которых в наносферы были загружены такие противоопухолевые препараты как камптотецин и доксорубицин [41]. Поскольку загрузка препаратов в наносферы позволяет, в том числе, преодолевать гематоэнцефалический барьер [45], значительные перспективы связаны с применением подобной методики для создания новых средств терапии нейродегенеративных заболеваний и иных болезней мозга [41].

#### **1.1.4 Гидрогели**

Еще одним классом биоматериалов, обладающих широкими перспективами биомедицинского применения (в т.ч. для доставки лекарств) являются т.н. гидрогели. Гидрогель представляет собой трехмерную, сетеподобную полимерную структуру, обладающую большим количеством гидрофильных групп, в которой полимерные цепи «сшиты» между собой, как правило, ковалентными связями [46]. Ключевой особенностью гидрогелей является способность к поглощению и удержанию значительного объема воды, при этом сам гидрогель не растворяется [47].

Впервые термин «гидрогель» был введен в конце XIX века (ориентировочно – 1893-1894 год) [48]. Первые работы, в которых гидрогели получают биомедицинское применение, относятся к 50-60тым годам XX века: чешские ученые Вихтерле и Лим исследуют полигидроксиметакрилат (polyHEMA) в качестве материала для биомедицинского применения [49]. Именно Вихтерле принято считать отцом современных мягких контактных линз, основой для которых послужил гидрогель [50]. Помимо контактных линз, гидрогели получили использование в клинической практике и экспериментальной медицине для широкого ряда применений, как то: тканевая инженерия и регенеративная медицина [51], диагностика [52], клеточная иммобилизация [53], разделение биомолекул или клеток [54] а так же в качестве барьерных материалов для регуля-

ции биологической адгезии [55]. Уникальные свойства гидрогелей обуславливают интерес к ним в контексте доставки и управляемого высвобождения лекарственных препаратов.

Для создания гидрогелей могут быть применены натуральные (хитозан, гиалуроновая кислота, каррагинан, альгиновая кислота, коллаген) или синтетические (полилактид (PLA), полиэтиленгликоль (PEG), поли-D,L-лактид-когликоид (PLGA), поливиниловый спирт (PVA) или поликапролактон (PCL)) полимеры. Отдельно следует отметить так называемые полусинтетические полимеры – группу производных целлюлозы, к которым относятся карбоксиметилцеллюлоза (СМС), гидроксиэтилцеллюлоза (НЕС), метилцеллюлоза (МС) и другие. Все перечисленные полимеры являются биосовместимыми, а кроме того, биоразлагаемыми, за исключением PEG. Сообщается о построении гидрогеля на основе ДНК для иммунотерапии рака [56]. Сшивание полимерных цепей в матричную структуру, образующую гидрогель, может осуществляться путем образования ковалентных связей или же путем физических и физико-химических взаимодействий, как то: гидрофобные, электростатические взаимодействия, образование водородных связей или стереокомплексация. Преимуществом физических и физико-химических способов образования гидрогелей является отсутствие необходимости в химической модификации полимерных цепей и использования дополнительных, связующих химических агентов, что допускает образование гидрогеля *in vivo*. Тем не менее, данные методики обладают значительным недостатком, в сравнении с ковалентным связыванием: они не позволяют тонким образом настраивать такие параметры, как время гелеобразования и деградации, размер пор гидрогеля, или его химическая функционализация [57]. Гидрогели представляют собой пористые полимерные матрицы, способные поддерживать высвобождение лекарственных препаратов в течение продолжительного периода времени. Высвобождение лекарства из матрицы гидрогеля-носителя может осуществляться путем диффузии, набухания гидрогеля или же под воздействием химического или иного активирующего воздействия. Гидрогели могут служить основой для резервуарных систем (в которых

ядро, богатое молекулами лекарства, окружено оболочкой гидрогеля) или матричных систем (пористый гидрогель служит матрицей для молекул активного вещества). С помощью гидрогелей можно создавать импланты, обеспечивающие длительное высвобождение требуемого препарата, например инсулина [58], противораковых препаратов [59] и иных биологически активных веществ. Недостатком имплантируемых систем, которые могут быть выполнены в виде дисков или цилиндров [56], является необходимость хирургического вмешательства с последующей возможностью попадания инфекции. Предлагаются гидрогели, вводимые посредством инъекции, лишенные данных недостатков; тем не менее, при введении предварительно полимеризованной системы на основе гидрогеля посредством шприца, могут возникнуть трудности [57]. Для облегчения введения гидрогелей, можно диспергировать гидрогель до состояния наночастиц [60]. Для гидрогелей, сшивки в которых образуются под воздействием УФ-излучения, существует и другой способ, облегчающий доставку: возможно образование гидрогеля под воздействием ультрафиолета *in vivo*, непосредственно в организме пациента. [57] Гидрогель может использоваться для создания облегчающих заживление ран перевязочных материалов, выделяющих лекарства. [56, 61] Доставка лекарств в офтальмологии традиционно является нишей, занимаемой гидрогелями [56]; гидрогели могут быть использованы как в качестве наночастиц, содержащихся в глазных каплях, так и в виде содержащих лекарство контактных линз [62]. Гидрогели обладают и другими недостатками, например проблемами с включением в гидрогель гидрофобных лекарств, потенциальной токсичностью некоторых химических соединений, используемых для образования сшивок, и недостаточной механической прочностью некоторых гидрогелей [59]. Тем не менее, существуют подходы, позволяющие обходить ряд вышеперечисленных недостатков; например, сообщается об использовании гидрогеля для доставки даже столь гидрофобного соединения как куркумин [63]. По состоянию на 2019 год коммерчески доступны и одобрены для клинических применений не менее пяти препаратов на основе гидроге-

лей, как то: «Серицин», «Гиалофем», «Декстенза», «Регранекс» и «мюГард» [56].

### **1.1.5 Полиплексы – комплексы с ДНК**

В настоящее время известно не менее 6000 заболеваний, обусловленных дефектами генетического материала. Практически единственным эффективным решением данной проблемы является генная терапия – введение наследственного материала в соматические клетки человека. Концепт генной терапии [64] был предложен в 1972 году Фридманом и Роблиным, ими же упоминается понятие «вектора» - средства, используемого для введения ДНК в соматические клетки пациента. Генная терапия может быть использована не только для лечения наследственных заболеваний, но и некоторых вирусных инфекций, а так же раковых опухолей [65]. Помимо генной терапии, доставку ДНК в клетки можно осуществить для генетической вакцинации [66] – введение в клетки модифицированного генетического материала заставляет клетки производить антиген, вызывая защитный иммунный ответ. Одним из невирусных векторов для доставки ДНК являются полиплексы [67] – комплексы полимеров и ДНК (термин «полиплекс» является сокращением от «полимерный комплекс»). Итак, полиплексами называют полимерные системы, содержащие уплотненный, и/или в комплексе ген, или же молекулу иРНК. Полиплексы образуются за счет электростатических взаимодействий между катионными группами полимера и отрицательными группами нуклеиновых кислот [68]. Таким образом, катионные полимеры скрывают отрицательный заряд молекулы ДНК и обеспечивают конденсацию генов в небольшие молекулярные структуры; помимо того, к поликатионам можно прикрепить лиганды, обеспечивающие направленность доставки ДНК. Для этого могут быть использованы такие полимеры как поли- $\epsilon$ -лактид, природные полисахариды, например хитозан и пектин с химически закрепленными олигоаминами. Но наиболее распространенными полимерами, применяемыми для полиплексов, являются полиамины, имеющие положительный заряд

при физиологических условиях [65]. Наиболее часто встречающимся для доставки ДНК полиамином является полиэтиленимин [69].

Полиплексы могут обеспечить направленность доставки генетического материала; полимеры защищают молекулы нуклеиновых кислот от ферментативной деградации, улучшают трансфекцию [68]. Невирусные системы доставки генов, включая полиплексы, с меньшей вероятностью вызывают иммунный ответ, нежели искусственные вирусы, в настоящее время являющиеся основным вектором для генной терапии [65]. Сообщается о разработке полиплекса, где молекула ДНК связана с противоопухолевыми препаратами – доксорубицином и цисплатином. Такой полиплекс показал значительное возрастание цитотоксичности *in vitro* в сравнении со свободными препаратами. Таким образом, представляется возможным создание комбинированных полиплексов, сочетающих в себе генную и лекарственную терапию, например для лечения онкологических заболеваний [70]. Разрабатывается так же и ДНК-вакцина на основе полиплексов, предназначенная для введения через кожу посредством растворимых микроигл [71].

Несмотря на ряд преимуществ по сравнению с искусственными вирусами, полиплексы не лишены недостатков. Как правило, большинство полиплексов не способно самостоятельно высвободить генетический материал в цитоплазму, требуя для этого дополнительных эндосомолитических агентов; лишь полиплексы на основе некоторых материалов, таких как хитозан, или полиэтиленимин, способны самостоятельно разрушать эндосомы [67]. Несмотря на продемонстрированную *in vitro* высокую эффективность трансфекции, большинство полиплексов демонстрируют высокую токсичность. Как правило, стабильные частицы полиплексов образуются при избытке катионного полимера, и, вообще говоря, демонстрируют значительный положительный заряд. Введение подобных полиплексов в кровь приводило к образованию агрегатов с отрицательно заряженными компонентами крови, эмболии легких и смерти подопытного животного. Положительный заряд полиплексов ухудшает распределение и значительно снижает эффективность полиплексов для доставки генов *in*

vivo. Способами обойти подобные недостатки полиплексов являются применение PEG для покрытия образующихся частиц комплекса, хроматографическая очистка полиплексов или же образование полиплексов на основе нейтральных полимеров, не обладающих катионными свойствами. Комплексы с нейтральными полимерами могут образовываться за счет временных положительных зарядов и дисульфидных связей между цепями полимера, обеспечивающими физическое удержание молекулы ДНК в комплексе [69].

### **1.1.6 Системы доставки лекарств на основе вирусов**

Возвращаясь к геномной терапии, одним из первых «векторов», предложенных для доставки ДНК в клетки, являлись именно модифицированные вирусы. По состоянию на 2018 год, 70% новых работ, посвященных генной терапии, использовали именно вирусные векторы. Несмотря на перспективы применения невирусных носителей для доставки ДНК, вирусные векторы остаются актуальными в этой области [72]. Помимо ставшего классическим применения в доставке ДНК, вирусы могут быть использованы для доставки ряда препаратов, например противоопухолевых (доксорубицин, профлавин, катепсин-б) и антибактериальных (хлорамфеникол) [73]. Вирусные частицы обладают точными размерами, находящимися в нанометровой области: порядка десятков или сотен нанометров. Поверхностные свойства вирусов могут быть отрегулированы как при помощи химических, так и при помощи физических подходов, без нарушения целостности вирусной частицы; кроме того, инфицируя клетки, вирусы можно производить в больших количествах. Недостатком вирусных частиц является их потенциальная опасность, ограничивающая их биомедицинское применение. Чаще всего для доставки лекарств предлагается использовать бактериофаги или растительные вирусы, однако отмечено, что и они могут внедрять свою ДНК в животные клетки, поэтому использование вирусных капсидов для доставки лекарств требует тщательной очистки вирусной частицы от ДНК.

### 1.1.7 Системы доставки лекарств на основе липидных структур: липосомы и мицеллы.

Крупная разнородная группа биологических соединений, нерастворимых в воде носит название липидов [74]. Характерным свойством липидов является амфифильность: то есть молекула обладает как гидрофильным (как правило, полярным), так и гидрофобным (как правило, неполярным) фрагментом. Амфифильные соединения агрегируют в водных растворах, образуя ряд структур, как то: бислои, мицеллы, обращенные мицеллы, везикулы. Показать, какие структуры будут преимущественно образовываться в растворе теми или иными молекулами может так называемый параметр упаковки. Он вычисляется по формуле  $p=v/S_0l$ , где  $v$ - молекулярный объем гидрофобной (например, углеводородной) части амфифильной молекулы,  $S_0$  - оптимальная площадь поверхности, занимаемой молекулой на гидрофобной поверхности раздела, а  $l$  - максимальная длина гидрофобной (алкильной) цепи. При значении параметра упаковки менее  $1/3$ , преимущественно образуются мицеллы сферической формы. Значениям параметра упаковки в диапазоне от  $1/3$  до  $1/2$  соответствуют глобулярные или цилиндрические мицеллы. Стабильный бислой образуется при значениях параметра упаковки от  $1/2$  до 1. Конфигурации амфифильных молекул, принимаемые ими в бислоях, можно упрощенно аппроксимировать конусами, усеченными конусами или же цилиндрами; при этом, рассматривая задачу об их плотной упаковке, можно упрощенно предположить, какие структуры будут образовываться ими в растворах. В значительной мере поведение амфифильных молекул определяется температурой раствора и концентрациями растворяемой амфифильной молекулы и растворителя [75]. Примеры структур, которые могут возникать при самоорганизации амфифильных липидных молекул, приводятся на рисунке 1.

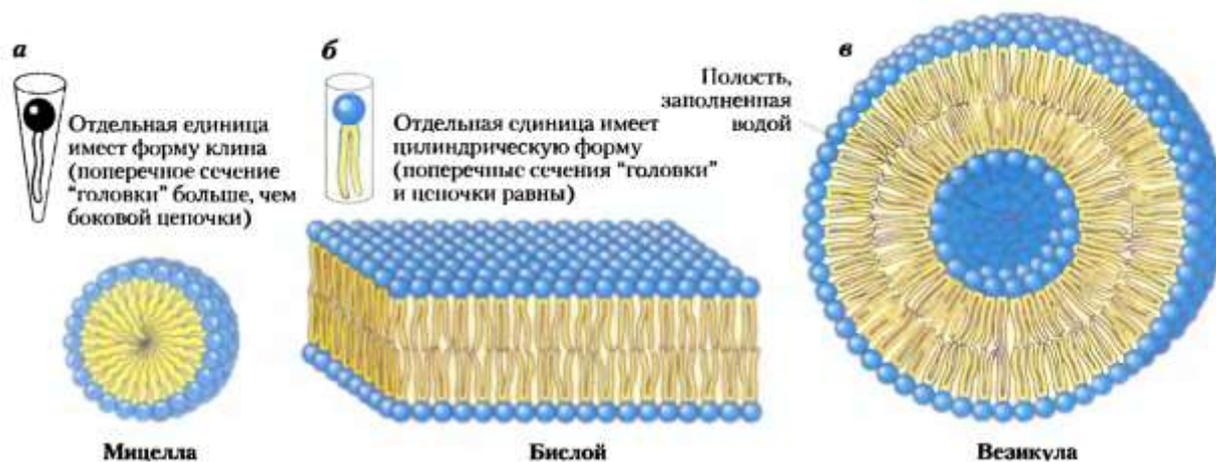


Рисунок 1. По материалам [74]. А) гидрофобные цепи собираются в центре практически безводной сферы. Конфигурация молекулы соответствует конус. Б) Гидрофобные ацильные цепи липидной молекулы защищены от взаимодействия с водой. Конфигурация молекулы представляет собой цилиндр.

Липидные мицеллы, как правило, обладают небольшим, порядка 20 нм, размером, не обладают внутренним объемом, заполненным растворителем, и по этой причине практически не используются в качестве носителей лекарственных препаратов *in vivo*. В 1961 году английский ученый Алек Бэнгем обнаружил замкнутые липидные везикулы, используя метод ПЭМ [76]. Замкнутые везикулы, образованные липидным бислоем, получили название липосом. Размер липосом может лежать в диапазоне от 25 нм до 2,5 мкм. В зависимости от размеров и количества слоев, разделенных заполненным растворителем внутренним объемом, различают малые моноламеллярные липосомы (их размер лежит в диапазоне 25-100 нм) и большие моноламеллярные липосомы, размером более 100 нм. Кроме того, существуют мультиламеллярные (многослойные) липосомы, образованные не одним бислоем [77]. Для получения липосом можно использовать метод гидратации тонкой пленки, ультразвуковой метод, метод экструзии, метод растворения и удаления детергента, метод испарения с обращением фаз, а так же ряд других методов [78]. Широкий спектр существующих методов позволяет получать липосомы требуемых размеров, оптимальные для каждого конкретного применения. Основным структурным компонентом для получения липосом являются фосфолипиды, например электронейтральные фосфатидилхолин, фосфатидилэтаноламин, отрицательно заряженные фосфа-

тидилглицерол или фосфатидилсерин. Ряд положительно заряженных липидов может быть использован для доставки ДНК [77]. Заряженные липиды, содержащиеся в мембране липосом, повышают их стабильность, предотвращая возможность агрегации [79]. Поскольку липосомы построены из природных фосфолипидов, они являются практически нетоксичным носителем лекарственных препаратов, не вызывающим аллергических реакций [80]. Еще одним достоинством липосом является широкая возможность их функционализации (см Рисунок 2).

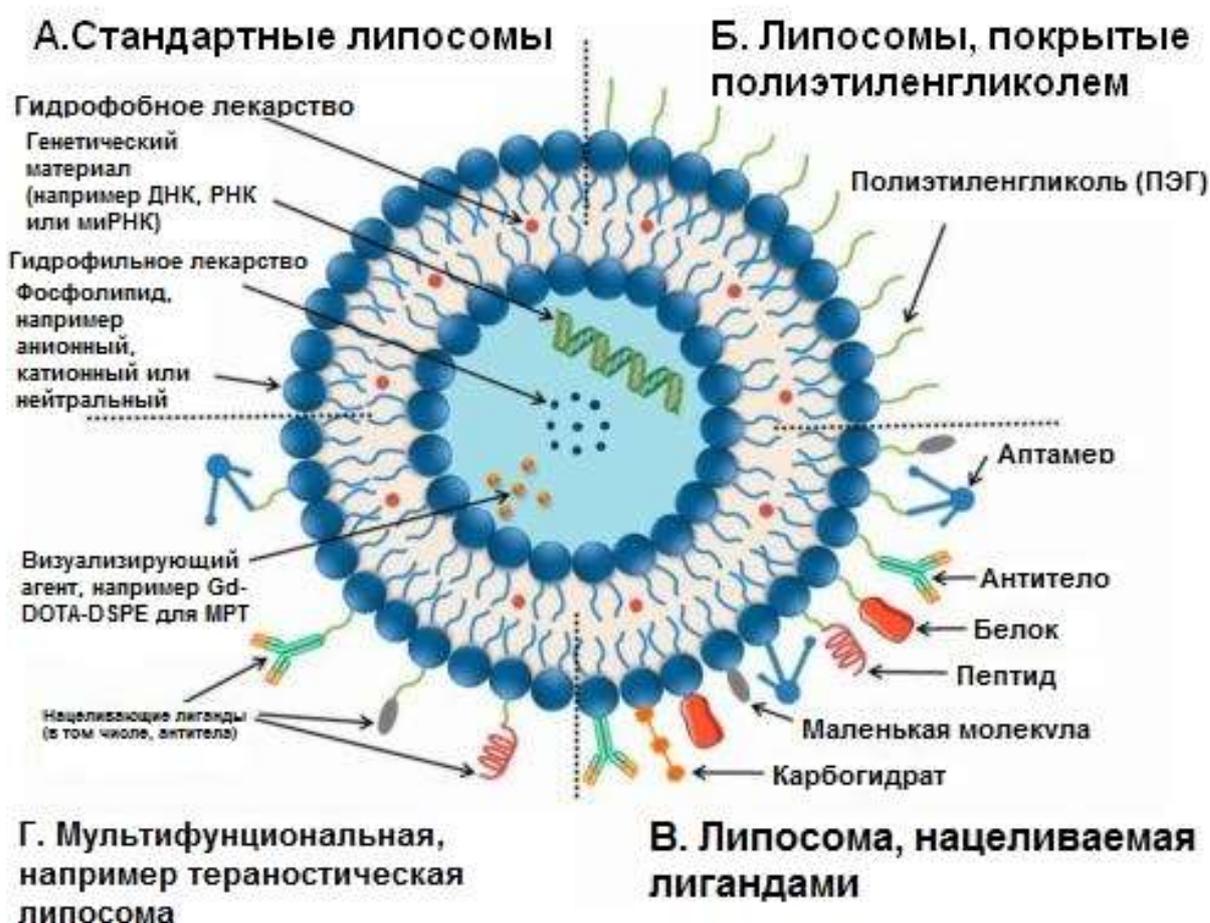


Рисунок 2. Липосомы и их функционализация. По материалам [77].

Использование таргетирующих лигандов, например антител, может обеспечить нацеленное воздействие заключенного в липосомы терапевтического агента на целевой очаг. Функционализация позволяет получить наноконструктивные липосомы, в том числе чувствительные к внешним активирующим воздействиям.

Липосомы могут использоваться как для доставки гидрофобных соединений (которые могут быть локализованы в гидрофобной области липидного бислоя), так и для доставки гидрофильных соединений, заключенных во внутренний объем липосомы. Попадая в организм, липосомы подвергаются опсонизации и фагоцитированию клетками ретикулоэндотелиальной системы. Используя конъюгацию с липосомами ряда полимеров, таких как декстран, альгинат, хитозан или же полиэтиленгликоль (ПЭГ), поливиниловый спирт и другие. Такие липосомы получают название скрытых, «стелс» липосом, поскольку они не подвергаются опсонизации и последующему фагоцитозу [81].

Благодаря описанным преимуществам, липосомы остаются одним из наиболее популярных выборов исследователей среди систем доставки лекарств. Так, наибольшее количество одобренных для клинического использования препаратов, в которых действующее вещество заключено внутрь наноразмерных формирований, занимают именно препараты на основе липосом [81]. Липосомы могут быть использованы для доставки противоопухолевых и антибактериальных препаратов, нуклеиновых кислот, контрастных агентов, ферментов, гормонов и ряда других соединений [82]; для создания вакцин.

Основным недостатком препаратов на основе липосом является их невысокая стабильность, включающая в себя физическую, химическую и коллоидную стабильность. Стабильность липосом находится в прямой зависимости от липидного состава, образующего бислой [77]. Американское управление по надзору за качеством пищи и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) требует от коммерчески доступных липосомальных препаратов стабильности в течение не менее двух лет [83]. Стабильность липосом можно повысить подбором липидного состава и дополнительной функционализацией полимерами. Для стабилизации липосомальных препаратов могут быть применены такие методики, как лиофилизация, высушивание спреями и метод суперкритической жидкости [77]. Подобные методы сопряжены с неизбежным повреждением части липосом с высвобождением заключенного в них действующего вещества. Кроме того, представляется возможным загружать лекарствен-

ные препараты в липосомы-носители непосредственно перед их введением в организм пациента.

### **1.1.8 Амфифильные полимеры и блок-сополимеры для доставки лекарств**

Соединения, имеющие как сольвофильные, так и сольвофобные домены, носят название амфифильных; как правило, понятие амфифильности определяется для воды и органического растворителя, однако возможно подобное поведение и для пары органических растворителей. Самым распространенным примером амфифильных соединений являются липиды, однако ряд полимерных молекул, в частности блок-сополимеры (рисунок 3), так же обладают амфифильными свойствами. Блок-сополимеры могут состоять из гидрофильного и гидрофобного домена, или же двух гидрофильных и одного гидрофобного домена. Следует отметить, что упомянутые молекулы блок-сополимеров так же являются амфифильными, как и молекулы природных липидов. По этой причине, соотношения, касающиеся параметра упаковки (см главу 1.1.7), оказываются верными и для блок-сополимеров. Другим важным параметром амфифильной молекулы, определяющим ее поведение в растворе [84, 85, 86], является так называемая гидрофильная фракция ( $f_{EO}$ ), коэффициент, показывающий, какую часть от массы всей молекулы составляет масса ее гидрофильного домена. При незначительной гидрофильной фракции ( $f_{EO} < 20\%$ ) самоорганизация таких молекул в растворе, как правило, приводит к образованию структур, подобных твердым частицам [84]. Если гидрофильная фракция составляет  $\sim 20\%$ - $42\%$ , то могут образовываться везикулярные структуры или же достаточно «жидкие» мицеллы. Предпочтительными для самосборки при  $f_{EO} \sim 40\%$ - $50\%$  являются цилиндрические мицеллы, а если  $f_{EO} > 50\%$ , то наиболее вероятным является образование сферических мицелл [84, 85]. При рассмотрении мицелл, так же важно учесть, что самосборка мицелл в растворе происходит при концентрации амфифильного вещества выше пороговой (так называемая критиче-

ская концентрация мицеллизации, СМС) а так же при температуре раствора ниже так называемой критической температуры мицеллизации (СМТ) [87].

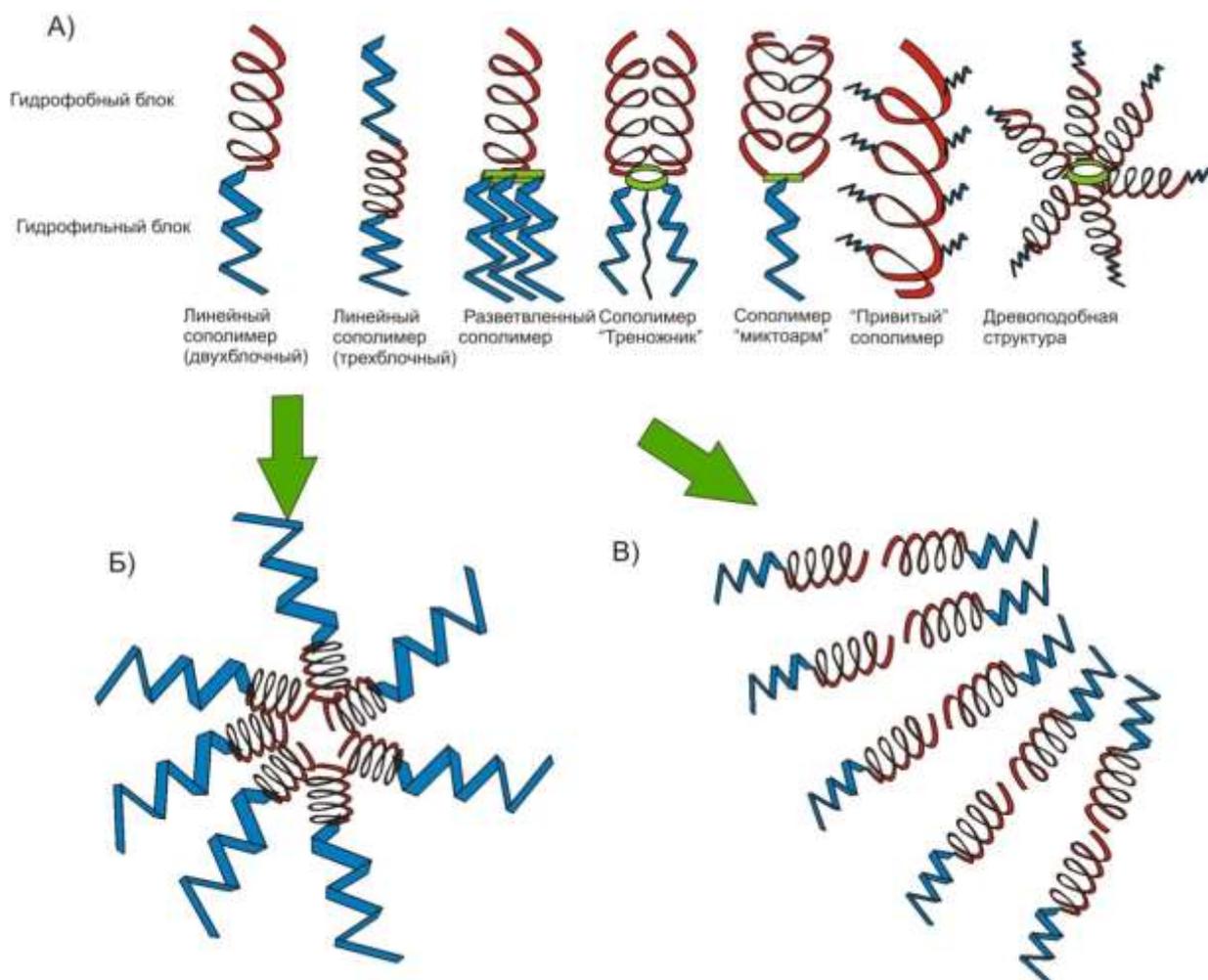


Рисунок 3. Блок-сополимеры, и их применения для доставки лекарственных препаратов. А) различные варианты структур блочных сополимеров (Схематическое изображение, по материалам [66]. Б) Образование полимерной мицеллы, В) образование полимеросомы (показан фрагмент бислойной мембраны, составленной из унимеров).

В качестве гидрофильных блоков для молекул блок-сополимеров могут выступать полиэтиленгликоль (PEG) и полиэтиленоксид (PEO), поливинилпирролидон (PVP) и поли-*n*-изопропилакриламид (pNIPAM) [88]. Куда более разнообразны применяемые для построения блок-сополимеров гидрофобные блоки. В качестве таковых могут быть использованы, например поли-*L*-аминокислоты, такие биоразлагаемые полиэфиры как полилактид, полигликолид, их ко-полимеры, поли- $\epsilon$ -капролактон, а также некоторые фосфолипиды или жирные кислоты с длинными цепями. Для построения трехблочных сополимеров могут быть использован полипропиленоксид (плюроники и полукса-

меры) [87]. При выборе конкретного гидрофобного домена следует исходить из конкретного лекарственного препарата, который будет применяться.

Популярными решениями для доставки лекарств, основанными на применении блок-сополимеров являются полимерные мицеллы или бислойные полимерные везикулы, носящие название полимеросом. Впервые использовать полимерные мицеллы в качестве системы, обеспечивающей доставку лекарственных препаратов, предлагалось Бадером и Рингсдорфом в 1984 году [89]. В 90-х годах XX века, была теоретически и экспериментально показана возможность получения бислойных везикул на основе блок-сополимеров [86]. Носители лекарств на основе блок-сополимеров обладают рядом значительных достоинств: так, мицеллы, обладая значительными гидрофобными внутренними областями, являются прекрасным носителем для гидрофобных лекарств, они обеспечивают стерическую защиту лекарственной молекулы и имеют значительное время циркуляции в кровотоке. В сравнении с классическими липосомами, образованными биолипидами, полимеросомы обладают значительной химической стабильностью, которую можно еще более усилить, путем образования поперечных сшивок между молекулами блок-сополимера. Достоинством полимеросом и полимерных мицелл являются широкие возможности их функционализации.

Полимеросомы и полимерные мицеллы обладают рядом достоинств, важных для практического применения в качестве носителя лекарств. Типичная мембрана липосом, образованных природными липидами составляет порядка 3-4 нм, в то время как блочные сополимеры образуют бислой, толщина которого может составлять 8-20 нм (в зависимости от молекулярного веса и показателя  $f$ ) [84]. Благодаря этому, полимеросомы и мицеллы обладают значительной стабильностью, превосходящей стабильность липосом. Стабильность мицелл и полимеросом можно дополнительно повысить путем ковалентной сшивки молекул блок-сополимеров, образующих частицу-носитель. Благодаря применению таких соединений как полиэтиленгликоль (ПЭГ) в блок-сополимерах, образующих полимеросомы или мицеллы, эти частицы-носители, как правило, не

подвергаются опсонизации и обладают свойством «скрытности» («stealth») [86]. В настоящее время на рынке имеется прошедший клинические испытания препарат «Genexol-PM» на основе противоракового препарата пакситаксела, еще ряд препаратов находится в стадии клинических испытаний [88, 90]. Исследовались полимеросомы с загруженными в них противоопухолевыми препаратами, а также гемоглобином (для создания искусственного переносчика кислорода) [91].

Клиническое применение полимеросом и полимерных мицелл на основе блок-сополимеров ограничивается рядом недостатков. Мицеллы не имеют внутреннего объема, а потому представляется возможным использовать их для доставки только гидрофобных препаратов. Значительная стабильность мицелл и полимеросом может послужить препятствием к высвобождению действующего вещества. Ряд белков, которые легко локализуются в мембранах липосом, не удастся локализовать в полимерных мембранах полимеросом ввиду значительной толщины последних. Кроме того, полимеросомы могут содержать остаточные количества токсичных органических растворителей, а их значительное время циркуляции в кровотоке может быть сопряжено с аллергическими реакциями и иными побочными эффектами. Потенциальным способом обойти эти недостатки полимеросом является использование методик их получения, в которых не применяется органический растворитель, и создание комбинированных, полимерно-липидных систем (липо-полимеросом), позволяющих объединить достоинства липосом и полимеросом [92].

### **1.1.9 Полиэлектролитные и нанокompозитные микрокапсулы**

В 1991 году Дехером и Хонгом был предложен метод сборки пленок, упорядоченных на молекулярном уровне, путем последовательной адсорбции разноименно заряженных полиионов [93]. Этот метод является одним из основных методов современной нанотехнологии. Для образования полиэлектролитных пленок, заряженную подложку помещают в раствор, содержащий ионы противоположного знака, например, положительно заряженная подложка и рас-

твор полианионов. При этом ионы осаждаются на подложке, вплоть до момента насыщения, приводящего к перезарядке поверхности. Формирующийся слой, как правило, имеет толщину вплоть до 1 нм. Затем подложка промывается водой и помещается в раствор, содержащий ионы противоположного знака, нежели те, что уже были осаждены на подложке (например, для рассмотренного нами случая, поликатионы). При этом разноименно заряженные группы образуют связи, и снова происходит перезарядка поверхности. Процесс можно повторять большое число раз, тем самым позволяя варьировать толщину формирующегося полиэлектролитного слоя в широких пределах [93, 94]. Образование полиэлектролитного слоя в основном происходит за счет электростатических взаимодействий, куда реже - за счет водородных связей [95], или даже молекулярного узнавания [96]. Ковалентные связи могут быть использованы для дополнительной стабилизации полиэлектролитных слоев.

В конце 90-х годов группа под руководством отечественного ученого Глеба Сухорукова одной из первых предлагает методику [97], в которой вместо плоских заряженных подложек использовались заряженные частицы полистирольного латекса. В той же работе исследовались две методики образования полиэлектролитных пленок на заряженных частицах, называемых ядрами. На каждом этапе можно добавить количество полиэлектролита, необходимое для насыщения адсорбции, или же добавить полиэлектролит с избытком, а после насыщения адсорбции, удалить лишние молекулы полиэлектролита при помощи фильтрации или центрифугирования. В той же [97] работе было показано, что во втором случае образуется меньшее количество агрегатов. С этого момента научные группы по всему миру начинают активное исследование новых перспективных объектов – полиэлектролитных капсул [94, 98].

В качестве ядер для полиэлектролитных капсул могут выступать меламинформальдегидный латекс, полистирол или же альгинат, карбонат кальция, оксиды кремния [97]. Использование латексных ядер или ядер на основе полистирола сопряжено с дополнительной токсичностью, однако они обладают хорошей монодисперсностью по размеру. Для доставки гидрофобных веществ, в

качестве ядра можно использовать капельки масла, стабилизированные амфифильным эмульгатором [99]. Используемое ядро влияет не только на размер образуемой капсулы, но и на толщину оболочки.

Для построения мультислойных пленок могут быть использованы такие полиионы, как поливинил- и полистирол- сульфонаты (PVS и PSS) и даже ДНК; в качестве поликатионов – полиаллиламин (PAA), полиэтиленимин (PEI), полидиметилдиаллиламоний (PEI) [98] а так же широкий ряд других соединений.

Предлагается использовать полиэлектролитные капсулы для доставки противоопухолевых лекарств к раковым клеткам или же для доставки таких биологически активных веществ как ДНК, РНК, белков в требуемые места. Сообщается об успешном использовании полиэлектролитных капсул для доставки тромболитических агентов, а также фактора свертывания 8 [100]. Полиэлектролитные капсулы обладают широкими возможностями функционализации, имеют перспективы применения не только в качестве средства доставки лекарств, но и в диагностических целях, например в качестве МРТ - контрастирующего агента, а также для осуществления манипуляций клетками при помощи внешнего поля. Основным недостатком полиэлектролитных послойно собираемых капсул является их неспособность удерживать небольшие, массой  $< 1$  кДа, молекулы [94, 98], для которых полиэлектролитная оболочка капсулы не служит препятствием. Для удержания малых молекул внутри полиэлектролитных капсул существует ряд подходов, например включение липидов в состав оболочек [101] а так же значительный, более одного микрометра, размер [100]. Кроме того, в некоторых методиках получения полиэлектролитных капсул используются токсичные реагенты, использование которых сопряжено с возможностью возникновения побочных эффектов.

