

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Национальный исследовательский Нижегородский
государственный университет им. Н.И. Лобачевского»
(ННГУ)

На правах рукописи

ШАНВАР САМАХ

**ВЛИЯНИЕ ПОКРЫТИЯ АЛЬБУМИНОМ НА ДОЛГОВРЕМЕННУЮ
КОЛЛОИДНУЮ СТАБИЛЬНОСТЬ И ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ
АНТИСТОКСОВЫХ НАНОФОСФОРОВ**

03.01.02 Биофизика

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.б.н. Гурьев Евгений Леонидович

Консультант:

д.ф.-м.н. Звягин Андрей Васильевич

Нижний Новгород – 2021 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. НАНОМЕДИЦИНА И ТЕРАНОСТИКА	15
1.2. АНТИСТОКСОВЫЕ НАНОФОСФОРЫ (НАФ).....	17
1.2.1. Развитие технологий получения НАФ	17
1.2.2. Оптические свойства НАФ.....	19
1.2.3. Химический состав и структура НАФ	23
1.2.4. Преимущества применения НАФ in vivo.....	27
1.2.5. Современные биологические применения	28
1.3. БЕЛКОВАЯ КОРОНА (БК).....	31
1.3.1. Пути проникновения наноматериалов в организм	31
1.3.2. Взаимодействие с белками и формирование БК в кровотоке	32
1.3.3. Роль БК в иммунном ответе на наночастицы.....	36
1.4. ЭФФЕКТ ПОВЫШЕННОЙ ПРОНИЦАЕМОСТИ И УДЕРЖАНИЯ (EPR-ЭФФЕКТ)....	38
1.4.1. Распределение наночастиц по организму.....	38
1.4.2. Экстравазация	39
1.4.3. Пассивная доставка наночастиц посредством EPR-эффекта.....	41
1.4.4. Ненаправленный активный перенос через клетки эндотелия сосудов...	42
1.4.5. Способы проникновения наночастиц в клетки	43
1.4.6. Способы выведения из организма	47
1.5. АЛЬБУМИН.....	49
1.5.1. Физико-химические свойства альбумина	49
1.5.2. Наночастицы на основе альбумина	50
1.5.3. Стабилизация наночастиц альбумином	52
1.5.4. Стабилизирующие свойства БСА и дБСА.....	53

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	55
2.1. МАТЕРИАЛЫ	55
2.2. МЕТОДЫ.....	57
2.2.1. Синтез и характеристика НАФ-ОК и НАФ-NOBF ₄	57
2.2.2. Оптимизация концентрации БСА для формирования стабильной БК на поверхности НАФ-ПЭИ.....	59
2.2.3. Оптимизация концентрации БСА и дБСА для формирования стабильной БК на НАФ-NOBF ₄	60
2.2.4. Осаждение наноконплексов и исследование их коллоидной стабильности в разных средах	60
2.2.5. Формирование жесткой БК на поверхности НАФ.....	62
2.2.6. Оценка влияния покрытия НАФ-NOBF ₄ денатурированным БСА на адсорбцию белков сыворотки.....	63
2.2.7. Исследование связывания НАФ-ПАК, НАФ-ПЭИ и НАФ@БК с клетками в культуре.....	64
2.2.8. Анализ цитотоксичности лиофилизированных дБСА-НАФ-NOBF ₄	65
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	68
3.1. СИНТЕЗ И ХАРАКТЕРИЗАЦИЯ НАФ-ОК И НАФ-NOBF ₄	68
3.2. ИССЛЕДОВАНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ЖЕСТКОЙ БК НА ПОВЕРХНОСТИ НАФ-ПАК И НАФ-ПЭИ И ИХ СВЯЗЫВАНИЯ С КЛЕТКАМИ В КУЛЬТУРЕ	71
3.3. ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОЙ КОНЦЕНТРАЦИИ АЛЬБУМИНА ДЛЯ ФОРМИРОВАНИЯ СТАБИЛЬНОЙ БК НА ПОВЕРХНОСТИ НАФ	74
3.4. ОЦЕНКА КОЛЛОИДНОЙ СТАБИЛЬНОСТИ БСА-НАФ-ПЭИ И дБСА-НАФ-NOBF ₄ , ОСАЖДЕННЫХ ЦЕНТРИФУГИРОВАНИЕМ	82
3.5. ОЦЕНКА КОЛЛОИДНОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫХ дБСА-НАФ-NOBF ₄	83

3.6.	ОЦЕНКА ДОЛГОВРЕМЕННОЙ КОЛЛОИДНОЙ СТАБИЛЬНОСТИ ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫХ ДБСА-НАФ-NOBF ₄	87
3.7.	ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ ПОКРЫТИЯ ДБСА ИНГИБИРОВАТЬ ФОРМИРОВАНИЕ ЖЕСТКОЙ БК НА НАФ-NOBF ₄	92
3.8.	АНАЛИЗ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫХ ДБСА-НАФ-NOBF ₄	94
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	97
	ВЫВОДЫ	99
	ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА	100

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

НАФ – Антистоксовы нанофосфоры

ФЛ – Фотолюминесценция

ИК – Инфракрасный

БК – Белковая корона

БСА – Бычий сывороточный альбумин

дБСА – Термически денатурированный БСА

NOBF₄ – Нитрозония тетрафторборат

SKOV-3 – Клетки аденокарциномы яичника человека

УФ – Ультрафиолетовый

ESA – Поглощение в возбужденном состоянии (англ. Excited-State Absorption)

Yb – Иттербий

Er – Эрбий

Tm – Тулий

λ_{ex} – Длина волны возбуждения

λ_{em} – Длина волны испускания

ETU – Апконверсионная передача энергии (англ. Energy transfer upconversion)

CSU – Апконверсионная кооперативная сенсбилизация (англ. Cooperative sensitization upconversion)

SET – Последовательный перенос энергии (англ. Successive energy transfer)

CL – Кооперативная люминесценция (англ. Cooperative luminescence)

CR – Перекрестная релаксация (англ. Cross-relaxation)

PA – Фотонная лавина (англ. Photon avalanche)

EDTA – Этилендиаминтетрауксусная кислота

ОК – Олеиновая кислота (англ. oleic acid)

ПЭИ – Полиэтиленимин

ПАК – Полиакриловая кислота

ПЭГ – Полиэтиленгликоль

КТ – Рентгеновская компьютерная томография

МРТ – Магнитно-Резонансная Томография

EPR–Эффект – Эффект повышенной проницаемости и удержания (англ. Enhanced permeability and retention effect)

АТ-II – Ангиотензин II

РЭС – Ретикулоэндотелиальная система

ЧСА – Человеческий сывороточный альбумин

grb0 – альбондин

SPARC – Секретируемый белок, кислый и богатый цистеином (англ. secreted protein acidic and rich in cysteine)

DMF – N,N-Диметилформамид (англ. Dimethylformamide)

ПЭМ – Просвечивающая электронная микроскопия (англ. Transmission electron microscopy)

DLS – Динамическое рассеяние света (англ. dynamic light scattering)

ELS – Электрофоретическое рассеяние света (англ. electrophoretic light scattering)

FTIR – Инфракрасные спектры поглощения (англ. Fourier-transform infrared spectroscopy)

FBS – Фетальная бычья сыворотка (англ. Fetal Bovine Serum)

PBS – Фосфатно-солевой буфер

DMEM – Модифицированная по способу Дульбекко среда Игла (англ. Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

BCA – Бицинхониновая кислота (англ. Bicinchoninic acid)

СНО – Клетки яичника китайского хомячка

МТТ – 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий бромид

ДМСО – Диметилсульфоксид (англ. dimethyl sulfoxide)

PDI – Индекс полидисперсности (англ. polydispersity index)

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Изучение возможности применения наночастиц в качестве тераностических агентов в настоящее время является активно развивающимся направлением биомедицины. Наночастицы представляют собой один из наиболее перспективных инструментов для диагностики, доставки лекарств и мониторинга терапевтического ответа. Наносистемы стремятся объединить достоинства наночастиц и эффективных фармацевтических препаратов, чтобы преодолеть их индивидуальные ограничения в биомедицинских применениях. Следовательно, эффективный комплекс на основе наночастиц должен быть биосовместимым, биоразлагаемым, невидимым для иммунной системы, коллоидно стабильным в биологических жидкостях и иметь длительное время циркуляции в кровотоке. Среди множества наночастиц, пригодных для применения в тераностике, антистоксовые нанофосфоры (НАФ) привлекают значительное внимание исследователей в течение последних двух десятилетий благодаря своим уникальным оптическим свойствам [1].

НАФ, получившие распространение в 1990-х годах, имеют широкие перспективы для имиджинга и доставки препаратов. НАФ преодолевают ограничения других флуоресцентных зондов, в том числе такие, как фотовыцветание флуоресцентных материалов, потенциальная токсичность квантовых точек и нежелательная авто-флуоресценция биологических тканей [2]. Помимо нанометрового размера и биосовместимости, НАФ обладают уникальными оптическими свойствами, такими как возбуждение и эмиссия фотолюминесценции (ФЛ) в ближнем инфракрасном (ИК) диапазоне, что обеспечивает глубокую визуализацию тканей и длительное время жизни ФЛ (0,1 – 1 мс), позволяющее избежать влияния автофлуоресценции тканей [3]. За

короткое время НАФ стали наиболее часто используемыми среди наночастиц для тераностических применений. Синтезированные НАФ проявляют липофильные свойства, склонность к агрегации делает их нестабильными в коллоидных растворах и затрудняет их применение. НАФ могут приобретать гидрофильность после модификации поверхности, например, с помощью методов обмена лигандов и покрытия полимерами [4].

При попадании наночастиц в биологические среды на их поверхности быстро адсорбируются белки, формирующие динамический слой – так называемую белковую корону (БК) [5]. При этом изменяются физико-химические свойства наночастиц, такие как размер, заряд, склонность к агрегации и соответственно меняется взаимодействие наночастиц с биологическими объектами [6]. На образование БК влияют разные факторы, связанные со свойствами наночастиц и с окружающей средой. Различают два типа БК: мягкую, создаваемую белками высокой концентрации и жесткую, создаваемую белками высокого сродства [7]. Состав и кинетика БК определяют биологическую идентичность наночастиц и следовательно судьбу этих наночастиц в организме [8].

В последнее время появляются данные о возможности использования БК для стабилизации наночастиц и увеличения времени их циркуляции. Такие подходы включают модификацию поверхности наночастиц для уменьшения адсорбции белков или увеличение адсорбции конкретного белка (например, Apo E) [9, 10], а также предварительное покрытие наночастиц стабилизаторами, которые минимизируют адсорбцию белка (например, полиэтиленгликоль и БК из молекул альбумина) [11, 12].

Альбумин является наиболее распространенным белковым компонентом крови человека. Покрытие наночастиц оболочкой из альбумина способствует сохранению их монодисперсности и коллоидной стабильности. В отличие от

многих полимеров, альбумин является биосовместимым, биоразлагаемым, нетоксичным, неиммуногенным и способен к длительной циркуляции в кровотоке. Свойства альбумина делают его потенциальным стабилизатором для НАФ, так как он адсорбируется на поверхности наночастиц и формирует жесткую БК, прочно связанную с поверхностью наночастиц с помощью электростатических связей [9, 12].

Таким образом, применение ключевых биофизических принципов для изучения и контроля взаимодействия наночастиц с биологическими системами является ключевым для их эффективного и безопасного применения. Исследование покрытия НАФ оболочкой из альбумина актуально с точки зрения создания стабильных и биосовместимых коллоидов. Это исследование открывает новые возможности для моделирования биофизических процессов, включая сорбцию биополимеров на поверхность неорганических материалов, протеин-опосредованную агрегацию наночастиц и др. Не менее важно оценить влияние оболочки из альбумина на формирование БК в крови и взаимодействие подобных комплексов с клетками организма.