### 1.1.10 Комплексы коллоидных неорганических наночастиц и молекул лекарств

Наночастицами называют частицы, размер которых менее 1 мкм [102]. Неорганические наночастицы демонстрируют как характерные для макроразмерных материалов свойства, так и некоторые свойства, характерные для отдельных молекул. В сравнении с макроразмерными частицами, наночастицы обладают значительным количеством расположенных на поверхности частицы атомов, что обуславливает ряд интересных физических свойств, которые могут быть полезны для биомедицинских применений, в том числе для доставки лекарств [103]. Значительный интерес в данном контексте вызывают наночастицы благородных металлов: золота и серебра, реже – платины, магнитные наночастицы, чаще всего магнетита ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) и маггемита ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), частицы оксида кремния, гидроксиапатита, а так же т.н. квантовые точки – полупроводниковые нанокристаллы [81]. Поверхностная модификация наночастиц может улучшать их стабильность, биосовместимость и практическую функциональность [104].

Золотые наночастицы могут иметь разнообразную форму, как то: сферическую, кубическую, стержневидную или форму звезды; их размеры могут варьировать от 1 и до 100 и более нанометров. При рассмотрении золотой наночастицы выделяют атомы ядра и поверхностные атомы, обладающие отрицательным зарядом. Благодаря последней особенности, наночастицы золота легко связываются с широким рядом органических и биологических молекул, как то: антибиотики, белки, нуклеиновые кислоты а так же ряд лигандов, обеспечивающих направленность воздействия. Для наночастиц золота характерно явление поверхностного плазмонного резонанса (SPR) [81], а коэффициент экстинкции может превышать типичные значения, характерные для органических красителей на пять порядков [103]. Биосовместимость и низкий уровень токсичности золотых наночастиц объясняются их значительной физико-химической и коллоидной стабильностью. В кровотоке коллоидная стабильность наночастиц золота снижается и, для того чтобы ее повысить, может быть использовано покрытие поверхности наночастиц, например PEG [81]. Лекарственные молекулы

могут быть сорбированы на поверхность золотых наночастиц или образовывать с ними ионные или ковалентные связи. Сообщается об улучшенном терапевтическом эффекте и эффективном внутриклеточном высвобождении для наночастиц золота, связанных с доксорубицином через рН – чувствительную «сшивку». Исследовались комплексы наночастиц золота и противоопухолевого препарата метатрексата. Золотые наночастицы могут быть использованы для доставки нуклеиновых кислот (защищая их от ферментативной деградации), белков и вакцин; системы на основе золотых наночастиц восприимчивы к широкому спектру активирующих воздействий [105].

В настоящее время получен широкий спектр магнитных наночастиц, как на основе чистых металлов Co, Fe, Ni, так и на основе ряда их соединений, например  $MgFe_2O_4$ ,  $CoFe_2O_4$ ,  $MnFe_2O_4$ ,  $LiFe_5O_8$ , а также CoPt, FePt, MnAl,  $SmCo_5$ ,  $Fe_{14}Nd_2B$  [106]. Чаще всего используются частицы на основе оксидов ввиду их значительной химической устойчивости в сравнении с чистыми металлами. Использование кобальта и никеля для биомедицинских применений ограничивается их значительной токсичностью [107], а наибольший интерес для наномедицинских применений представляют наночастицы магнетита ( $Fe_3O_4$ ) и  $\gamma$ -маггемита ( $Fe_2O_3$ ). При размере ниже критического (обычно 10-20 нм), такие частицы проявляют супер-парамагнитные свойства: частица становится равномерно намагничена по всему объему, во внешнем поле она ведет себя как парамагнетик, но со значительно большим значением магнитной восприимчивости, нежели у обычных парамагнетиков; однако в отсутствии внешнего поля, супер-парамагнитные частицы не демонстрируют остаточной намагниченности [81]. В англоязычной научной литературе для обозначения таких частиц часто используется аббревиатура SPION (Super Paramagnetic Iron Oxides Nanoparticles). Функционализация поверхности магнитных наночастиц предотвращает их агрегацию [81], позволяет связывать на поверхности лекарства и лиганды, обеспечивающие направленность воздействия, защищает от опсонизации и захвата макрофагами [106]. Для покрытия парамагнитных наночастиц могут быть использованы такие соединения как декстран, полиэтиленгли-

коль (PEG), крахмал, поливинилэтанол, гепарин, высшие карбоновые кислоты [106]. Модифицированные наночастицы могут связывать противораковые лекарства, белки, короткие пептиды и антитела; под действием внешнего градиентного магнитного поля они могут сосредотачиваться в требуемом участке организма [81]. Помимо доставки лекарств, магнитные наночастицы могут быть использованы в качестве МРТ-контрастных агентов, для иммуномагнитного отделения клеток и терапии методом магнитной гипертермии [107]. Сообщается о экспериментах *in vitro* с культурой раковых клеток человека и противораковым антибиотиком метатрексатом, конъюгированным к магнитным наночастицам [108]. В экспериментах на кроликах сообщается об успешной локализации магнитных наночастиц, конъюгированных с доксорубицином в требуемом участке (левой почке) при помощи покрытых слоем золота магнитных имплантов [104]. Интерес к магнитным наночастицам в биомедицине неуклонно возрастает [107, 106], однако для широкого применения их в клинической практике, требуются методики, способные предотвратить возможные вмешательства таких частиц в обмен железа в организме, и окислительный стресс [81].

Флуоресцентные полупроводниковые (например, CdS, CdTe, или ZnS) нанокристаллы носят название квантовых точек. Особенностью квантовых точек является ограниченность движения носителей заряда по всем трем направлениям [109]. Для квантовых точек характерны узкий симметричный пик флуоресценции, широкая полоса возбуждения, высокая яркость флуоресценции и уникально высокая фотостабильность. Квантовая точка, как правило, состоит из небольшого (2-10 нм) полупроводникового ядра, например из CdSe, окруженного защитной оболочкой, например из золота или ZnS. Модификация систем доставки лекарств квантовыми точками позволяет с высокой точностью отследить их поведение *in vivo* и распределение носителя лекарства в организме [109, 110].

### 1.1.11 Металлорганические комплексы

Металлорганические комплексы (в англоязычной литературе Metal-Organic Frameworks, MOF, так же встречаются названия «металлорганические координационные полимеры» или «пористые координационные полимеры») — это трехмерные структуры, построенные из «узлов» - ионов или кластеров металлов и органических лигандов, образующих координационные связи. Такая структура имеет каналы, поры и полости, которые могут быть использованы для доставки лекарств. Одно из первых подобных соединений было получено в 1897 году Хофманом и Купертом [111] путем медленной диффузии бензола в аммиачный раствор  $Ni(CN)_2$ . Пик работ, посвященных разработке MOF, приходится на 90-е годы XX века [112]. Эти соединения изучались в качестве сорбента для газов, катализаторов, миниатюрных топливных элементов, молекулярной электроники и люминесцентных сенсоров [113]. Пористая структура обуславливает интерес к металлорганическим комплексам в контексте доставки биологически активных веществ, в т.ч., лекарств. Для этих целей могут быть использованы хиральные MOF, MOF на основе хрома, цинка, меди или марганца, MOF семейства MIL (Matériaux de l'Institut Lavoisier) и ряд других соединений данной структуры [113]. Существует три возможных стратегии использования металл-органических комплексов в качестве средств доставки лекарств: стратегия инкапсуляции (требуемое вещество загружается внутрь пористой структуры MOF), стратегия прямой сборки (вещество, которое необходимо доставить, само выступает в качестве лиганда, образующего координационные связи с металлическими узлами; для этого могут быть использованы такие противоопухолевые препараты как палмидронат, золедронат, метотрексат а так же ряд противоопухолевых препаратов на основе платины). Третьей возможной стратегией является пост-синтетическая стратегия, когда молекулы требуемого вещества связываются на поверхности уже сформированных наночастиц MOF требуемого размера, посредством координационных связей с металлическими узлами или же ковалентных связей с органическими «сшивками» [114]. Помимо противоопухолевых препаратов, возможности доставки которых с помощью

наночастиц MOF наиболее часто изучались, существуют работы с использованием MOF для доставки препаратов от аритмии, анальгетиков (ибупрофен), кофеина, люминесцентных красителей, ряда биомолекул (белки, ферменты, ДНК) и некоторых других соединений [113]. Несмотря на относительную новизну, системы доставки лекарств на основе MOF вызывают значительный практический и теоретический интерес, однако следует учесть такие важные для практического биомедицинского применения факторы как потенциальная токсичность используемых лигандов, и особенно металлических «узлов». Значительных усилий требует изучение функционализации наноразмерных MOF для увеличения времени циркуляции в кровотоке и достижения направленности доставки.

### **1.1.12 Мезопористые материалы (пористый SiO<sub>2</sub>)**

Пористые материалы, имеющие пустоты размером 2-50 нм носят название мезопористых материалов. Многие мезопористые материалы имеют в своем составе кремний или алюминий, существуют так же мезопористые оксиды ниобия, тантала и титана [115]. Впервые методики синтеза мезопористых материалов на основе кремния появляются в 70-х годах 20 века, но значительный научный интерес к ним возникает в конце 90-х, с появлением методики синтеза на подложке. В основном в контексте доставки лекарств имеют применение мезопористые материалы на основе кремния, но может применяться и гидроксипатит, а также некоторые другие материалы. Способность к адсорбции является свойством, позволяющим использовать мезопористые системы для доставки лекарств; поверхностная площадь пор и их диаметр определяют свойства адсорбции и высвобождения необходимых молекул [116]. Пористая структура мезопористых материалов облегчает доставку гидрофобных молекул; поскольку представляется возможным подобрать размер пор незначительно больше размера целевых молекул, это позволяет ограничить целевые молекулы и не позволить им кристаллизоваться. Исследовалась возможность доставки противоопухолевых, противовоспалительных препаратов, инсулина, нейрорепарантов, лекарств от болезни Паркинсона и широкого спектра других соединений [115].

Мезопористые материалы на основе кремния обладают такими достоинствами как универсальность, биосовместимость, биоразлагаемость, большая поверхностная площадь и объем пор, гомогенное распределение молекул лекарства внутри пор носителя и свободное распространение в организме [117]. Поверхностные силанольные группы допускают химическую функционализацию, обеспечивающую контроль над высвобождением лекарства, а так же восприимчивость к ряду управляющих воздействий [116], однако большое количество силанольных групп на поверхности таких частиц, взаимодействуя с фосфолипидами мембран эритроцитов, может приводить к гемолизу [117], поэтому использование таких материалов для создания новых средств доставки лекарственных препаратов требует химической модификации поверхности.

### **1.1.13 Керамические нанотрубки**

В 1826 году был открыт и описан алюмосиликатный минерал галлуазит (химическая формула:  $\text{Al}_2\text{Si}_2\text{O}_5(\text{OH})_4 \times n\text{H}_2\text{O}$ ), получивший название по имени открывшего его геолога [118]. По своему химическому составу галлуазит близок к каолину и представляет собой листы каолина, свернутые 15-20 раз так, что образуется трубчатая структура, своего рода «рулет»; по сравнению с каолином такая структура имеет большее количество воды в своем составе [119]. Внутренний диаметр таких трубчатых структур составляет порядка 15 нм, внешний – 40-60 нм, а длина может составлять от 0,4 до 1,5 мкм. Помимо рассмотренной трубчатой формы, встречаются так же сферические, плоские и короткие трубчатые структуры галлуазита, однако рассмотренная форма нанотрубки является наиболее распространенной [118]. Галлуазит является изолятором, устойчив к УФ-излучению и сохраняет форму при значительных температурах [118]; относительно легко образует коллоидные растворы в воде или полярных растворителях [119]. Внутренняя сторона таких наноструктур обладает положительным зарядом (на внутренней стороне слоя находится большое количество алюминия), а наружная – отрицательным (большое количество  $\text{SiO}_2$ ). Благодаря указанным свойствам, керамические нанотрубки галлуазита могут

быть использованы для доставки противоопухолевых или антибактериальных препаратов, летучих соединений, например некоторых масел, а так же крупных биомолекул, например ДНК или ферментов (исследовалась загрузка в нанотрубки таких соединений как краситель бриллиантовый зеленый, глицерин, для применений в косметике). Без функционализации керамические нанотрубочки обеспечивают высвобождение загруженного препарата в течение порядка 10 ч, но использованием полимерных материалов для «запечатывания» концов трубочек можно добиться высвобождения нагрузки в течение недель и месяцев. Керамические нанотрубочки могут быть использованы для доставки активных веществ в таких лекарственных формах как мази, спреи, перевязочные материалы и даже таблетки; помимо применений для доставки лекарств, нанотрубки галлуазита могут быть использованы в тканевой инженерии, в качестве подложек, костных имплантов или для создания нанопленок. Галлуазит является керамическим материалом, демонстрирующим высокую биосовместимость; исследования показывают, что при низких концентрациях нанотрубочки галлуазита не демонстрируют токсичности, а токсичность при концентрациях выше 5 мг/мл может быть обусловлена механическим повреждением клеток. Для широкого биомедицинского и биоинженерного применения следует изучить возможные долгосрочные токсические эффекты нанотрубочек галлуазита [118].

#### **1.1.14 Углеродные материалы (фуллерены, наноалмазы, нанотрубки, графен, углеродные квантовые точки, капсулы с углеродными нанотрубками)**

Углерод не только является основным химическим элементом, из которого построены все биомолекулы, но и способен образовывать ряд наноструктур, как то: фуллерены, углеродные нанотрубки, графен [120], нано-конусы<sup>1</sup>, нано-алмазы [121] и другие. Нано-конусы и углеродные нанотрубки могут

---

<sup>1</sup> Дословный перевод – «нано-рожки», имеются ввиду, например, структуры, подобные коническим вафельным рожкам мороженого.

быть использованы для загрузки лекарственными препаратами; ряд наномедицинских применений могут так же иметь фуллерены и наноалмазы.

Открытые в 1991 году углеродные нанотрубки представляют собой цилиндрические структуры наподобие графена, которые могут иметь один или несколько слоев, см. рисунок 4. Цилиндрическую структуру могут образовывать один или несколько слоев графена. Углеродные нанотрубочки демонстрируют прекрасную теплопроводность и электропроводность, механическую прочность; обладают значительной поверхностью и внутренним объемом. Диаметр нанотрубок может составлять от 0,4-2 нм для однослойных нанотрубочек и 2-100 нм для многослойных трубочек, в зависимости от методики синтеза [81]. Нанотрубки допускают две методики загрузки активного вещества: ковалентное связывание с двойными связями на поверхности или же загрузку во внутренний объем.

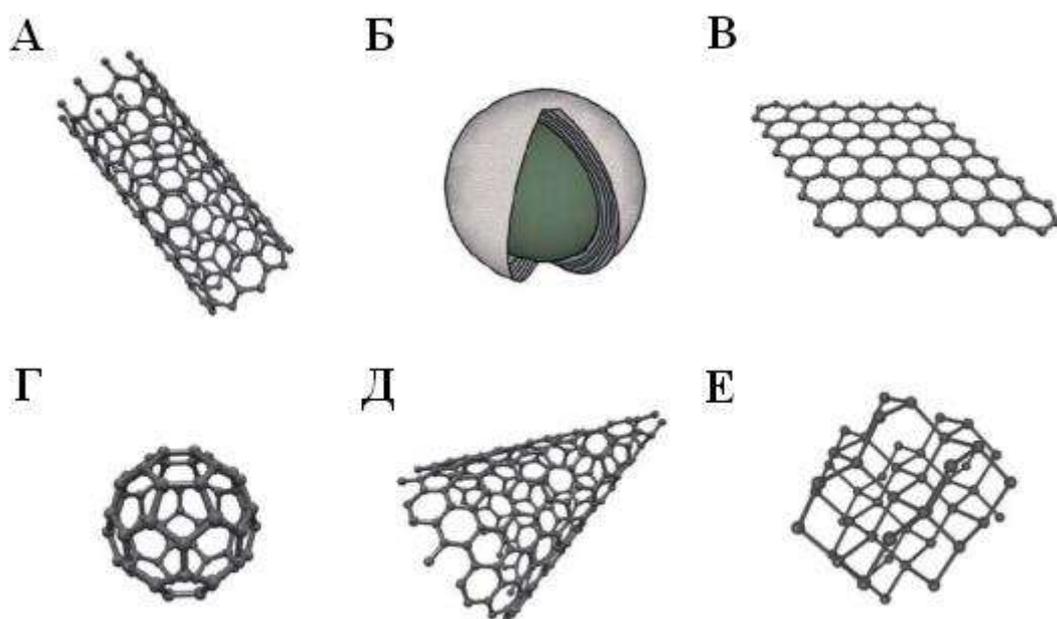


Рисунок 4. Углеродные наноструктуры. А - однослойные нанотрубки углерода, Б - "нано-луковица" - слои графита, окружающие частицу, В - слой графена, Г - фуллерен C<sub>60</sub>, Д - однослойный углеродный наноконус, Е - наноалмаз. По материалам [121]

Ряд методик позволяет обеспечить синтез углеродных нанотрубочек, наиболее популярной является методика химического парофазного осаждения [121]. Возможны два механизма попадания нанотрубок (и других углеродных наноматериалов) внутрь клеток: эндоцитоз или фагоцитоз и нанопроникновение, при котором происходит диффузия нанотрубочек через клеточную мем-

брану [120]. Средства доставки лекарственных препаратов на основе углеродных нанотрубочек исследовались с такими противоопухолевыми препаратами как доксорубин, метатрексат, пакситаксель и цисплатин [81]. Помимо того, углеродные нанотрубочки являются перспективным носителем для плазмидной ДНК, малых интерферирующих РНК, антисенсовых олигонуклеотидов и аптамеров. Функционализированные нанотрубочки являются перспективным терапевтическим материалом, обеспечивающим раннюю диагностику рака, а также фототермальную терапию путем поглощения света ближнего инфракрасного диапазона. Тем не менее, нанотрубочки обладают рядом значительных недостатков: без функционализации нанотрубочки гидрофобны по своей природе и агрегируют в растворе [120]. Кроме того, углеродные нанотрубочки не биodeградируемы и обладают цитотоксичностью [81], которая зависит в основном от размера нанотрубочек и их функционализации. Возможные механизмы токсичности углеродных нанотрубочек – повреждение ДНК; при больших концентрациях нанотрубочки так же могут вызывать патологические изменения в лизосомах и митохондриях [120]. Для практического использования нанотрубочек в качестве носителей биологически активных веществ требуются дополнительные исследования связанных токсических эффектов; необходимо так же добиться эффективной направленной доставки и управляемого высвобождения путем химической функционализации нанотрубочек.

## **1.2 Системы доставки лекарств, восприимчивые к внутренним активирующим воздействиям**

### **1.2.1 Системы доставки лекарств, восприимчивые к изменению рН**

Разумным подходом при создании новых, основанных на нанотехнологиях средств лекарственной терапии (в частности, терапии онкологических заболеваний), является создание средств доставки активных веществ, восприимчивых к ряду внутренних активирующих стимулов, как то: изменение рН, окислительно-восстановительные условия среды или ряд ферментативных реакций [122, 123].

Одной из характерных особенностей пролиферирующей раковой опухоли является высокий уровень гликолиза и накопление молочной кислоты. Благодаря этому, а также благодаря гипоксии и ряду метаболических нарушений, внеклеточный уровень рН в воспалившихся тканях опухоли составляет порядка 6,5 против значения 7,4, характерного для нормальных тканей. В ряде внутриклеточных органелл могут достигаться и еще более низкие значения рН, например  $\approx 6,4$  (комплекс Гольджи), 5-6 (эндосомы), 4-6 (лизосомы). [124] Основой для системы доставки лекарств, чувствительной к изменению рН, часто являются соединения, содержащие протонируемые группы, например аминокислоты, карбоксильные группы или имидазольные группы. При кислых значениях рН они могут приводить к дестабилизации носителя лекарства и высвобождению полезной нагрузки [122]. Примером могут служить мицеллы на основе рН чувствительных полимеров. Такие полимеры могут содержать в своей структуре кислые группы, (например, карбоксильные или сульфоновые) и основные группы (например, аминокислоты). При изменении рН такие соединения претерпевают конформационную перестройку, приводящую к диссоциации, дестабилизации, например разрушению или набуханию. Кроме того, для рН чувствительной доставки лекарств могут быть использованы соединения с кислото-лабильными связями. Так, орто-эфирная связь, ацеталь/кетальная связь и гидразонная связь могут разрушаться в кислых условиях, следовательно, если связать молекулу требуемого вещества с системой доставки лекарства посредством такой связи, она может высвободиться в кислых условиях. Кроме того, подобный подход, основанный на использовании лабильных в кислых условиях связей, применим для закрепления компонентов носителя лекарств, например молекул полиэтиленгликоля (ПЭГ), обеспечивающего стабильность носителя. Еще одним подходом к рН-чувствительной доставке лекарств могут служить системы доставки с обратным зарядом: отрицательно заряженные при нейтральных значениях рН, они меняют свой поверхностный заряд на положительный при понижении рН [125]. На основе выше перечисленных подходов, сообщалось о разработке рН- чувствительных носителей для таких лекарств как

адриамицин, доксорубицин, [122] куркумин [123]. Кроме того, сообщается о создании рН – чувствительных мицелл для доставки плазмидной ДНК [122].

### **1.2.2 Системы доставки лекарств, чувствительные к окислительно-восстановительным реакциям**

Важными соединениями-восстановителями в организме человека являются витамин С (Аскорбиновая кислота), витамин Е и глутатион [123]. Следует отметить, что для опухоли характерны концентрации глутатиона значительно большие, нежели в нормальных тканях, что обуславливает возможность создания систем доставки лекарств, использующих окислительно-восстановительные реакции как активирующий стимул. Популярным подходом для обеспечения чувствительности к окислительно-восстановительным реакциям является использование дисульфидных связей, которые в восстановительной среде восстанавливаются, разрушая носитель лекарства и увеличивая цитотоксические свойства препарата [122]. Основываясь на данном подходе, были разработаны системы-носители (мицеллы, наночастицы ядро-оболочка, дендримеры, конъюгаты) для доставки таких препаратов как доксорубицин, паклитаксел а также мРНК и генов [122, 123]. Помимо чувствительных к восстановительной среде систем доставки, сообщается так же о разработке полимерных мицелл, чувствительных к условиям гипоксии, характерным для некоторых областей опухолей и зон инфаркта. Подход, основанный на использовании окислительно-восстановительного состояния в качестве стимула для активации носителей лекарств, позволяет снизить побочные эффекты и способствует преодолению сопротивляемости к лекарствам, однако подобные системы нестабильны при введении в кровоток, а возможность контролировать процесс высвобождения лекарства отсутствует [123].

### **1.2.3 Системы доставки лекарств, активируемые ферментативными реакциями**

Значительная экспрессия ряда белков, обладающих ферментативной активностью, например матриксных металлопротеиназ (особенно матриксная ме-

таллопротеиназа -2 и металлопротеиназа -9) характерна для пролиферирующей опухолевой ткани. Данный факт может использоваться не только в качестве диагностического критерия для раковых опухолей, но и для активации систем доставки лекарств [122]. Основой данного подхода является использование в системах доставки лекарств специфических субстратов (обычно пептидов), характерных для матриксных металлопротеиназ. Другим ферментом, значительная экспрессия которого характерна для раковых опухолей, является катепсин-Б. Основываясь на данном подходе, было разработано несколько препаратов. Сообщается, что конъюгат пакситаксела с октопептидом, гидролизуемым матриксными металлопротеиназами, показал в сто раз меньшую эффективную концентрацию, требуемую для достижения эффекта и нарушению клеточного цикла в опухолевой ткани [126]. Сообщается так же о разработке таких восприимчивых к матриксным металлопротеиназам препаратов как конъюгаты доксорубицина с золотыми наночастицами, полимерные мицеллы, содержащие пакситаксел и наночастицы, содержащие миРНК и доксорубицин [122]. Кроме того, были разработаны конъюгаты доксорубицина с дендримером, отщепляющие доксорубицин под воздействием катепсина-б. Недостатком данного подхода является значительно варьирующийся, в зависимости от стадии развития опухоли, уровень экспрессии указанных ферментов [123].

### **1.3 Термочувствительные системы доставки лекарств**

Среди систем доставки лекарств, восприимчивых к активирующим воздействиям, системы, восприимчивые к изменению температуры, стоят особняком. Для воспаленных тканей и раковых опухолей характерно локальное повышение температуры, поэтому термочувствительные системы можно отнести к системам, восприимчивым к внутренним активирующим воздействиям. Однако при использовании данных систем можно специально нагревать требуемый участок организма, к тому же ряд систем доставки лекарств, чувствительных к внешним активирующим стимулам, на самом деле основан на явлении обусловленной внешним фактором гипертермии и термочувствительности.

Идеальная система, основанная на данном подходе, должна сохранять стабильность при нормальной температуре человеческого тела (порядка 37 °С). Высвобождение полезной нагрузки должно происходить при температурах порядка 40-45 °С. Наиболее распространенными термочувствительными системами являются липосомы, полимерные мицеллы и полимерные наночастицы [127]. Для получения термочувствительных липосом, необходимо использовать липиды с температурой фазового перехода гель-жидкость порядка 40-42 °С. Одним из наиболее широко используемых для данной цели липидов является дипальмитоилфосфатидилхолин (ДПФХ), обладающий температурой фазового перехода гель-жидкость в 41 °С [122]. Так, доксорубин, загруженный в термочувствительные липосомы, проходит клинические испытания под коммерческим названием ThermoDox (компания Celsius) [127]. Термочувствительные липосомы так же допускают функционализацию лигандами, обеспечивающими нацеленность воздействия.

Наиболее распространенным термочувствительным полимером является поли-*N*-изопропилакриламид (ПНИПАМ), помимо него ряд других полимеров может быть использован для создания термочувствительных мицелл или наночастиц. При температуре ниже критической температуры растворимости, данный полимер является гидрофильным, но при нагревании приобретает гидрофобные свойства [122]. Так, получены загруженные камптотецином мицеллы, высвобождающие препарат при температуре более 40 °С.

Сообщается о построении нанокапсул на основе плуроник ф-127 и полиэтиленimina для доставки миРНК. При понижении температуры, например обусловленном криотерапией, данные капсулы изменяют проницаемость, высвобождая свое содержимое [128].

Недостатками термочувствительных систем доставки лекарств является температурная разница между внеклеточным и внутриклеточным пространствами, которая может влиять на процесс высвобождения лекарства [123], кроме того, значительная гипертермия может повредить и здоровые ткани.

## **1.4 Системы доставки лекарств, восприимчивые к внешним воздействиям**

### **1.4.1 Системы доставки лекарств, активируемые магнитным полем**

Перспективный подход, основанный на использовании внешних переменных или постоянных магнитных полей для доставки и управляемого высвобождения лекарственных препаратов, требует включения парамагнитных или суперпарамагнитных частиц в носители лекарств [123]. Наиболее популярными магнитными материалами для использования в данной области являются оксиды железа:  $\gamma$ - $\text{Fe}_2\text{O}_3$  (маггемит) и  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (магнетит). Магнитные наночастицы размером менее 20 нм представляют собой один домен и приобретают свойство суперпарамагнетизма. Магнитные наночастицы допускают покрытие биополимерами, лекарственными молекулами, белками или плазмидами [122].

Воздействие постоянного неоднородного магнитного поля обеспечивает магнитное наведение носителей лекарств [104, 127], в то время как переменное магнитное поле, воздействуя на магнитные наночастицы, заставляет их магнитные моменты осциллировать. Энергия данных осцилляций переходит в тепло благодаря потерям гистерезисным потерям и релаксации Нееля; таким образом, наночастицы выступают в роли приемников, преобразователей энергии [122, 127]. В сочетании с описанными выше термочувствительными системами, это позволяет добиться контролируемого высвобождения полезной нагрузки. Например, это может вызывать сжатие гидрогеля, содержащего наночастицы магнетита, и высвобождение загруженного в гель лекарства [127]. Помимо использования для высвобождения полезной нагрузки, магнитная гипертермия может выступать в качестве дополнительного терапевтического фактора. Воздействие температур порядка 41-43 °C обратимо повреждает здоровые клетки, в то время как опухолевые клетки под его воздействием погибают.

Следует отметить, что высвобождение полезной нагрузки может происходить и под действием постоянного магнитного поля [127]. Так, мицеллы из плуроника Ф127, содержащие суперпарамагнитные наночастицы оксидов же-

леза, сжимаются под воздействием постоянного магнитного поля, приводя к высвобождению гидрофобного лекарства [129]. Еще одним достоинством магнитных средств доставки лекарств является возможность визуализировать распределение носителя лекарства в организме пациента методом магнитно-резонансной томографии (МРТ). В случае использования дополнительных таргетирующих лигандов, такие системы-носители могут быть применены как для лечения, так и для диагностических целей (тераностика) [127, 122].

Для терапевтического применения могут быть разработаны такие системы как пористые нанокapsулы, магнитолипосомы или наночастицы «ядро-оболочка», конъюгированные с действующим веществом [127]. Ввиду описанных выше достоинств, данный подход весьма перспективен и число работ, ему посвященных, значительно во всем мире. Еще в 80-90 тые годы XX века группа отечественных ученых рассматривала применение феррожидкости на основе декстрана и наночастиц магнетита для доставки тромболитических препаратов непосредственно в кровотоке [130, 131]. Ими делались оценки для градиентов напряженности магнитных полей, необходимых для удержания вязких магнитных жидкостей непосредственно в кровотоке. Было показано, что для данной задачи требуется градиент магнитного поля порядка десятков килоэрстед на сантиметр.

Сообщается о включении доксорубина в термически сшитую полимерную оболочку суперпарамагнитных наночастиц. Загруженные винбластином магнитные катионные липосомы, при воздействии внешнего магнита, показали свою эффективность в подавлении опухолевых узлов (у мышей) в сравнении со свободным лекарством [122]. Другое исследование показало возросшую вдвое эффективность накопления магнитных липосом в модели меланомы мыши в присутствии внешнего магнита [132]. Имеется ряд работ по доставке миРНК и ДНК с использованием магнитных наночастиц, например использующих комплексы плазмидной ДНК с наночастицами магнетита или магнитные наночастицы бактерий в качестве носителей для рекомбинантной ДНК [127]. Экспериментов, сравнивающих эффективность загрузки и высвобождения пре-

парата в системы-носители, содержащие магнитные наночастицы (липосомы, полимерные мицеллы, гидрогели, конъюгаты) не проводилось [127].

Магниточувствительные системы доставки лекарств могут быть эффективным решением для воздействия на опухолевые очаги в случае, если прямое хирургическое вмешательство затруднено, например, в случае большого риска для здоровых тканей (опухоль мозга) [127]. Однако магнитное нацеливание таких систем сопряжено с проблемой разработки источников внешних направленных магнитных полей достаточной мощности [123, 127].

#### **1.4.2 Внешние электрические поля в доставке лекарств**

Электрические сигналы достаточно просты в генерации и управлении, поэтому представляется возможным их использование в доставке лекарственных препаратов [133]. Электрические поля могут служить в качестве стимула, обеспечивающего высвобождение лекарств из ряда электрочувствительных носителей, а также изменять проницаемость клеточных мембран. Терапевтические электрочувствительные системы могут быть представлены имплантатами или системами доставки лекарств в виде тонких пленок и наночастиц. Такие системы под воздействием внешних электрических полей могут высвобождать лекарство или электрически стимулировать расположенные рядом клетки.

Так, для данных целей могут быть использованы электропроводящие полимеры. Самым распространенным и наиболее изученным проводящим полимером является полипиррол с анионными примесями, помимо него могут быть использованы N-метилпиррол, полианилин и некоторые производные политиофена [136]. Атомы серы в составе проводящих полимеров могут связываться с наночастицами благородных металлов: серебра или золота. Сообщается о разработке ряда наночастиц на основе проводящих полимеров, высвобождающих под воздействием внешних электрических полей такие соединения как флуоресцеин [133], пироксикам, инсулин, даунорубин и др [136]. Под воздействием электрического поля на полисахаридные гидрогели, происходят изменения в полярности, ионной силе и рН, приводящие к скручиванию, набуха-

нию или, напротив, сжатию полимера и высвобождению загруженной в гидрогель полезной нагрузки [136].

Электрическое поле в доставке лекарств и биологически активных веществ наиболее широко применяется в контексте явления электропорации – пробоя клеточных мембран под воздействием внешнего электрического поля [134, 135]. Явление электропорации нашло широкий ряд приложений в медицине, биотехнологии и косметологии.

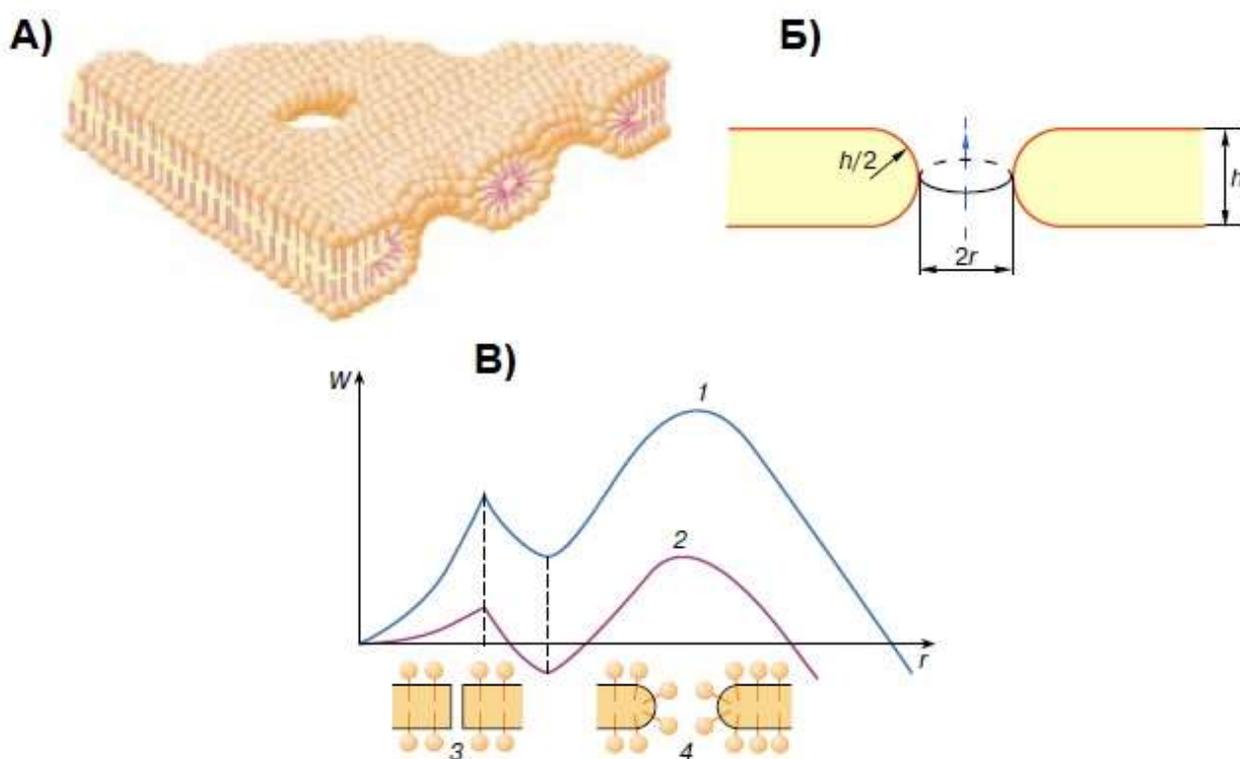


Рисунок 5. А - липидная мембрана с образовавшимися дефектами - гидрофильными порами. Б) Модель гидрофильной поры, которая имеет два радиуса кривизны:  $h/2$ - радиус кривизны бислоя,  $r$  - радиус поры. В - зависимость энергии липидной поры от ее радиуса  $r$ . Кривая 1 – в отсутствие внешнего электрического поля, кривая 2 -при его наличии. Левые восходящие ветви графиков характерны для гидрофильной поры (3), остальные – для гидрофобной поры (4). А, Б – по материалам [134], В - по материалам [135].

Величина трансмембранного потенциала обычно составляет порядка 0,1-0,2 В, в то время как толщина мембраны, как правило, не превышает 10 нм [134]. Так же следует отметить, что в силу амфифильности липидных молекул, диэлектрическая проницаемость бислоя на порядок меньше таковой в воде (порядка 2 против 80 для воды). Благодаря этому ионам энергетически невыгодно

находиться в гидрофобной области мембраны; полярные головки липидных молекул, напротив, притягивают ионы. Упомянутые факты обуславливают значительное сопротивление липидного бислоя, превосходящее таковое для большинства используемых в технике жидких изоляторов:  $10^7$ - $10^8$  Ом\*см<sup>2</sup>. Липидная мембрана стабильна при стандартных для живой клетки значениях трансмембранного потенциала и, по сути, представляет собой конденсатор.

При превышении критического значения трансмембранного потенциала происходит пробой мембраны с образованием временных проницаемых структур, называемых порами [136]. Часто в теоретических расчетах используется выражение, связывающее трансмембранный потенциал  $\psi_m$ , напряженность внешнего электрического поля и длительность импульса, называемое уравнением Шванна:

$$\psi_m = -f E(t) R \cos(\theta) (1 - e^{-\frac{t}{\tau}}) \quad (1)$$

Здесь  $f$  – фактор, зависящий от формы клетки (для сферической клетки он равен 1,5),  $E(t)$  – напряженность прикладываемого к клетке электрического поля,  $R$  – радиус клетки,  $\theta$  – угол между направлением вектора напряженности электрического поля и нормалью к поверхности клетки в рассматриваемой точке. Константа  $\tau$  представляет собой характерное время зарядки «конденсатора», образованного мембраной и для клетки, как правило, имеет порядок микросекунд [136, 137]. В случае стационарного состояния, при условии что  $\tau \ll t$ , уравнение 1 принимает следующий вид:

$$\psi_m = 1,5 E(t) R \cos(\theta) \quad (2)$$

Поскольку согласно (1) и (2) трансмембранный потенциал зависит от радиуса клетки, следует отметить, что большая, порядка нескольких кВ/см, напряженность электрического поля требуется для электропорации бактерий, а также липосом. На практике используются импульсы длительностью от наносекунд до микросекунд, напряжённостями от нескольких кВ/см до тысяч кВ/см, в зависимости от области применения [136].

Пробой липидной бислоидной мембраны при приложении напряжения выше критического происходит по механизму возникновения малых гидрофобных пор, которые, как правило, быстро схлопываются. Тем не менее, при возникновении поры может происходить структурная перестройка среди липидных молекул и образование гидрофильной поры [135, 134], (рисунок 5). Простая модель, основанная на формуле для давления Лапласа, позволяет установить, что энергия гидрофильной поры, образовавшейся в липидном бислое, зависит от радиуса поры. Расширение узких пор энергетически невыгодно, в то время как если радиус поры превышает некоторый критический радиус  $R_{кр}$ , то энергия краевого линейного натяжения периметра поры превосходит энергию поверхностного натяжения липидного бислоя. При этом происходит разрушение липидной мембраны по механизму необратимого роста поры. В настоящее время для описания поведения клеток во внешнем электрическом поле разработаны и более продвинутые математические модели, использующие более широкий ряд параметров [137].

Систематическое изучение явления электропорации началось в 80-х годах XX века; в 1982 Нойманом и коллегами было показано, что электропорацию можно эффективно использовать для доставки генетического материала в виде плазмид внутрь клеток [138]. В настоящее время электропорация остается одним из наиболее популярных и перспективных методов доставки в живую клетку как малых молекул, так и плазмидов, крупных белков и антител [137]. Для маленьких молекул характерным механизмом является диффузия их внутрь клетки через образовавшиеся поры по градиенту концентрации. В движении заряженных молекул присутствует дополнительная электрофоретическая составляющая. Эффективность электропорационного проникновения крупных молекул внутрь клетки находится в прямой зависимости от времени, в течение которого пора не схлопывается, поэтому предпочтительным для доставки крупных молекул внутрь клетки является использование более длительных импульсов электрического поля. Помимо обратимой электропорации с целью доставки сторонних веществ во внутриклеточное пространство (электропермеабилитизация)

ция), необратимая электропорация может быть использована для выборочного уничтожения раковых клеток и патологических микроорганизмов [136]. Необратимая электропорация относится к малоинвазивным, нетермическим и эффективным методикам терапии неоперабельных опухолей. Необратимую электропорацию возможно использовать вблизи крупных кровеносных сосудов, нервных узлов и в нервной ткани. Гетерогенная природа онкологических опухолей и нежелательные самопроизвольные сокращения мускулатуры ограничивают широкое применение данной методики. Как правило, протокол терапии, основанной на необратимой электропорации требует применения анестезии для пациента [139]. Локализованные (например, при помощи антител) на поверхности клетки наночастицы, (в частности, золота и серебра), являются способом, позволяющим повысить эффективность необратимой электропорации; снизить напряженности используемых полей [140]. Имеется ряд возможных механизмов, теоретически объясняющих данный факт. Наличие наночастиц на мембране может способствовать разрядке через них трансмембранного потенциала, кроме того, проводящие наночастицы во внешнем электрическом поле представляют собой диполи, локально усиливающие электрическое поле около своей поверхности [141].

### **1.4.3 Активация носителей лекарств ультразвуком**

Ультразвук широко используется в медицине в качестве средства визуальной диагностики [122]. Контрастными агентами, используемыми для ультразвуковой диагностики, являются микроскопические пузырьки. Разумным и широко распространенным подходом является использование ультразвуковой технологии для вскрытия носителей лекарственных препаратов, в частности, полимерных мицелл, липосом. Эффективность высвобождения загруженных веществ напрямую зависит от времени и частоты прилагаемого ультразвукового воздействия, его плотности энергии, лиофильности лекарства, а также типа ультразвука – продолжительная волна или импульсы. Низкочастотный ультразвук (20-100 кГц) демонстрирует большую эффективность высвобождения ле-

карства и более глубокое проникновение в ткани, в сравнение с высокочастотным ультразвуком, однако трудно добиться его точной фокусировки. Кроме того, воздействие импульсов высокочастотного ультразвука повышает проницаемость клеточной мембраны, облегчая проникновение лекарств внутрь клетки. Одним из механизмов создания средств доставки лекарств, восприимчивым к ультразвуковым воздействиям, является заключение капелек эмульсии внутрь липосом. Под действием ультразвука эмульсии переходят из жидкого в газообразное состояние, увеличивая свой объем и давление и, таким образом, разрушая липосому. Недостатком данной технологии являются часто возникающие нежелательные термические эффекты, проникающее воздействие ультразвука, приводящее к неконтролируемому высвобождению лекарственной нагрузки.

#### **1.4.4 Активация носителей лекарств излучением оптического диапазона**

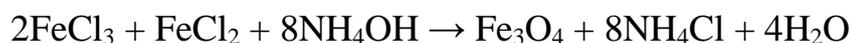
Метод, позволяющий высвобождать биологически активные вещества из их носителей под воздействием внешнего излучения оптического диапазона, носит название фотоактивации [122]. При использовании данного метода возможно варьировать такие параметры как длительность светового импульса, его интенсивность и частота. Легко обеспечить как пространственное, так и временное управление активирующим источником света. Фотоактивация может быть обеспечена широким рядом механизмов, таких как фотоизомеризация, фотосшивка или же наоборот, фотодеградация полимеров. В ряде предлагаемых в литературе носителей лекарств под воздействием света происходит окисление или изменение полярности. Поверхностный плазмонный резонанс на золотых наноструктурах позволяет им поглощать ИК-излучение и нагреваться, приводя к термически обусловленному высвобождению нагрузки. Тем не менее, интенсивность и длительность светового воздействия усложняет точное и направленное высвобождение лекарств [123], а излучение оптического диапазона, как правило, не проникает в ткани глубоко.

## ГЛАВА 2. Материалы и методы

### 2.1 Получение функциональных неорганических наночастиц

#### 2.1.1 Получение наночастиц магнетита (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)

Для синтеза наночастиц магнетита использовался широко распространенный метод, предложенный Рене Массартом [142]. В процессе синтеза 10 мл 1М раствора хлорида трехвалентного железа FeCl<sub>3</sub> смешивали с 2,5 мл 2М раствора хлорида двухвалентного железа FeCl<sub>2</sub>. Смесь солей вливали в 125 мл 0,7М раствор щелочи NH<sub>4</sub>OH и подвергали интенсивному перемешиванию в течение получаса. Суммарное уравнение проходившей реакции имеет следующий вид:



Образующиеся наночастицы осаждались полем постоянного самарий-кобальтового магнита. Для магнетита Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> характерна точка нулевого заряда (изоэлектрическая точка) pI=6,7-7; при меньших значениях pH наночастицы магнетита имеют положительный заряд. Для электростатической стабилизации коллоидной суспензии наночастиц магнетита и предотвращения агрегации частиц, pH суспензии был доведен до 3,7 при помощи соляной кислоты HCl. Кроме того, коллоидный раствор наночастиц подвергался обработке ультразвуком в течение 15 минут для дополнительного предотвращения агрегации.

Полученные наночастицы были охарактеризованы при помощи установки Brookhaven instruments corporation 90 Plus. ζ-потенциал для наночастиц, измеренный методом электрофоретического светорассеяния, составил 20,5 мВ±0,8мВ. Средний размер полученных наночастиц магнетита, измеренный методом динамического светорассеяния при помощи той же установки, составил порядка 3,7 нм. Кроме того, наночастицы магнетита были дополнительно охарактеризованы методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с использованием микроскопа LEO 912AB (IOMEGA). Анализ ПЭМ-микрофотографий наночастиц магнетита позволил установить их распределение по размерам. Данные по среднему размеру синтезированных наночастиц,

полученные при помощи метода ПЭМ, находятся в согласии с данными метода динамического светорассеяния. Кроме того, исследование методом дифракции электронов позволяет утверждать, что полученные частицы представляют собой наночастицы магнетита ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Возможно, присутствие в образцах примеси маггемита ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), поскольку оба оксида железа обладают схожей кристаллической решеткой. Экспериментальные данные, полученные при помощи микроскопа LEO 912AB (IOMEGA), приведены на рисунке 6.

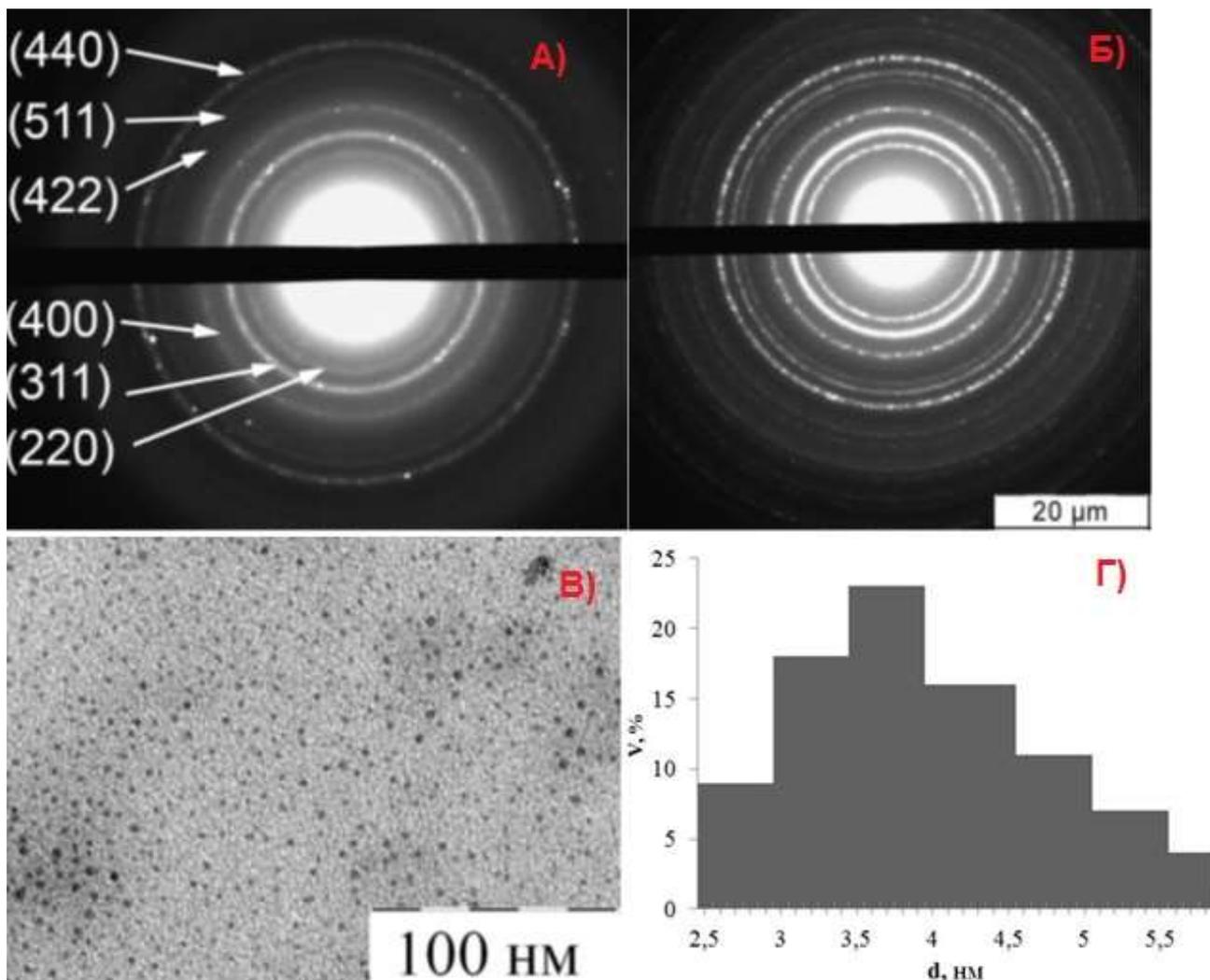


Рисунок 6. Данные о наночастицах магнетита, полученные с помощью электронного просвечивающего микроскопа LEO 912AB, IOMEGA. А - дифрактограмма для частиц, полученных в настоящей работе, цифрами указаны номера кристаллографических плоскостей для кристаллической фазы магнетита. Б - эталонная электронная дифрактограмма для дисперсного магнетита. В - типичная микрофотография высушенной коллоидной суспензии наночастиц магнетита. Г - Справа – построенная на ее основе гистограмма, отображающая распределение наночастиц магнетита по размерам.

Поскольку магнетит относится к материалам с выраженными магнитными свойствами, полученные наночастицы магнетита были охарактеризованы

методом ЭПР (рисунок 7). Представленный на графике сигнал ЭПР характерен для однодоменных ферромагнитных и суперпарамагнитных наночастиц магнетита.

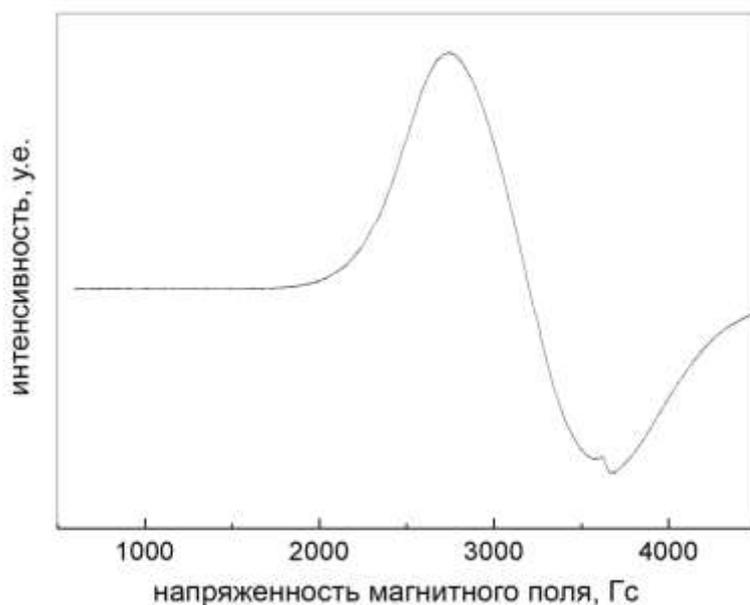


Рисунок 7. Спектр ЭПР полученной нами суспензии коллоидных наночастиц магнетита (средний диаметр 4 нм) в водной фазе.

### 2.1.2 Гидрофобизация наночастиц магнетита

Положительный заряд поверхности неорганических наночастиц магнетита ограничивает их применение *in vivo*. Он обуславливает неспецифическое связывание таких наночастиц с анионными биологическими коллоидными объектами и поверхностями; может являться причиной побочных эффектов. Одним из способов модификации полученных наночастиц для биомедицинских применений является их гидрофобизация. Кроме того, гидрофобизация позволяет дополнительно стабилизировать наночастицы и изолировать их от водной фазы биологических жидкостей. В литературе предложен широкий ряд методов, позволяющих обеспечить гидрофобизацию неорганических наночастиц магнетита. Поскольку получаемые в нашей работе наночастицы необходимы для создания нанокompозитных липосом-носителей лекарств, методики, использующие токсичные реагенты, неприменимы. Нами предложен метод гидрофобизации наночастиц магнетита, не использующий высокотоксичные реагенты и не требую-

щих сложных условий для протекания. Синтез происходит в двухфазной системе, образованной полученным ранее водным коллоидным раствором наночастиц магнетита и раствором стеариновой кислоты в хлороформе. Два указанных раствора не смешиваются, при этом происходит переход наночастиц магнетита из водной в гидрофобную фазу хлороформа посредством образования на границе раздела фаз комплекса с водонерастворимым амфифильным лигандом. (Рисунок 8,1).

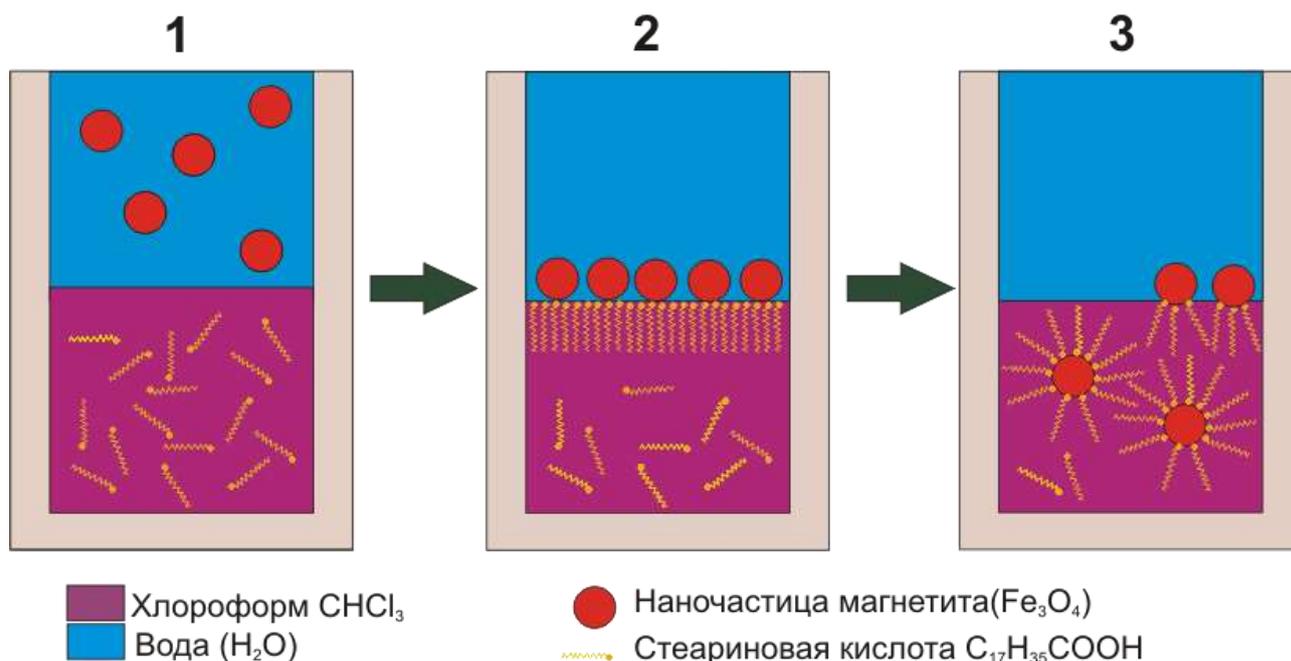


Рисунок 8. Схема, отображающая методику гидрофобизации наночастиц магнетита в двухфазной системе (пояснения см в тексте).

Другим лигандом, способным обеспечить гидрофобизацию наночастиц магнетита, является октадекантиол (ОДТ). Наночастицы магнетита, гидрофобизованные с использованием ОДТ, также были получены и обладали свойствами, аналогичными гидрофобизованным наночастицам магнетита со стеариновой кислотой в качестве амфифильного лиганда. Поэтому в последующих экспериментах с загрузкой флуоресцентного красителя внутрь липосом и исследования влияния на них внешних воздействий использовались преимущественно наночастицы, гидрофобизованные стеариновой кислотой.

В водную фазу, содержащую наночастицы магнетита, постепенно добавлялся этаноламин C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>NO до достижения pH = 10. На схеме (рисунок 8) добавлению этаноламина соответствует пункт 2. Добавление этаноламина приво-

дит к изменению структуры воды и разрушению гидратной оболочки, образовавшейся вокруг неорганических наночастиц  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . Тем самым этаноламин способствует связыванию наночастиц с карбоксильными группами стеариновой кислоты (или ОДТ), с последующим переходом наночастиц в гидрофобную фазу – хлороформ. Плавный процесс перехода наночастиц из гидрофильной в гидрофобную фазу занимает порядка суток.

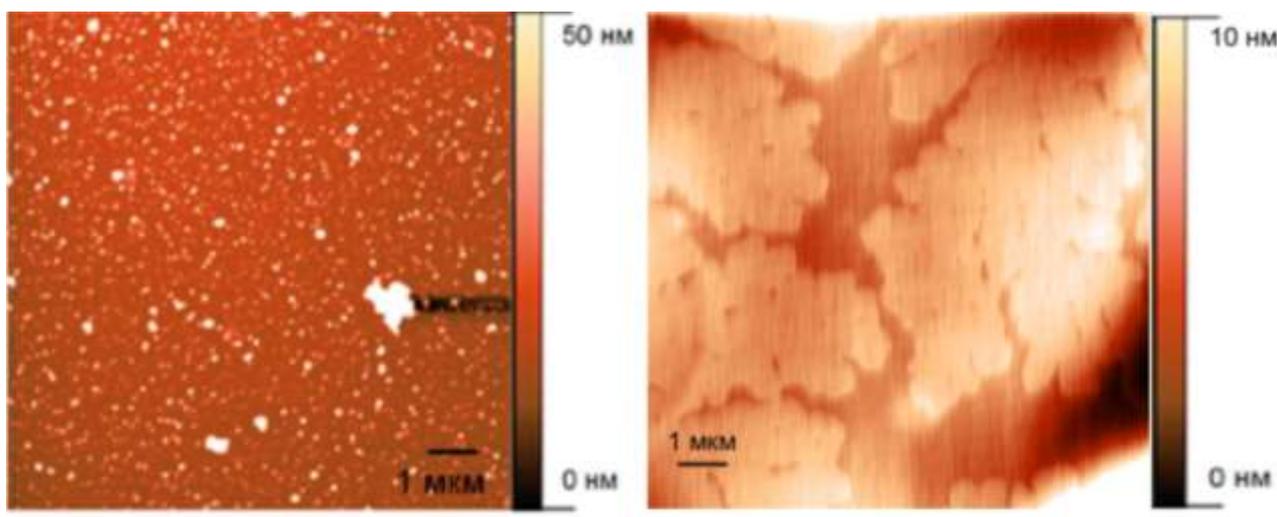


Рисунок 9. АСМ-микрофотографии для наночастиц магнетита. Слева – катионные наночастицы, справа – наночастицы, гидрофобизованные с использованием стеариновой кислоты.

Полученные гидрофобизованные наночастицы магнетита были охарактеризованы с использованием метода АСМ с использованием установки Ntegra-Spectra фирмы NT-MDT (Рисунок 9). Было проведено сравнение АСМ-микрофотографий гидрофобизованных и не гидрофобизованных образцов. Следует отметить, что на АСМ изображении гидрофобизованных наночастиц магнетита, адсорбированных на подложку, не удастся выделить агрегатов частиц или отдельных частиц; вместо этого на подложке можно наблюдать конденсированную фазу, образованную комплексами стеариновой кислоты и наночастиц магнетита, а также свободной стеариновой кислоты. Гидрофобизованные наночастицы магнетита, имеющие сродство к гидрофобной углеводородной фазе, могут быть встроены в гидрофобную область липидных мембран.

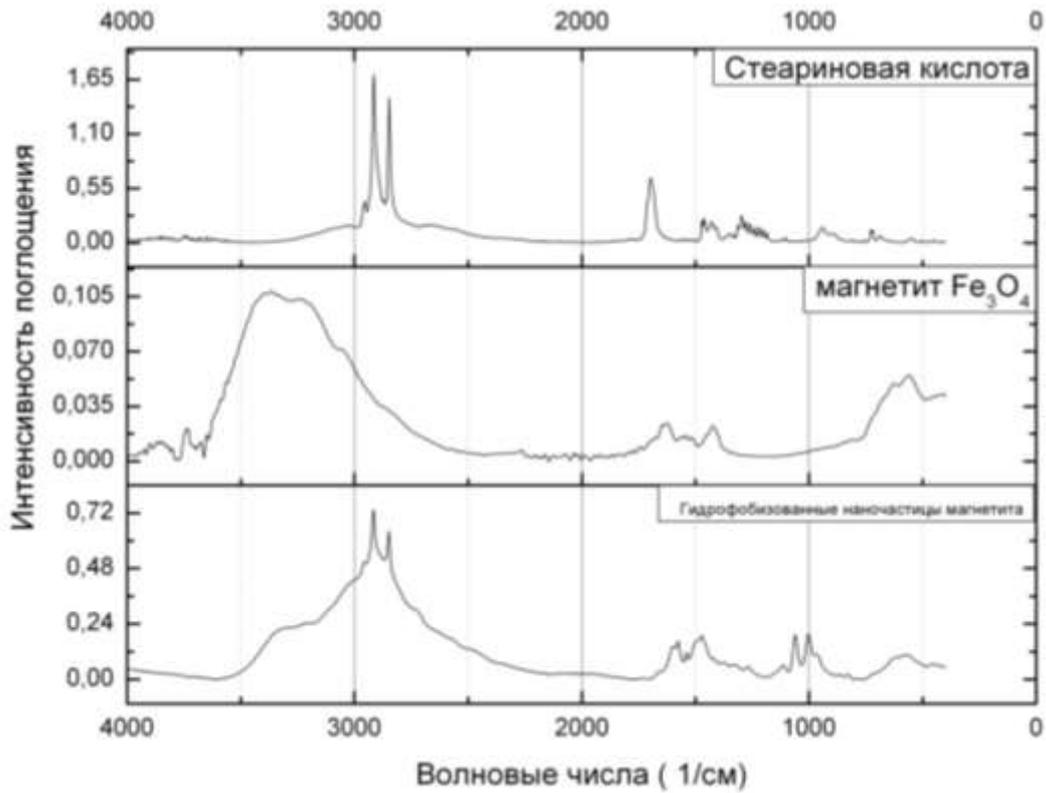


Рисунок 10. Сравнение ИК-Фурье спектров. Сверху вниз: спектр для стеариновой кислоты, магнетита  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и полученных нами гидрофобизованных наночастиц магнетита

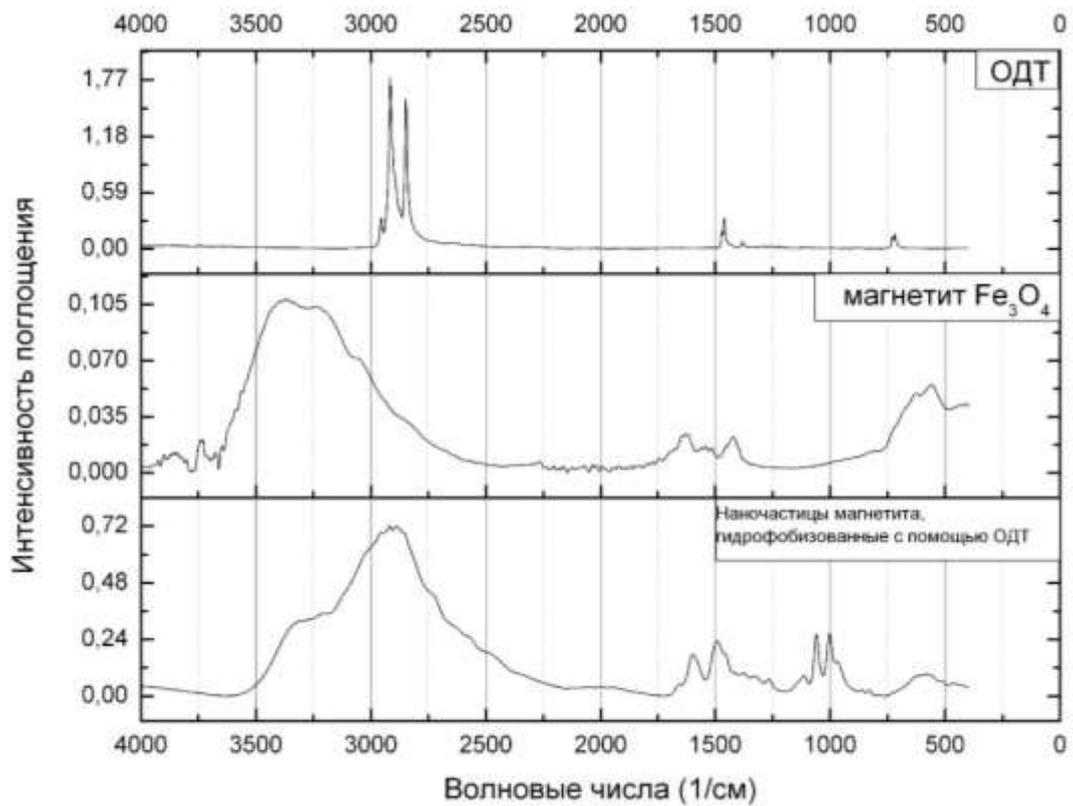


Рисунок 11. Сравнение ИК-Фурье спектров. Сверху вниз: спектр для ОДТ, магнетита  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и полученных нами наночастиц магнетита, гидрофобизованных с использованием ОДТ

Кроме того, проводилось снятие ИК-Фурье спектров для коллоидных растворов наночастиц в хлороформе, гидрофобизованных с использованием стеариновой кислоты (рисунок 10) и ОДТ (рисунок 11). Пики, наблюдаемые на спектрах гидрофобизованных наночастиц, соответствуют характерным колебаниям групп, присутствующих в молекулах стеариновой кислоты, октадекантиола ОДТ, а также характерным пикам ИК-спектра магнетита.

### **2.1.3 Методика синтеза золотых наночастиц с одновременной гидрофобизацией**

Еще в 1847 году Майкл Фарадей описал и охарактеризовал коллоиды золота в двухфазной системе, по сути, получив коллоидный раствор золотых наночастиц [143]. Фактически, упомянутая работа является одной из первых работ в области практической нанотехнологии. Существуют две больших группы методов синтеза: дисперсионные и конденсационные методы.

Особенностью предлагаемого нами конденсационного метода является стабилизация зарождающихся кластеров золота прикрепляющимися молекулами алкилтиолов; т.е. синтез и гидрофобизация наночастиц золота происходят одновременно. Изменяя концентрацию ОДТ, возможно варьировать размер получаемых наночастиц. Лигандами, стабилизирующими зарождающиеся кластеры золота, и обеспечивающими их гидрофобизацию, являются трифенилфосфин  $P(C_6H_5)_3$  и октадецилтиол (ОДТ). Именно наличие ОДТ позволяет варьировать размер образующихся наночастиц.

Синтез начинался с разведения растворов ОДТ ( $CH_3(CH_2)_{17}SH$ ) в хлороформе: 15 мл раствора ОДТ в хлороформе с концентрацией ОДТ 0,35 мг/мл (образец 1) или же 13,5 мл раствора с концентрацией 0,11 мг/мл (образец 2). В каждый из образцов было добавлено 5 мг золотосодержащего прекурсора  $Au(P(C_6H_5)_3)Cl$ . Далее к каждому из образцов добавлялось по 2 мл дистиллированной воды. Реакция запускалась медленным добавлением 4 мг борогидрида натрия  $NaBH_4$ . Роль борогидрида натрия в данной реакции состоит в том, что он выступает в роли восстановителя, отдавая электроны.

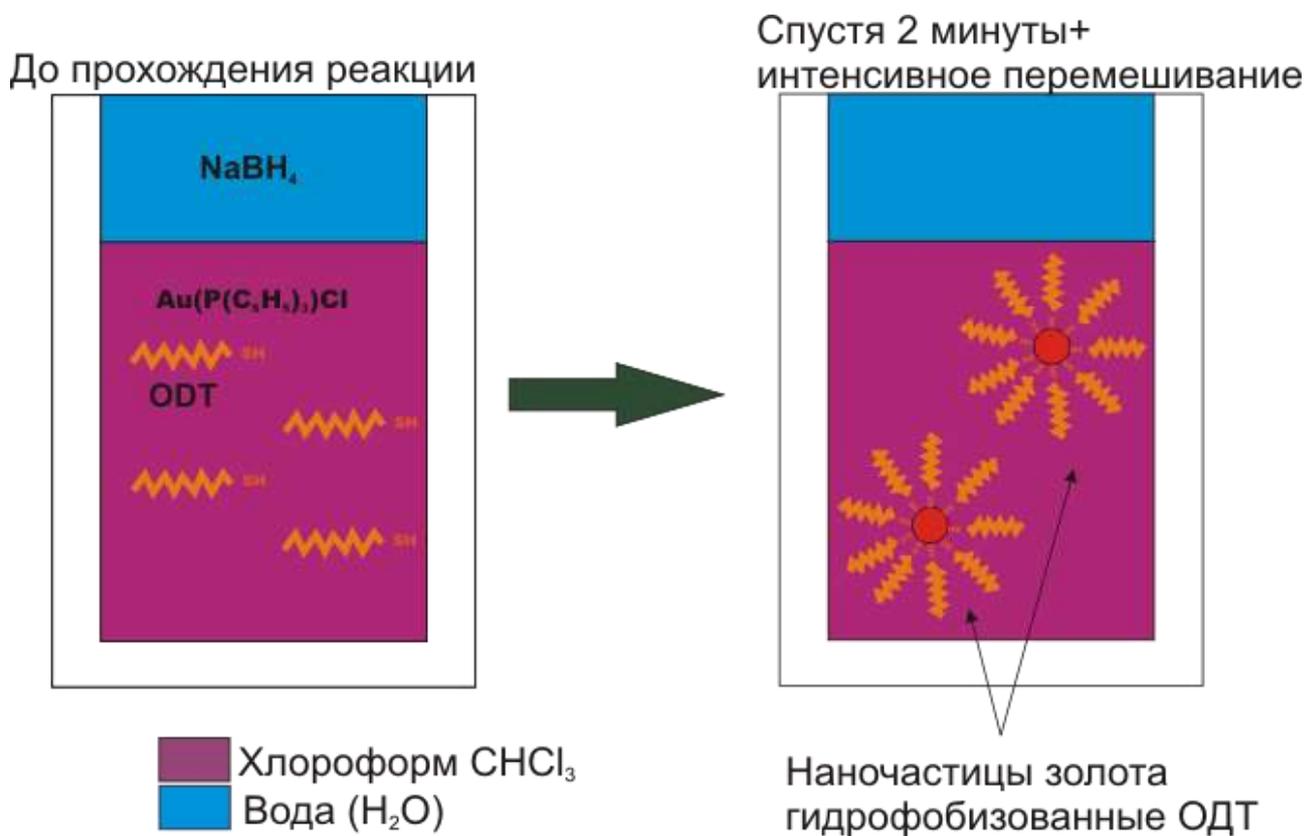
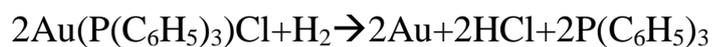
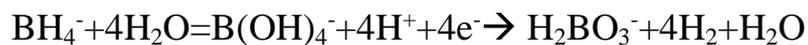


Рисунок 12. Схематическое изображение процесса синтеза наночастиц золота с их одновременной гидрофобизацией.

Происходящие при этом процессы определяются следующими уравнениями реакции:



Во время прохождения реакции растворенный в хлороформе ОДТ ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{SH}$ ) связывается на поверхности наночастиц. Борогидрид натрия ( $\text{NaBH}_4$ ) является донором электронов, выполняя роль восстановителя, и образует водород. Схематическое изображение процесса синтеза наночастиц золота с одновременной гидрофобизацией представлено на рисунке 12.