Цели и задачи исследования

Целью работы было изучение формирования белковой короны на поверхности антистоксовых нанофосфоров и выявление ключевых факторов, определяющих формирование стабильных комплексов, покрытых белковой короной.

В соответствии с поставленной целью решались следующие задачи:

1. Исследовать формирование белковой короны из бычьего сывороточного альбумина (БСА) и термически денатурированного БСА (дБСА) вокруг НАФ, определить оптимальные концентрации БСА и дБСА для образования стабильной короны.

2. Исследовать долговременную коллоидную стабильность НАФ, покрытых тетрафторборатом нитрозония (НАФ-NOBF₄) и белковой короной из дБСА в различных буферах и биологических средах.

3. Изучить влияние белковой короны на эффективность адсорбции белков сыворотки на поверхности комплексов дБСА-НАФ-NOBF₄.

4. Исследовать цитотоксичность дБСА-НАФ-NOBF₄ в отношении клеток аденокарциномы яичника человека SKOV-3.

Научная новизна

Впервые показано, что белковая корона из термически денатурированного БСА (дБСА) обеспечивает лучшую дисперсность коллоидов по сравнению с нативным БСА.

Впервые исследована зависимость образования стабильной белковой короны от концентрации белка; оптимальные концентрации БСА и дБСА для образования стабильной белковой короны вокруг НАФ-NOBF₄ определены как 100 мкМ и 10 мкМ, соответственно.

Предложена новая методика стабилизации НАФ-NOBF₄ с помощью покрытия альбумином и лиофилизации, позволяющая получать комплексы, сохраняющие стабильность при их последующей солюбилизации в различных растворителях, в том числе в присутствии белков сыворотки.

Показано, что исходно сформированная белковая корона из дБСА на поверхности НАФ-NOBF₄ снижает дальнейшую нежелательную адсорбцию белков сыворотки и позволяет сохранить размер и коллоидную устойчивость комплексов.

Научно-практическая значимость

Полученные НАФ, покрытые NOBF_4 , перспективны для биомедицинских применений благодаря их небольшому размеру, уникальным оптическим свойствам и биосовместимости. Определение оптимальных концентраций нативного и денатурированного БСА, позволяющих формировать стабильную белковую корону, дополняет текущее понимание феномена белковой короны и способствует разработке технологий получения стабилизированных белком наночастиц для биомедицинских применений. Предложенная новая технология, с использованием метода лиофилизации, позволяет получать стабильные коллоиды НАФ- NOBF_4 , покрытых термически денатурированным БСА, которые представляются перспективной основой для создания тераностических агентов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Белковая корона из термически денатурированного БСА обеспечивает лучшую дисперсность коллоидов по сравнению с нативным БСА.
2. Для получения стабильных комплексов необходимо определение оптимальной концентрации белка в процессе образования белковой короны.
3. Проведение лиофилизации после формирования белковой короны из дБСА на поверхности наночастиц позволяет получать стабильные комплексы, устойчивые в сложных биологических средах.
4. Искусственно сформированная белковая корона препятствует адсорбции белков из биологической среды на поверхности наночастиц.

Личный вклад автора

Автор лично участвовал в проведении работы на всех этапах её выполнения, включая постановку задач, планирование и проведение

экспериментов, обработку и интерпретацию полученных результатов. Совместно с соавторами автор принимал участие в подготовке научных статей и докладов на семинарах и конференциях.

Достоверность научных результатов

Надежность используемых методов исследования вместе с воспроизводимостью результатов подтверждает достоверность научных результатов. Кроме того, аргументы и выводы, основанные на научных результатах, совпадают с результатами независимых исследований в литературе.

Апробация

Основные результаты работы представлялись на международных и российских мероприятиях: Всероссийской с международным участием школе-конференции молодых ученых «Биосистемы: организация, поведение, управление» (Н. Новгород, 2018, 2019, 2020); Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых "Биология-наука XXI века" (Пущино, 2019, 2020); Нижегородской сессии молодых ученых (технические, естественные, математические науки) (Н. Новгород, 2019); XIII Международной научно-практической конференции «PTSCIENSE» (Санкт-Петербург, 2020).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 13 работ, включая 5 статей в рецензируемых научных изданиях (Web of Science, Scopus), входящих в список ВАК.

Структура и объем работы

Работа состоит из введения, трех глав, заключения, выводов, цитируемой литературы, списка сокращений. Объем составляет 114 страниц машинописного текста, иллюстрированного 46 рисунками и 6 таблицами. Список литературы включает 117 источников, в том числе 111 работ иностранных авторов.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Наномедицина и тераностика

Одним из направлений развития наномедицины является применение наночастиц для диагностики, профилактики и лечения различных заболеваний [13]. В последнее время активно исследуются возможности применения наночастиц как потенциальных носителей терапевтических агентов для ряда биомедицинских применений. Применение многих лекарственных препаратов и наночастиц ограничено из-за нерастворимости в воде, нестабильности в биологической среде, плохого клеточного поглощения, отсутствия селективности к мишени и нежелательных побочных эффектов [14]. Наноконструкции на основе наночастиц способны объединить желаемые свойства составляющих их компонентов для преодоления этих ограничений и демонстрируют многообещающий потенциал для применения в тераностике [12].

Наночастицы обладают рядом уникальных характеристик, включая контролируемые нанометровый размер и форму, большое отношение площади поверхности к объему и регулируемые химические свойства поверхности, что позволяет реализовать простые схемы сборки комплексов носитель-лекарство для тераностических применений [15]. Кроме того, модификация и функционализация поверхности наночастиц с помощью молекул-мишеней позволяет использовать активную адресную доставку *in vivo* и добиться специфического связывания с целевыми клетками [16]. Для успешного применения *in vivo*, идеальные системы на основе наночастиц должны быть биосовместимыми, биоразлагаемыми, невидимыми для иммунной системы, а также должны иметь коллоидную стабильность в биологических жидкостях и длительное время циркуляции в кровотоке [17].

В ходе развития подходов прецизионной медицины, в 2002-ом году Фанхаусером было предложено понятие «тераностика», как сочетание терапии и диагностической визуализации во время лечения рака молочной железы (рисунок 1) [18]. Тераностика подразумевает направленное, безопасное и эффективное воздействие, ориентированное на лечение индивидуального пациента. Это обеспечивает переход от традиционной медицины к персонализированной медицине, где план лечения основан на уникальности каждого человека [19]. Тераностический подход особенно актуален в онкологии, где активно исследуется применение наносистем в виде липосом, дендримеров, полимерных наночастиц, металлических наночастиц, квантовых точек и углеродных нанотрубок [20, 21]. Таким образом, тераностика представляет собой целостный переход от медицины проб и ошибок к прогностической, профилактической и персонализированной медицине, что ведет к общему повышению качества медицинской помощи [19].



Рисунок 1. Тераностика как комплексный подход.

1.2. Антистоксовы нанофосфоры (НАФ)

Антистоксовы нанофосфоры или **Наноразмерные Антистоксовы Фосфоры (НАФ)**, представляют собой неорганические наноразмерные частицы (диаметром 1 – 100 нм), способные к процессу апконверсии фотонов. Апконверсия фотонов происходит, когда два или более падающих фотона с относительно низкой энергией поглощаются и преобразуются в один испущенный фотон с более высокой энергией [22]. Как правило, поглощение происходит в инфракрасном (ИК) диапазоне, в то время как излучение происходит в видимой или ультрафиолетовой (УФ) областях электромагнитного спектра. Это особенно важно для медицинских применений, поскольку обеспечивает способность к глубокому проникновению (ИК и ближний ИК могут проникать в ткани до нескольких см) [23]. НАФ состоят из кристаллической матрицы, легированной ионами редкоземельных переходных металлов из группы лантаноидов. НАФ привлекают особое внимание исследователей в связи с возможностями их применения для задач биоимиджинга, биосенсинга и наномедицины благодаря своим уникальным оптическим свойствам и высокоэффективному поглощению клетками [1, 22].

1.2.1. Развитие технологий получения НАФ

Технология создания НАФ была впервые разработана лауреатом Нобелевской премии по физике Ч.В. Раманом в 1928-ом году, когда он обнаружил антистоксов сдвиг рассеянного света [24]. Д. Стокс описал сдвиг во флуоресценции в 1852-ом году: фотоны возбуждения имеют более короткую длину волны (и, соответственно, более высокую энергию), чем излучаемые фотоны (рисунок 2) [25].

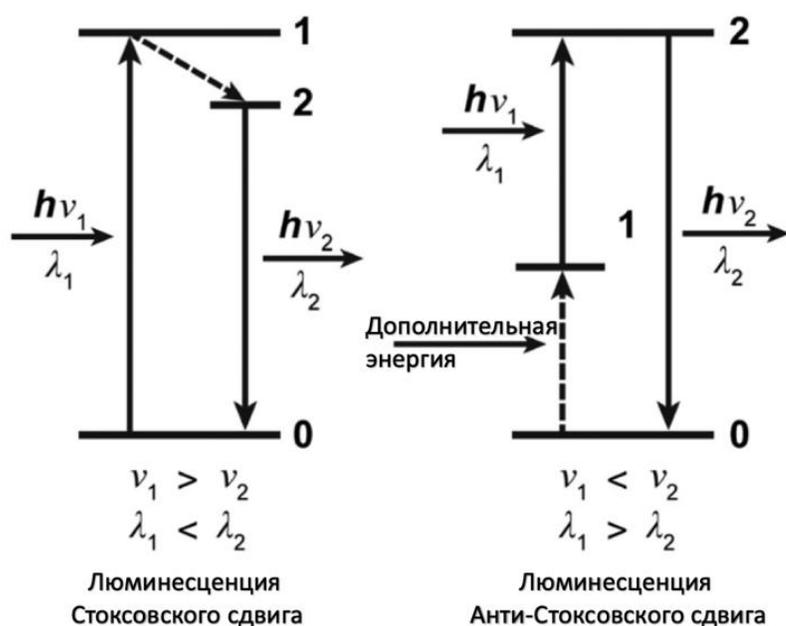


Рисунок 2. Схематическая иллюстрация типичного Стоксова сдвига (слева) и антистоксовского сдвига (справа) в процессе люминесценции [26].

Антистоксовая люминесценция представляет собой уникальный оптический процесс, нарушающий закон Стокса в своей основе. Он преобразует длинноволновое возбуждение в коротковолновое излучение и является основой оптических свойств НАФ [26]. Первоначальная идея апконверсии в ионно-легированных системах была предложена Н. Бломбергенем в 1959-ом году, который предложил энергетическую диаграмму для кристаллов, содержащих ионные примеси, которые по существу описывали поглощение в возбужденном состоянии (англ. excited-state absorption – ESA), основную модель апконверсии [27, 28].

Достижения в области лазерных технологий в 1960-х годах позволили наблюдать нелинейные оптические эффекты, такие как апконверсия [29]. Это позволило Ф. Аузелю экспериментально подтвердить процесс апконверсии фотонов и передачи энергии в 1966-ом году [30]. Аузель показал, что фотон ИК света может быть преобразован в фотон видимого света в системе

иттербий/эрбий (Yb/Er) и иттербий/тулий (Yb/Tm). В решетке переходного металла, легированной редкоземельными металлами, существует передача заряда в возбужденном состоянии между двумя возбужденными ионами. Аузель заметил, что передача этого заряда позволяет испускать фотон с гораздо большей энергией, чем соответствующий поглощенный фотон. Таким образом, апконверсия может происходить через реальное стабильное возбужденное состояние, что подтвердило более раннюю работу Бломбергера [30]. Эта работа послужила толчком к исследованиям апконверсии в решетках, легированных редкоземельными металлами.