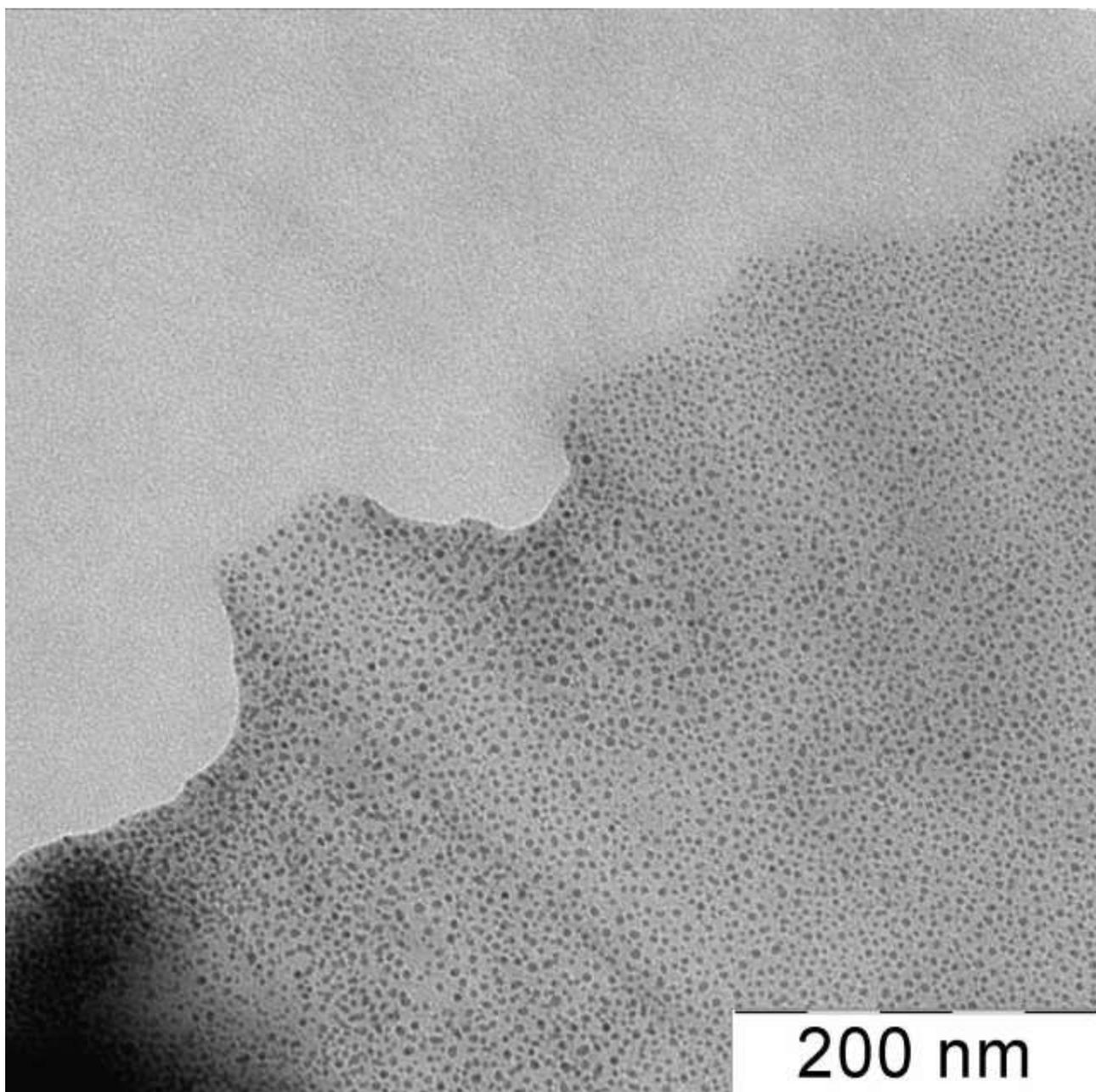


Рисунок 13. ПЭМ изображение золотых наночастиц, гидрофобизованных с использованием лигандов октадекантиола (ОДТ). Размеры частиц распределены от 2,5 до 6 нм, средний размер порядка 3,5-3,7 нм (образец 2).

Описанная в настоящей работе методика обладает рядом значительных преимуществ для биофизических и биомедицинских применений - при одношаговом синтезе с одновременной гидрофобизацией наночастиц золота отсутствуют высокотоксичные компоненты; так же методика не требует создания специфических условий для синтеза. Ее ограничением является сложность в получении металл-органического прекурсора  $\text{Au}(\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3)\text{Cl}$ .

Синтезированные наночастицы были охарактеризованы с использованием электронного микроскопа LEO 912AB, IOME GA; как и в случае с гидрофобизованными наночастицами магнетита, были получены микрофотографии и дифрактограмма для рассеяния электронов на наночастицах. Помимо этого, для характеристики наночастиц был использован метод ИК-Фурье спектроскопии. Было показано, что при концентрации ОДТ 0,35 мг/мл (образец 1) в процессе синтеза образуются более крупные частицы, размерами 5-8 нм, в то время как при концентрации 0,11 мг/мл, размеры частиц распределены в диапазоне 2,5-5 нм (образец 2). На основе анализа микрофотографии высушенного образца коллоидного раствора гидрофобизованных золотых наночастиц (рисунок 13), была построена гистограмма, отображающая распределение частиц по размерам (рисунок 14).

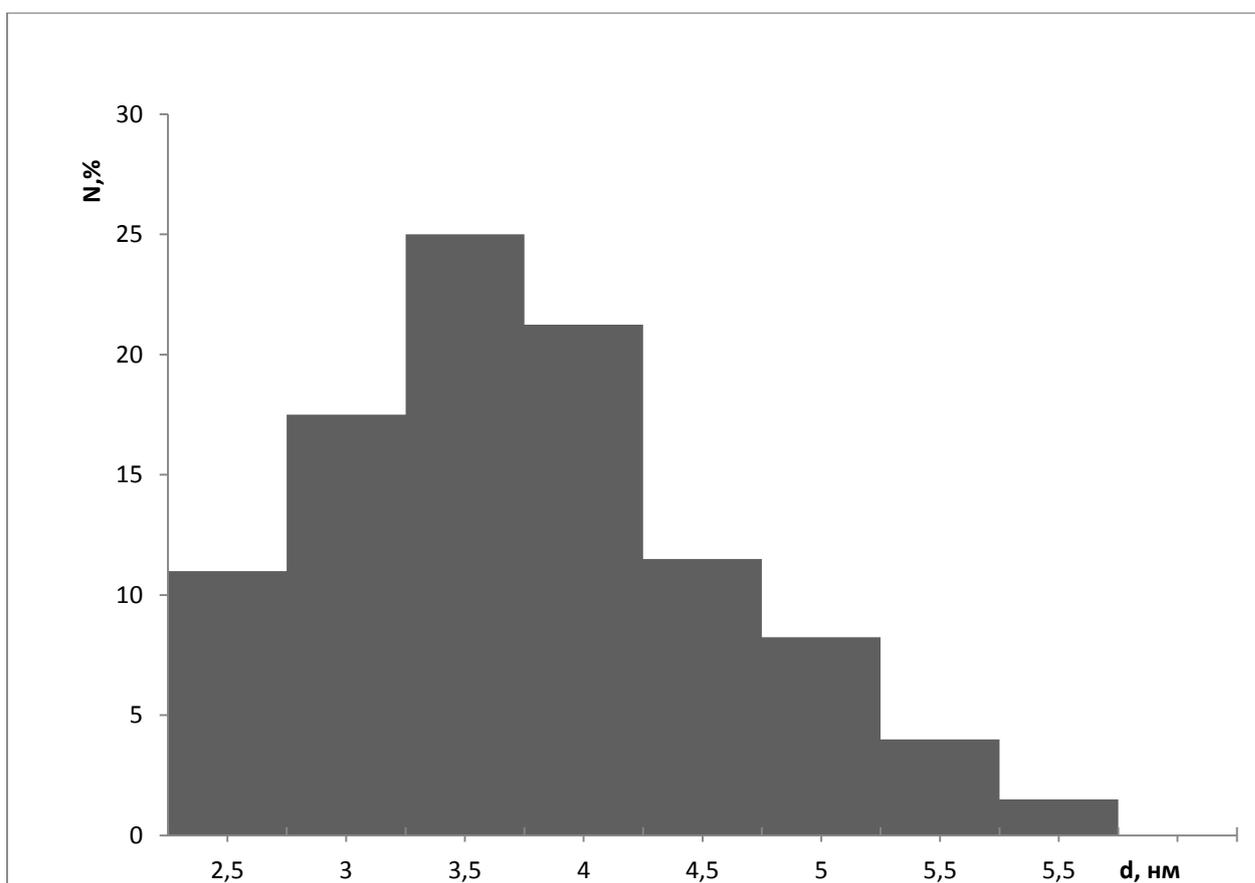


Рисунок 14. Гистограмма, отражающая распределение гидрофобизованных золотых наночастиц по размерам.

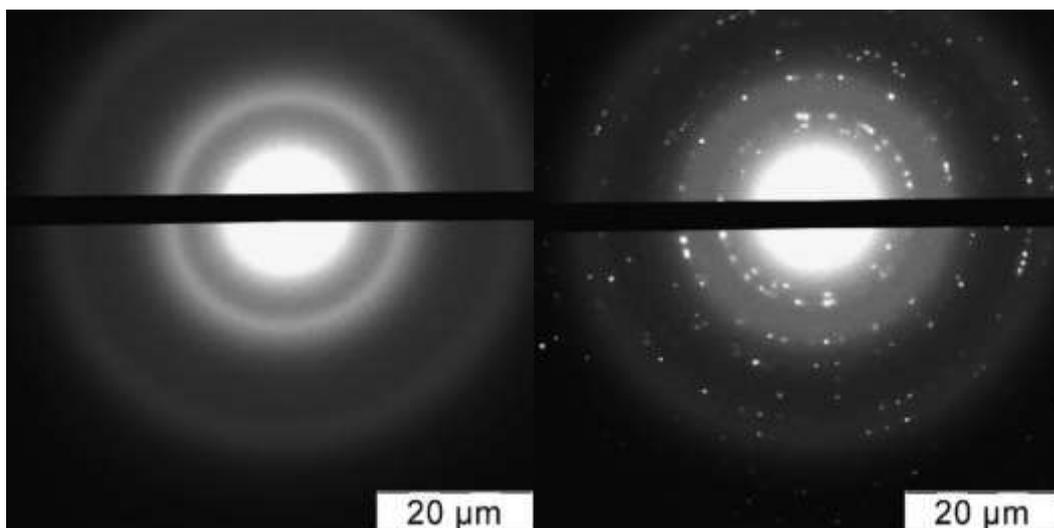


Рисунок 15. Рассеяние электронов на золотых наночастицах. Слева - характерная дифрактограмма для эталонного образца, справа - дифрактограмма для гидрофобизованных неорганических наночастиц

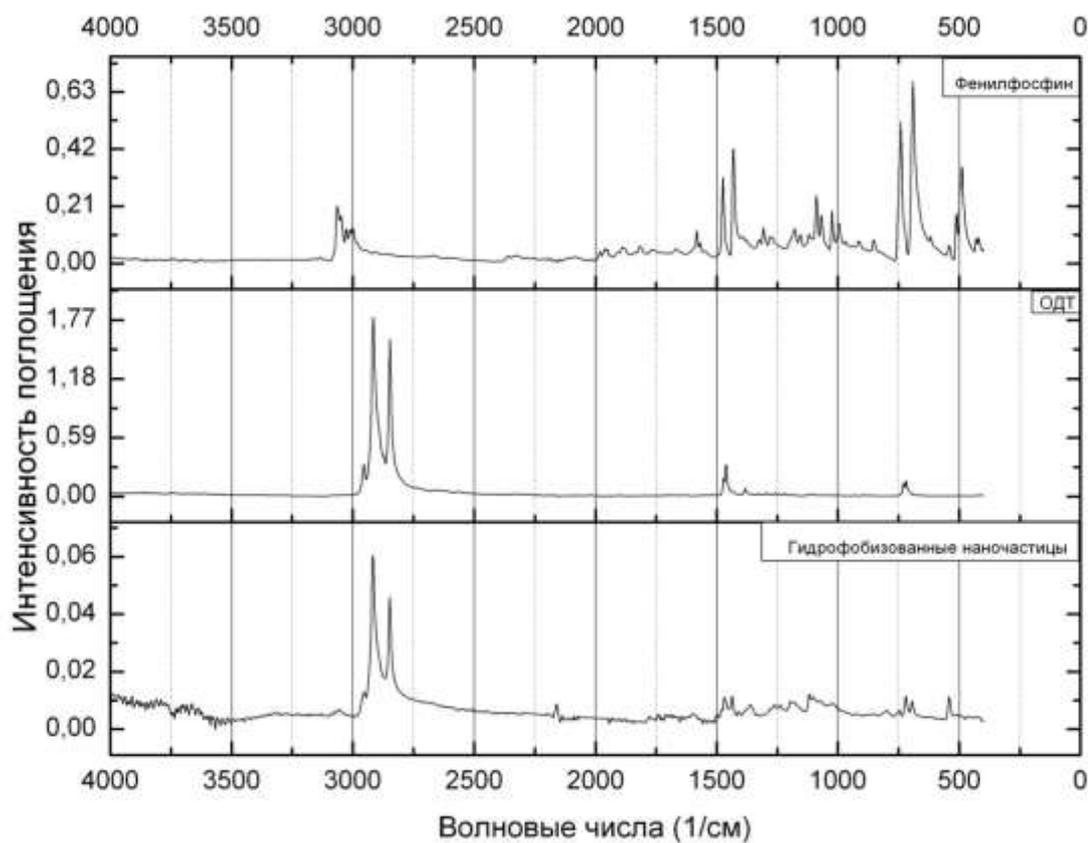


Рисунок 16. Результаты исследования коллоидного раствора гидрофобизованных золотых наночастиц методом ИК-Фурье спектроскопии.

Поскольку гидрофобизованные наночастицы в настоящей работе необходимы для функционализации нанокомпозитных липосом, оптимальным размером получаемых наночастиц является именно размер, сравнимый с толщиной

липидного бислоя, который для фосфатидилхолина составляет порядка 4,1 нм [144].

Данные дифракции электронов на образце (рисунок 15) свидетельствуют о том, что нами были получены наночастицы, состоящие именно из золота. Пики, наблюдаемые на ИК-Фурье спектре гидрофобизованных наночастиц золота (рисунок 16), соответствуют характерным колебаниям групп, присутствующих в молекулах ОДТ и фенилфосфина.

## 2.2 Получение и загрузка липосом

Липосомы – полые везикулы (пузырьки), ограниченные бислойной мембраной. Такие структуры могут быть образованы рядом амфифильных соединений [145]. После их открытия в 60-е годы XX века, липосомы получили широкое применение в качестве модельных систем, но прежде всего в фармакологии и медицине. Широкий интерес к липосомам в ряде биомедицинских областей объясняется тем, что, будучи построены из фосфолипидов, являющихся основными структурными компонентами живых клеток, липосомы полностью биосовместимы, а потому не вызывают аллергических реакций. Кроме того, липосомы универсальны в качестве средства доставки биологически активных веществ: гидрофильные вещества могут быть заключены в их внутренний объем, а гидрофобные – локализованы в мембранах. В настоящей работе были получены нанокомпозитные липосомы с неорганическими гидрофобизованными наночастицами, локализованными непосредственно в гидрофобных областях липосомальных мембран, между монослоями. Схематическое, концептуальное изображение получаемых в работе липосом представлено на рисунке 17.

В настоящей работе проводился синтез липосом, содержащих локализованные в гидрофобных областях мембраны суперпарамагнитные наночастицы магнетита или же наночастицы золота. В качестве модельных веществ, загружаемых внутрь липосом с наночастицами магнетита в мембране, выступали раствор соли NaCl и краситель карбоксифлуоресцеин. В липосомы, содержащие наночастицы золота, загружался противоопухолевый препарат доксорубин

или раствор соли NaCl. Для контрольных экспериментов по воздействию электрического поля так же создавались липосомы, не содержащие наночастицы, также загруженные доксорубицином или раствором соли NaCl.

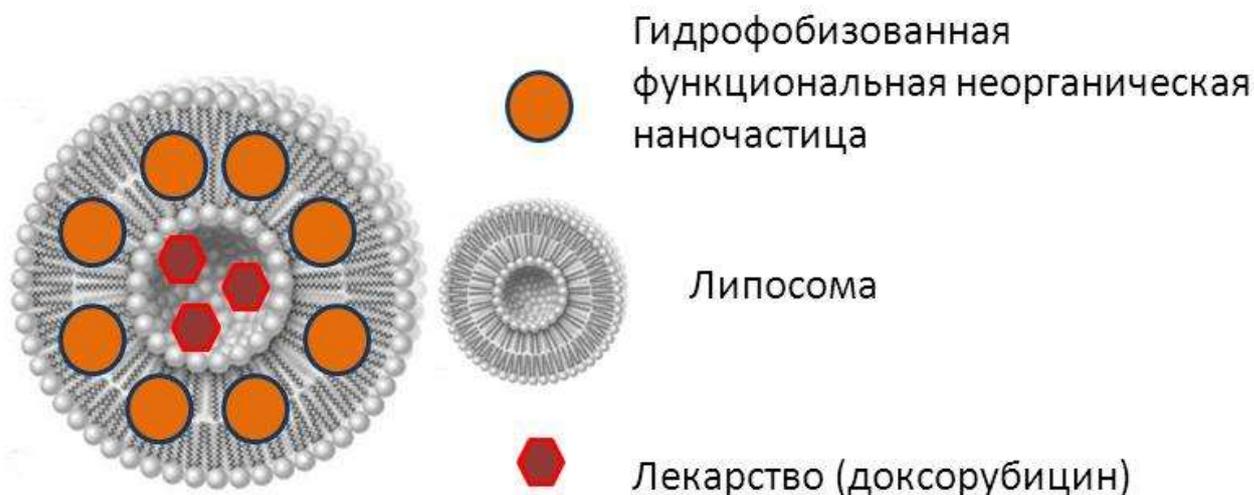


Рисунок 17. Схематическое изображение получаемых в работе нанокompозитных липосом

### 2.2.1 Липосомы с гидрофобизованными наночастицами магнетита

Липосомы в настоящей работе были получены по стандартному методу гидратации тонкой липидной пленки с последующим воздействием ультразвуком. В липосомы, содержащие гидрофобизованные наночастицы магнетита в гидрофобной области липидного бислоя, загружались модельные вещества: раствор NaCl и краситель карбоксифлуоресцеин.

Для синтеза липосом использовался стандартный фосфолипид фосфатидилхолин (брутто-формула  $C_{42}H_{80}N_1O_8P_1$ ) фирмы Sigma. Стандартная процедура синтеза липосом начиналась с добавления 5 мг фосфатидилхолина в виде спиртового раствора с концентрацией  $c=50$  мг/мл в колбу вместе с 0,4 мл суспензии гидрофобизованных наночастиц магнетита. После высушивания смеси при помощи вакуумного роторного испарителя на стенках колбы образовывалась сухая липидная пленка. В качестве модельного вещества выступал карбоксифлуоресцеин. В колбу, содержащую сухую липидную пленку, добавляли 2 мл карбоксифлуоресцеина (фирмы “Serva”) с концентрацией 2 мг/мл, стабилизированного буфером трис. Для того чтобы липидная пленка полностью пе-

решла со стенок колбы в растворе, колба подвергалась кратковременному ультразвуковому воздействию в ультразвуковой ванне. Это приводило к образованию многослойных, т.н. мультиламеллярных липосом. Характерной особенностью раствора, содержащего многослойные липосомы, является его помутнение. Для образования моноламеллярных липосом, пригодных для описанных в данной работе применений и имеющих более приемлемое распределение по размерам, образцы далее подвергались обработке ультразвуком в течение 10-15 минут. При этом раствор в пробирке становился менее мутным. Тем не менее, модельные вещества при этом оказывались как загруженными в липосомы, так и во внешнем, по отношению к липосомам, растворе. По этой причине образцы подвергались диализу в течение 1,5-3 часов против 0,001 М буфера Трис, имеющего  $pH=7$ , с заменой буфера каждые 30 минут.

Кроме того, для каждого из экспериментов проводилось приготовление контрольных липосом, не содержащих наночастиц, локализованных в мембране. Процедура синтеза контрольных образцов идентична описанной для нанокompозитных липосом, за исключением того, что в начале синтеза в колбу добавлялось 6 мг фосфатидилхолина в виде раствора в спирте с концентрацией  $ФХ= 50$  мг/мл. Полученные нанокompозитные липосомы использовались в экспериментах по высвобождению полезной нагрузки под действием внешних полей: импульсного электрического и магнитного. Кроме того, липосомы были охарактеризованы методом просвечивающей электронной микроскопии (с использованием микроскопа LEO 912AB IOMEGA, рисунок 18). На представленных микрофотографиях видно, что липосомы имеют круглую форму, их размер составляет порядка 100-200 нм. Можно рассмотреть локализованные в мембране функциональные неорганические наночастицы. Липосомы имеют темный цвет благодаря загруженному во внутреннее пространство модельному флуоресцентному красителю-карбоксифлуоресцеину. Локализованные в липосомальной мембране наночастицы могут обеспечивать восприимчивость к внешним электрическим и магнитным полям (глава 3).

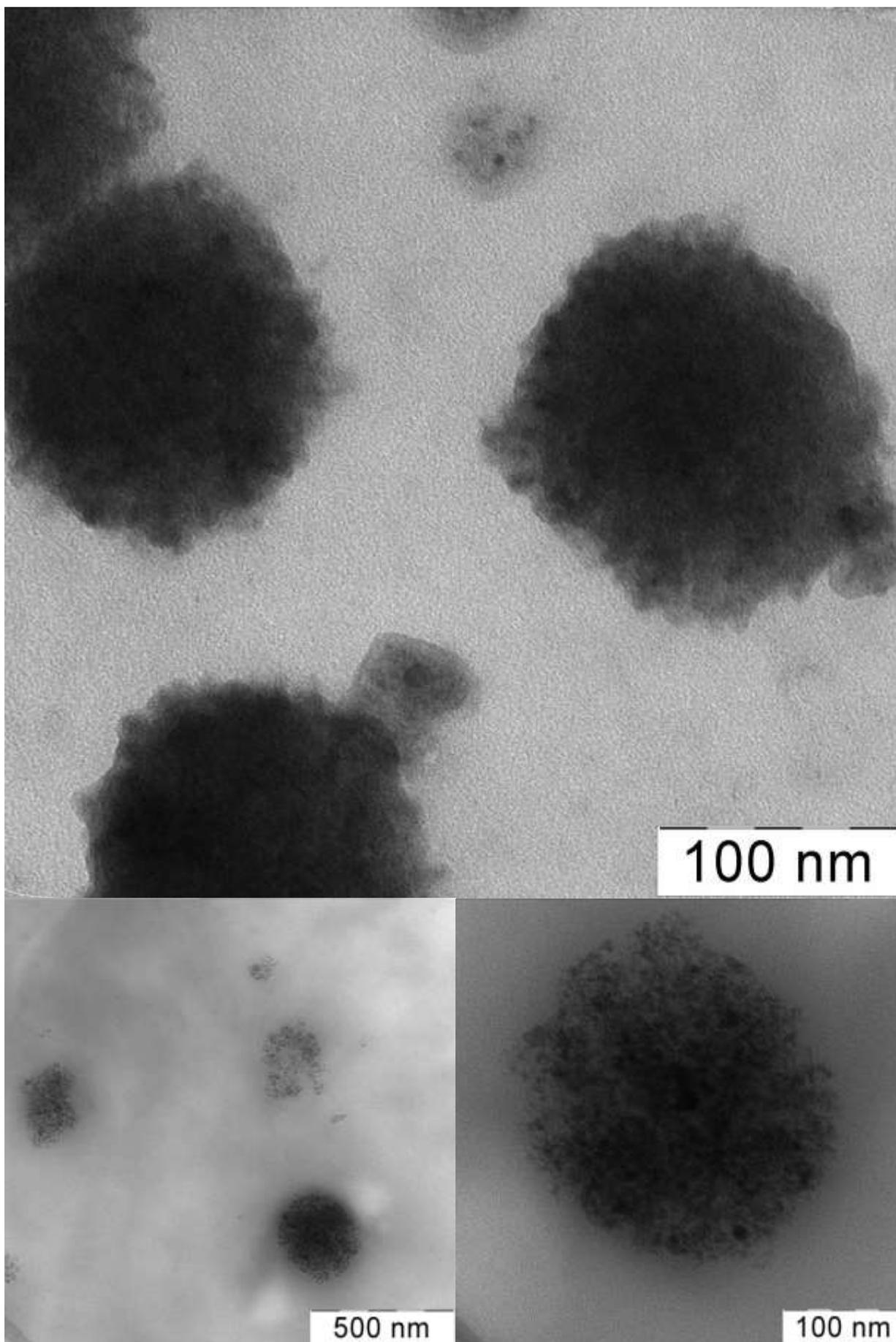


Рисунок 18. ПЭМ-изображения нанокomпозитных липосом, содержащих локализованные в гидрофобной области мембраны наночастицы магнетита.

### **2.2.2 Получение липосом с гидрофобизованными наночастицами золота, локализованными в гидрофобной области мембраны**

Модельными веществами, использованными для экспериментов с нанокompозитными липосомами, имеющими локализованные в мембране наночастицы золота, являлись раствор соли NaCl и противоопухолевый антибиотик доксорубин, широко применяемый в клинической практике и в исследованиях. Как и в случае липосом, содержащих локализованные в мембране наночастицы магнетита, в колбу было добавлено 5 мг фосфатидилхолина в виде спиртового раствора с концентрацией  $c=50$  мг/мл. Затем в раствор добавляли 0,4 мл суспензии гидрофобизованных золотых наночастиц. Смесь высушивали с помощью вакуумного роторного испарителя. Для экспериментов с исследованием загрузки в липосомы солевого раствора, в колбу, содержащую сухую липидную пленку, добавлялось 2 мл 1М раствора соли NaCl, и далее процедура получения липосом не отличалась от процедуры, описанной в главе 2.2.1. Для загрузки в липосомы доксорубина, в колбу, после высушивания смеси липидов при помощи вакуумного роторного испарителя добавляли 2 мл аптечного препарата Доксорубин ЛЭНС (ООО «Верофарм»), представляющего собой раствор доксорубина с концентрацией 2 мг/мл в физрастворе. Диализ липосом, загруженных доксорубином, после стандартной обработки ультразвуком проводился против физраствора. Он проходил в течение 3-5 часов, со сменой физраствора каждые 30 минут. Нанокompозитные липосомы с золотыми наночастицами подвергались характеристике с использованием методов атомно-силовой (АСМ) микроскопии и просвечивающей электронной микроскопии. Использование комплекса независимых методов позволяет установить сферическую форму липосом и их размеры, лежащие в диапазоне 70-300 нм. ПЭМ-микрoфотографии (рисунок 19) позволяют наблюдать локализованные в гидрофобной области мембраны функциональные золотые наночастицы.

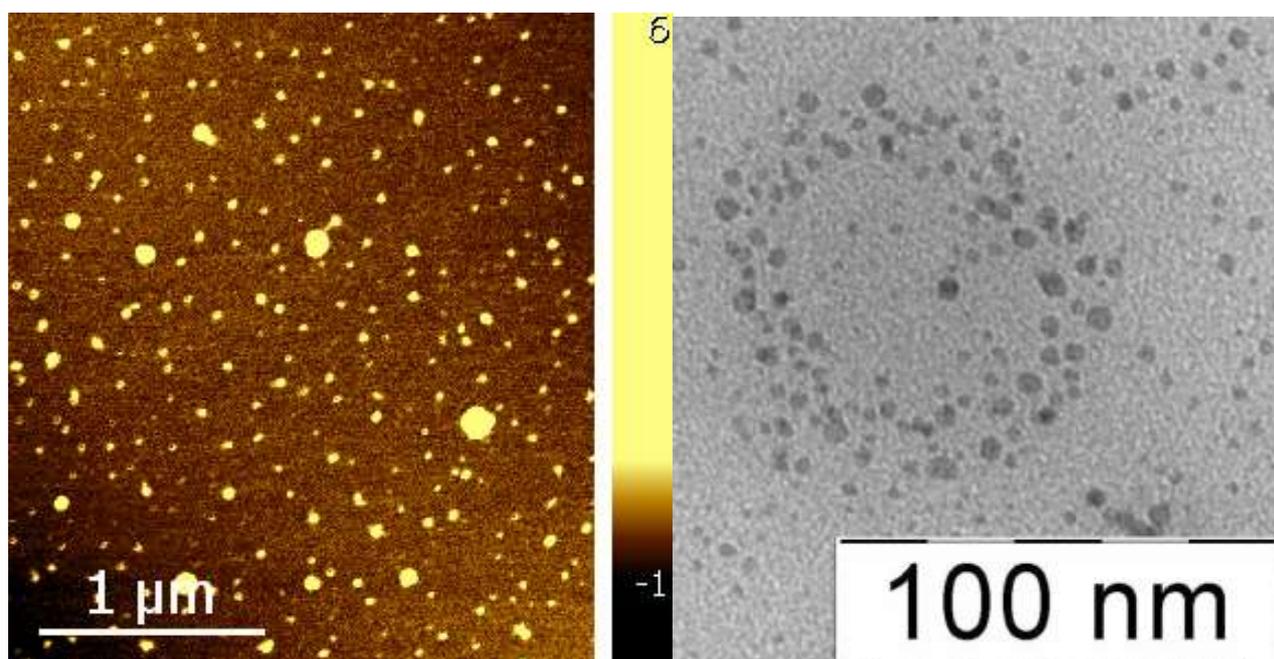


Рисунок 19. АСМ (слева) и ПЭМ (справа) микрофотографии липосом, содержащих локализованные в мембране золотые наночастицы

### **ГЛАВА 3. Исследование воздействия внешних электрических и магнитных полей на нанокompозитные липосомы**

#### **3.1 Воздействие внешних магнитных полей на липосомы, содержащие в мембранах гидрофобизованные наночастицы магнетита**

Образцы коллоидной суспензии нанокompозитных липосом, функционализированных гидрофобизованными наночастицами магнетита и загруженных раствором карбоксифлуоресцеина, экспонировались в постоянном магнитном поле напряженностью 1,9 кЭ в течение 1 часа. До и после воздействия производились измерения флуоресценции образцов при помощи флуоресцентного спектрофотометра Hitachi F-4000. Идея эксперимента обусловлена эффектом концентрационного тушения флуоресценции: внутри липосом краситель находится при концентрации большей, нежели концентрация самотушения. При выходе красителя из липосом во внешнюю, по отношению к липосомам, водную фазу раствора, он равномерно распределяется по объему суспензии, его концентрация снижается, что приводит к значительному увеличению интенсивности наблюдаемого сигнала флуоресценции.

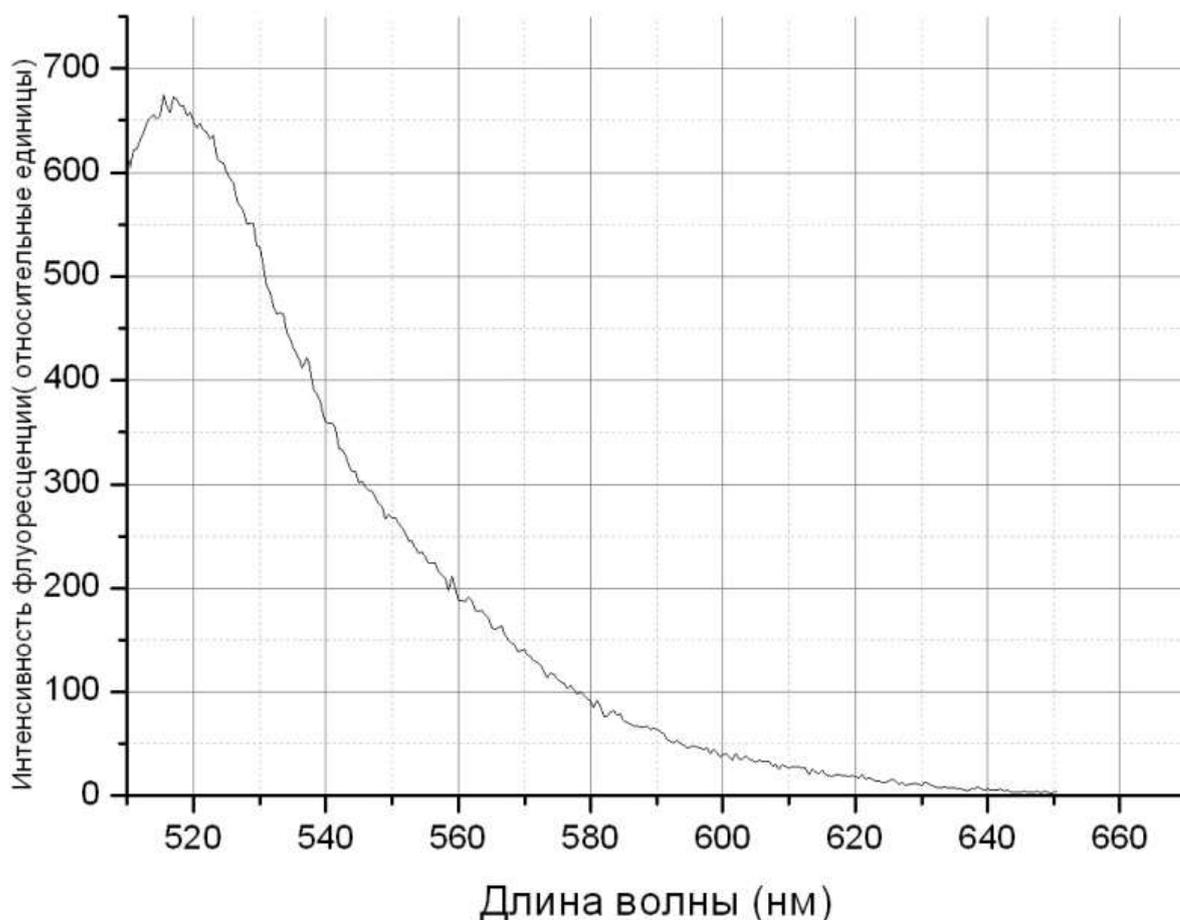


Рисунок 20. Спектр флуоресценции, характерный для красителя карбоксифлуоресцеина.

Таблица 1. Измерение флуоресценции загруженного карбоксифлуоресцеина (измерения для пика 517 нм.)

Без воздействия		После воздействия		Эффективность, по отношению пиков
Интенсивность, отн.ед.	Интенсивность после добавления Triton X100, отн.ед.	Интенсивность, отн.ед.	Интенсивность после добавления Triton X100, отн.ед.	
118±5	323,5±5	308±5	320±5	
Отношение интенсивностей пиков		Отношение интенсивностей пиков		
2,74±0,1		1,03±0,1		

Характерный для карбоксифлуоресцеина спектр флуоресценции можно видеть на рисунке 20. Длина волны возбуждения составляла 495 нм при ширине

щелей прибора 2,5 нм. Был использован спектрометр "Perkin-Elmer LS-55"(США). Для спектра карбоксифлуоресцеина характерен пик на 517 нм, обладающий концентрационной зависимостью (рисунок 21). Детергент Triton X-100, использованный для разрушения липосом, не влияет на интенсивность флуоресценции непосредственно. [146, 147]). Результаты измерения флуоресценции приводятся в таблице 1.

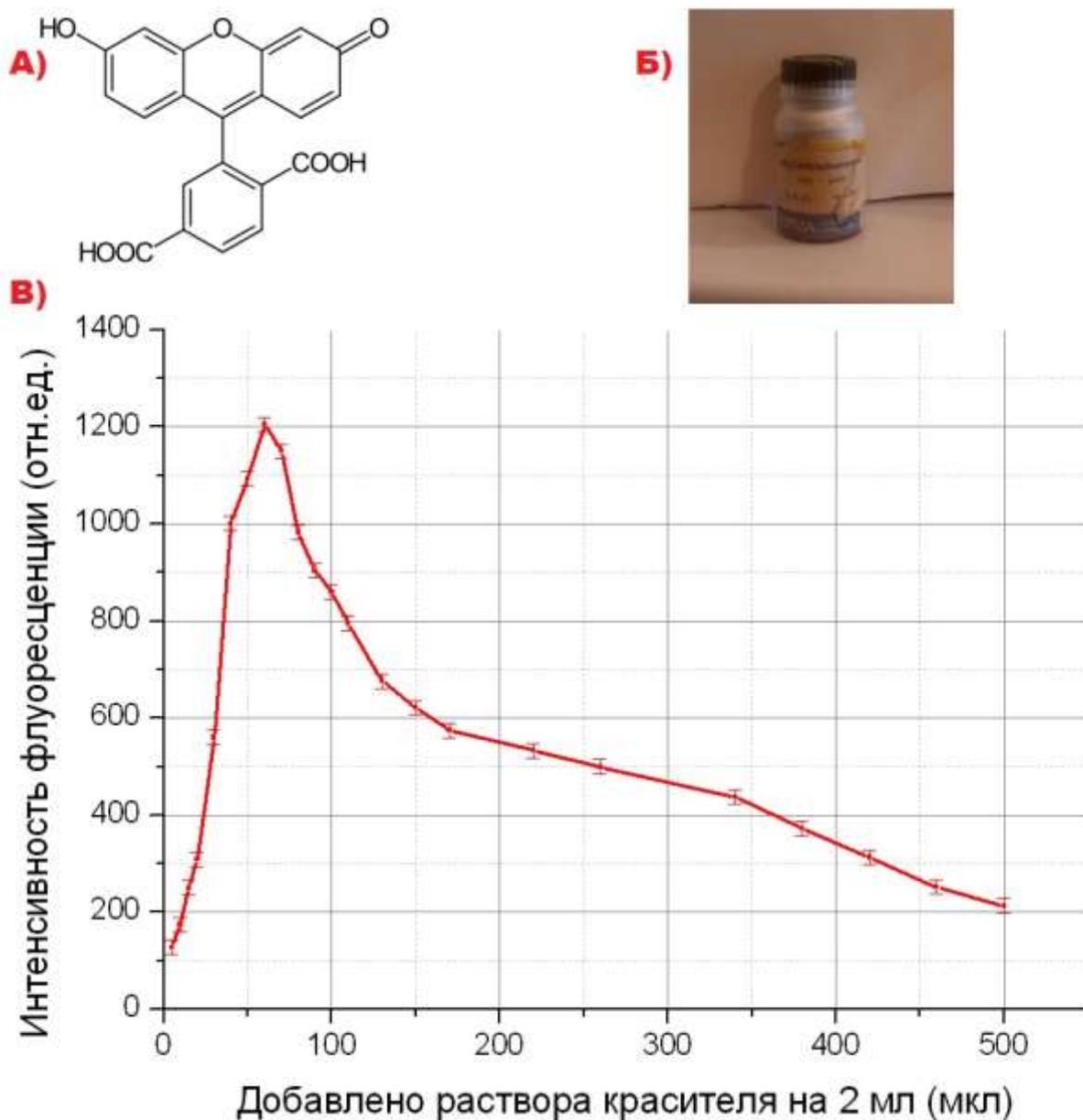


Рисунок 21. Эксперименты с карбоксифлуоресцеином, загруженным в липосомы. А) - формула карбоксифлуоресцеина, Б) - использовавшийся карбоксифлуоресцеин фирмы "Serva", В) - концентрационная зависимость для карбоксифлуоресцеина. Концентрация добавляемого в кювету раствора составляла 4,9 г/мл

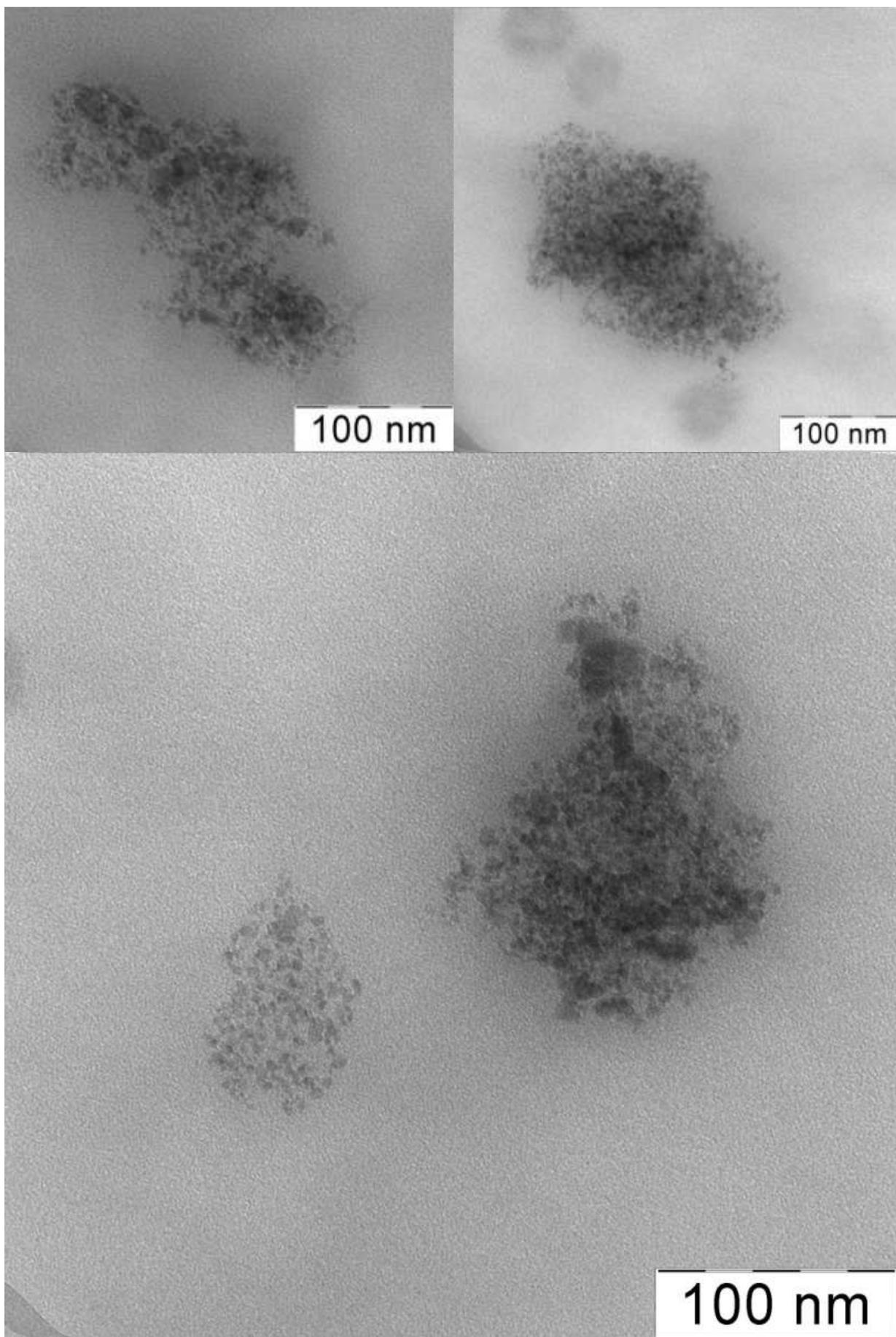


Рисунок 22. Высушенные во внешнем магнитном поле липосомы, содержащие наночастицы магнетита, локализованные в мембране. Изображения получены методом ПЭМ.

Данные результаты являются свидетельством того, что флуоресцентный краситель вышел из внутреннего объема липосом во внешний раствор. Наблюдаемый эффект выхода флуоресцентного красителя в раствор объясняется изменением проницаемости липосомальных мембран по причине их обусловленного внешним магнитным полем растяжения и деформации.

Кроме того, высушенные во внешнем поле образцы нанокompозитных липосом были охарактеризованы методом ПЭМ (рисунок 22). На ПЭМ-микрофотографии можно наблюдать изменение формы нанокompозитных липосом под действием внешнего магнитного поля. ПЭМ-изображения свидетельствуют об изменении формы липосом со сферической на эллипсоидальную. Более подробное теоретическое рассмотрение эффекта приводится в главе 4.

### **3.2 Воздействие импульсных электрических полей на липосомы, содержащие в мембранах золотые наночастицы, эксперимент с раствором NaCl**

Эксперимент, позволяющий наглядно установить влияние импульсов внешнего электрического поля на нанокompозитные липосомы, состоит в загрузке внутрь липосом солевого раствора NaCl (с последующим диализом, обеспечивающим удаление раствора соли из внешнего, по отношению к липосомам, объема водной фазы раствора). Затем проводится измерение проводимости суспензии таких липосом до и после воздействия импульсов. Наблюдаемый при этом скачок проводимости является свидетельством разрушения липосом и выхода из них солевого раствора. Для эксперимента с солевым раствором, пробирки с образцами, содержащие коллоидную суспензию нанокompозитных липосом, помещались между электродами в установке, генерирующей импульсы электрического поля (рисунок 23, справа). На электроды установки подавали импульсы напряжения 150 кВ, при этом зазор между электродами установки составлял не более 1 см, а продолжительность импульса не превышала 10 нс. На образцы воздействовали последовательностями в 10 и 50 им-

пульсов, до и после воздействия измерялась проводимость образцов. Результаты измерения электропроводности образцов приводятся в таблице 2.

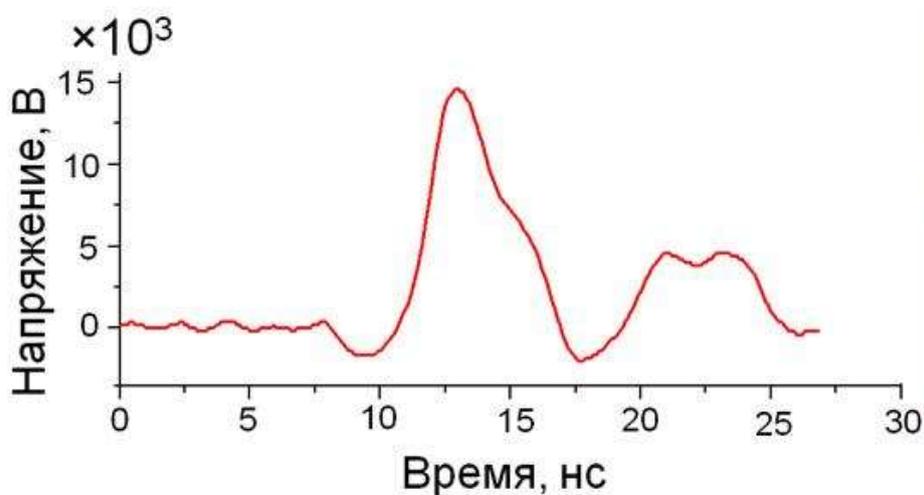


Рисунок 23. Одна из установок-генераторов импульсного электрического поля в ИРЭ РАН (справа). Типичная форма импульса, генерируемого установкой (пиковое напряжение может изменяться) – слева

Таблица 2. Результаты измерения проводимости для экспериментов с капсулированием раствора NaCl в нанокompозитных липосомах, содержащих гидрофобизованные золотые наночастицы.

Образец	Электропроводность образца $\mu\text{S}/\text{cm}$	Электропроводность образца после добавления TritonX-100 $\mu\text{S}/\text{cm}$	Электропроводность образца после 10 имп. $\mu\text{S}/\text{cm}$	Электропроводность образца после 10 имп. После добавления TritonX-100 $\mu\text{S}/\text{cm}$	Электропроводность образца после 50 имп. $\mu\text{S}/\text{cm}$
Липосомы с наночастицами №4 и NaCl	$40,0 \pm 0.6$	$76,0 \pm 0.6$	$50,0 \pm 0.6$	$75,8 \pm 0.6$	$74,0 \pm 0.6$
Эффективность воздействия)	$27 \pm 3\%$			$94 \pm 3\%$	
Липосомы с NaCl без наночастиц	$45,0 \pm 0.6$	$58,0 \pm 0.6$	$48,0 \pm 0.6$	$59,0 \pm 0.6$	$54,0 \pm 0.6$
Эффективность воздействия	$23 \pm 3\%$			$64 \pm 3\%$	

На основании приведенных данных можно сделать вывод о разрушении большей части нанокompозитных липосом с золотыми наночастицами под воздействием сверхкоротких импульсов внешнего электрического поля и выхода содержимого липосом во внешний раствор. Кроме того, были сделаны ПЭМ и АСМ-микрофотографии образцов, свидетельствующие о разрушении липосом под действием внешнего поля.

### 3.3 Воздействие импульсных электрических полей на липосомы, содержащие в мембранах золотые наночастицы, эксперимент с доксорубицином

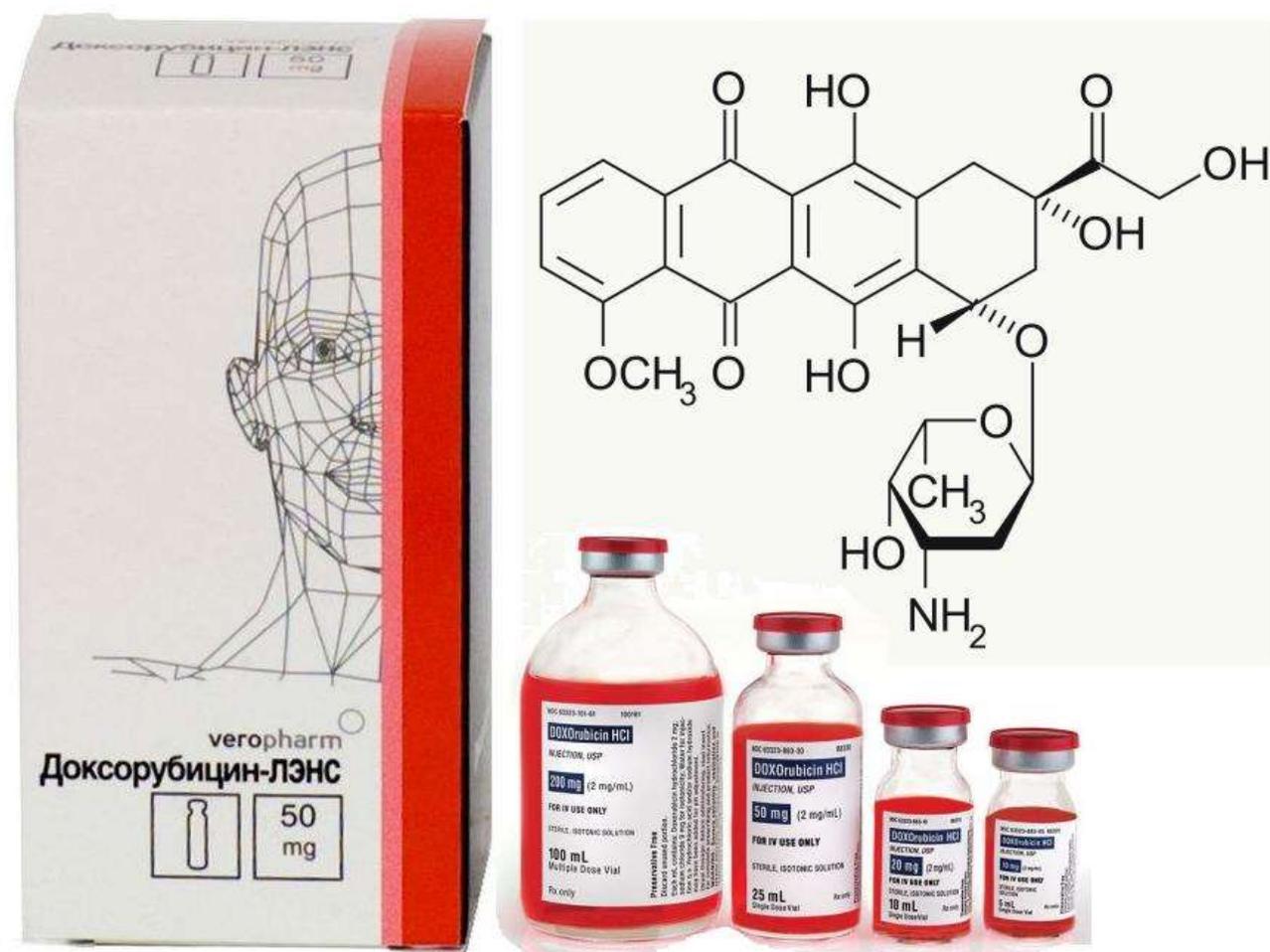


Рисунок 24. Доксорубицин. Слева - упаковка препарата, применявшегося нами в эксперименте, справа сверху - структурная химическая формула, справа внизу - ампулы с доксорубицином, имеющие характерную ярко-красную окраску.

Более подробно остановимся на экспериментах с загрузкой в нанокompозитные липосомы противоопухолевого антибиотика доксорубицина. Экспе-

рименты с загрузкой доксорубицина в липосомы представляют собой наиболее приближенную к практическому применению модель.

Доксорубин ( $C_{27}H_{29}NO_{11}$ ) – появившийся в начале 60-ых годов антибиотик антрациклинового ряда с цитостатическим эффектом (рисунок 24). Широко применяется для лечения ряда онкологических заболеваний. Поскольку молекула доксорубицина имеет большое количество сопряженных  $\pi$  – связей, препарат обладает свойством флуоресценции [148], что делает его идеальным кандидатом в качестве модельного в исследованиях, связанных с доставкой лекарств. На рисунке 25 приводится спектр флуоресценции для доксорубицина, снятый при следующих параметрах: длина волны возбуждения составляла 490 нм, длина волны испускания – 560 нм, ширина щелей составляла по 2,5 нм. Был использован спектрометр "Perkin-Elmer LS-55"(США).

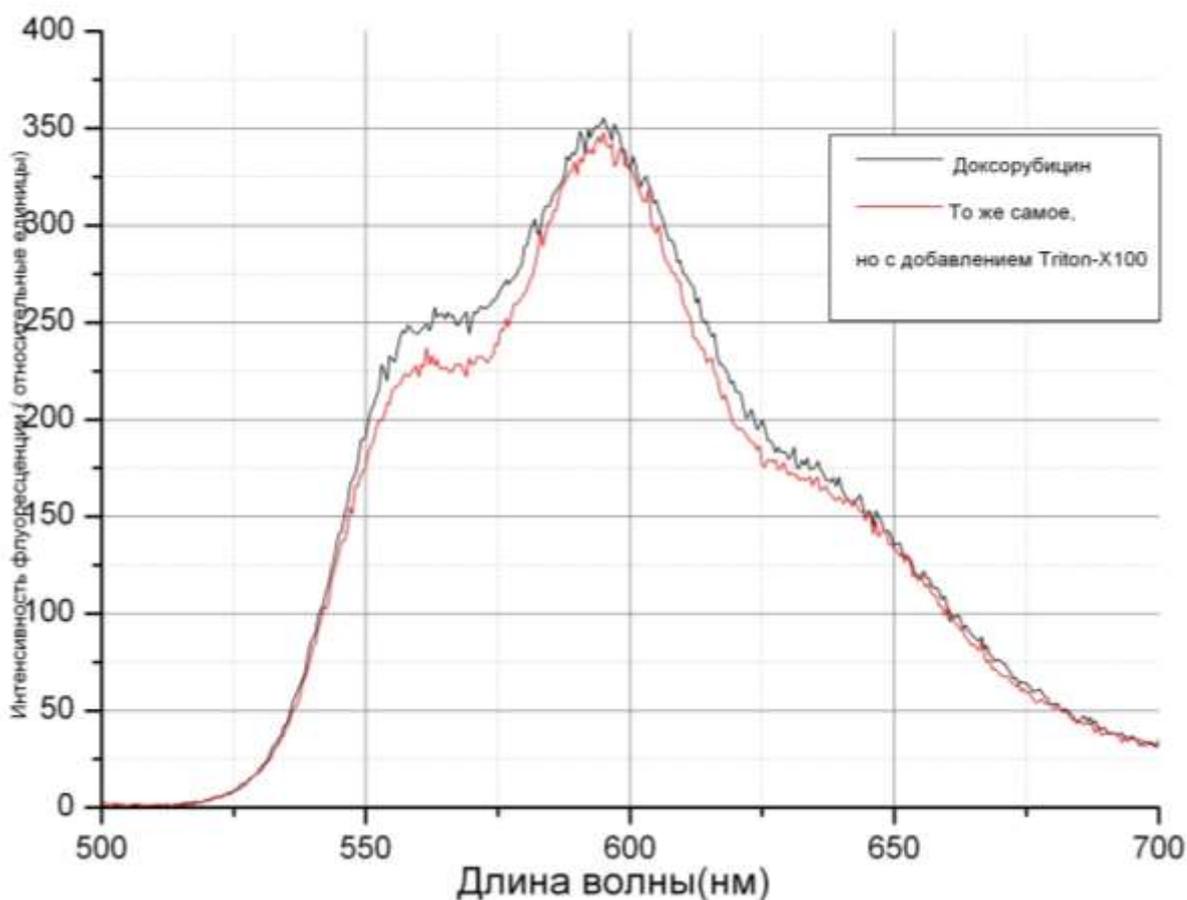


Рисунок 25. Спектр флуоресценции противоопухолевого препарата доксорубицина. Верхний график - для 40 мкл доксорубицина-ЛЭНС, нижний график - то же самое, но с добавлением детергента Тритон X-100.

Анализируя рисунок 25, можно заметить, что добавление детергента незначительно снижает интенсивность флуоресценции доксорубина, а на некоторых участках спектра не оказывает на нее влияния. Необходимость сравнения флуоресценции, как в случае добавления тритона X-100, так и в его отсутствии, обусловлена тем, что в экспериментах измерялась интенсивность флуоресценции пиков как сразу после воздействия, так и после обработки подвергшихся воздействию образцов детергентом Triton X-100. Это позволяет оценить долю липосом, оставшихся невскрытыми после импульса электрического поля.

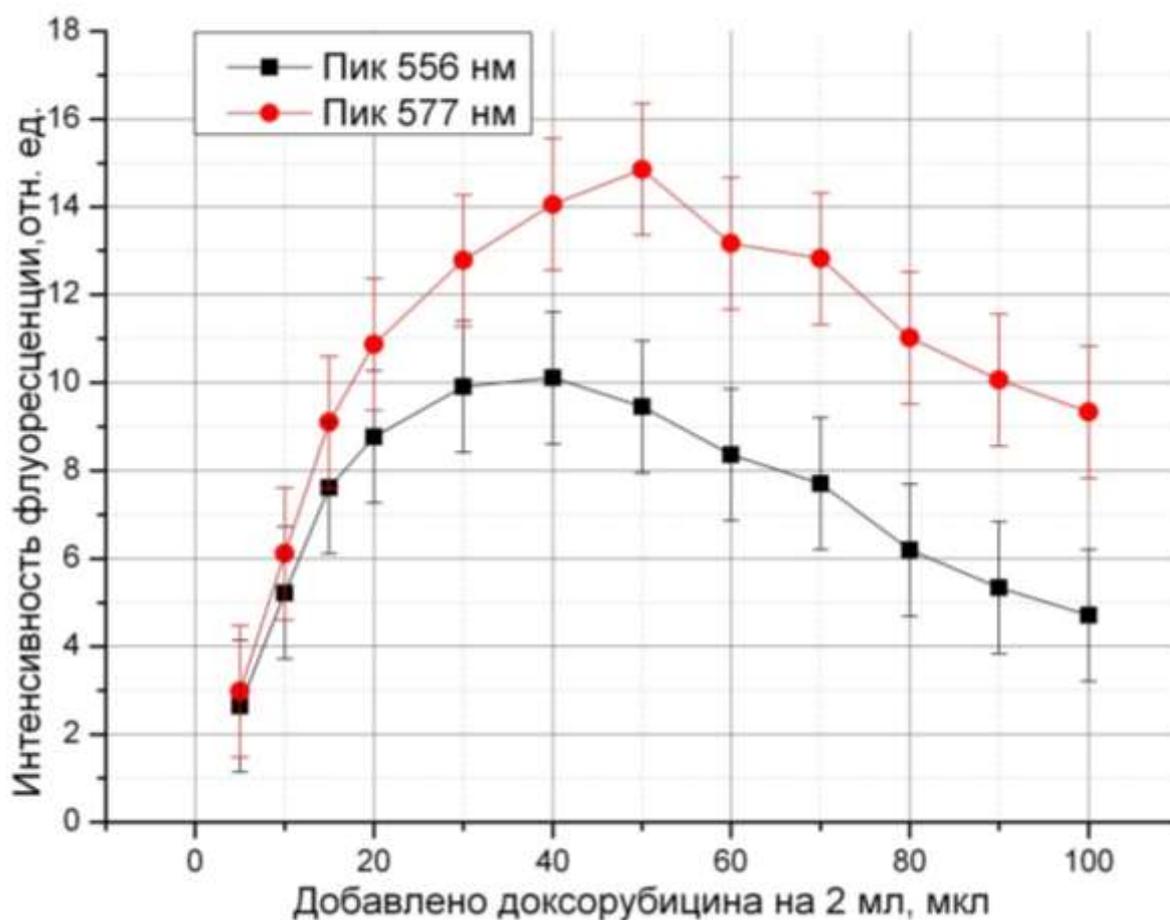


Рисунок 26. Концентрационная зависимость интенсивности флуоресценции доксорубина для двух пиков. Круги (верхняя линия) - для пика 575 нм, нижняя линия (квадраты) для пика 550 нм.

Идея описанного в данной работе эксперимента основывается на использовании концентрационной зависимости флуоресценции доксорубина для пика 577 нм (Рисунок 26). Если концентрация загруженного в липосомы доксорубина соответствует правым ветвям графика на Рисунок 26, то при

разрушении липосом, доксорубин равномерно распределяется в растворе. Это сопровождается уменьшением концентрации доксорубина и возрастанием интенсивности флуоресценции. В эксперименте по воздействию сверхкоротких импульсов электрического поля на нанокompозитные липосомы с золотыми наночастицами и доксорубином было дано 10 импульсов наносекундной длительности. При этом расстояние между электродами стандартной электропорационной кюветы составляло 2 мм, а напряжение между электродами составляло порядка 4,5 кВ. Результаты эксперимента приводятся в таблице 3:

Таблица 3. Результаты измерения флуоресценции доксорубина при воздействии внешнего электрического поля на нанокompозитные и контрольные липосомы, содержащие капсулированный доксорубин.

Образец	Интенсивность флуоресценции, отн.ед.	Интенсивность флуоресценции после добавления TritonX-100, отн.ед.	Интенсивность флуоресценции после воздействия, отн.ед.	Интенсивность флуоресценции после воздействия и добавления TritonX-100, отн.ед.	Эффективность воздействия, оценивая по отношению пиков
Липосомы с наночастицами	185,3±5	241,6±5	169,3±5	191,2±5	96,6±2
Отношение пиков	1,303±0,03		1,12±0,03		
Липосомы без наночастиц	156,1±5	212,0±5	151,0±5	303,6±5	33,3±2
Отношение пиков	1,36±0,03		1,348±0,03		

Анализ полученных в результате эксперимента данных позволяет сделать следующий вывод: нанокompозитные липосомы эффективно капсулируют доксорубин во внутреннем объеме. Однако при воздействии внешних импульсов электрического поля, липосомы разрушаются, доксорубин выходит в раствор, при этом изменяется наблюдаемый спектр флуоресценции. О разру-

шении липосом под действием внешних импульсов так же свидетельствуют результаты характеристики образцов методами ПЭМ и АСМ (рисунок 27).

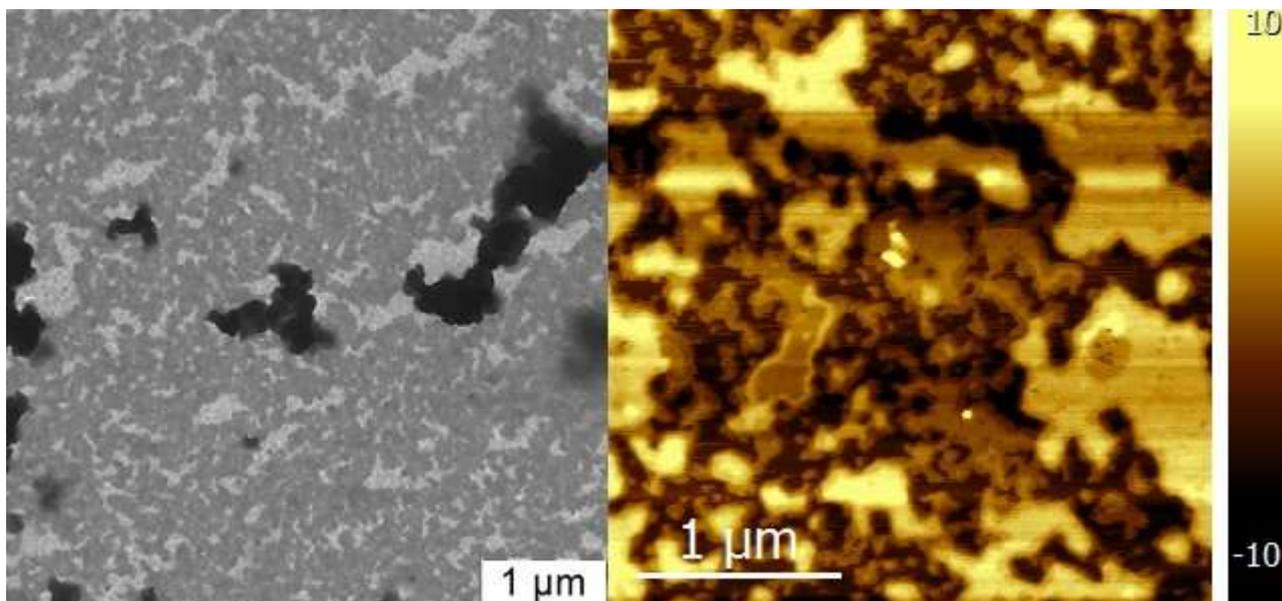


Рисунок 27. ПЭМ (слева) и АСМ (справа) - изображения образца липосом после воздействия импульсов электрического поля. Видны фрагменты разрушенных липосом.

### 3.4 Цитотоксичность липосом с локализованными в мембране наночастицами

Поскольку разрабатываемые нанокompозитные липосомы обладают широкими перспективами биомедицинского применения и внедрения в клиническую практику, в сотрудничестве с коллегами (кафедра высокомолекулярных соединений химического факультета МГУ) был проведен эксперимент по измерению цитотоксичности липосом. Цитотоксичность липосом измерялась на клеточной линии A375 (меланома человека) стандартным МТТ-тестом, основанным на способности митохондриальных дегидрогеназ и эстераз конвертировать водорастворимый 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид (МТТ) желтого цвета в пурпурный формазан, образующий кристаллы внутри клетки. Поскольку образование формазана происходит только в живых клетках, его количество позволяет рассчитать процент выживших клеток от их общего числа после добавления исследуемого реагента.

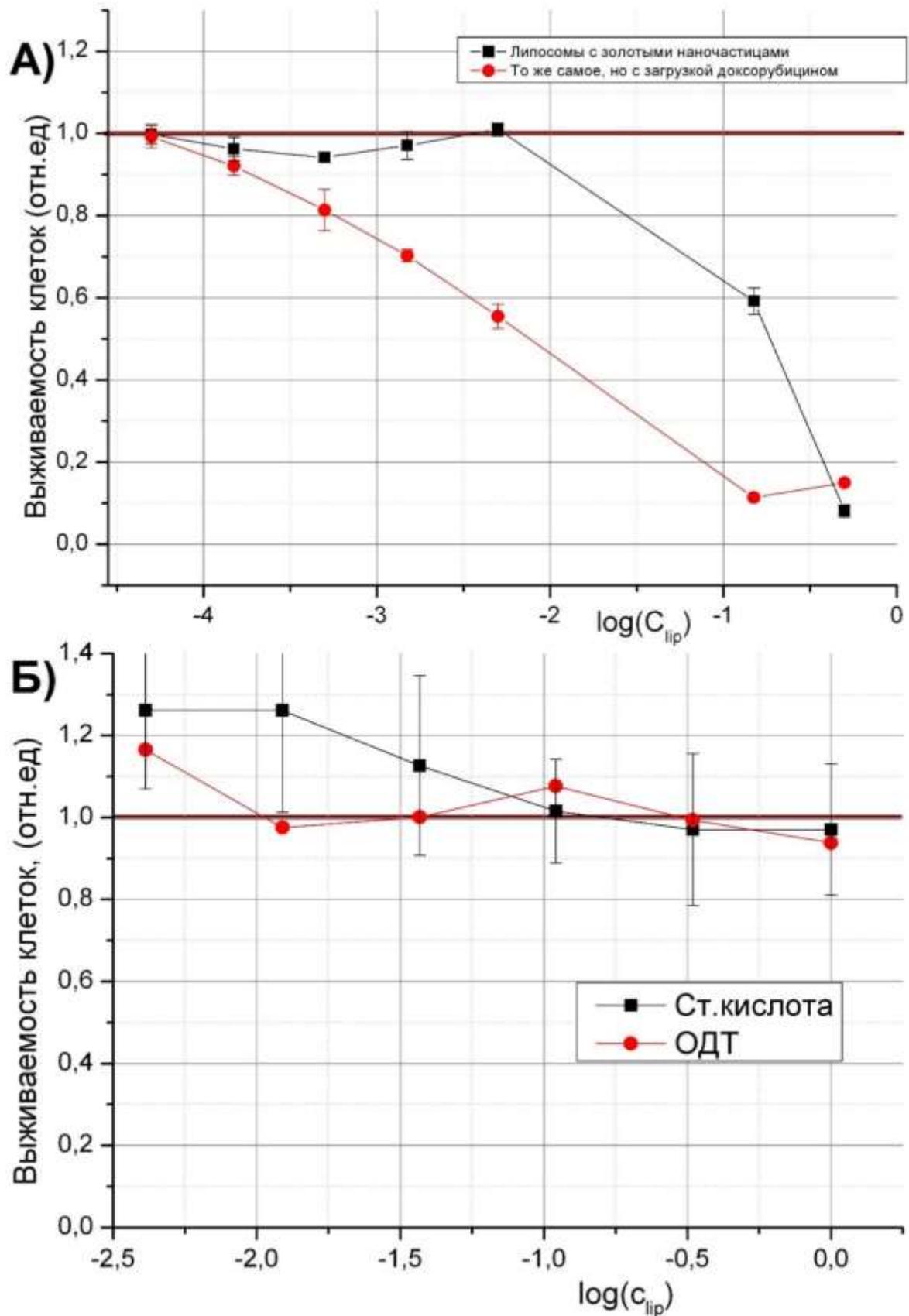


Рисунок 28. Цитотоксичность нанокompозитных липосом. А) – липосомы содержат гидрофобизованные наночастицы золота, Б) – липосомы содержат гидрофобизованные наночастицы магнетита. По оси x в обоих случаях отложен логарифм концентрации липосом в мг/мл.

Исследуемые нанокompозитные липосомы добавлялись к культуре клеток в сыворотке DMEM, содержащей соли, аминокислоты и витамины, необходимые для жизни и размножения клеток. В каждом эксперименте было задействовано одинаковое количество клеток, причем засевалось порядка 70% от общей площади ячейки. Раствор липосом выдерживали с клетками в течение 1 часа, добавляли МТТ и инкубировали клетки еще в течение 1 часа. Затем удаляли верхний слой жидкости и переводили формазан в раствор добавлением диметилсульфоксида. Раствор фотометрировали при длине волны 550 нм. Сопоставляя изменение оптической плотности раствора по отношению к контролю, определяли количество формазана в каждой пробе. На основании этих данных получали зависимость доли выживших клеток от концентрации добавленного субстрата и определяли концентрации липосом без загрузки доксорубицином и загруженных липосом, при которых они убивали 50% клеток (LC50). Каждый эксперимент был проведен трижды. Результат измерения цитотоксичности образцов представлен на графиках (рисунок 28).

На рисунке 28, А, представлены результаты измерения цитотоксичности для липосом, содержащих золотые наночастицы, локализованные в мембране, с загрузкой доксорубицином (круглые точки, красная линия) и без таковой (квадратные точки, черная линия). Рисунок 28, Б отображает результаты измерения цитотоксичности для образцов липосом, содержащих в мембране наночастицы магнетита, гидрофобизованные с использованием стеариновой кислоты (квадратные точки, черная линия) и ОДТ (круглые точки, красная линия). Бордовая линия обоих графиков соответствует уровню выживаемости в отсутствие добавления липосом в клеточную культуру, концентрация добавленных суспензий липосом измерялась в мг/мл. Анализ графика 28, А свидетельствует о том, что липосомы, содержащие локализованные в межмембранном пространстве наночастицы золота не проявляют выраженных цитотоксических свойств при концентрациях менее 0,5 мг/мл. В то же время, при загрузке внутрь липосом противоопухолевого препарата доксорубицина, цитотоксические свойства липосом проявляются уже при их концентрации 0,005 мг/мл, что является под-

тверждением эффективности доставки модельного лекарства – доксорубицина такими липосомами.

Анализируя график 28, Б можно сделать вывод о практически полном отсутствии цитотоксичности во всем диапазоне концентраций, на котором проводились измерения (от 0,004 до 1 мг/мл), как для образцов липосом, содержащих в мембране наночастицы магнетита, гидрофобизованные с помощью стеариновой кислоты, так и для образцов липосом, содержащих в мембранах наночастицы магнетита, гидрофобизованные с помощью ОДТ. Более того, присутствие наночастиц магнетита в нанокompозитных липосомах, добавляемых в культуры клеток, приводит к определенному увеличению выживаемости клеток по сравнению с контролем (в отсутствие добавок липосом). Этот эффект может быть следствием биогенности и полной биосовместимости наночастиц магнетита, метаболизирующихся клетками.