Один из первых удачных опытов эффективного легирования кристаллической решетки ионами лантаноидов ($\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$) описан в работе Менюка с коллегами [31].

1.2.2. Оптические свойства НАФ

Наиболее заметной особенностью НАФ является их способность к апконверсионной ФЛ, которая представляет собой нелинейный процесс, в котором низкоэнергетические возбуждающие фотоны (два или более) длинноволнового диапазона преобразуются в более высокие энергетические излучения с более короткой длиной волны $\lambda_{ex} > \lambda_{em}$ [32]. Как правило, процессы апконверсии НАФ происходят с участием реальных энергетических уровней, более конкретно, от орбитальных электронных переходов 4f–4f и связанных с ними волновых функций в пределах одного лантаноидного иона [22]. Электроны 4f защищены внешними полными оболочками 5s и 5p, что приводит к длительному излучению и сопротивляемостью к фотохимической деградации и фотообесцвечиванию. Эти электронные переходы с участием ионных оболочек 4f имеют более одного метастабильного уровня, которые являются

запрещенными правилами квантово-механического отбора, однако их запрещенная природа приводит к очень длительным периодам жизни излучения (до десятков миллисекунд) [22, 32]. Процесс апконверсии содержит несколько сложных стадий поглощения фотонов ионами, безызлучательного переноса энергии между ионами, а также рассеивания энергии различными дефектами в НАФ в окружающую среду [28].

Пример процесса апконверсии показан на рисунке 3, где ионы Yb^{3+} поглощают ИК фотоны возбуждения, действуя в качестве сенсбилизаторов, а затем эта энергия возбуждения распределяется по всей сети активаторов посредством непрерывной безызлучательной передачи энергии ионам $\text{Er}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$, действующими в качестве активаторов, со скоростью процесса около 1000 с^{-1} [33]. Существует три различных класса механизмов апконверсии, показанных на рисунке 4 и перечисленных ниже [23, 34].

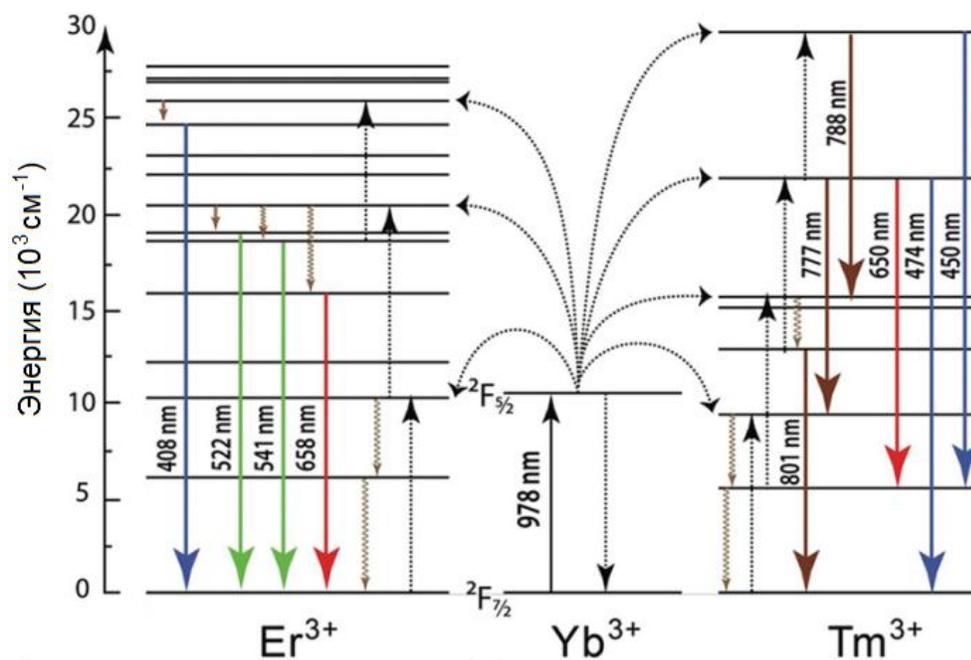


Рисунок 3. Диаграмма энергетических переходов ионов иттербия (Yb^{3+}) с участием ионов эрбия (Er^{3+}) или тулия (Tm^{3+}), где Yb^{3+} действует как сенсбилизатор, а Er^{3+} и Tm^{3+} как излучатели [32].

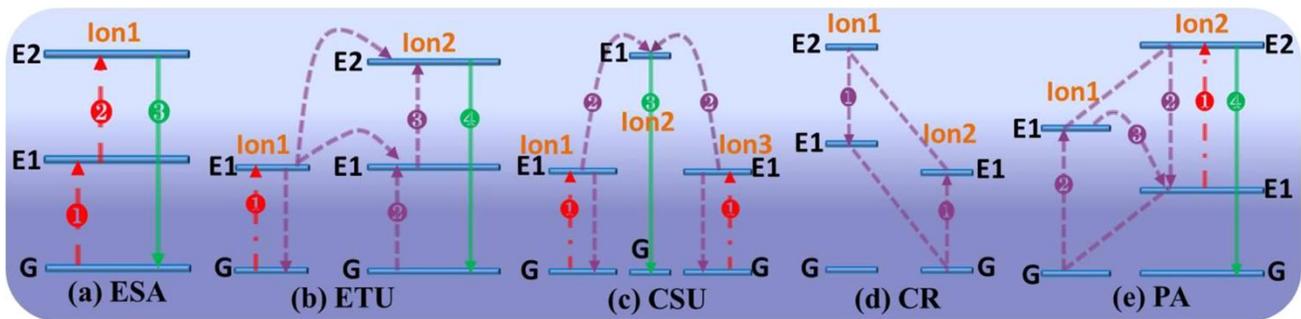


Рисунок 4. Основные процессы апконверсии НАФ: (а) поглощение в возбужденном состоянии (ESA), (b) апконверсионная передача энергии (ETU), (c) апконверсионная кооперативная сенсбилизация (CSU), (d) перекрестная релаксация (CR) и (e) фотонная лавина (PA). Красная, фиолетовая и зеленая линии представляют собой процессы возбуждения фотонов, передачи энергии и эмиссии, соответственно [22]. Ion – Ион, G – Основное состояние, E1 – Промежуточное возбужденное состояние, E2 – Высокое возбужденное состояние.

1. *Поглощение в возбужденном состоянии (ESA):* ESA представляет собой последовательное поглощение фотонов одним ионом, наблюдаемое в материалах с низкими концентрациями легирующих веществ [23]. ESA, также известная как последовательное двухфотонное поглощение, была первоначально предложена Блумбергенем в 1959-ом году [27]. Она включает в себя поглощение фотонов одним ионом. Первый фотон заставляет ион из основного состояния (G) перейти в промежуточное возбужденное состояние (E1). Второй фотон продвигает этот ион из E1 в более высокое возбужденное состояние (E2) в оптическом переходе и приводит к апконверсионной ФЛ [23]. Возникновение ESA объясняется лестничной структурой энергетических состояний с равными промежутками между уровнями (G, E1 и E2) (рисунок 4), а также продолжительным временем жизни состояния E1, дающим достаточно времени для последовательного поглощения фотонов до возвращения в основное состояние G [22].

2. *Апконверсионная передача энергии (ETU)*: ETU представляет собой апконверсию через передачу энергии между двумя соседними ионами, то есть от ионов сенсibilизатора к ионам активатора, в отличие от ESA, которая задействует один ион лантаноида [22]. Аузель впервые наблюдал и изучил ETU в середине 1960-х годов [30]. ETU включает последовательное поглощение фотонов ионом-сенсibilизатором, который возбуждается от основного состояния G до метастабильного уровня E1, а затем передает эту энергию возбуждения иону-активатору, продвигая его в состояние E2, где происходит эмиссия излучения [22]. Эффективная ETU обычно наблюдается в материалах с высокой концентрацией легирующих ионов, поскольку она чувствительна к среднему расстоянию между ионами сенсibilизатора и активатора [22, 23]. Другие изученные механизмы ETU включают в частности апконверсионную кооперативную сенсibilизацию (CSU), где активатор получает энергию возбуждения от двух ионов сенсibilизатора одного типа одновременно. Существует также последовательный перенос энергии (SET), кооперативная люминесценция (CL) и перекрестная релаксация (CR), которая обычно отвечает за механизм гашения излучения из-за частичного переноса энергии между двумя соседними ионами, однако, если ее хорошо регулировать и контролировать, она может привести к фотонной лавине (PA) [22, 23].

3. *Фотонная лавина (PA)*: Фотонная лавина или лавина поглощения была открыта Чивианом и коллегами в 1979-ом году [35]. Фотонная лавина может быть объяснена как комбинация ESA и CR. Поскольку первый ион поглощает фотоны и поднимается до своего E1, а затем E2, он может взаимодействовать с соседним состоянием иона на уровне G, способствуя его возбуждению до E1. Теперь оба иона могут действовать как сенсibilизаторы и аналогичным образом производить еще четыре иона, которые производят восемь и т. д. [22, 23]. PA – это процесс апконверсии, который происходит

только выше определенного порога энергии возбуждения. Он наименее заметен среди механизмов апконверсии и легко распознается по его специфическому порогу и длительному времени (секунды) для накопления популяции возбужденных ионов в уровне E1 перед эмиссией [22].

1.2.3. Химический состав и структура НАФ

НАФ состоят из кристаллической решетки (матрицы) с размером менее 100 нм и легирующей примеси (dopant), которая обычно представляет собой трехвалентный лантаноидный ион (или ионы), добавляемый в низких концентрациях и действующий как сенсibilизатор/эмиттер (или активатор) (обычно ~20 моль% для сенсibilизатора и <2 моль% для активатора) [36]. Легирующая добавка создаёт оптически активные (люминесцентные) центры, а решетка со своей кристаллической структурой обеспечивает матрицу для приведения этих центров в оптимальное положение. Сенсibilизатор может быть эффективно возбужден энергией падающего света, а затем он передает эту энергию активатору, который испускает излучение. Поэтому последний действует как фактический центр люминесценции в НАФ, в то время как сенсibilизатор увеличивает эффективность апконверсионной люминесценции [23].

НАФ способны к селективной апконверсии длины волны (или цвета), такой как преобразование ближний ИК в более короткий ближний ИК, видимый (синий, зеленый, красный) или даже УФ. Однако высокоэффективная апконверсия происходит за счет разумного отбора и координации между матрицей, ионами легирующей примеси и концентрацией легирующей примеси [22, 29]. Поскольку и сенсibilизатор, и эмиттер являются ионами лантаноидов, они обладают сходными ионными размерами и химическими свойствами, что

делает их интеграцию довольно легкой. Наиболее часто используемым сенсбилизатором является Yb^{3+} из-за его чрезвычайно простой схемы энергетического уровня и относительно большого поперечного сечения поглощения в области ближнего ИК [23, 26]. Эмиссионные цвета наноматериалов на основе лантаноидов могут регулироваться добавлением различных типов ионов-эмиттеров. Наиболее часто используемые ионы-эмиттеры в НАФ – это Er^{3+} , Tm^{3+} и Ho^{3+} . Однако в последнее время другие ионы лантаноидов, такие как Tb^{3+} , Eu^{3+} , Sm^{3+} и Dy^{3+} , также разрабатываются в качестве эмиттеров [37, 38].