## **ГЛАВА 4. Теоретические оценки наблюдаемых эффектов**

### **4.1 Механизмы разрушения нанокompозитных липосом во внешнем электрическом поле**

Построение адекватной теоретической модели, описывающей поведение нанокompозитных липосом во внешних электрических полях как *in vitro*, так и *in vivo* является нетривиальной биофизической задачей, требующей учета ряда факторов. Воздействие внешнего импульса электрического поля на суспензию нанокompозитных липосом может приводить к возникновению трансмембранного электрического потенциала и пробоем по методу электропорации, поляризации внутреннего раствора липосом, а также поляризации проводящих неорганических наночастиц, локализованных в мембране. Для подсчета потенциала, возникающего на мембранах липосом под действием импульсов внешнего электрического поля, в первом приближении можно воспользоваться уравнением Швана (см главу 1.4.2, формула 1, а также [137]). Следует заметить, что в уравнении Швана в показателе экспоненты находится постоянная  $\tau$ , имеющая

смысл характерного времени заряда мембраны как конденсатора. В общем виде Шваном было предложено следующее выражение для этой константы [149]:

$$\tau = R_{\text{кл}} C_{\text{мембр}} \frac{\lambda_{\text{внутр}} + 2\lambda_{\text{внеш}}}{2\lambda_{\text{внутр}}\lambda_{\text{внеш}} + R_{\text{кл}} G_{\text{мембр}} (\lambda_{\text{внутр}} + 2\lambda_{\text{внеш}})} \quad (3)$$

Здесь  $R_{\text{кл}}$  – радиус клетки,  $C_{\text{мембр}}$  – характерное значение емкости мембраны,  $\lambda_{\text{внутр}}$  и  $\lambda_{\text{внеш}}$  – характерные значения проводимостей для внутренней среды клетки и внеклеточного раствора.  $G_{\text{мембр}}$  представляет собой проводимость клеточной мембраны. Как правило, величина проводимости клеточной мембраны весьма мала, поэтому чаще всего в первом приближении клеточную (в нашем случае липосомальную) мембрану полагают идеальным диэлектриком, формула 3 при этом принимает следующий вид [149, 150]:

$$\tau \approx R_{\text{кл}} C_{\text{мембр}} \frac{\lambda_{\text{внутр}} + 2\lambda_{\text{внеш}}}{2\lambda_{\text{внутр}}\lambda_{\text{внеш}}} \quad (4)$$

Отметим, что в отличие от случая с электропорацией клетки, для экспериментов с воздействием импульсов электрического поля на суспензию липосом в электропорационной кювете, описанных в главе 3,3 имеем:  $\lambda_{\text{внутр}} = \lambda_{\text{внеш}} = \sigma_{\text{физраствора}} = 1.3846$  Сименс/м [151]. При этом формула 4 еще более упрощается и принимает следующий вид:

$$\tau \approx \frac{3R_{\text{кл}} C_{\text{мембр}}}{2\delta_{\text{физраствора}}} \quad (5)$$

Радиус липосомы примем равным 150 нм. В книге [149] приводится значение  $C_{\text{мембр}} \approx 1$  мкФ/см<sup>2</sup>, однако следует отметить, что данное значение характерно для клеточных мембран, удельная емкость искусственной бислойной мембраны из фосфатидилхолина, образующей липосомы, как правило, несколько ниже [152]. Для практической оценки эффекта нарастания электрического потенциала на липосомальных мембранах во внешнем поле, воспользуемся данными из [153]. Значение удельной емкости мембран, построенных из фосфатидилхолина, в зависимости от длины цепи может варьировать от  $0,375 \cdot 10^{-2}$  Ф/м<sup>2</sup> до  $0,81 \cdot 10^{-2}$  Ф/м<sup>2</sup>. Результаты оценки трансмембранного потен-

циала с использованием уравнения Швана (формула 1, глава 1.4.2) удобно представить в виде таблицы (таблица 4).

Таблица 4. Оценки значений трансмембранного потенциала при воздействии внешних полей на липосомы, с использованием уравнения Швана (формула 1).

Эксперимент	Характерные времена зарядки мембран, секунд	Достигающаяся в эксперименте величина трансмембранного потенциала, мВ	Предельная величина потенциала, (при бесконечной длительности импульса), мВ	Отношение достигающейся величины потенциала к предельной
С солевым раствором (глава 3.2, расчет по формуле 3)	$5,627 \cdot 10^{-7}$ - $1,21 \cdot 10^{-6}$	59-5,9	3375	1,7-0,1%
С раствором доксорубицина (глава 3.3, расчет по формуле 4)	$1,31 \cdot 10^{-7}$ - $6,09 \cdot 10^{-8}$	76,66-37,2	506	15,3-7,3%

Следует отметить, что согласно данным из [152] для пробоя бислоевых липидных мембран, необходимо возникновение на них напряжений порядка 150-300 мВ. Несмотря на меньший, в сравнении с большинством эукариотических клеток, размер, длительностей импульсов, применяемых в описанных в главе 3 экспериментах, недостаточно для пробоя липосомальных мембран по методу электропорации. В зависимости от параметра емкости бислоя, возникающие на мембранах липосом потенциалы меньше критических в разы или на порядки.

Под действием импульсов внешнего электрического поля происходит перемещение заряженных частиц. Это является наиболее общим механизмом, объясняющим как поляризацию содержимого липосом, так и поляризацию локализованных в гидрофобной области липосомальных мембран, проводящих

наночастиц золота. Однако следует отметить, что массы основных носителей заряда в растворе внутри и вне липосом (ионы) и в проводящих наночастицах золота (электроны) отличаются на порядки. На этом основании, ожидаемо, что под действием внешних электрических полей, процесс поляризации наночастиц будет проходить на порядки быстрее, нежели нарастание трансмембранного потенциала, обусловленное поляризацией содержимого липосом.

Остановимся более подробно на простых оценках характерных времен процессов, происходящих при воздействии внешних электрических полей на нанокompозитные липосомы с проводящими наночастицами в мембране. Приблизительную оценку сверху характерных времен поляризации наночастиц можно получить, разделив средний размер наночастиц на т.н. дрейфовую скорость электронов. Среднюю дрейфовую, т.е. обусловленную внешним полем скорость движения носителей заряда представляется возможным оценить с помощью широко известной формулы:

$$|\vec{v}_{др}| = \mu * \vec{E} \quad (6)$$

Коэффициент пропорциональности между средней дрейфовой скоростью электронов и напряженностью поля, обуславливающего движение электронов, носит название подвижности электронов и имеет размерность  $\text{м}^2/\text{с}*\text{В}$ . Для золота коэффициент подвижности электронов  $\mu$  равен  $30*10^{-4} \text{ м}^2/\text{с}*\text{В}$  [154]. Грубые оценки характерных времен происходящих процессов, для описанных экспериментов удобно представить в виде таблицы (таблица 5).

Проанализировав указанные в таблице 5 временные оценки, отметим, что характерные времена процессов, описывающих поляризацию золотых наночастиц, на несколько порядков меньше, нежели длительности импульсов электрического поля в проведенных экспериментах (десятки наносекунд). По этой причине процесс поляризации электропроводящих наночастиц, локализованных в гидрофобных областях липосомальных мембран, представляется возможным рассматривать в предположении квазистационарного поля. В то же время, процессы поляризации внутреннего содержимого липосомы и нараста-

ния обусловленного этим трансмембранного потенциала обладают характерными временами, сравнимыми со временем импульса. По этой причине, процесс необходимо рассматривать в динамике.

Таблица 5. Оценки характерных времен для процессов, происходящих в липосомах с золотыми наночастицами, во внешних импульсных электрических полях

Эксперимент	Характерные времена зарядки мембран, секунд	Время распространения напряженности электрического поля, с	Характерная дрейфовая скорость для движения электронов, м/с	Характерное время для поляризации частиц, секунд.
С солевым раствором (глава 3.2)	$5,627 \cdot 10^{-7}$ - $1,21 \cdot 10^{-6}$	$3,3 \cdot 10^{-11}$	450	$9,11 \cdot 10^{-12}$
С раствором доксорубицина (глава 3.3)	$1,31 \cdot 10^{-7}$ - $6,09 \cdot 10^{-8}$	$6,67 \cdot 10^{-12}$	$13,5^2$	$3,037 \cdot 10^{-10}$

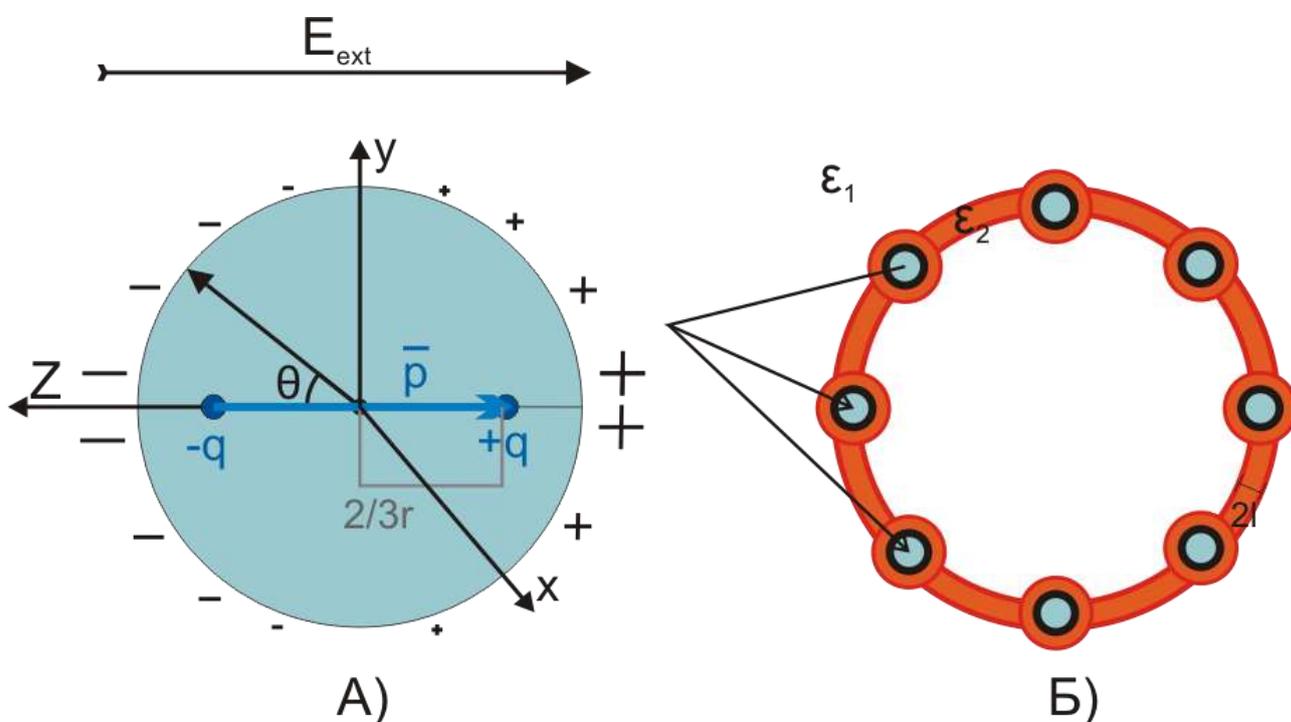


Рисунок 29. А) проводящий шар во внешнем постоянном электрическом поле (пояснения в тексте) Б) нанокompозитная липосома с проводящими золотыми наночастицами.

<sup>2</sup> Данная скорость рассчитана без учета наличия ионов в физрастворе, содержащем суспензию липосом.

Отметим, что физической величиной, характеризующей силовые свойства электрического поля и его способность оказывать влияние на липидную мембрану, является напряженность электрического поля  $E$ . Согласно литературным данным [152] для критического трансмембранного потенциала и толщины липидного бислоя, критические значения напряженности электрического поля  $E$ , вызывающие пробой мембраны, составляют порядка  $3,75 \cdot 10^7 - 7,5 \cdot 10^7$  В/м. В качестве нулевого приближения для оценки влияния наличия проводящих наночастиц в гидрофобных областях липосомальных мембран представляется возможным рассмотреть задачи о поляризации проводящей частицы сферической формы в диэлектрической среде. Наиболее подробно решение задачи о поляризации сферического проводника рассмотрено в [155].

Пусть проводящая наночастица сферической формы находится в однородном внешнем электрическом поле. Направим ось  $z$  параллельно вектору напряженности внешнего поля (см рисунок 29). Во внешнем поле проводящая частица поляризуется, и ее можно представить в виде диполя с дипольным моментом, который выражается следующей формулой:

$$\vec{p} = 3V_{\text{ч}}\varepsilon_0\vec{E}_{\text{вн}} = 4\pi r_{\text{ч}}^3\varepsilon_0\vec{E}_{\text{вн}} \quad (7)$$

Здесь  $V_{\text{ч}}$  – объем частицы,  $r_{\text{ч}}$  – радиус частицы,  $E_{\text{вн}}$  – напряженность внешнего поля. Поле такого диполя выражается следующей формулой:

$$\vec{E} = \frac{1}{4\pi\varepsilon_0} \left( \frac{3(\vec{p}\vec{r})\vec{r}}{r^5} - \frac{\vec{p}}{r^3} \right) \quad (8)$$

Здесь  $r$  – радиус вектор, проведенный из центра частицы в интересующую нас точку пространства. Максимальная напряженность поля достигается для точек, лежащих на оси  $z$  (см рисунок 29, а). Для точек оси  $z$ , с учетом (7), получаем следующую формулу для напряженности поля диполя:

$$\vec{E} = \frac{2r_{\text{ч}}^3\vec{E}_{\text{вн}}}{(r_{\text{ч}} + l)^3} \quad (9)$$

$L$  в формуле (9) представляет собой расстояние от поверхности поляризованной частицы до интересующей нас точки координатной оси  $z$ . При  $l=0$ , т.е. для точки возле поверхности частицы  $E=2*E_{вн}$ .

Обратим внимание, что формула (8) была получена в предположении  $r \gg 1$ , т.е. расстояние между диполем и интересующей нас точкой пространства много больше линейных размеров диполя. В то же время, в контексте рассматриваемой нами задачи, нас интересует поле на расстояниях от поверхности частицы и до полутолщины липидного бислоя (примерно 1,98 нм) [152]. Это расстояние сравнимо с линейными размерами золотой наночастицы (радиус которой равен 4,1 нм), а значит и с линейными размерами диполя, аппроксимирующего наночастицу, поляризованную во внешнем электрическом поле. Моделью, более точно описывающей поле поляризованной наночастицы во внешнем поле, является неточечный диполь, представляющий собой два точечных заряда, одинаковые по модулю и разной полярности. В рассматриваемой нами модели, распределение поверхностной плотности индуцированных на поверхности частицы зарядов, имеет следующий вид (см рисунок 29) [155].

$$\sigma = 3\varepsilon_0 E_{вн} \cos(\theta) \quad (10)$$

Линией, разделяющей область положительного и отрицательного зарядов, является окружность  $\theta=0$ . Для того, чтобы определить величину зарядов, образующих диполь, необходимо проинтегрировать формулу (10):

$$Q = \int_0^{2\pi} \int_0^{\frac{\pi}{2}} 3r^2 \varepsilon_0 E_{вн} \cos(\theta) \sqrt{\sin^2(\theta)} d\varphi d\theta = 3\pi r^2 \varepsilon_0 E_{вн} \quad (11)$$

Для вычисления напряженности электрического поля, создаваемого неточечным диполем, необходима не только величина зарядов, образующих диполь, но и так называемое «плечо» диполя – расстояние между двумя точечными фиктивными зарядами. Формула, являющаяся определением электрического дипольного момента, выглядит так:

$$\vec{p} = q * \vec{l}_{\text{дип}} \quad (12)$$

Плечо диполя  $l_{\text{дип}}$  представляет собой вектор, по модулю равный расстоянию между двумя зарядами, образующими диполь, направленный от отрицательного заряда к положительному. Разделив (7) на (11), для плеча диполя получим, что расстояние между двумя фиктивными точечными зарядами, образующие диполь, приближающий частицу, будет равно  $4/3r_{\text{частицы}}$ , то есть так, как и показано на рисунке 29. Максимальное значение напряженности может быть достигнуто в точке, лежащей на оси z, для этого случая можно записать следующее выражение:

$$\vec{E}_{\text{дип}} = \frac{3}{4} r_{\text{ч}}^2 E_{\text{вн}} \left( \frac{1}{\left(\frac{r_{\text{ч}}}{3} + l\right)^2} - \frac{1}{\left(\frac{5}{3}r_{\text{ч}} + l\right)^2} \right) \quad (13)$$

Если упростить формулу (13), то можно получить выражение, более удобное для практических расчетов и оценок:

$$\vec{E}_{\text{дип}} = 2E_{\text{вн}} r_{\text{ч}}^2 \frac{r_{\text{ч}}^2 + r_{\text{ч}}l}{\left(\frac{5r_{\text{ч}}^2}{9} + 2r_{\text{ч}}l + l^2\right)^2} \quad (14)$$

Следует отметить, что в приближении  $l=0$ , то есть для оценки поля на поверхности частицы, с использованием формулы 14, мы имеем напряженность поля, превышающую напряженность внешнего поля в 6,48 раз. Согласно литературным данным, металлические проводящие наночастицы действительно способны усиливать напряженность приложенного электрического поля в разы [141, 156]. Применим формулы (9) и (14) для численной оценки максимальных величин напряженностей электрического поля вблизи проводящих наночастиц, на расстояниях от частицы и до 1,98 нм (толщина монослоя липидов, образующих липосомальную мембрану). Оценки представим в виде Таблицы 6.

Оценки с использованием формулы (14) показывают, что величина напряженности электрического поля вблизи проводящей золотой наночастицы сравнима с критической величиной напряженности, приводящей к пробою мембраны. Следует отметить, что решение уравнения Лапласа, а так же чис-

ленный эксперимент в предположении дискретных диполей для вытянутой эллипсоидальной проводящей наночастицы с полуосями 10 нм и 40 нм показывают увеличение напряженности электрического поля в десятки и сотни раз [141].

Таблица 6. Численные оценки для напряженности электрического поля вблизи сферических проводящих наночастиц.

Приложенное поле, В/м	Поле в дипольном приближении без учета диэлектрической проницаемости, В/м	Поле в дипольном приближении с учетом диэлектрической проницаемости, В/м	Поле в приближении двух точечных зарядов, без учета диэлектрической проницаемости, В/м.	Поле в приближении двух точечных зарядов с учетом диэлектрической проницаемости, В/м.
$1,5 \cdot 10^7$ (эксперимент с соляным раствором)	$3 \cdot 10^7 - 9,2 \cdot 10^6$	$7,5 \cdot 10^6 - 2,3 \cdot 10^6$	$9,72 \cdot 10^7 - 1,6 \cdot 10^7$	$2,43 \cdot 10^7 - 4 \cdot 10^6$
$2,25 \cdot 10^6$ (эксперимент с доксорубицином)	$4,5 \cdot 10^6 - 6,9 \cdot 10^5$	$1,125 \cdot 10^6 - 1,7 \cdot 10^5$	$1,45 \cdot 10^7 - 2,45 \cdot 10^6$	$3,645 \cdot 10^6 - 6 \cdot 10^5$

Локальное усиление напряженности электрического поля на проводящих наночастицах, по-видимому, является одним из важных механизмов, обеспечивающих разрушение нанокompозитных липосом во внешних импульсных электрических полях. Подробное теоретическое описание поведения нанокompозитных липосом во внешних полях требует учета ряда факторов, как то: учет взаимодействия диполей друг с другом и с внешним электрическим полем, упругие свойства липидных мембран, изменение формы липосомы под действием внешнего поля, взаимодействие с ионами, присутствующими во внутренних и внешних растворах.

## 4.2 Липосомы с магнитными наночастицами в мембране: теоретические оценки эффектов

Для численной оценки эффектов воздействия внешнего магнитного поля на нанокompозитные липосомы, аппроксимируем нанокompозитную липосому эллиптическим слоем магнитной жидкости. Поскольку ПЭМ-микрoфотографии показывают, что во внешнем магнитном поле липосомы изменяют форму со сферической на эллипсоидальную, то необходимо использовать эллипсоидальные координаты. Остановимся более подробно на используемых системах координат.

Семейство софокусных эллипсоидов в цилиндрических координатах описывается следующим уравнением:

$$\frac{z^2}{c^2 + \lambda} + \frac{\rho^2}{b^2 + \lambda} = 1 \quad (15)$$

Здесь  $b$ ,  $c$ - полуоси,  $\lambda$  – параметр семейства. Если  $b < c$ , то такой эллипсоид вращения называют вытянутым (рисунок 30, А), если же  $c > b$ , то эллипсоид является сплюснутым (геоидом, рисунок 30,Б). Для вычислений с вытянутым эллипсоидом используется вытянутая сфероидальная система координат (ВСК, рисунок 30, а, справа), для вычислений с геоидом – сплюснутая сфероидальная система координат (ССК, рисунок 30, б, слева).

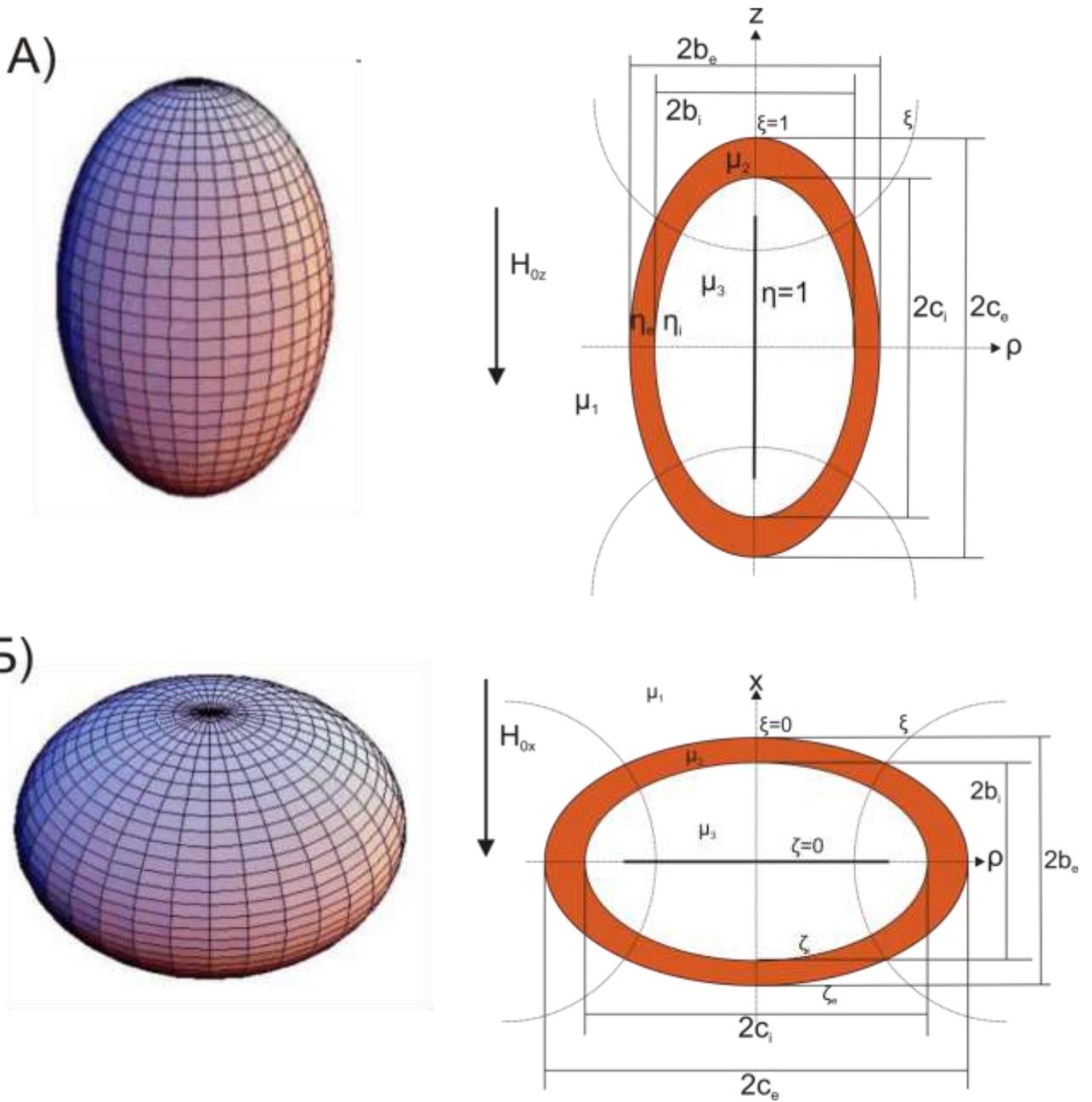


Рисунок 30. А) Слева - вытянутый эллипсоид вращения, справа - вытянутые сфероидальные координаты с указанием полуосей. Б) Слева - геоид, справа - сплюснутые сфероидальные координаты с указанием полуосей.

Вытянутые сфероидальные координаты  $\eta$  и  $\xi$  связаны с цилиндрическими координатами следующими соотношениями:

$$z = f\eta\xi \tag{16}$$

$$\rho = f\sqrt{(\eta^2 - 1)(1 - \xi^2)} \tag{17}$$

Здесь -  $f = \sqrt{c^2 - b^2}$ - половина фокусного расстояния для вытянутого эллипсоида. Третьей координатой в случае ВСК выступает координата  $\varphi$  цилиндрической системы координат. Область изменения координат в случае ВСК такова:  $\eta \in [1, \infty)$ ,  $\xi \in [-1, 1]$ ,  $\varphi \in [0, 2\pi]$ . Координата  $\eta$  в ВСК является своеобразным аналогом радиуса в сферической системе координат: все точки, лежащие на поверхности эллипсоида, имеют в ВСК одинаковую координату  $\eta$ . Для полуосей эллипса имеются следующие выражения:

$$c = f\eta \quad (18)$$

$$b = f\sqrt{(\eta^2 - 1)} \quad (19)$$

Более подробно вытянутые сфероидальные координаты описаны в [157, 158]. Кроме того, в [158] описана система сплюснутых сфероидальных координат, использованная в данных расчетах. Рассмотрим такую цилиндрическую систему координат, в которой осью, вокруг которой обращается ось  $\rho$ , является ось  $x$ , а не  $z$ . Свяжем с данной системой координат систему сплюснутых сфероидальных координат  $\zeta$  и  $\xi$ , используя следующие соотношения:

$$x = f\zeta\xi \quad (20)$$

$$\rho = f\sqrt{(\zeta^2 + 1)(1 - \xi^2)} \quad (21)$$

Третьей координатой является угол  $\psi$ . Сплюснутые сфероидальные координаты имеют следующий диапазон изменения:  $\zeta \in [0, \infty)$ ,  $\xi \in [-1, 1]$ ,  $\psi \in [0, 2\pi]$ . Полуоси эллипса связаны со сплюснутыми сфероидальными координатами так:

$$b = f\zeta \quad (22)$$

$$c = f\sqrt{(\zeta^2 + 1)} \quad (23)$$

Решение уравнения Лапласа для магнитного скалярного потенциала  $V$  в сфероидальных координатах (вытянутых и сплюснутых) позволяет оценить энергию

наноккомпозитных липосом. Данная задача имеет широко рассмотренную электростатическую аналогию.

Уравнение Лапласа для скалярного потенциала магнитного поля имеет следующий вид:

$$\nabla^2 V = 0 \quad (24)$$

Для задачи о сфероидальной оболочке во внешнем магнитном поле, решения Лапласа дают относительно простые выражения для потенциалов вне оболочки ( $V_1$ ) и во внутренней области оболочки ( $V_3$ ). Тем не менее, возможны четыре случая: оболочка может быть вытянутой или сплюснутой, а напряженность внешнего магнитного поля может быть направлена вдоль полуоси  $z$  или перпендикулярно ей. Случай вытянутой сфероидальной оболочки с внешним полем, направленным вдоль большой полуоси ( $z$ ), наиболее подробно рассмотрен в [157]. Потенциалы  $V_1$  и  $V_3$  для данного случая имеют следующий вид:

$$V_1(\eta, \xi) = f\eta\xi H_{0z} (K(\eta) \frac{\Delta_1}{\Delta_0} - 1) \quad (25)$$

$$V_3(\eta, \xi) = f\eta\xi H_{0z} \frac{\Delta_4}{\Delta_0} \quad (26)$$

Здесь  $K(\eta)$  представляет собой функцию следующего вида:  $K(\eta) = 0,5 \ln \left( \frac{\eta+1}{\eta-1} \right) - \frac{1}{\eta}$ , а  $\Delta_0$ ,  $\Delta_1$  и  $\Delta_4$  - определители матриц Крамера, которые в раскрытом виде имеют следующий вид:

$$\Delta_0 = -K^2(\eta_e)(\mu_1 - \mu_2)(\mu_2 - \mu_3) + \mu_1 \eta_e k(\eta_e) (K(\eta_i)(\mu_2 - \mu_3) + \mu_2 \eta_i k(\eta_i)) + K(\eta_e) (\mu_1 - \mu_2) ((K(\eta_i) - \eta_e k_e)(\mu_2 - \mu_3) + \mu_2 \eta_i k(\eta_i)) \quad (27)$$

$$\Delta_1 = -(\mu_1 - \mu_2)(\mu_2 - \mu_3) \{K(\eta_e) - K(\eta_i)\} - \mu_2 \{ \eta_e k_e (\mu_3 - \mu_2) + \eta_i k(\eta_i) (\mu_2 - \mu_1) \} \quad (28)$$

$$\Delta_4 = -\mu_1 \mu_2 \eta_e k(\eta_e) \eta_i k(\eta_i) \quad (29)$$

Здесь  $k(\eta) = \frac{dK(\eta)}{d\eta} = 0,5 \ln \left( \frac{\eta+1}{\eta-1} \right) - \frac{1}{\eta}$ . Для остальных трех случаев, уравнение Лапласа приводит к системам четырех уравнений и четырех неизвестных

[158], разрешаемым с помощью метода матриц Крамера. Следует отметить, что уравнения, необходимые для получения скалярных потенциалов, описанные в [158] содержат ошибки: знак слагаемых, содержащих половину фокусного расстояния  $f$ , следует изменить, чтобы обеспечить убывание получаемого потенциала на бесконечности. Не останавливаясь на системах уравнений и их решении, далее приведем только получаемые с их помощью потенциалы. Так, для случая вытянутого эллипсоида с внешним полем, направленным перпендикулярно большой полуоси  $c$ , выражения для потенциалов примут следующий вид:

$$V_1(\eta, \xi) = fH_{0x}\sqrt{1-\xi^2}N(\eta)\cos(\varphi)\left(\frac{\Delta_1 L(\eta)}{\Delta_0} - 1\right) \quad (30)$$

$$V_3(\eta, \xi) = fH_{0x}\sqrt{1-\xi^2}N(\eta)\cos(\varphi)\frac{\Delta_4}{\Delta_0} \quad (31)$$

Здесь  $N(\eta) = \sqrt{\eta^2 - 1}$  а  $\Delta_0$ ,  $\Delta_1$  и  $\Delta_4$ - определители матриц Крамера, которые в раскрытом виде имеют следующий вид:

$$\Delta_0 = q(\eta_e)L(\eta_e)n(\eta_i)(\mu_2-\mu_3)(\mu_2-\mu_1) + (\mu_3n(\eta_i)L(\eta_i) - \mu_2q(\eta_i))(\mu_2n(\eta_e)L(\eta_e) - \mu_1q(\eta_e)) \quad (32)$$

$$\Delta_1 = (\mu_2q(\eta_e) - \mu_1n(\eta_e)L(\eta_e))n(\eta_i)(\mu_2-\mu_3) + (\mu_3n(\eta_i)L(\eta_i) - \mu_2q(\eta_i))n(\eta_e)(\mu_2+\mu_1) \quad (33)$$

$$\Delta_4 = \mu_1\mu_2(q(\eta_i) - n(\eta_i)L(\eta_i))(L(\eta_e)n(\eta_e) - q(\eta_e)) \quad (34)$$

Здесь  $L(\eta) = 0,5 \ln\left(\frac{\eta+1}{\eta-1}\right) - \frac{\eta}{\eta^2-1}$ ,  $n(\eta) = \frac{dN}{d\eta} = \frac{\eta}{\eta^2-1}$ , а для функции  $q(\eta)$  имеем следующее выражение  $q(\eta) = \frac{d(L(\eta)N(\eta))}{d\eta} = \eta L(\eta) + \frac{2}{(\eta^2-1)^{\frac{3}{2}}}$ . Теперь рас-

смотрим два случая, связанные с геоидом. Если магнитное поле направлено вдоль короткой полуоси геоида  $b$  (см рисунок 30), то интересующие нас потенциалы магнитного поля  $V_1$  и  $V_3$  примут следующий вид:

$$V_1(\zeta, \xi) = \xi f H_{0x} \left( \zeta + \frac{\Delta_1 Q(j\zeta)}{\Delta_0} \right) \quad (35)$$

$$V_3(\zeta, \xi) = \zeta \xi f H_{0x} \frac{\Delta_4}{\Delta_0} \quad (36)$$

Здесь функция  $Q(j\zeta)$  имеет следующий вид:  $Q(j\zeta) = \zeta \operatorname{arcctg}(\zeta) - 1$ , а раскрытые определители  $\Delta_0$ ,  $\Delta_1$  и  $\Delta_4$  имеют следующий вид:

$$\Delta_0 = \zeta_i \mu_2^2 Q_1(j\zeta_e)(q(\zeta_e) - q(\zeta_i)) + \mu_2 \mu_3 Q_1(j\zeta_e)(Q_1(\zeta_i) - \zeta_i q(\zeta_e)) + \mu_1 q(\zeta_e) Q_1(j\zeta_e) \zeta_i (\mu_3 - \mu_2) - \mu_1 q(\zeta_e) \zeta_e (\mu_3 Q_1(j\zeta_i) - \mu_2 \zeta_i q(\zeta_i)) \quad (37)$$

$$\Delta_1 = \mu_2^2 \zeta_e \zeta_i (q(\zeta_e) - q(\zeta_i)) + \mu_2 \mu_3 \zeta_e (Q_1(j\zeta_i) - \zeta_i q(\zeta_e)) + \mu_1 Q_1(j\zeta_e) \zeta_i (\mu_3 - \mu_2) - \mu_1 \zeta_e (\mu_3 Q_1(j\zeta_i) - \mu_2 \zeta_i q(\zeta_i)) \quad (38)$$

$$\Delta_4 = \mu_2 \mu_1 (Q_1(j\zeta_i) - \zeta_i q(\zeta_e))(q(\zeta_e) \zeta_e - Q_1(j\zeta_e)) \quad (39)$$

Здесь функция  $q(j\zeta)$  так же является производной  $Q(j\zeta)$ :  $q(j\zeta) = \operatorname{arcctg}(\zeta) - \frac{\zeta}{\zeta^2 + 1}$ . Рассмотрим последний возможный случай, когда уравнение Лапласа решалось для геоида, и внешнее магнитное поле было направлено перпендикулярно его короткой полуоси. Скалярные потенциалы в этом случае примут следующий вид:

$$V_1(\zeta, \xi) = f H_{0y} \sqrt{1 - \xi^2} \cos(\psi) \left( U(\zeta) + \frac{\Delta_1 Q_1^1(j\zeta)}{\Delta_0} \right) \quad (40)$$

$$V_3(\zeta, \xi) = f H_{0y} \sqrt{1 - \xi^2} \cos(\psi) U(\zeta) \frac{\Delta_4}{\Delta_0} \quad (41)$$

Обратим внимание, что присутствующая здесь функция  $Q_1^1(j\zeta)$  не совпадает с  $Q(j\zeta)$ , и задается следующим выражением:  $Q_1^1(j\zeta) = \sqrt{\zeta^2 + 1} (\operatorname{arcctg}(\zeta) - \frac{\zeta}{\zeta^2 + 1})$ . Функция  $U(\zeta)$  задана следующим выражением:  $U(\zeta) = \sqrt{\zeta^2 + 1}$ . Выражения для определителей Крамера  $\Delta_0$ ,  $\Delta_1$  и  $\Delta_4$  для данного случая выглядят так:

$$\Delta_0 = \mu_2^2 U(\zeta_i) Q_1^1(j\zeta_e) (u(\zeta_e) q(\zeta_i) - u(\zeta_i) q(\zeta_e)) + \mu_2 \mu_3 u(\zeta_i) Q_1^1(j\zeta_e) (U(\zeta_i) q(\zeta_e) - u(\zeta_e) Q_1^1(j\zeta_i)) + \mu_1 q(\zeta_e) U(\zeta_e) (\mu_3 Q_1^1(j\zeta_i) u(\zeta_i) - \mu_2 U(\zeta_i) q(\zeta_i)) - \mu_1 q(\zeta_e) Q_1^1(j\zeta_e) U(\zeta_i) u(\zeta_i) (\mu_3 - \mu_2) \quad (42)$$

$$\Delta_1 = \mu_2^2 U(\zeta_i) U(\zeta_e) (u(\zeta_e) q(\zeta_i) - u(\zeta_i) q(\zeta_e)) + \mu_2 \mu_3 u(\zeta_i) U(\zeta_e) (U(\zeta_i) q(\zeta_e) - u(\zeta_e) Q_1^1(j\zeta_i)) + \mu_1 u(\zeta_e) U(\zeta_e) (\mu_3 Q_1^1(j\zeta_i) u(\zeta_i) - \mu_2 U(\zeta_i) q(\zeta_i)) - \mu_1 u(\zeta_e) Q_1^1(j\zeta_e) U(\zeta_i) u(\zeta_i) (\mu_3 - \mu_2) \quad (43)$$

$$\Delta_4 = \mu_1 \mu_2 (q(\zeta_e)U(\zeta_e) - Q^{1_1}(j\zeta_e)u(\zeta_e)) (q(\zeta_i)U(\zeta_i) - Q^{1_1}(j\zeta_i)u(\zeta_i)) \quad (44)$$