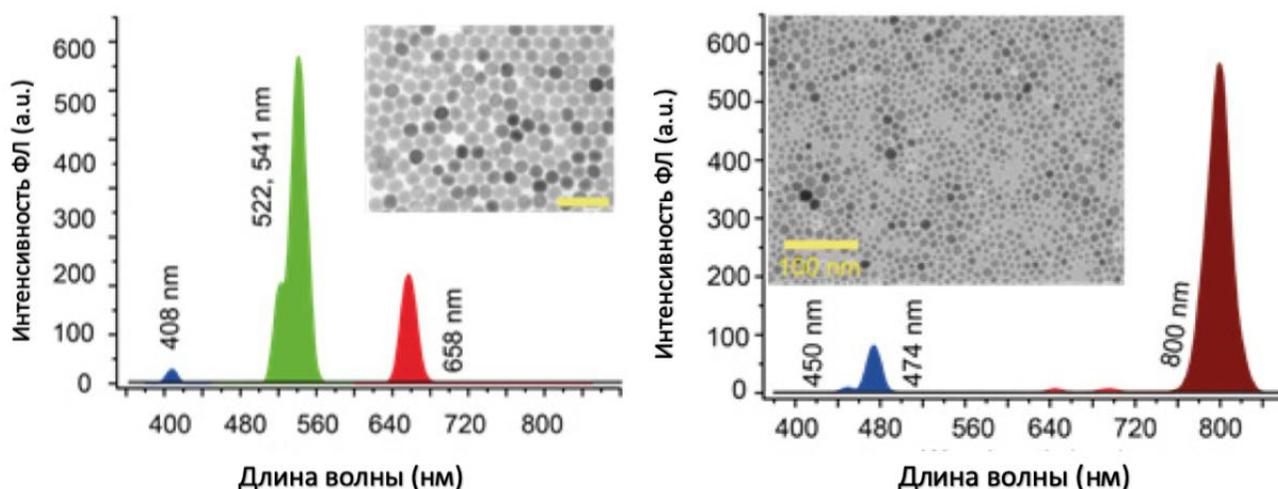


Рисунок 5. Спектры эмиссии ФЛ наноматериалов $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ (слева) и $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Tm}^{3+}$ (справа) и соответствующие им ТЭМ-изображения (масштабный отрезок 100 нм). Спектр $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ имеет двойную полосу в зеленой области и одну полосу в красной области, тогда как спектр $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Tm}^{3+}$ имеет полосы в синей и ИК областях [32].

Соответствующий выбор материала носителя имеет важное значение для достижения желаемых оптических свойств. Было обнаружено, что фториды являются идеальными кандидатами на роль матрицы среди различных типов материалов-хозяев, доступных для апконверсии, благодаря их очень низким

энергиям фононов и высокой химической стабильности. В частности, легированные ионами $\text{Yb}^{3+}/\text{Er}^{3+}$ и $\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ кристаллы NaYF_4 были признаны наиболее эффективными для получения спектров с максимумами эмиссии в зеленой и синей областях и наиболее часто используются с тех пор (рисунок 5) [39, 40]. Существует два типа кристаллических фаз в NaYF_4 при атмосферном давлении: кубическая фаза (α -фаза) и гексагональная фаза (β -фаза) [41]. Было замечено, что β -фаза более термодинамически стабильна и в большинстве случаев и может быть получена из α -фазы с помощью термической обработки, такой как отжиг и гидротермальная или сольватотермическая обработка [23, 42]. Это необходимо в отношении эффективности апконверсии, где эффективность апконверсии β - NaYF_4 намного выше, чем α - NaYF_4 : например сообщалось, что зеленое излучение β - $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ было в 10 раз сильнее, чем у α - $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+},\text{Er}^{3+}$ [23].

Поверхностная пассивация НАФ может быть достигнута путем формирования структуры "ядро/оболочка", которая уже показала чрезвычайную эффективность в развитии технологии получения квантовых точек, многократно увеличивая их квантовый выход и значительно уменьшая тушение ФЛ [43]. Идеальная структура ядра/оболочки НАФ должна удовлетворять двум условиям:

1. Конфигурация кристаллической оболочки и конфигурация ядра должны быть совместимы друг с другом для предотвращения деформации ядра и нарушения фотодинамики процессов апконверсии [44].

2. Оболочка должна генерировать энергию и пространственный барьер, чтобы предотвратить туннелирование энергии квази-экситона (рассеяния), которая распространяется в основном к поверхности оболочки НАФ и окружающей среде [2].

Наиболее простой реализацией структуры "ядро/оболочка" является ядро $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}(\text{Tm}^{3+})$, покрытое оболочкой NaYF_4 , которая отвечает вышеупомянутым требованиям (рисунок 6). Однородные кристаллические структуры ядра и оболочки не только предотвращают деформацию ядра, но и способствуют пассивации поверхностных дефектов ядра. В связи с этим покрытие НАФ тем же кристаллическим материалом, из которого состоит ядро, увеличивает скорость апконверсии в несколько раз в порошке НАФ и значительно повышает коэффициент апконверсии в водных растворах [2, 45].

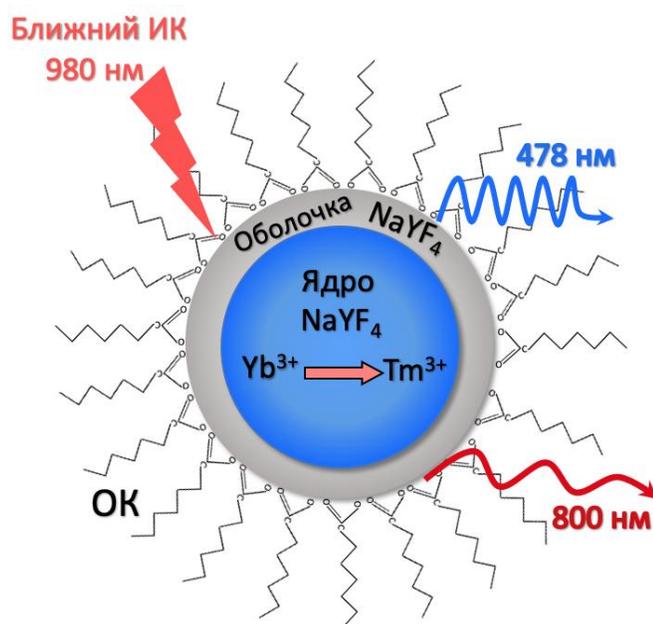


Рисунок 6. Иллюстрация структуры ядра/оболочки, возбуждения, переноса энергии и апконверсионной ФЛ на примере $\text{NaYF}_4:\text{Tb}^{3+},\text{Tm}^{3+}$.

Существует несколько методов, используемых в области нанотехнологий для синтеза НАФ, включая соосаждение, термическое разложение, гидротермальные или сольватотермические методы и другие [23]. В результате всех этих методов получают гидрофобные наночастицы, что обусловлено наличием органических лигандов на их поверхности. Например, при использовании в качестве поверхностного лиганда этилендиаминтетрауксусной

кислоты (EDTA) последняя карбонизируется после процесса отжига, в результате чего образуется гидрофобная поверхность НАФ. Поверхностный лиганд олеиновая кислота (ОК) связывается с поверхностью НАФ через внешние гидрофобные алкильные цепи, уменьшая гидрофильность НАФ. Эти реагенты/лиганды играют важную роль в повышении интенсивности апконверсионной ФЛ, предотвращении агломерации, повышении коллоидной стабильности и контроле размера и морфологии наночастиц [23]. Низкая гидрофильность, наряду с отсутствием соответствующих функциональных групп (таких как карбоксильные группы или аминогруппы) на поверхности НАФ, ограничивает способность к конъюгации между ними и биомолекулами, а также их использование для биологических применений. Поэтому поверхностные модификации НАФ являются важными для преодоления этих ограничений, повышения растворимости в воде и улучшения биосовместимости. Существует две группы подходов к поверхностной модификации НАФ [22, 23]:

- Модификация поверхности путём покрытия неорганической оболочкой, такой как оболочка из оксида кремния по методу Штобера или путём покрытия NOBF_4 по методу обмена лигандов.
- Модификация поверхности путём покрытия органическими полимерами (ПЭИ, ПАА и ПЭГ) по методу обмена лигандов.

1.2.4. Преимущества применения НАФ in vivo

НАФ обладают набором специфических свойств, которые дают им ряд преимуществ перед другими наноматериалами и делают их привлекательными для наномедицинских исследований.

1. НАФ способны к ФЛ после возбуждения ИК или ближним ИК светом, который попадает в диапазон оптической прозрачности биологических тканей (700 – 1100 нм), что позволяет добиться большей глубины проникновения при работе с биологическими объектами [46]. Некоторые из них даже излучают в том же диапазоне, например, наночастицы $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$ возбуждаются светом ~ 975 нм и излучают при 800 нм в диапазоне ближнего ИК (рисунок 5) [32].

2. НАФ имеют относительно длительное время ФЛ. Оно продолжается до десятков миллисекунд, в отличие от флуоресценции, которая длится несколько наносекунд. Непрерывность сигнала ФЛ и защищенная структура ядра/оболочки НАФ приводит к отсутствию мерцания и фотообесцвечивания [32, 47].

3. Возбуждение НАФ в ИК и ближней ИК области спектра практически не вызывает клеточной аутофлуоресценции. Кроме того, длительное время жизни сигнала ФЛ НАФ по сравнению с аутофлуоресценцией биологических тканей (почти на шесть порядков больше) предотвращает любое перекрытие этих сигналов. С другой стороны, пики их излучения сдвигаются в противоположных направлениях, то есть аутофлуоресценция сдвигается в красную сторону спектра, а ФЛ НАФ смещается в противоположную сторону [32, 48].

1.2.5. Современные биологические применения

Уникальные оптические свойства НАФ поддерживают высокий интерес к разработке способов их применения в различных областях. Среди потенциальных биомедицинских применений НАФ выделяют биоимиджинг,

создание биосенсоров, агентов для нанотермометрии, доставки и высвобождения лекарств (рисунок 7).



Рисунок 7. Схематическая иллюстрация применений НАФ в биомедицине.

Описано применение НАФ в качестве фотолюминесцентных зондов и контрастирующих агентов для рентгеновской компьютерной томографии (КТ), а также в качестве контрастирующих агентов для магнитно-резонансной томографии (МРТ) [49, 50]. Кроме того, сообщалось об использовании НАФ для функциональной визуализации лимфатических узлов и сосудистой системы в ходе хирургических операций по удалению опухолей [51, 52].

Разработана технология использования НАФ в качестве нанотермометров для обнаружения внутриклеточных температурных различий, продемонстрировано измерение температуры в физиологическом диапазоне (от 25°C до 45°C) с точностью менее 0,5°C в клетках HeLa [53]. Кроме того НАФ могут применяться для обнаружения биомолекул, изменений pH и тяжелых металлов [54].

Создание систем доставки лекарств на основе НАФ достигается с помощью загрузки гидрофобных лекарств, таких как доксорубицин, на поверхность гидрофобных частиц с последующим высвобождением при более

низком pH в опухоли, или загрузки лекарств на НАФ покрытых мезопористым диоксидом кремния, где лекарства могут удерживаться и высвободиться с пористой поверхности, или инкапсуляция и перенос лекарств в полую оболочку НАФ (рисунок 8) [55].

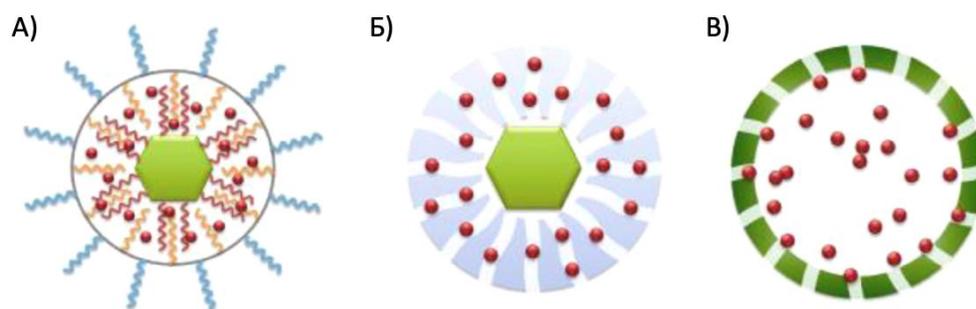


Рисунок 8. Схематическая иллюстрация подходов к созданию систем доставки лекарств на основе НАФ: А) гидрофобные поверхности; Б) НАФ, покрытые мезопористым диоксидом кремния; и В) полые сферы с мезопористым покрытием [55].

Более современные направления развития в доставке лекарств с помощью НАФ включают использование молекул альбумина в качестве носителей или для стабилизации наночастиц и создание многофункциональных агентов для тераностики и сочетанной терапии [12, 56, 57].

1.3. Белковая корона (БК)

Хотя адсорбция белков на поверхностях, в том числе на частицах, известна с 1960-х годов [58, 59], термин «белковая корона» был предложен в 2007 году Сидерваллом и коллегами [5]. БК представляет собой динамический слой белков, формирующийся на поверхности наноматериалов при нахождении в биологических жидкостях (рисунок 9) [7].



Рисунок 9. Белковая корона вокруг наночастицы [7].

1.3.1. Пути проникновения наноматериалов в организм

БК наночастиц, мигрирующих из одной биологической жидкости в другую, определяется белками исходной среды, а это означает, что путь введения наночастиц в организм может влиять на состав БК. Путь наночастиц к месту назначения начинается с проникновения в организм через один из многих физиологических барьеров. Эти биологические барьеры являются важными компонентами защитной системы организма и предназначены для ограничения проникновения посторонних объектов [32, 60].

Некоторые применения наночастиц основаны на доставке через кожу. Другие доставляются через слизистые оболочки дыхательной системы,

желудочно-кишечного тракта, выделительной системы и репродуктивной системы [32, 61]. Однако основным путем введения наночастиц в организм является внутрисосудистая инъекция, этот путь наиболее изучен и распространён в медицине. Он помогает обойти защитные механизмы организма и требует преодоления только тех барьеров, которые проявляются после попадания в кровоток. Хотя этот путь не самый удобный для пациента, он наиболее эффективен для достижения жизненно важных органов, особенно когда польза превышает риск [61].

В кровотоке наночастица сталкивается с целым рядом препятствий, которые могут привести к резким изменениям ее свойств и оказать огромное влияние на ее поведение в организме. Основные барьеры, которые препятствуют наночастицам при поступлении в кровь [61]:

- Иммуный клиренс в печени и селезенке.
- Проникновение через эндотелий в ткани-мишени.
- Проникновение через тканевый интерстиций.
- Эндоцитоз в клетки-мишени.
- Диффузия через цитоплазму и, в случае необходимости, проникновение в ядро.

1.3.2. Взаимодействие с белками и формирование БК в кровотоке

Кровь состоит из клеточной и жидкой частей, каждая из которой составляет почти 50% крови (рисунок 10). Основными клеточными компонентами крови являются эритроциты, тромбоциты и лейкоциты, которые ответственны за иммунный ответ крови на любое инородное вещество [62].

Более 90% жидкой части крови или плазмы – это вода, а остальные 10% составляют белки плазмы крови, в основном альбумин, факторы свертывания

крови, иммуноглобулин, липопротеин, опсонин и другие белки и компоненты системы комплемента [62]. Плазма также обеспечивает циркуляцию растворенных питательных веществ, таких как глюкоза, аминокислоты и жирные кислоты (растворенные в крови или связанные с белками плазмы), и удаляет отходы, такие как диоксид углерода, мочевины и молочная кислота [62].

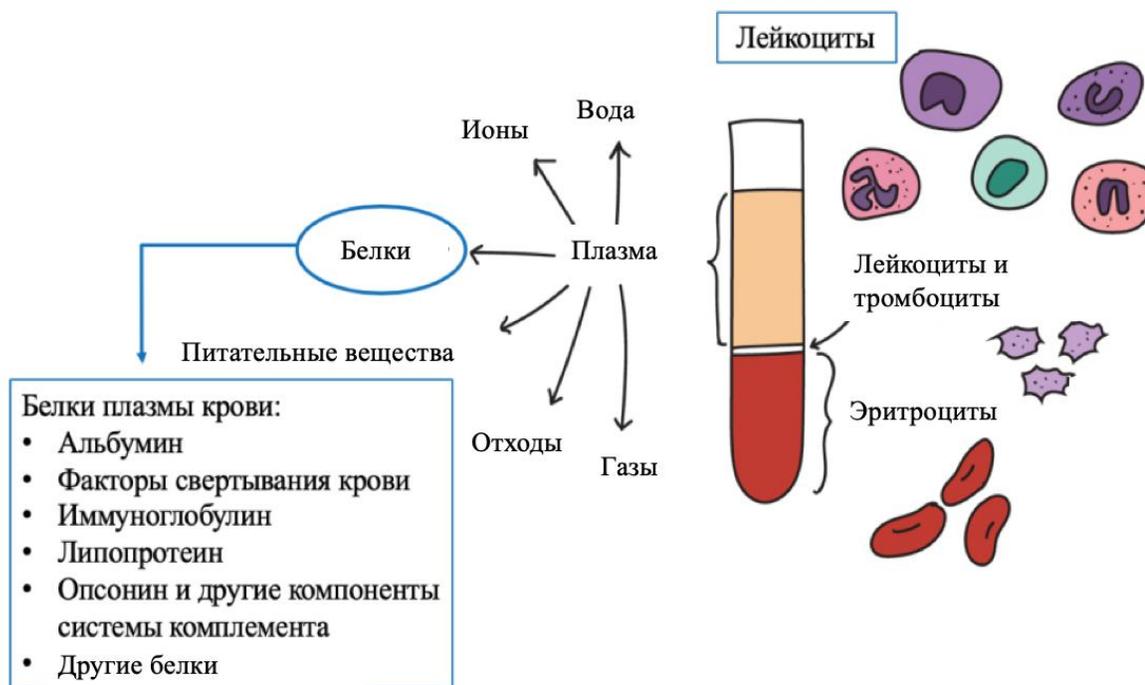


Рисунок 10. Компоненты крови. Нижняя часть (40%) состоит из эритроцитов, верхняя часть (60%) состоит из плазмы крови, включая основные белки [62].

При попадании наноматериалов в биологическую жидкость они самопроизвольно взаимодействуют с ее компонентами. В результате этого взаимодействия наночастицы покрываются белками или иногда другими биомолекулами посредством адсорбции, которая представляет собой адгезию, самопроизвольную сборку и образование слоёв молекул белка на различных поверхностях. Сформированная таким образом БК может оказывать значительное влияние на результат биологического ответа на наночастицы [60, 63].

Адсорбция белков на поверхности материалов, включая наночастицы, и образование белковой короны обусловлено термодинамикой в водной среде. Это происходит самопроизвольно при постоянной температуре и давлении в соответствии с законом термодинамики Гиббса, где свободная энергия Гиббса (Дж) уменьшается, т.е. ΔG – отрицательное число. Таким образом, система достигает термодинамического равновесия [64].

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S < 0$$

Процесс адсорбции белков опосредуется ионными и ван-дер-ваальсовыми силами, водородными связями и гидрофобными взаимодействиями и влечет за собой изменение свободной энергии Гиббса [63]. Дегидратация гидрофобных участков снижает свободную энергию Гиббса системы и положительное изменение энтропии. Это изменение свободной энергии Гиббса объясняет адсорбцию белков даже при наличии электростатического отталкивания между поверхностью наночастицы и белком [60, 64].

Таблица 1

Основные факторы, влияющие на формирование белковой короны, связаны с наночастицами и окружающей средой [7]

Основные факторы, влияющие на формирование белковой короны	
<i>Наночастицы</i>	<i>Окружающая среда</i>
Материал	Состав
Поверхность	Длительность экспозиции
Размер	pH
Заряд	Температура
Форма	Касательное напряжение

БК является динамическим слоем белков, адсорбированных на поверхности наночастиц при контакте с биологическими средами, изменяет исходные физико-химические свойства и определяет «биологическую идентичность» наночастиц и, следовательно, судьбу этих наноматериалов. Этот новый интерфейс даже влияет на взаимодействие наночастиц с клетками и, следовательно, на реакцию биологических систем. На формирование белковой короны влияют различные факторы, связанные как с наночастицами, так и с окружающей средой (таблица 1) [7].

Динамический слой БК постоянно развивается со временем и изменяется при переходе наночастиц через различные биологические среды. При попадании в биологическую жидкость наночастица сначала принимает временную белковую корону, которая называется мягкой короной, создаваемая белками высокой концентрации. Со временем наночастица покрывается более стабильной белковой короной путём замещения одних белков другими, которая называется жесткой короной, создаваемой белками высокого сродства в соответствии с эффектом Вромана [59]. Обычно жесткая корона описывается как внутренний слой плотно связанных белков, а мягкая корона как внешний быстро сменяемый слой слабо связанных белков (рисунок 11) [63]. Другая гипотеза предполагает, что белки жесткой короны взаимодействуют непосредственно с поверхностью наночастиц, а белки мягкой короны связываются с белками жесткой короны через слабые белок-белковые взаимодействия [65].

При связывании энергетически выгодных белков, энтальпия уменьшается, и гидратная оболочка вокруг наночастиц смещается, что увеличивает энтропию [60]. Последствия таких био-нано-взаимодействий являются множественными: во-первых, они могут увеличить растворимость наночастиц и, следовательно, доступность в водных средах; во-вторых, они могут запускать биофизические

процессы неправильного сворачивания и агрегации белка, в то время как происходящие конформационные изменения белка могут вызывать иммунный ответ хозяина для устранения наночастиц из кровотока; наконец, но, возможно, самое главное, они могут маскировать химические или биологические функции, специально придаваемые наночастицам [60].

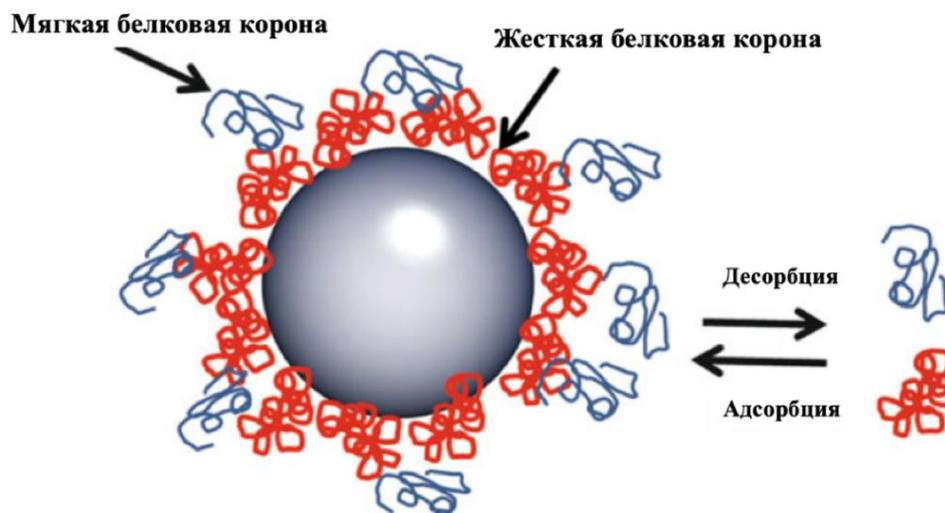


Рисунок 11. Формирование мягкой короны, состоящей из белков высокой концентрации и её переход в более стабильную жесткую корону, создаваемую белками высокого сродства в соответствии с эффектом Вромана [59, 66].