В формулах (42)  $u(\zeta)$  и  $q(\zeta)$  так же представляют собой производные соответствующих функций:  $u(\zeta) = \frac{dU(\zeta)}{d\zeta} = \frac{\zeta}{\sqrt{\zeta^2+1}}$ , а  $q(\zeta) = \frac{dQ^{1_1}(\zeta)}{d\zeta} = u(\zeta) \operatorname{arccctg}(\zeta) - \frac{2+\zeta^2}{(\zeta^2+1)^{\frac{3}{2}}}$ . Для практических расчетов и оценок, скалярные потенциалы магнитного поля необходимо проинтегрировать в каждом из четырех случаев. Так, формулу для магнитостатической энергии эллипсоидальной оболочки во внешнем магнитном поле можно получить, вычислив следующий интеграл:

$$W = \int_{\text{по поверхности}} \sigma V dS = \frac{\mu_0}{2} \int_{\text{по поверхности}}^{\text{по внешней}} \sigma_1 V_1 dS + \frac{\mu_0}{2} \int_{\text{по поверхности}}^{\text{по внутренней}} \sigma_3 V_3 dS \quad (45)$$

Здесь  $\sigma_1$  – плотность фиктивного магнитного заряда на внешней поверхности оболочки,  $\sigma_3$  – плотность фиктивного магнитного заряда на внутренней поверхности оболочки. Согласно [157], где подробно описано получение формул для плотности фиктивных магнитных зарядов, конечные формулы, применимые для вычисления интеграла (45), будут иметь следующий вид:

$$\sigma_1 = H_{1n} \left(1 - \frac{\mu_1}{\mu_2}\right) = -\frac{\partial V_1}{\partial n} \left(1 - \frac{\mu_1}{\mu_2}\right) \quad (46)$$

$$\sigma_3 = H_{1n} \frac{\mu_1}{\mu_2} \left(1 - \frac{\mu_2}{\mu_3}\right) = -\frac{\partial V_3}{\partial n} \left(\frac{\mu_3}{\mu_2} - 1\right) \quad (47)$$

Элемент площади, необходимый для вычисления интеграла (45) в случае ВСК, имеет вид:

$$dS = f^2 \sqrt{(\eta^2 - 1)(\eta^2 - \xi^2)} d\eta d\xi \vec{\eta} \quad (48)$$

В случае, когда внешнее поле направлено вдоль большой полуоси вытянутого эллипсоида с, необходимости в вычислении интеграла (45) нет: формула для магнитостатической энергии уже была получена в [157]. В виде, более удобном для практических вычислений, она выглядит так:

$$W = \frac{2\pi\mu_0 f^3 H_{0z}^2}{3} \left\{ \eta_i (\eta_i^2 - 1) \left( 1 - \frac{\mu_3}{\mu_2} \right) \left( \frac{\Delta_4}{\Delta_0} \right)^2 + \right. \\ \left. + \eta_e (\eta_e^2 - 1) \left( 1 - \frac{\mu_1}{\mu_2} \right) \left( K(\eta_e) \frac{\Delta_1}{\Delta_0} - 1 \right) \left( 1 - [K(\eta_e) + \eta_e k(\eta_e)] \frac{\Delta_1}{\Delta_0} \right) \right\} \quad (49)$$

Аналогичную формулу для случая, когда внешнее поле направлено перпендикулярно большой полуоси сфероиды, необходимо получить, воспользовавшись интегралом (45). Каждое из слагаемых в интеграле, в данном случае выглядит так:

$$\int_{\text{по поверхности}}^{\text{по внешней}} \sigma_1 V_1 dS = -f \left( 1 - \frac{\mu_1}{\mu_2} \right) (\eta_e^2 - 1) \iint_{-1}^1 \int_0^{2\pi} V_1 \left( \frac{\partial V_1}{\partial \eta} \right) d\xi d\varphi \quad (50)$$

$$\int_{\text{по поверхности}}^{\text{по внутренней}} \sigma_3 V_3 dS = -f \left( \frac{\mu_3}{\mu_2} - 1 \right) (\eta_i^2 - 1) \iint_{-1}^1 \int_0^{2\pi} V_3 \left( \frac{\partial V_3}{\partial \eta} \right) d\xi d\varphi \quad (51)$$

Подставив (30) в (50), а (31) в (51), получим следующую формулу для магнитостатической энергии, в случае, когда внешнее поле перпендикулярно большой полуоси вытянутого сфероиды:

$$W = \frac{2\pi\mu_0 f^3 H_{0x}^2}{3} \left\{ \eta_i (\eta_i^2 - 1) \left( 1 - \frac{\mu_3}{\mu_2} \right) \left( \frac{\Delta_4}{\Delta_0} \right)^2 + \right. \\ \left. + (\eta_e^2 - 1) \left( \frac{\mu_1}{\mu_2} - 1 \right) \left( L(\eta_e) \frac{\Delta_1}{\Delta_0} - 1 \right) \left( q(\eta_e) \frac{\Delta_1}{\Delta_0} - n(\eta_e) \right) \right\} \quad (52)$$

В случае ССК, общий вид интеграла 45 сохраняется. Формулы (46) и (47) для плотностей фиктивных магнитных зарядов примут следующий вид:

$$\sigma_1 = -\frac{1}{f} \left( \frac{\partial V_1}{\partial \zeta} \right) \left( 1 - \frac{\mu_1}{\mu_2} \right) \sqrt{\frac{(\zeta^2 + 1)}{(\zeta^2 + \xi^2)}} \quad (53)$$

$$\sigma_3 = -\frac{1}{f} \left( \frac{\partial V_3}{\partial \zeta} \right) \left( \frac{\mu_3}{\mu_2} - 1 \right) \sqrt{\frac{(\zeta^2 + 1)}{(\zeta^2 + \xi^2)}} \quad (54)$$

Изменится и элемент площади  $dS$ :

$$dS = f^2 \sqrt{(\zeta^2 + 1)(\zeta^2 + \xi^2)} d\zeta d\xi \vec{\zeta} \quad (55)$$

Для случая поля, направленного вдоль короткой полуоси геоида (потенциалы заданы формулами (35) и (36), интеграл (45), с учетом (53) дает следующую формулу для магнитостатической энергии:

$$W = \frac{2\pi\mu_0 f^3 H_{0x}^2}{3} \left\{ \zeta_i (\zeta_i^2 + 1) \left( 1 - \frac{\mu_3}{\mu_2} \right) \left( \frac{\Delta_4}{\Delta_0} \right)^2 + \right. \\ \left. + (\zeta_e^2 + 1) \left( \frac{\mu_1}{\mu_2} - 1 \right) \left( Q(j\zeta_e) \frac{\Delta_1}{\Delta_0} - \zeta_e \right) \left( q(\zeta_e) \frac{\Delta_1}{\Delta_0} - 1 \right) \right\} \quad (56)$$

Если же поле направлено перпендикулярно короткой полуоси геоида, а скалярные потенциалы магнитного поля задаются формулами (40) и (41), подставив (53) в интеграл (45), получим следующую формулу для магнитостатической энергии:

$$W = \frac{2\pi\mu_0 f^3 H_{0y}^2}{3} \left\{ \zeta_i (\zeta_i^2 + 1) \left( 1 - \frac{\mu_3}{\mu_2} \right) \left( \frac{\Delta_4}{\Delta_0} \right)^2 + \right. \\ \left. + (\zeta_e^2 + 1) \left( \frac{\mu_1}{\mu_2} - 1 \right) \left( Q_1^1(j\zeta_e) \frac{\Delta_1}{\Delta_0} - U(\zeta_e) \right) \left( q(\zeta_e) \frac{\Delta_1}{\Delta_0} - u(\zeta_e) \right) \right\} \quad (57)$$

Правильность получения всех формул для магнитостатической энергии можно проверить численно, применив предельную функцию для шара, описанную в [157]:

$$W = \frac{2\pi\mu_0 f^3 H_0^2}{3} \left( \frac{5 - \mu_2^2 - \mu_2}{(\mu_2 - 1)^2 (\mu_2 + 2)^2} \right) \quad (58)$$

Сфероидальная оболочка переходит в шар, при следующих условиях:  $\eta_e \rightarrow \infty$  (или для геоида,  $\zeta_e \rightarrow \infty$ )  $\eta_i \rightarrow 1$  (или же для геоида  $\zeta_i \rightarrow 0$ ),  $\mu_1 = \mu_3 = 1$ . В предельном случае, каждая из полученных формул для магнитостатической энергии: (49), (52), (56), (57) переходит в формулу магнитостатической энергии для шара (58). Численная проверка (рисунок 31) формул проводилась при следующих условиях:  $\mu_1 = \mu_3 = 1$ ,  $\mu_2$  пробегает значения от 2 до 1000,  $f = 1 \text{ м}$ ,  $H = 1 \text{ Ое}$ . Для (49) и (52) (случай вытянутого эллипсоида) использованы значения  $\eta_e = 1000$ ,  $\eta_i = 1.001$ , для случая геоида (формулы (56) и (57)) -  $\zeta_e = 1000$ ,  $\zeta_i = 0.001$ .

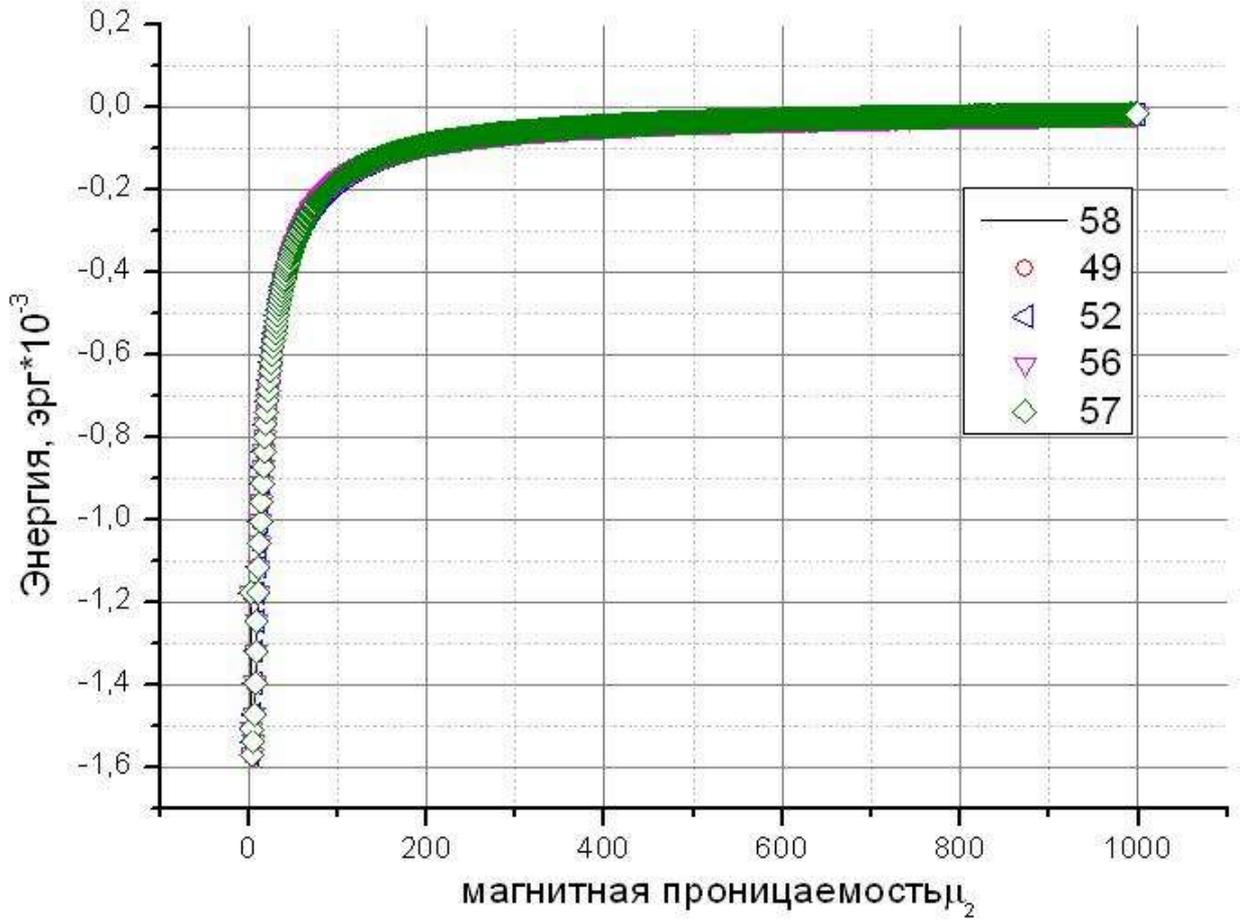


Рисунок 31. Проверка полученных формул для магнитных проницаемостей в предельном случае для шара

Для получения силы и момента силы, а также более удобного сравнения каждого из случаев друг с другом, получим так же выражения для свободной энергии  $F$ . Интеграл, необходимый для вычисления свободной энергии имеет следующий вид:

$$F = \frac{\mu_0(\mu_2 - 1)H_0}{2} \left( \int_{\text{поверхности}}^{\text{по внешней}} V_1 dS + \int_{\text{поверхности}}^{\text{по внутренней}} V_3 dS \right) \quad (59)$$

Для случая, когда внешнее магнитное поле направлено вдоль большой полуоси эллипсоида, имеем [157]:

$$F = \frac{2\pi\mu_0(\mu_2 - 1)f^3 H_{0z}^2}{3} (\eta_e(\eta_e^2 - 1) \left( K(\eta_e) \frac{\Delta_1}{\Delta_0} - 1 \right) - \eta_i(\eta_i^2 - 1) \frac{\Delta_4}{\Delta_0}) \quad (60)$$

Определители  $\Delta_0$ ,  $\Delta_1$  и  $\Delta_4$  заданы формулами (27)-(29). Если же внешнее поле направлено перпендикулярно большой полуоси вытянутого эллипсоида, то свободная энергия, с учетом формул для потенциалов (30),(31) имеет следующий вид:

$$F = \frac{2\pi\mu_0(\mu_2 - 1)f^3 H_{0x}^2}{3} (\eta_e(\eta_e^2 - 1) \left( L(\eta_e) \frac{\Delta_1}{\Delta_0} - 1 \right) - \eta_i(\eta_i^2 - 1) \frac{\Delta_4}{\Delta_0}) \quad (61)$$

Как и в соответствующем случае для магнитостатической энергии, соответствующие определители заданы формулами (31),(32),(34). Для сплюснутой сфероидальной оболочки, в случае если внешнее поле направлено вдоль малой полуоси, формула для свободной энергии примет следующий вид:

$$F = \frac{2\pi\mu_0(\mu_2 - 1)f^3 H_{0x}^2}{3} \left( \left( \frac{\Delta_1}{\Delta_0} Q(j\zeta_e) - \zeta_e \right) (\zeta_e^2 + 1) - \zeta_i(\zeta_i^2 + 1) \frac{\Delta_4}{\Delta_0} \right) \quad (62)$$

Определители  $\Delta_0$ ,  $\Delta_1$  и  $\Delta_4$  здесь задаются формулами (37)-(39). Для последнего рассмотренного нами случая, когда напряженность внешнего магнитного поля лежит в плоскости больших полуосей геоида, получается следующее выражение для свободной магнитостатической энергии:

$$F = \frac{2\pi\mu_0(\mu_2 - 1)f^3 H_{0y}^2}{3} * \left( \left( \frac{\Delta_1}{\Delta_0} (\text{arcctg}(\zeta_e) - \frac{\zeta_e}{\zeta_e^2 + 1}) \right) - 1 \right) \zeta_e(\zeta_e^2 + 1) - \zeta_i(\zeta_i^2 + 1) \frac{\Delta_4}{\Delta_0} \quad (63)$$

Следует отметить, что в [157] указан предельный случай для свободной энергии магнитного поля. Случай шара реализуется для вытянутого эллипсоида при  $\eta_i \rightarrow 1$ ,  $\eta_e \rightarrow \infty$ ,  $\mu_1 = \mu_3 = 1$ , а для геоида -  $\zeta_i \rightarrow 0$ ,  $\zeta_e \rightarrow \infty$ ,  $\mu_1 = \mu_3 = 1$ . Формула для свободной магнитной энергии шара имеет следующий вид:

$$F = -2\pi\mu_0 H_0^2 \left\{ \frac{\mu_2 - 1}{\mu_2 + 2} \right\} f^3 \eta_e^3 \quad (64)$$

Проверку предельного равенства для формул свободной энергии проведем численно, положив  $\eta_i = 1,001$ ,  $\eta_e = \zeta_e = 1000$ ,  $\zeta_i = 0,001$ ,  $\mu_1 = \mu_3 = 1$ ,  $H_0 = 1,9$  килоэрстед. Магнитная проницаемость оболочки  $\mu_1$  пробегает значения от 1 до 1000.

Результат численной проверки предельного равенства для случая шара представлен на рисунке 32.

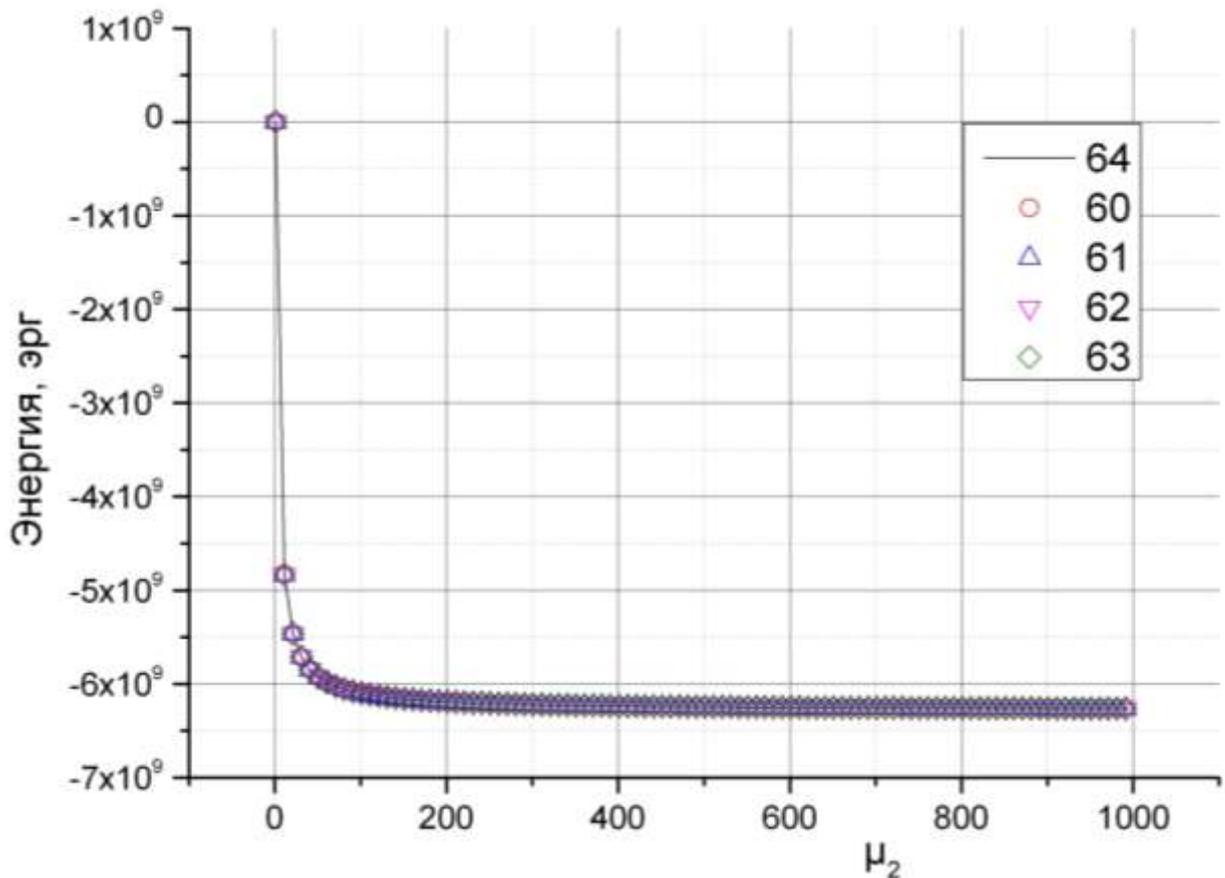


Рисунок 32. Численная проверка предельного равенства для свободных энергий.

Сравним формулы для свободной энергии вытянутой эллипсоидальной оболочки для двух ориентаций внешнего поля: параллельно большой полуоси и перпендикулярно ей. Рассмотрим деформацию, сохраняющую внутренний объем оболочки и объем самой оболочки. Полученные нами липосомы являются достаточно тонкими оболочками ( $4,1 \text{ нм} \ll 150 \text{ нм}$ ), поэтому при их описании в данной модели, можно считать  $\eta_e \approx \eta_i$  (или  $\zeta_e \approx \zeta_i$  для геоидальной модели). Для описания оболочки достаточно одного параметра – эксцентриситета:  $e \approx 1/\eta_e \approx 1/\eta_i$ . Межфокусное расстояние у сферы равно нулю, поэтому для рассмотрения деформации, выберем очень малое расстояние  $f$  (эллипсоид будет весьма близок к сфере), и на каждой итерации будем его увеличивать. Из условия софокусности и сохранения объема оболочки, следует:

$$f^3 \eta_{e1} (\eta_{e1}^2 - 1) = (f + df)^3 \eta_{e2} (\eta_{e2}^2 - 1) \quad (65)$$

$$f^3 \eta_{i1} (\eta_{i1}^2 - 1) = (f + df)^3 \eta_{i2} (\eta_{i2}^2 - 1) \quad (66)$$

Формулы (65) и (66) представляют собой кубические уравнения относительно новых (после деформации) сфероидальных координат  $\eta_{e2}$ ,  $\eta_{i2}$ . Данные кубические уравнения имеют единственный корень и разрешимы по методу, подробно описанному в [159]. После нахождения новых координат, уже для них (и нового значения фокусного расстояния) повторяется вычисление энергии или свободной энергии. Итерации следует продолжать, пока эксцентриситет эллипсоидальной оболочки не станет максимально возможным ( $e \approx 1/\eta \approx 1$ ).

Сравнение формул для свободной энергии: (60), поле ориентировано вдоль большой полуоси и (61), поле ориентировано перпендикулярно большой полуоси показывает, что свободная энергия в первом случае убывает, а значит, данное положение эллипсоидальной оболочки во внешнем поле является более энергетически выгодным. Аналогично проведем численный эксперимент с моделью геоида.

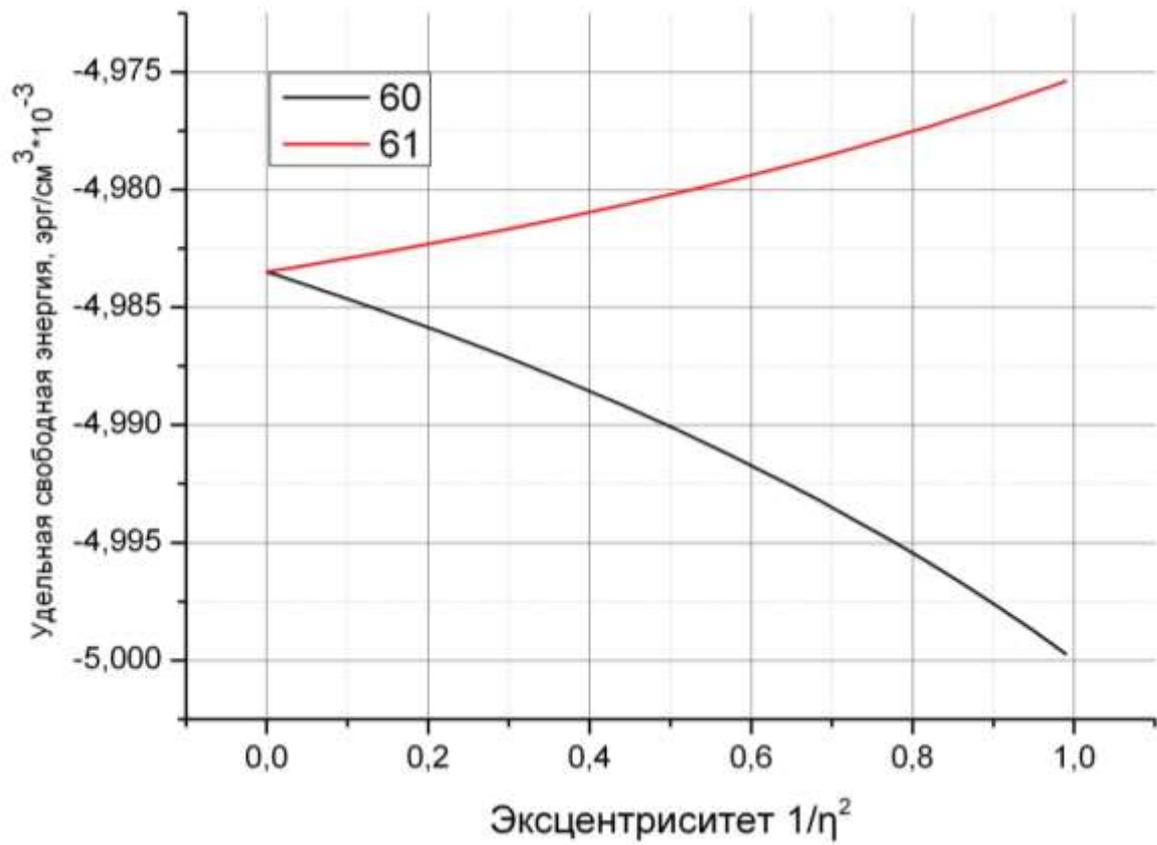


Рисунок 33. Численное сравнение двух формул для свободной энергии в случае вытянутого эллипсоида

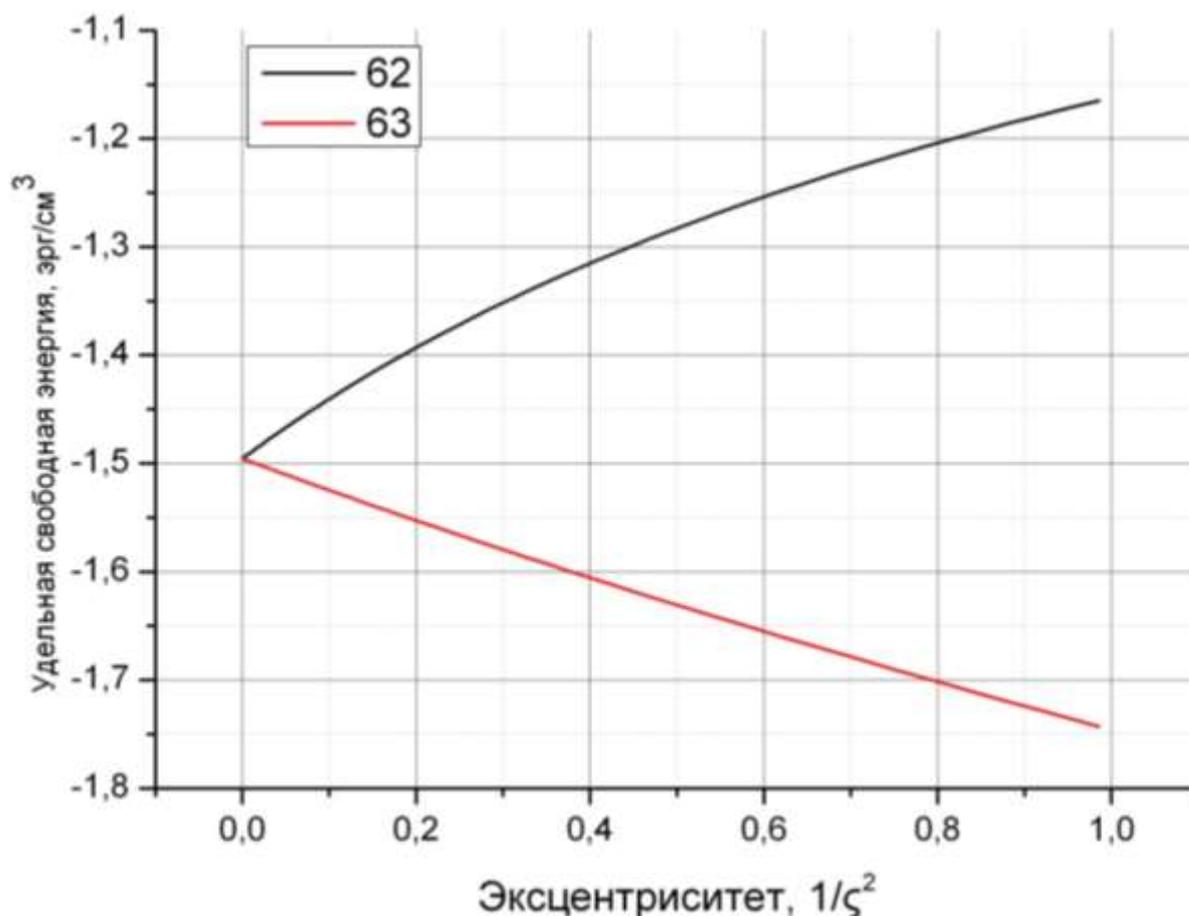


Рисунок 34. Численное сравнение формул для свободной энергии в случае геоида. Пояснения в тексте.

Заметим, что при одинаковом объеме, сплюснутая сфероидальная оболочка (Рисунок 34) обладает значительно большими по модулю значениями свободной энергии, нежели вытянутая (Рисунок 33). Данный результат находится в согласии с соответствующим результатом [160] для электрической аналогии. Для геоида наиболее выгодным с точки свободной энергии является положение, когда внешнее поле лежит в плоскости больших полуосей (63). По аналогии с электростатической задачей, свободная энергия оболочки во внешнем магнитном поле может быть использована для получения силы или момента сил, действующих на оболочку со стороны внешнего поля.

Перейдем к оценкам, связанным с липосомами непосредственно. Пусть изначально липосома обладает формой, близкой к сферической, и ее фокусное расстояние составляет порядка 1 нм, при длине полуоси 150 нм (линейные размеры липосомы – порядка 300 нм). Исходя из 18, получим для координаты  $\eta_c$

=150. С учетом толщины липосомальной мембраны, разумно схожим образом выбрать координату  $\eta_i=146$ . Приращение фокусного расстояния  $f$  примем за 1 нм. Энергия поверхностного натяжения прямо пропорциональна площади оболочки. Для площади вытянутого эллипсоида вращения с большой полуосью  $c$  и малой полуосью  $b$ , имеем:

$$S = 2\pi b \left( b + \frac{c^2}{\sqrt{c^2 - b^2}} \arcsin\left(\frac{\sqrt{c^2 - b^2}}{c}\right) \right) \quad (67)$$

В то же время, для сплюснутого эллипсоида вращения с большими полуосями  $c$  и малой полуосью  $b$ , существует следующая формула для площади поверхности:

$$S = 2\pi c \left( c + \frac{b^2}{\sqrt{c^2 - b^2}} \ln\left(\frac{c + \sqrt{c^2 - b^2}}{b}\right) \right) \quad (68)$$

Коэффициент пропорциональности между энергией поверхностного натяжения и площадью поверхности составляет 25 Дин/см. Полная энергия представляет собой сумму магнитостатической энергии и энергии поверхностного натяжения. График для полной энергии оболочки показан на рисунке 35.

Итак, были сделаны численные оценки эффектов деформации нанокompозитной липосомы во внешнем магнитном поле. Построение полной и исчерпывающей модели требует учета широкого ряда дополнительных факторов, как то: вязкие свойства среды, в которой находится липосома, упругие свойства липосомальной мембраны, взаимодействие магнитных эллипсоидальных диполей с внешним полем. Однако убывание графика полной энергии, для случая, когда магнитостатическая энергия представлена формулой (49) для случая большой полуоси, ориентированной вдоль напряженности внешнего магнитного поля, свидетельствует о неустойчивости системы и возможности возникновения в ней деформаций, приводящих к растяжению липосомальных мембран, изменению их проницаемости и высвобождению лекарственной нагрузки.

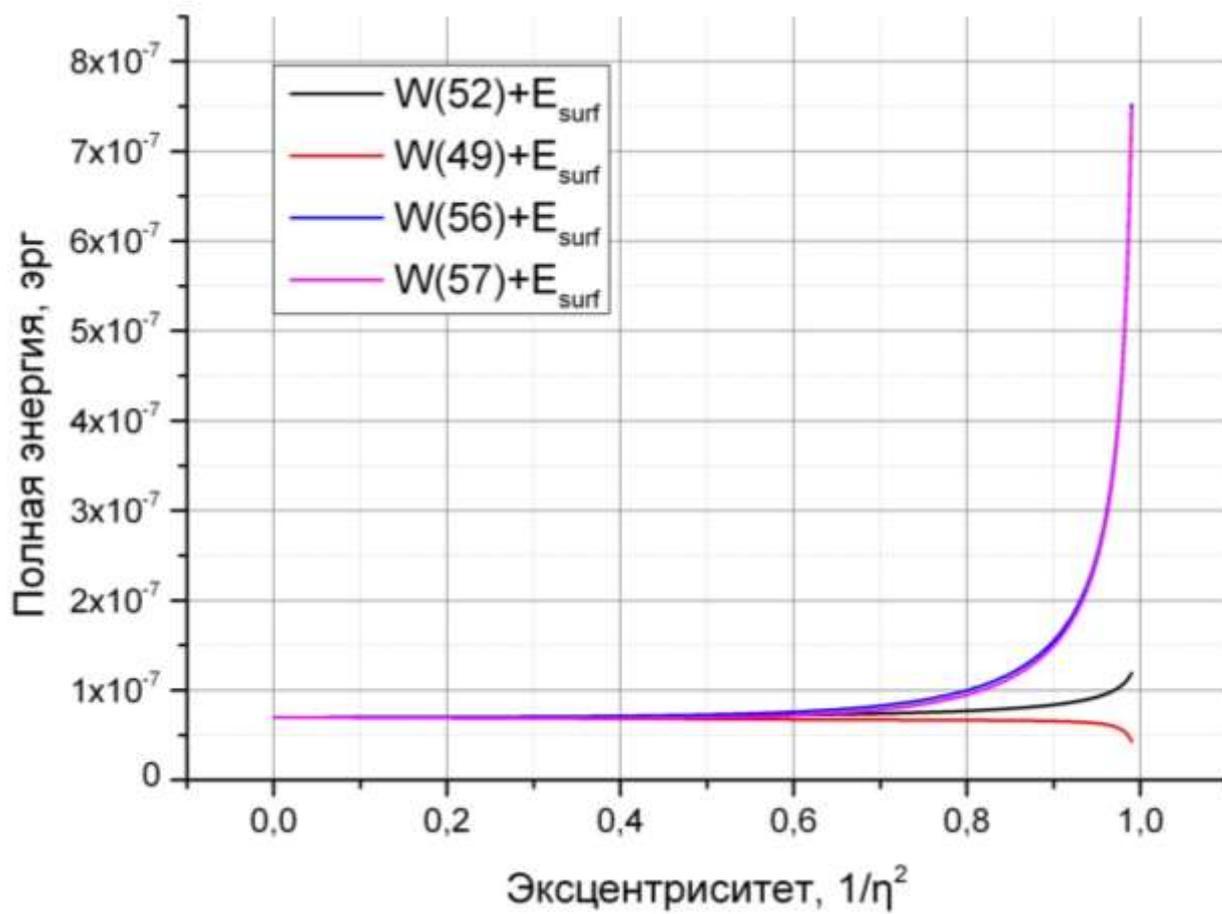


Рисунок 35. Сравнение формул для полной энергии, при деформации сфероидальной оболочки.

## **Заключение**

Разработка фундаментальных научных основ технологий создания биосовместимых средств капсулирования лекарственных препаратов и высокоэффективных методов управления их доставкой и высвобождением является актуальной и важной междисциплинарной задачей, решение которой необходимо для радикального повышения эффективности лекарственной терапии. В настоящей работе впервые созданы и охарактеризованы новые биомиметические нетоксичные средства капсулирования различных веществ, включая лекарственные препараты - нанокompозитные липосомы на основе фосфатидилхолина и гидрофобизованных функциональных наночастиц магнетита или золота, локализованных внутри липидного бислоя липосомальной мембраны. В работе разработаны экспериментальные методы синтеза гидрофобизованных наночастиц магнетита и золота, обладающих оптимальными для локализации в мембране размерами. Кроме того, была продемонстрирована возможность капсулирования в таких липосомах и управляемого высвобождения как раствора соли NaCl, так и молекулярных соединений: красителя карбоксифлуоресцеина и противоопухолевого препарата доксорубицина. Полученные в работе теоретические оценки эффектов влияния внешнего импульсного электрического поля и внешнего магнитного поля на нанокompозитные липосомы дают информацию, необходимую для понимания физических механизмов активации нанокompозитных липосом такими внешними управляющими воздействиями, обеспечивающими контролируемый выход капсулированных веществ из липосом во внешнюю среду. Полученные в работе научные результаты являются важными для разработки биосовместимых средств капсулирования и доставки лекарств, имеющих перспективы реальных практических биомедицинских применений.