1.3.3. Роль БК в иммунном ответе на наночастицы

Взаимодействие иммунных клеток с наночастицами определяет судьбу наночастиц и направление иммунного ответа и зависит в значительной степени от состава БК [7]. Существуют фагоциты (макрофаги, нейтрофилы, дендритные клетки, тучные клетки и некоторые другие), которые распознают и разрушают инородные частицы посредством фагоцитоза (абсорбция и последующее внутриклеточное пищеварение) и лимфоциты – основные компоненты приобретенного иммунитета, которые являются высокоспецифичными по отношению к определенному типу антигенов [62].

БК играет важную роль в определении клеточного взаимодействия с наночастицами [67].

- Некоторые белки являются опсонинами, и после связывания с поверхностями частиц они распознаются защитными клетками (например, макрофагами), обладающими рецепторами для их определения, что приводит к фагоцитозу и клиренсу (например, скавенджер рецепторами).
- Белки системы комплемента связываются с инородными поверхностями, что приводит к каскаду эффектов, включая производство опсонинов и индукцию воспаления.
- Иммуноглобулины присутствуют в различных биологических жидкостях и действуют как специфические опсонины при распознавании специфического антигена.

Эти взаимодействия между наночастицами и иммунной системой обладают иммуномодулирующим потенциалом, поскольку они могут стимулировать или подавлять иммунную функцию и могут приводить к воспалению, аутоиммунным заболеваниям, длительному действию наночастицы или быстрому выведению ее из системы [68].

Увеличение времени циркуляции наночастиц и уход от иммунной системы были основными направлениями исследований, и было разработано много стратегий, включая покрытие наночастиц альбумином или полимерами, невидимыми для иммунной системы, такими как полиэтиленгликоль (ПЭГ) [12, 69].

1.4. Эффект повышенной проницаемости и удержания (EPR-эффект)

EPR-эффект наблюдается в солидных опухолях, благодаря ему наноразмерные материалы имеют тенденцию накапливаться в опухолевых тканях больше, чем в нормальных тканях в связи с аномальным строением сосудистой сети опухоли [61, 70].

1.4.1. Распределение наночастиц по организму

Биораспределение наночастиц по всему организму наталкивается на множество препятствий, влияющих на эффективность их действия. Они могут быть быстро выведены из крови ретикулоэндотелиальной системой и почечной экскрецией, или могут оставаться в органах, таких как печень и селезенка, длительные периоды времени (рисунок 12) [9].

Наночастицы, особенно носители лекарств, должны некоторое время оставаться стабильными в плазме системного кровообращения и избегать ретикулоэндотелиальной системы и выведения через почки, а также неспецифического накопления в селезенке и печени [71].

Было обнаружено, что белковые короны *in vivo* и *in vitro* различаются как по типу белка, так и по его обилию. Изменение скоростей потока между капиллярами и артериями *in vivo* приводит к возникновению сдвиговых напряжений и изменению связей и состава белковой короны после миграции наночастиц из одной среды в другую, т. е. эндотелиальных взаимодействий и экстравазации из кровеносных сосудов [60, 72].

Разработку наночастиц со специфическими характеристиками, такими как размер, форма и поверхностное покрытие, можно осуществлять целенаправленно для продления присутствия в кровообращении и повышения эффективности лечения, но неспецифическое распределение до настоящего

времени является неизбежным. Для того, чтобы носители лекарств могли попасть в опухолевую ткань, им необходимо проникнуть через отверстия в кровеносных сосудах используя уникальные особенности сосудистой системы опухоли [71].

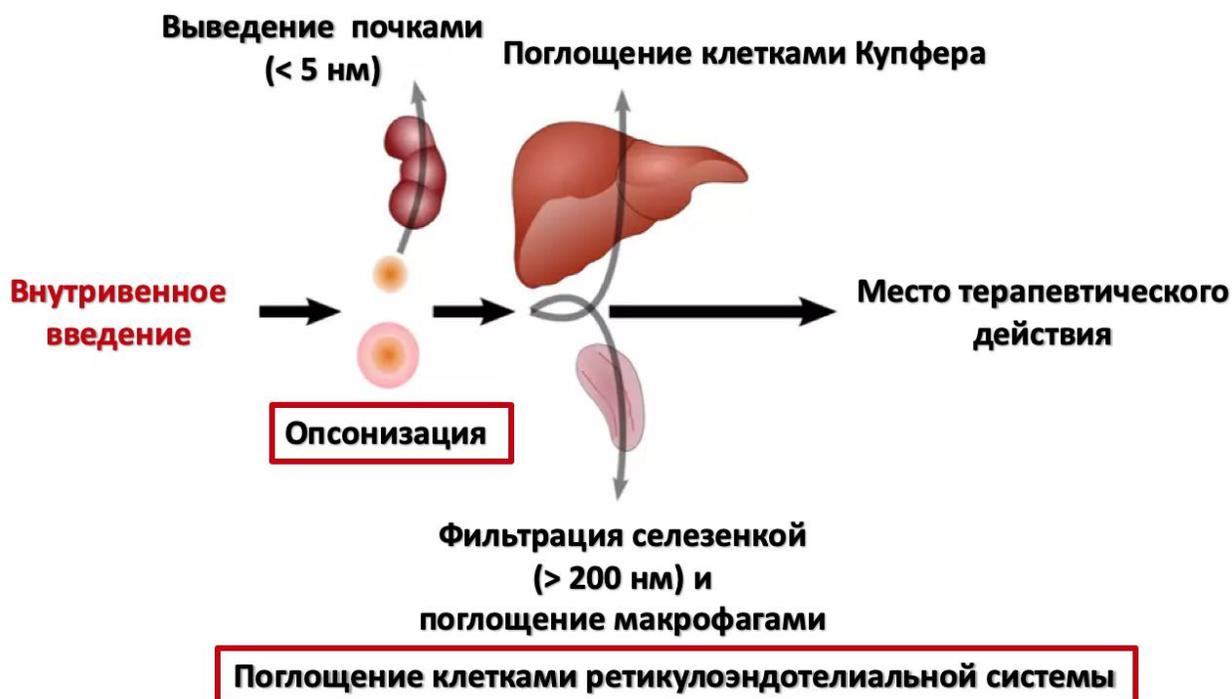


Рисунок 12. Биораспределение наночастиц в организме [9].

1.4.2. Экстравазация

Биораспределение наночастиц зависит от многих факторов, включая путь введения. Внутривенная инъекция в настоящее время является одним из наиболее изученных путей. Благодаря этому пути наночастицы подвергаются воздействию богатой среды белков, клеток и тканей при попадании в кровоток. Здесь размер наночастиц и морфология эндотелия кровеносных сосудов влияют на транспорт наночастиц в окружающие ткани [71].

В то время как эндотелий капилляров легких и мышц обычно характеризуется непрерывной морфологией, которая позволяет

транспортировать через стенку капилляра только небольшие молекулы (размером менее 3 нм), почки имеют кровеносные сосуды с фенестрированным эндотелием, а печень и селезенка – сосуды с прерывистым эндотелием. Как фенестрированные, так и прерывистые эндотелии подразумевают наличие больших пор. Эти пространства делают более вероятным попадание наночастиц с гидродинамическим диаметром (менее 60 нм) в ткани, снабжаемые такими кровеносными сосудами [61, 71].

С другой стороны, сосудистая система опухоли характеризуется множеством аномалий, включая нерегулярную архитектуру, плохой лимфодренаж и другие факторы, повышающие проницаемость и удержание нанообъектов, что приводит к накоплению наночастиц в опухолевой ткани. Наночастицы попадают в опухолевую ткань случайным броуновским движением через отверстия между эндотелиальными клетками сосудов, размер которых может быть достаточно большим для прохождения широкого спектра наночастиц (рисунок 13) [61, 73].

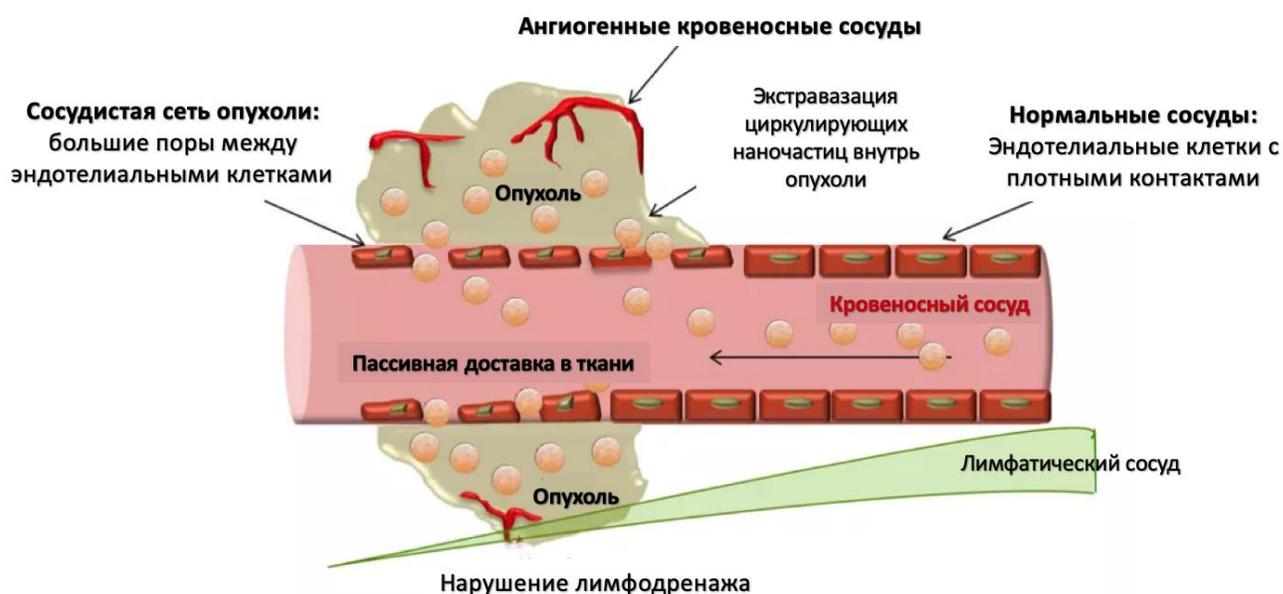


Рисунок 13. Нормальная сосудистая сеть по сравнению с опухолевой сосудистой системой и эффект повышенной проницаемости и удержания [9].

Это явление, приводящее к накоплению наночастиц в опухолевых тканях вследствие их сосудистых аномалий, известно как эффект повышенной проницаемости и удержания (EPR-эффект). Однако, в 2020-ом году обнаружили, что фактический доминирующим механизмом транспорта наночастиц является активный перенос через клетки эндотелия сосудов [74].

1.4.3. Пассивная доставка наночастиц посредством EPR-эффекта

Существует две различные стратегии адресной доставки наночастиц (или лекарств): пассивная и активная доставка (перенос) (рисунок 14) [75]. Пассивная доставка облегчается EPR-эффектом, который означает пассивную диффузию наноразмерных материалов через большие поры поврежденных сосудов опухоли [76]. Активная доставка включает в себя прикрепление к поверхности наночастиц таргетных агентов, специфичных к целевым клеткам, что повышает эффективность адресной доставки [77].