## **Выводы**

1. Синтезированы суперпарамагнитные коллоидные наночастицы магнетита ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) со средним диаметром порядка 4 нм и разработана методика их гидрофобизации с использованием амфифильных водонерастворимых лигандов

(стеариновой кислоты, октадецилтиола), обеспечивающая получение коллоидного раствора гидрофобизованных наночастиц магнетита в хлороформе. Впервые получен коллоидный раствор наночастиц золота в хлороформе, гидрофобизованных при помощи водонерастворимого лиганда октадекантиоловой кислоты (ОДТ). Размер гидрофобизованных наночастиц золота эффективно варьируется в диапазоне 0,5-8 нм посредством изменения соотношения концентраций прекурсор-лиганд в процессе синтеза.

2. Впервые получены и охарактеризованы новые нанокompозитные липосомы на основе фосфатидилхолина, содержащие в своих мембранах гидрофобизованные неорганические наночастицы золота или магнетита. Диаметр нанокompозитных липосом варьирует от 80 до 300 нм, а неорганические наночастицы обладают относительно однородным пространственным распределением в липосомальных мембранах.

3. Нанокompозитные липосомы эффективно удерживают во внутреннем объеме различные химические соединения, в том числе раствор соли NaCl, флуоресцентный краситель карбоксифлуоресцеин и противоопухолевый препарат доксорубицин.

4. Короткие импульсы электрического поля длительностью порядка 10 нс и напряженностью от 3,5 до 15 кВ/см, воздействуя на коллоидные суспензии нанокompозитных липосом, содержащих в мембранах золотые наночастицы, приводят к высвобождению их содержимого во внешнюю, по отношению к ним, водную фазу раствора. Данный процесс является нетермическим и вызывается эффектом избирательной электропорации липосомальных мембран, обусловленной присутствием в мембране поляризующихся электропроводящих наночастиц, значительно усиливающих напряженность локального электрического поля вблизи частицы.

5. Нанокompозитные липосомы с локализованными в липидных бислоях суперпарамагнитными наночастицами магнетита под действием внешнего магнитного поля изменяют свою форму со сфероидальной на квази-эллипсоидальную. Это сопряжено со структурными изменениями в нанокompо-

зитных мембранах, приводящими к изменениям их проницаемости, и постепенному высвобождению содержимого липосомы во внешнюю водную среду.

**Список литературы**

1. Wilitschko R., Wilitschko W. The magnetite-based receptors in the beak of birds and their role in avian navigation // *J Comp Physiol A*. 2013. Vol. 199. pp. 89-98.
2. Dobson J. Nanoscale biogenic iron oxides and neurodegenerative disease // *FEBS Letters*. April 2001. Vol. 496. pp. 1-5.
3. Feng Q., Tong R. Anticancer nanoparticulate polymer-drug conjugate // *Bioengineering & Translational Medicine*. August 2016. No. 1. pp. 277-296.
4. Mathe G., Loc T., Bernard J. Effet Sur La Leucemie 1210 De La Souris Dune Combinaison Par Diazotation Da-Methopterine Et De Gamma-Globulines De Hamsters Porteurs De Cette Leucemie Par Heterogrefe // *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L Academie Des Sciences*. 1958. No. 246. pp. 1626-1629.
5. Ringsdorf H. Structure and properties of pharmacologically active polymers // *J. Polym. Sci. Pol. Sym.* 1975. pp. 135-153.
6. Nowotnik D., Cvitkovic E. ProLindac<sup>TM</sup> (AP5346): a review of the development of an HPMA DACH platinum polymer therapeutic. // *Adv Drug Deliv Rev*. 2009. No. 61. pp. 1214-1219.
7. Posey J., Saif M., Carlisle R., et al. Phase 1 study of weekly polyethylene glycol-camptothecin in patients with advanced solid tumors and lymphomas. // *Clin Cancer Res*. 2005. No. 11. pp. 7866-7871.
8. Li C., Yu D.F., Newman R., et al. Complete regression of well-established tumors using a novel water-soluble poly(L-glutamic acid)-paclitaxel conjugate // *Cancer Res*. 1998. Vol. 58. pp. 2404-2409.
9. Maeda H., Ueda M., Morinaga T., Matsumoto T. Conjugation of poly(styrene-co-maleic acid) derivatives to the antitumor protein neocarzinostatin:pronounced improvements in pharmacological properties. // *J Med Chem*. 1985. Vol. 28. pp. 455-461.

10. Fox M., Szoka,FC, Frechet J. Soluble polymer carriers for the treatment of cancer: the importance of molecular architecture. // *Acc Chem Res.* 2009. No. 42. pp. 1141-1151.
11. Duncan R., Vincent M.J., Greco F., Nicholson R.I. Polymer–drug conjugates: towards a novel approach for the treatment of endocrine-related cancer // *Endocrine-Related Cancer.* July 2005. Vol. 12. No. 1. pp. S189-S199.
12. Erickson H., Park P., Widdison W., et al. Antibody-maytansinoidconjugates are activated in targeted cancer cells by lysosomal degradation and linker-dependent intracellular processing. // *Cancer Res.* 2006. No. 66. pp. 4426–4433.
13. Rihova B., Strohalm J., Prausova J. Cytostatic and immunomobilizing activities of polymer-bound drugs:experimental and first clinical data. // *Journal of Controlled.* No. 91. pp. 1-16.
14. Noriega-Luna B., Godínez L.A., Rodríguez F.J., et al. Applications of Dendrimers in Drug Delivery Agents,Diagnosis, Therapy, and Detection // *Journal of Nanomaterials.* April 2014.
15. Pandey N., Mahara K. Dendrimers: A novel carrier for drug delivery system // *PharmaTutor.* October 2017. Vol. 5. No. 10. pp. 48-54.
16. Buhleier E., Wehner E., Vogtle F. Cascade-chain like and nonskid-chain-like synthesis of molecular cavity topologies // *Synthesis.* Vol. 2. pp. 155–158.
17. Tomalia D., Baker H., Dewald J., et al. A New Class of Polymers: Starburst-Dendritic Macromolecules // *Polym. J.* 1985. Vol. 17. No. 1. pp. 117-132.
18. Garg T., Singh O., Arora S. Dendrimer- a novel scaffold for drug delivery // *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research.* April 2011. Vol. 7. No. 2. pp. 211-220.

19. de Araújo R.V., Santos D.S., Ferreira E.I., Giarolla J. New Advances in General Biomedical Applications of PAMAM Dendrimers // *Molecules*. November 2018. Vol. 23.
20. Shiah J., Dvorak M., Kopečková P., et al. Biodistribution and antitumour efficacy of long-circulating N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide copolymer–doxorubicin conjugates in nude mice. // *Eur J Cancer*. 2001. No. 37. pp. 131–139.
21. Ritzén A., Frejd T. Synthesis of a chiral dendrimer based on polyfunctional amino acids // *Chem. Commun.* December 1998. pp. 207-208.
22. Jain N., Khopade A. Advances in controlled and novel drug delivery. 2nd ed. New Delhi: CBS Publishers & Distributors, 2001. 361–380 pp.
23. Crespo L., Sanclimens G., Montaner B., et al. Peptide Dendrimers Based on Polyproline Helices // *Journal of the American Chemical Society*. June 2002. Vol. 124. pp. 8876-8883.
24. Hawker C.J., Fréchet J.M.J. Preparation of Polymers with Controlled Molecular Architecture. A New Convergent Approach to Dendritic Macromolecules // *J. Am. Chem. Soc.* January 1990. Vol. 112. pp. 7638-7647.
25. Frechet M.J. Functional Polymers and Dendrimers: Reactivity, Molecular Architecture, and Interfacial Energy // *Science*. March 1994. Vol. 263. pp. 1710-1716.
26. Cheng Y., Xu Z., Ma M., Xu T. Dendrimers as Drug Carriers: Applications in Different Routes of Drug Administration // *Journal of pharmaceutical sciences*. January 2008. Vol. 97. No. 1. pp. 123-143.
27. Wu D., Yang J., Li J., et al. Hydroxyapatite-anchored dendrimer for in situ remineralization of human tooth enamel // *Biomaterials*. 2013. Vol. 34. No. 21. pp. 5036–5047.

28. Shimamura M., Kasai S., Nagasawa H., Ashino H., Yamamoto Y., Uto Y. Angiogenesis inhibition of arginine-rich dendrimers, TX-1943 and TX-1944, which mimic the surface structure of endostatin // *Vascular Pharmacology*. 45 2006. P. e119.
29. Malik N., Duncan R., Tomalia D.A., Esfand R. An antineoplastic-dendritic polymer drug delivery system, EP 1 439 859 B1, March 18, 2007.
30. Kojima C., Kono K., Maruyama K., Takagishi T. Synthesis of polyamidoamine dendrimers having poly(ethylene glycol)grafts and their ability to encapsulate anticancer drugs // *Bioconjugate*. 2000. Vol. 11. No. 6. pp. 910–917.
31. Kukowska-Latallo J.F., Raczka E., Quintana A., et al. Intravascular and Endobronchial DNA Delivery to Murine Lung Tissue Using a Novel, Nonviral Vector // *HUMAN GENE THERAPY*. July 2000. Vol. 11. pp. 1385– 1395.
32. Heegaard P.M.H., Boas U., Sorensen N.S. Dendrimers for vaccine and immunostimulatory uses. A review // *Bioconjugate Chemistry*. 2010. Vol. 21. No. 3. pp. 405–418.
33. Wiener E.C., Brechbiel M.W., Brothers H. Dendrimer-based metal chelates: a newclass of magnetic resonance imaging contrast agents // *Magnetic Resonance in Medicine*. 1994. Vol. 31. No. 1. pp. 1-8.
34. Hong S., Bielinska A.U., Mecke A., et al. Interaction of Poly(amidoamine) Dendrimers with Supported Lipid Bilayers and Cells: Hole Formation and the Relation to Transport // *Bioconjugate Chem*. June 2004. Vol. 15. pp. 774-782.
35. Hong S., Leroueil P.R., Janus E.K., al. E. Interaction of Polycationic Polymers with Supported Lipid Bilayers and Cells:Nanoscale Hole Formation and Enhanced Membrane Permeability // *Bioconjugate Chem*. February 2006. Vol. 17. pp. 728-734.
36. Crampton H., Simanek E.E. Dendrimers as drug delivery vehicles:

non-covalent interactions of bioactive compounds with dendrimers // *Polym Int.* March 2007. Vol. 56. No. 4. pp. 489–496.

37. Kumari S., Nagpal M., Aggarwal G., al. E. Microparticles drug delivery system: a review // *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* February 2016. Vol. 5. No. 03. pp. 543-566.
38. Reddy Y.D., Dhachinamoorthi D., Chandra sekhar K.B. A Brief Review on Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery and Targeting // *Journal of Medical and Pharmaceutical Innovation.* February 2015. Vol. 2. No. 7. pp. 19-32.
39. Kramer P.A. Albumin Microspheres as Vehicles for Achieving Specificity in Drug Delivery // *Journal of Pharmaceutical Sciences.* August 1974. Vol. 63. No. 10. pp. 1646-1647.
40. Soppimath K.S., Aminabhavi T.M., Kulkarni A.R., Rudzinski W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices // *Journal of Controlled Release.* 2000. Vol. 70. pp. 1-20.
41. Calzoni E., Cesaretti A., Polchi A., al. E. Biocompatible Polymer Nanoparticles for Drug Delivery Applications in Cancer and Neurodegenerative Disorder Therapies // *Journal of Functional Biomaterials.* January 2019. Vol. 10.
42. Yadav H.K.S., Almokdad A.A., Shaluf S.I.M., Debe M.S. Polymer-Based Nanomaterials for Drug-Delivery Carriers. // In: *Nanocarriers for Drug Delivery.* Elsevier, 2019. pp. 531–556.
43. Sharma M. Transdermal and Intravenous Nano Drug Delivery Systems // In: *Applications of Targeted Nano Drugs and Delivery Systems.* Elsevier, 2019. pp. 499-550.
44. Zhang Z., Tsai P.C., Ramezanli T., Michniak-Kohn B.B. Polymeric nanoparticles-based topical delivery systems for the treatment of dermatological diseases // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology.* 2013. Vol. 5. No. 3. pp. 205–218.

45. Tosi G., Bortot B., Ruozi B., al. E. Potential use of polymeric nanoparticles for drug delivery across the blood-brain barrier // *Current Medicinal Chemistry*. June 2013. Vol. 20. No. 17. pp. 2212-2225.
46. Rosiak J.M., Yoshii F. Hydrogels and their medical applications // *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*. 1999. Vol. 151. pp. 56-64.
47. Ilić-Stojanović S., Nikolić L., Nikolić V., al. E. Stimuli-sensitive Hydrogels for Pharmaceutical and Medical Applications // *Facta Universitatis; Series: Physics, Chemistry and Technology*. June 2011. Vol. 9. No. 1. pp. 37-56.
48. Bemmelen J.M. Der Hydrogel und das kristallinische Hydrat des Kupferoxydes // *Zeitschrift Fur Anorganische Chemie*. 1894. Vol. 5. No. 1. pp. 466-483.
49. Wichterle O., Lim D. Hydrophilic gels for biological use // *Nature*. January 1960. Vol. 165. No. 4706. pp. 117-118.
50. Wichterle O. Colored contact lenses and to process for their fabrication, BE633091A, May 31, 1962.
51. Lee K.Y., Mooney D.J. Hydrogels for Tissue Engineering // *Chemical Reviews*. July 2001. Vol. 101. No. 7. pp. 1869-1880.
52. van der Linden H.J., Herber S., Olthuis W., Bergveld P. Stimulus-sensitive hydrogels and their applications in chemical (micro)analysis // *The Analyst*. February 2003. Vol. 128. No. 4. pp. 325-331.
53. Jen A., Wake M.C., Mikos A. Review: Hydrogels for Cell Immobilization // *Biotechnology and Bioengineering*. 1996. Vol. 50. No. 4. pp. 357-364.
54. Wang K.L., Burban J.H., Cussler E.L. Hydrogeis as Separation Agents // *Advances in Polymer Science*. 1993. Vol. 110. pp. 67-79.
55. Bennett S.L., Melanson D.A., Torchiana D.F., Wiseman D.M. Next-

- Generation HydroGel Films as Tissue Sealants and Adhesion Barriers // Journal of Cardiac Surgery. 2003. Vol. 18. No. 6. pp. 494–499.
56. Torchilin V.P., Narayanaswamy R. Hydrogels and Their Applications in Targeted Drug Delivery // *Molecules*. February 2019. Vol. 24. No. 603.
57. Hoare T.R., Kohane D.S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges // *Polymer*. January 2008. Vol. 49. pp. 1993-2007.
58. Jensen S., Jensen H., Møller H., et al. In vitro release studies of insulin from lipid implants in solution and in a hydrogel matrix mimicking the subcutis // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. January 2016. Vol. 81. pp. 103-112.
59. Ghasemiyeh P., Mohammadi-Samani S. Hydrogels as Drug Delivery Systems; Pros and Cons // *Trends in Pharmaceutical Sciences*. February 2019. Vol. 5. No. 1. pp. 7-24.
60. Hamidi M., Azadi A., Rafiei P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery // *Advanced Drug Delivery Reviews*. December 2008. Vol. 60. No. 15. pp. 1638-1649.
61. Sun L., Huang Y., Bian Z., al. E. Sundew-inspired Adhesive Hydrogels combined with Adipose Derived Stem Cells for Wound Healing // *ACS Applied Materials & Interfaces*. January 2016. Vol. 8. No. 3. pp. 2423–2434.
62. Alvarez-Lorenzo C., Anguiano-Igea S., Varela-García A., et al. Bioinspired hydrogels for drug-eluting contact lenses // *Acta Biomaterialia*. January 2019. Vol. 84. pp. 49-62.
63. Yanbin C., Chen G., Li J., al. E. A Glycyrrhetic Acid-Modified Curcumin Supramolecular Hydrogel for liver tumor targeting // *Scientific Reports*. March 2017. Vol. 7. No. 1.
64. Friedmann T., Roblin R. Gene Therapy for Human Genetic Disease?

// Science. March 1972. Vol. 175. pp. 949-955.

65. Sung Y., Kim S. Recent advances in the development of gene delivery systems // Biomaterials Research. March 2019. Vol. 23. No. 1.
66. Robinson H., Pertmer T. DNA vaccines for viral infections: Basic studies and applications // Advances in Virus Research. 2000. Vol. 55. pp. 1-74.
67. Шаймарданова Ф. Генно-клеточная терапия для стимулирования нейрорегенерации при травме спинного мозга [Текст]: дис. докт. биол. наук: 03.03.04: защищена 25.12.2014. Казань. 2014. 260 с. режим доступа: <http://www.paralife.narod.ru/reabilitaciya> , свободный - (02.09.2019).
68. Vasile C. Polymeric Nanomaterials: Recent Developments, Properties And Medical Applications // In: Polymeric Nanomaterials in Nanotherapeutics. Elsevier, 2019. pp. 1-66.
69. Novo L., Mastrobattista E., van Nostrum C.F., al. E. Decationized polyplexes for gene delivery // Expert Opinion on Drug Delivery. November 2014. Vol. 12. No. 4. pp. 507-512.
70. Kang H.C., Cho H., Bae Y.H. DNA Polyplexes as Combinatory Drug Carriers of Doxorubicin and Cisplatin: An In Vitro Study // Mol Pharm. August 2015. Vol. 12. No. 8. pp. 2845–2857.
71. Liao J.F., Lee J.C., Lin C.K., et al. Self-Assembly DNA Polyplex Vaccine inside Dissolving Microneedles for High-Potency Intradermal Vaccination // Theranostics. 2017. Vol. 7. No. 10. pp. 2593-2605.
72. Lundstrom K. Viral Vectors in Gene Therapy // Diseases. May 2018. Vol. 6. No. 42. P. 20.
73. Sokullu E., Soleymani Abyaneh H., Gauthier M.A. Plant/Bacterial Virus-Based Drug Discovery, Drug Delivery, and Therapeutics // Pharmaceutics. Nov 2019. Vol. 211. P. 38.

74. Нельсон Д., Кокс М. Основы биохимии Ленинджера. Т. 1. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. 693 с.
75. Р.Геннис. Биомембраны: молекулярная структура и функции. Москва: Мир, 1997. 624 с.
76. Bangham A.D., Horne R.W. Negative Staining of Phospholipids and Their Structural Modification by Surface-Active Agents As Observed in the Electron Microscope // *Journal of Molecular Biology*. 1964. Vol. 8. No. 5. pp. 660–668.
77. Olusanya O.B., Haj Ahmad R.R., Ibegbu M., et al. Liposomal Drug Delivery Systems and Anticancer Drugs // *Molecules*. 2018. Vol. 23. No. 907. P. 17.
78. Новикова А.А., Кезимана П., Станишевский Я.М. Методы получения липосом, используемых в качестве носителей лекарственных средств (обзор) // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. май 2017. Т. 2. № 19. С. 134-138.
79. Elizondo E., Moreno E., Cabrera I., et al. Liposomes and other vesicular systems: structural characteristics, methods of preparation, and use in nanomedicine. Vol 104. // *In: Progress in molecular biology and translational science*. Elsevier Inc., 2011. pp. 1–52.
80. Campbell P.I. Toxicity of Some Charged Lipids Used in Liposome Preparations. // *Cytobios*. 1983. Vol. 37. pp. 21-26.
81. Lombardo D., Kiselev M.A., Caccamo M.T. Smart Nanoparticles for Drug Delivery Application: Development of Versatile Nanocarrier Platforms in Biotechnology and Nanomedicine // *Journal of Nanomaterials*. February 2019. No. 12. pp. 1-26 .
82. Pérez-Herrero E., Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. // *Eur. J. Pharm.* 2015.

83. Gregoriadis G, editor. Liposome Technology. Volume I. Liposome Preparation and Related Techniques. Vol I. 2007.
84. Jain J., Ayen W., Kumar. Self Assembling Polymers as Polymersomes for Drug Delivery // Current Pharmaceutical Design. 2011. Vol. 17. No. 1. pp. 65-79.
85. Lee J.S., Feijen J. Polymersomes for drug delivery: Design, formation and characterization // Journal of Controlled Release. 2012. Vol. 161. pp. 473–483.
86. Anajafi T., Mallik S. Polymersome-based drug-delivery strategies for cancer therapeutics // Therapeutic delivery. April 2015. Vol. 6. No. 4. pp. 521-534.
87. Batrakova E.V., Bronich T.K., Vetro J.A., Kabanov A.V. Polymer Micelles as Drug Carriers // In: Nanoparticulates As Drug Carriers / Ed. by Torchilin V. World Scientific Publishing Company, 2006. pp. 57-93.
88. Zhang Y., Huang Y., Li S. Polymeric Micelles: Nanocarriers for Cancer-Targeted Drug Delivery // PharmSciTech. August 2014. Vol. 15. No. 4. pp. 863-871.
89. Bader H., Ringsdorf H., Schmidt B. Watersoluble Polymers in Medicine // Die Angewandte Makromolekulare Chemie. 1984. Vol. 123. No. 1. P. 457485.
90. Vasile C. Polymeric Nanomaterials:Recent Developments, Properties And Medical Applications // In: Polymeric Nanomaterials in Nanotherapeutics. Elsevier, 2019. pp. 1-66.
91. Collins J., Bhaskaran A., Conna L.A. Polymersomes for Drug Delivery // Material Matters. 2017. Vol. 12. No. 2. pp. 45-52.
92. Anajafi , Mallik S. Polymersome-based drug-delivery strategies for cancer therapeutics // Therapeutic delivery. April 2015. Vol. 6. No. 4. pp. 521-534.

93. Decher G., Hong J.D. Buildup of Ultrathin Multilayer Films by a Self-Assembly Process:11. Consecutive Adsorption of Anionic and Cationic Bipolar Amphiphiles and Polyelectrolytes on Charged Surfaces // *Berichte Der Bunsengesellschaft Für Physikalische Chemie*. 1991. Vol. 95. No. 11. pp. 1430-1434.
94. Марченко И.В. Модификация полиэлектролитных капсул наночастицами серебра и молекулами красителей и перенос энергии фотовозбуждения в этих системах [Текст]: дис. канд. физ.-мат. наук: 02.00.06: защищена 15.02.2012. Москва. 2012. 114 с.
95. Antipina M.N., Kiryukhin V., Skirtach A.G., Sukhorukov G.B. Micropackaging via layer-by-layer assembly: microcapsules and microchamber arrays // *International Materials Reviews*. 2014. Vol. 59. No. 4. pp. 224-244.
96. Kida T., Mouri M., Akashi M. Fabrication of Hollow Capsules Composed of Poly(methyl methacrylate) Stereocomplex Films // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006. Vol. 45. pp. 7534 –7536.
97. Sukhorukov G.B., Donath E., Lichtenfeld H., al. E. Layer-by-layer self assembly of polyelectrolytes on colloidal particles // *Colloids and Surfaces*. 1998. Vol. 137. pp. 253-266.
98. Антипина М.Н. Разработка полимерных мультислойных капсул для обеспечения оптимального биоэффекта лекарственных препаратов и активных веществ [Текст]: дис. докт. физ.-мат. наук: 03.01.02: защищена 25.12.2014. Саратов. 2016. 210 с. режим доступа свободный: [https://www.sgu.ru/sites/default/files/dissertation/2016/05/09/dissertaciya\\_antipina\\_1.pdf](https://www.sgu.ru/sites/default/files/dissertation/2016/05/09/dissertaciya_antipina_1.pdf) (18.09.2019).
99. Grigoriev D.O., Bukreeva T., Mohwald H., Shchukin D.G. New Method for Fabrication of Loaded Micro- and Nanocontainers: Emulsion Encapsulation by Polyelectrolyte Layer-by-Layer Deposition on the Liquid Core // *Langmuir*. October 2008. Vol. 24. No. 3. pp. 999-1004.

100. Zyuzin M.V., Timin A.S., Sukhorukov G.B. Multilayer capsules inside biological systems: state of the art and open challenges // *Langmuir*. March 2019. Vol. 35. No. 13.
101. Sukhorukov G.B., Antipov A.A., et al. pH-controlled macromolecule encapsulation in and release from polyelectrolyte multilayer nanocapsules. // *Macromolecular Rapid Communications*. 2001. Vol. 22. No. 1. pp. 44-46.
102. Vert M., Doi Y., Hellwich K.H., et al. Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012) // *Pure Appl. Chem*. January 2012. Vol. 84. No. 2. pp. 377–410.
103. Lohse S.E., Murphy C.J. Applications of Colloidal Inorganic Nanoparticles: From Medicine to Energy // *Journal of the American Chemical Society*. 2012. Vol. 134. No. 38. pp. 15607–15620.
104. Tan M.C., Ren L., Chow G.M., Zhang Q. Inorganic Nanoparticles for Biomedical Applications // In: *NanoScience in Biomedicine*. Tsinghua University Press, Beijing and Springer-Verlag GmbH Berlin Heidelberg, 2009. pp. 272-289.
105. Kong F.Y., Zhang J.W., Li R.F., et al. Unique Roles of Gold Nanoparticles in Drug Delivery, Targeting and Imaging Applications // *Molecules*. 2017. Vol. 22. No. 9.
106. Першина А.Г., Сазонов А.Э., Мильто И.В. Использование магнитных наночастиц в биомедицине // *Бюллетень сибирской медицины*. 2018. Т. 2. С. 70-78.
107. Nikiforov V.N., Filinova E.Y. Biomedical Applications of Magnetic Nanoparticles // In: *Magnetic Nanoparticles*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009. pp. 393-455.
108. Kohler N., Sun C., Wang J., Zhang M. Methotrexate-Modified Superparamagnetic Nanoparticles and Their Intracellular Uptake into Human Cancer Cells // *Langmuir*. 2005. Vol. 21. No. 19. pp. 8858-8864.

109. Олейников В., Чугунов А., Панов А. Квантовые точки — наноразмерные сенсоры для медицины и биологии // Природа. 2010. № 3. С. 22-28.
110. Probst C.E., Zrazhevskiy P., Bagalkot V., Gao X. Quantum dots as a platform for nanoparticle drug delivery vehicle design // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2013. Vol. 65. pp. 703-718.
111. Hofmann K.A., Küspert F. Verbindungen von Kohlenwasserstoffen mit Metallsalzen // *Zeitschrift für anorganische Chemie*. 1897. Vol. 15. No. 1. pp. 204-207.
112. Методическое пособие «Metal-Organic Frameworks (MOF), или металлорганические координационные полимеры (МКОП)». Казань. 2013. 41 с.
113. Chowdhury M. Metal-organic-frameworks for biomedical applications in drug delivery, and as MRI contrast agents // *Journal of biomedical materials research A*. April 2017. Vol. 105A. No. 4. pp. 1184-1194.
114. Wang L., Zheng M., Xie Z. Nanoscale metal-organic frameworks for drug delivery: A conventional platform with new promise // *Journal of Materials Chemistry B*. January 2018. Vol. 6. pp. 707-717.
115. Singh P., Sen K. Contemporary mesoporous materials for drug delivery applications: a review // *Journal of Porous Materials*. September 2017. Vol. 25. No. 4. pp. 965–987.
116. Vallet-Regi M., Balas F., Arcos D. Mesoporous Materials for Drug Delivery // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2007. Vol. 46. pp. 7548 – 7558.
117. Bharti C., Nagaich U., Kumar Pal A., Gulati N. Mesoporous silica nanoparticles in target drug delivery system: A review // *International Journal of Pharmaceutical Investigation*. July 2015. Vol. 15. No. 3. pp. 124-133.

118. Рожина Э.В., Данилушкина А.А., Науменко Е.А., Львов Ю.М., Фахруллин Р.Ф. Нанотрубки галлуазита – перспективный биосовместимый материал для «умных» композитов с инкапсуляцией биологически активных веществ // Гены & клетки. 2014. Т. 9. № 3. С. 25-28.
119. Lvov Y.M., Santos A.C., Ferreira C., et.al. Halloysite clay nanotubes for life sciences applications: From drug encapsulation to bioscaffold // Advances in Colloid and Interface Science. 2018. Vol. 257. pp. 58-70.
120. Tripathi A., Saraf S., Saraf S. Carbon Nanotropes: A Contemporary Paradigm in Drug Delivery // Materials. 2015. Vol. 9. pp. 3068-3100.
121. Mendes R.G., Bachmatiuk A., Buchner B., al. E. Carbon nanostructures as multi-functional drug delivery platforms // J. Mater. Chem. B. September 2013. Vol. 1. pp. 401-428.
122. Torchilin V.P. Fundamentals of Stimuli-responsive Drug and Gene Delivery Systems // In: Biomaterials Science Series No. 1. Stimuli-responsive Drug Delivery Systems. The Royal Society of Chemistry, 2018. pp. 1-32.
123. Li L., Wu-Wei Y., Dong-Gang X. Stimuli-responsive nanoscale drug delivery systems for cancer therapy // Journal of Drug Targeting. September 2018. Vol. 27. No. 4. P. 36.
124. Karimi M., Ghasemi A., Sahandi Z.P., et al. Smart micro/nanoparticles in stimulusresponsive drug/gene delivery systems. // Chemical Society Reviews. 2016. Vol. 45. No. 3. pp. 1457-1501.
125. Ganta S., Devalapally H., Shahiwala A., Amiji M. A review of stimuli-responsive nanocarriers for drug and gene delivery // Journal of controlled release. 2008. Vol. 126. No. 3. pp. 187-204.
126. Yamada R., Kostova M.B., Anchoori M.K., et al. Biological evaluation of paclitaxel-peptide conjugates as a model for MMP2-targeted drug delivery. // Cancer Biol Ther. February 2010. Vol. 9. No. 3. pp. 192-

- 203.
127. Mura S., Nicolas J., Couvreur P. Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery // *Nature materials*. November 2013. Vol. 12. pp. 991-1003.
128. Lee S.H., Choi S.H., Kim S.H., Park T.G. Thermally sensitive cationic polymer nanocapsules for specific cytosolic delivery and efficient genesilencing of siRNA: swelling induced physical disruption of endosome by cold shock. // *J. Control. Release*. 2008. Vol. 125. pp. 25-32.
129. Qin J., et al. Injectable superparamagnetic ferrogels for controlled release of // *Adv. Mater*. 2009. Vol. 21. pp. 1354–1357.
130. Ruuge E.K., Rusetski A.N. Magnetic fluids as drug carriers: Targeted transport of drugs by a magnetic field // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 1993. Vol. 122. pp. 335-339.
131. Rusetski A.N., Ruuge E.K. Magnetic fluid as a possible drug carrier for thrombosis treatment // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. 1990. Vol. 85. pp. 299-302.
132. Laurent S., Dutz S., Häfeli U.O., Mahmoudi M. Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. // *Adv Colloid Interface Sci*. August 2011. Vol. 166. No. 1-2. pp. 8-23.
133. Ge J., Neofytou E., Cahill T.J., al E. Drug Release from Electric Field Responsive Nanoparticles // *ACS Nano*. January 2012. Vol. 6. No. 1. pp. 227–233.
134. Антонов В.Ф. Липидные поры: стабильность и проницаемость мембран // *Соросовский образовательный журнал*. 1998. № 10. С. 10-17.
135. Чизмаджев Ю.А. Мембранная биология: от липидных бислоев до молекулярных машин // *Соросовский образовательный журнал*. 2000. Т. 6. № 8. С. 13-17.
136. Kolosnjaj-Tabi J., Gibot L., Fourquaux I., et al. Electric field-

- responsive nanoparticles and electric fields: Physical, chemical, biological mechanisms and therapeutic prospects // *Advanced Drug Delivery Reviews*. October 2018. Vol. 138. pp. 56-67.
137. Shi J., Ma Y., Zhu J., al E. A Review on Electroporation-Based Intracellular Delivery // *Molecules*. November 2018. Vol. 23. No. 11. P. 19.
138. Neumann E., Schaefer-Ridder M., Wang Y., Hofschneider P.H. Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. // *EMBO J*. 1982. Vol. 1. No. 7. pp. 841-845.
139. Sano M.B., Arena C.B., Bittleman K.R., al E. Bursts of Bipolar Microsecond Pulses Inhibit Tumor Growth // *Scientific Reports*. October 2015. Vol. 5. No. 14999. P. 13.
140. Davalos R.V., Rylander M.N., Arena C.B. Irreversible electroporation using nanoparticles, WO201015127, December 29, 2010.
141. DePrince E.A., Hinde R.J. Accurate Computation of Electric Field Enhancement Factors for Metallic Nanoparticles Using the Discrete Dipole Approximation // *Nanoscale Res Lett*. January 2010. Vol. 5. pp. 592–596.
142. Massart R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media // *IEEE Transactions on Magnetic*. March 1981. Vol. Mag-17. No. 2. pp. 1247-1248.
143. Faraday M. Experimental relations of gold (and other metals) to light // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. January 1857. Vol. 147. pp. 145-181.
144. Balgavy P., Dubnickova M., Uhrikova. Bilayer Thickness In Unilamellar Extruded Egg Yolk Phosphatidylcholine Liposomes: A Small-Angle Neutron Scattering Study // *acta physica slovacica*. May 1998. Vol. 48. No. 4. P. 509 — 533.
145. Барсуков Л.И. Липосомы // *Соросовский образовательный журнал*. 1998. Т. 10. С. 8.

146. Swiecicki J.M., Thiebaut F., Di Pisa , et al. How to unveil self-quenched fluorophores and subsequently map the subcellular distribution of exogenous peptides // *Scientific Reports*. 2016. Vol. 6. No. 1. P. 11.
147. Chen R.F., Knutson R. Mechanism of Fluorescence Concentration Quenching of Carboxyfluorescein in Liposomes: Energy Transfer to // *Analytical Biochemistry*. 1988. Vol. 172. pp. 61-77.
148. Watanabe A., Murayama S., Karasawa K., al E. A Simple and Easy Method of Monitoring Doxorubicin Release from a Liposomal Drug Formulation in the Serum Using Fluorescence Spectroscopy // *Chem. Pharm. Bull.* December 2019. Vol. 67. No. 4. pp. 367–371.
149. Neumann E, Sowers AE, Jordan CA, editors. *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*. New York: Plenum Press, 1989. 435 pp.
150. Teissie J., Golzio M., Rols. Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: A minireview of our present (lack of ?) knowledge // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005. Vol. 1724. pp. 270 – 280.
151. Методика поверки общепромышленных кондуктометров и кондуктометрических концентратометров. Москва: Издательство стандартов, 1978.
152. Рубин Б. Биофизика. Том 2.Биофизика клеточных процессов. 3rd ed. Москва: Издательство Московского Университета, 2004. 19 pp.
153. Костюк ПГ, редактор. Биофизика мембран. Том 2. Ионные каналы и их модели. Т. 2. Москва: ВИНТИ, 1982. 279-280 с.
154. Полунин В.М., Беседин А.Г., Сычев Г.Т. Электростатика, постоянный электрический ток, электромагнитные явления. Тестовые задания по физике для проверки качества знаний. Курск: Юго-западный гос. ун – т., 2010. 180 с.
155. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Электродинамика сплошных сред. 4-е изд. Т. VIII. Москва: Физматлит, 2005. 656 с. с.

156. Xu J., Xiao X., Ren F., et al. Enhanced photocatalysis by coupling of anatase TiO<sub>2</sub> film to triangular Ag nanoparticle island // *Nanoscale Research Letters*. 2012. Vol. 7. No. 239. P. 6.
157. Кокшаров Ю.А. Энергия вытянутой сфероидальной оболочки в однородном магнитном поле // *Физика твердого тела*. июль 2017. Т. 59. № 4. С. 706-711.
158. Frumkis L., Kaplan B.Z. Spherical and Spheroidal Shells as Models in Magnetic Detection // *IEEE Transactions on magnetic*. September 1999. Vol. 35. No. 5. pp. 4151-4158.
159. Табачников С.Л., Фукс Д.Б. Математический дивертисмент. 30 лекций по классической математике. Москва: МЦНМО, 2017. 510 с.
160. Гайдуков Г.Н., Горбатый И.Н., Фаттахдинов А.У. Диэлектрический эллипсоид во внешнем электрическом поле // *Инновации в науке: научный журнал*. 2017. Т. 5. № 66. С. 73-76.