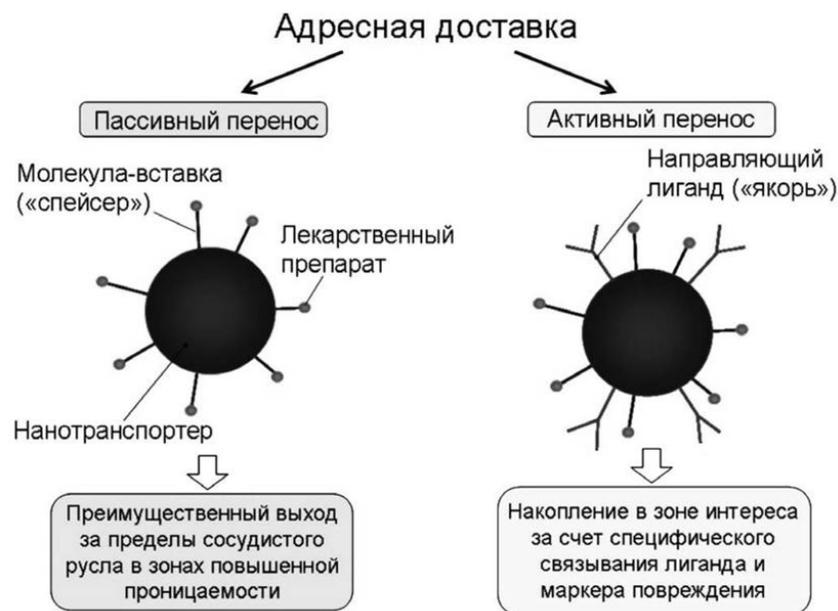


Рисунок 14. Адресная доставка наночастиц (или лекарств): пассивный перенос и активный перенос [77].

Микроокружение солидных опухолей отличается от нормальной ткани множеством аномалий, таких как высокое давление межклеточной жидкости, гипоксия, низкий внеклеточный pH, нерегулярность кровотока, нарушение функциональных рецепторов ангиотензина II (АТ-II), повышение регуляции ангиогенных факторов и снижение регуляции ангиогенных ингибиторов, образование новых сосудов (ангиогенез), локальное удаление клеток гладких мышц и отсутствие эффективного лимфодренажа [78].

EPR-эффект зависит от свойств наночастиц, включая размер, форму и поверхностный заряд, и в свою очередь влияет на время циркуляции, скорость проникновения и внутриклеточную интернализацию. Макромолекулы размером менее 2000 нм выборочно проникают из опухолевых сосудов и накапливаются в опухолевых тканях. Наночастицы с отрицательным поверхностным зарядом будут дольше циркулировать в крови, а положительно заряженные наночастицы быстро поглощаются раковыми клетками (которые имеют отрицательный поверхностный заряд) [61, 78].

1.4.4. Ненаправленный активный перенос через клетки эндотелия сосудов

Известно, что наноразмерные материалы (менее 2000 нм) способны накапливаться в тканях солидных опухолей намного больше, чем в нормальных тканях, в результате их пассивной диффузии через большие поры аномальной сосудистой сети опухоли посредством EPR-эффекта [61]. Недавно проведенная серия экспериментов поставила под сомнение нынешнее понимание накопления наночастиц внутри солидных опухолей. Было показано, что межклеточные промежутки кровеносных сосудов ответственны только за 3 – 25% экстравазации наночастиц через сосудистую сеть опухоли, а фактический доминирующий механизм транспорта наночастиц – это активный перенос через

трансэндотелиальные каналы, фенестры или с привлечением других механизмы, которые еще предстоит исследовать (рисунок 15) [74].

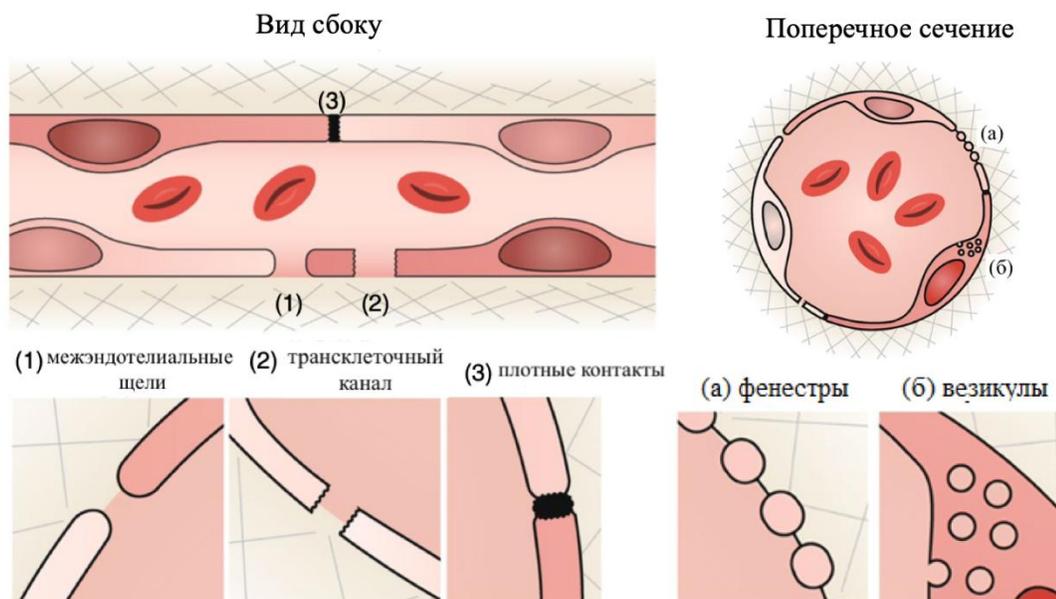


Рисунок 15. Разрывы вдоль эндотелиальной выстилки могут быть результатом разрыва плотных контактов (3) с образованием (1) межэндотелиальных щелей или (2) трансклеточных каналов. Оба типа каналов обеспечивают пассивные пути для экстравазации наночастиц. Трансэндотелиальные пути для наночастиц включают (а) образование фенестр и (б) захват везикулами и перемещение цитоплазму [74].

1.4.5. Способы проникновения наночастиц в клетки

Механизмы поступления наночастиц в клетку в значительной степени определяются физическими и межфазными характеристиками наночастиц, их взаимодействием с биологической средой и свойствами клеточной мембраны. Размер, форма и поверхностные характеристики наночастиц (в частности, заряд и гидрофобность) могут влиять на пути поступления наночастиц в клетку [79]. Кроме того, взаимодействия наночастиц с клетками могут зависеть от присоединённых к частицам лигандов и рецепторов клеточной поверхности для рецепторно-опосредованного эндоцитоза. Кроме того, тип клеток и природа

плазматической мембраны клетки, такие как текучесть мембраны, рецепторы и т.д., могут влиять на взаимодействие наночастиц с мембраной и, следовательно, на путь поступления в клетку. Несколько путей поступления в клетку могут использоваться одновременно, хотя и с различной эффективностью [77, 79].

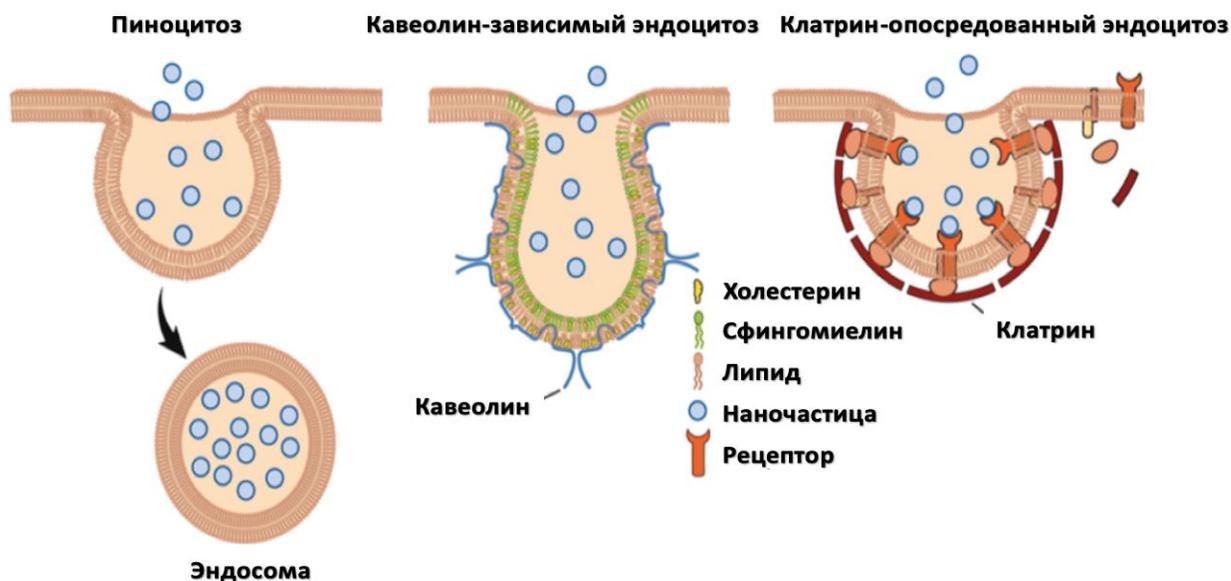


Рисунок 16. Способы проникновения наночастиц в клетки [79].

Общие пути, с помощью которых наночастицы поступают в клетки (рисунок 16):

- Пиноцитоз – это захват внеклеточной жидкости и ее содержимого клетками. Он подразделяется на микро- или макропиноцитоз в зависимости от размера инвагинации клеточной мембраны, которая захватывает внеклеточную жидкость [80]. Этот путь клеточной интернализации наночастиц может происходить без прямого взаимодействия наночастиц с клеточной мембраной, поскольку интернализуется определённый объем внеклеточной жидкости. Вследствие небольшого размера инвагинаций клеточной мембраны пиноцитоз является преобладающим путем для поглощения больших наночастиц и микрочастиц [80]. Микропиноцитоз встречается почти во всех клетках, тогда

как макропиноцитоз встречается у конкретных типов клеток, например, у незрелых дендритных клеток [79].

- Клатрин-опосредованный эндоцитоз представляет собой механизм эндоцитоза, который включает образование покрытых клатрином везикул диаметром ~ 100 нм [81]. Этот процесс начинается со связывания лиганда с рецептором на клеточной мембране. Этот механизм, используемый клетками для захвата наночастиц, конъюгированных с лигандом, можно использовать для нацеливания наночастиц на определенные клетки [82]. Клатрин-опосредованный эндоцитоз также является важным, когда опсонины связываются с наночастицами в биологической среде. Примером может быть опсонизация наночастиц комплементом, то есть группой белков, которые распознаются рецепторами на макрофагах [79].

- Кавеолин-зависимый эндоцитоз. Кавеолы – везикулы, образованные инвагинациями клеточной мембраны диаметром 50-100 нм [83]. Кавеолярные везикулы включают преимущественно сфинголипиды, холестерин и кавеолин, которые связываются с ассоциированным белком с образованием микродоменов [84]. Эти микродомены, которые могут содержать катионные липиды, такие как сфингомиелин, могут взаимодействовать с анионными наночастицами обеспечивая эндоцитоз пэгилированных наночастиц золота. Кавеолин-зависимый эндоцитоз является преобладающим путем поглощения наночастиц в эндотелиальных и мышечных клетках [84].

- Фагоцитоз. Фагоциты, в частности макрофаги, являются ключевыми клетками, определяющими иммунный ответ на наноматериалы, их биораспределение, выведение из организма и нанотоксичность. Фагоциты сталкиваются с наночастицами во всех тканях, где они присутствуют, включая ретикулоэндотелиальную систему (РЭС) в фильтрующих органах организма (в печени, почках, селезенке и легких). Фагоциты распознают наночастицы с

помощью двух различных механизмов: 1) распознавание посредством адсорбции белков. Как было установлено ранее, «белковая корона», содержащая опсоины, которые быстро представляют наночастицы фагоцитам в качестве чужеродного материала и запускают их быстрый вывод из организма посредством фагоцитоза [67]. 2) распознавание чужеродного материала через поверхностные рецепторы фагоцитов (такие как рецепторы скавенджеров и Fc-рецепторы на поверхности макрофагов). Эти рецепторы обычно распознают чужеродный материал, патогены и поврежденные естественные ткани, но наночастицы также могут потенциально иметь аналогичные молекулярные структуры из-за их адсорбции белков или связанные физико-химическими свойствами конкретного материала [85]. Фагоцитозу подвергаются частицы размером менее 10 микрон (чаще менее 6 микрон). Обычно после фагоцитоза везикулы, содержащие инородный материал, сливаются с лизосомными компартментами, в которых происходит снижение pH и разрушение захваченного материала [85].

Идеальные терапевтические и тераностические агенты или наноразмерные носители лекарств должны обладать способностью избегать выведения в течение относительно длительного периода для увеличения времени циркуляции, вероятности накопления в опухоли и достижения желаемого физиологического эффекта. Тем не менее, они должны быть биоразлагаемыми и в конечном итоге выводиться из организма, чтобы избежать токсичности и нежелательных долгосрочных эффектов.

1.4.6. Способы выведения из организма

После введения наночастиц в организм происходит их вымывание из крови и проникновение в различные ткани (рисунок 17). Для безопасного медицинского применения наночастиц их выведение из организма должно происходить в течение определенного промежутка времени. Текущие стратегии элиминации наночастиц основаны на их способности к биологическому разложению или небольшим размерам, благодаря чему частицы могут быть выведены почками. Тем не менее, многие перспективные наночастицы для медицинских применений обладают большим размером, не поддаются биоразложению и не способны выводиться почками [86].

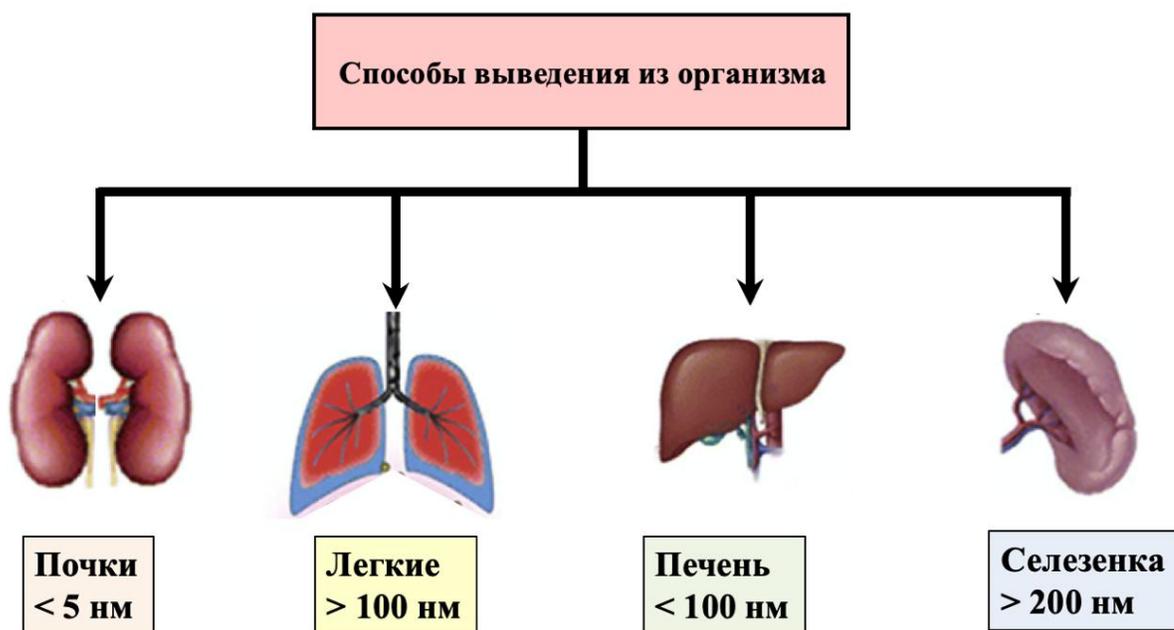


Рисунок 17. Способы выведения наночастиц из организма через фильтрующие органы, наночастицы > 200 нм, которые не выводятся через почки или печень, в конечном итоге выводятся с помощью РЭС (например, селезенки) [86].

Механизмы выведения наночастиц из организма включают:

- Дезинтеграция наночастиц путем адсорбции белка.
- Опосредованное опсонинами удаление наночастиц иммунными клетками.
- Фильтрация органами с фенестрированной сосудистой сетью (почками, печенью, селезенкой и т. д.) [86].

Основными путями удаления наночастиц является выведение через почки (с мочой) и через печень (с желчью и калом). Почечный путь для удаления наночастиц хорошо охарактеризован. Наночастицы с диаметром $<5,5$ нм подвергаются эффективной экскреции с мочой из-за ограничения размера пор при клубочковой фильтрации в почках.

Некоторые исследования показали, что материалы могут подвергаться гепатобилиарной элиминации транцитозом через гепатоциты в печени, что приводит к транспортировке через желчные каналцы в желчную систему, затем в желудочно-кишечный тракт и, в конечном итоге, к выведению из организма с фекалиями. Гепатобилиарная элиминация наночастиц обычно происходит медленно, от нескольких часов до нескольких месяцев или дольше.

Дренаж наночастиц в зависимости от их свойств может происходить через различные органы [86]:

- Почки являются основной дренажной системой, выводящей наночастицы размером < 5 нм.
- Лёгкие, хотя и не являются обычной системой элиминации, могут помочь в фильтрации аэрозольных наночастиц с размерами >100 нм.
- Второй этап выведения осуществляется через печень, через которую могут проходить частицы размером от 20 до 100 нм.
- Более крупные частицы (>200 нм), которые не удаляются через почки или печень, в конечном итоге удаляются с помощью мононуклеарной фагоцитарной системы (РЭС), в частности, через лимфатические узлы и селезенку.

1.5. Альбумин

Альбумин является самым распространенным белком в плазме крови (35-50 г/л сыворотки крови человека) [87]. Он играет несколько важных ролей в поддержании коллоидного осмотического давления, в связывании нескольких гидрофобных стероидных гормонов в качестве носителя в плазме и в транспорте питательных веществ, таких как жирные кислоты [9, 87]. Кроме того, альбумин способен действовать как внеклеточный антиоксидант против свободных радикалов и других вредных химических веществ [88].

1.5.1. Физико-химические свойства альбумина

Альбумин является кислым белком и очень растворим в воде (до 40% w/v) при рН 7,4. Он стабилен в диапазоне рН от 4 до 9, растворим в 40% этаноле и может выдерживать нагревание до 60°C без каких-либо необратимых структурных изменений [9, 87, 89]. Существует два типа альбумина, широко используемых в создании наночастиц на основе альбумина: человеческий сывороточный альбумин (ЧСА) и бычий сывороточный альбумин (БСА) [12]. По данным ряда исследований, ЧСА и БСА являются гомологичными белками (рисунок 18) [9]. Они имеют много общих характеристик, включая сходную молекулярную массу (65 – 70 кДа), сходное количество аминокислотных остатков (585 аминокислот для ЧСА и 583 аминокислоты для БСА), высокую растворимость в воде и длительный период полураспада в крови [12, 90].

БСА – это глобулярный белок, который в физиологических условиях состоит не менее чем на 67% из α -спиральной вторичной структуры. БСА содержит 3 основных домена (рисунок 18), которые могут изменять конформацию. Белок имеет 17 внутримолекулярных дисульфидных контактов и свободный остаток сульфгидрильного цистеина-34 (Cys-34) [91].

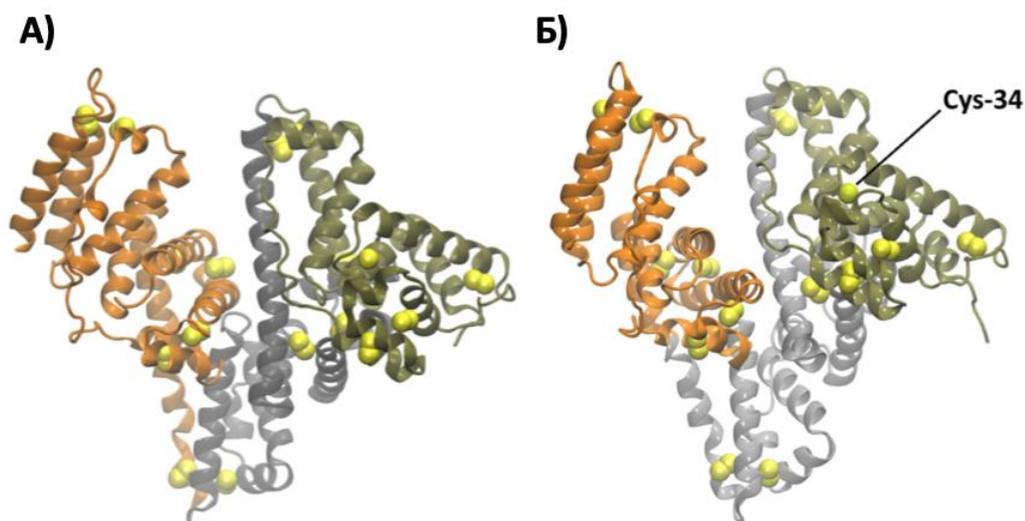


Рисунок 18. Структура альбумина: (А) ЧСА и (Б) БСА. Изображения иллюстрируют 3 основных домена, 17 дисульфидных мостиков (желтые шарики) и свободный остаток цистеина в БСА (Cys-34) [9].

1.5.2. Наночастицы на основе альбумина

Альбумин является идеальным кандидатом для доставки лекарств по нескольким причинам. Во-первых, являясь компонентом человеческой крови, он легко доступен, биосовместим, биоразлагаем, нетоксичен и не иммуногенен [9, 87]. Во-вторых, период полураспада альбумина в крови человека составляет в среднем около 19 дней [12]. В-третьих, альбумин является отличным лиопротектором для твердых наночастиц и позволяет немедленно повторно диспергировать лиофилизированные наночастицы в инъекционных растворах [92].

Далее, наночастицы на основе альбумина несут на своих поверхностях реактивные группы (тиоловые, амино- и карбоксильные группы), которые позволяют проводить их дальнейшую модификацию и конъюгацию для оптимальной диагностики и доставки лекарств в живом организме [9]. Кроме того, наночастицы альбумина могут обеспечивать электростатическую

адсорбцию благодаря высокому содержанию заряженных аминокислот (например, лизина, аргинина, аспартата и глутамата) (рисунок 19А) [9, 87]. Кроме того, известно усиленное накопление наночастиц на основе альбумина в солидных опухолях посредством EPR-эффекта [61, 93] и связывания альбумина с альбуминсвязывающими белками, такими как мембраносвязанный 60-кДа гликопротеин (gp60 или альбондин) и “секретируемый белок, кислый и богатый цистеином” (англ. secreted protein acidic and rich in cysteine, SPARC) [94].

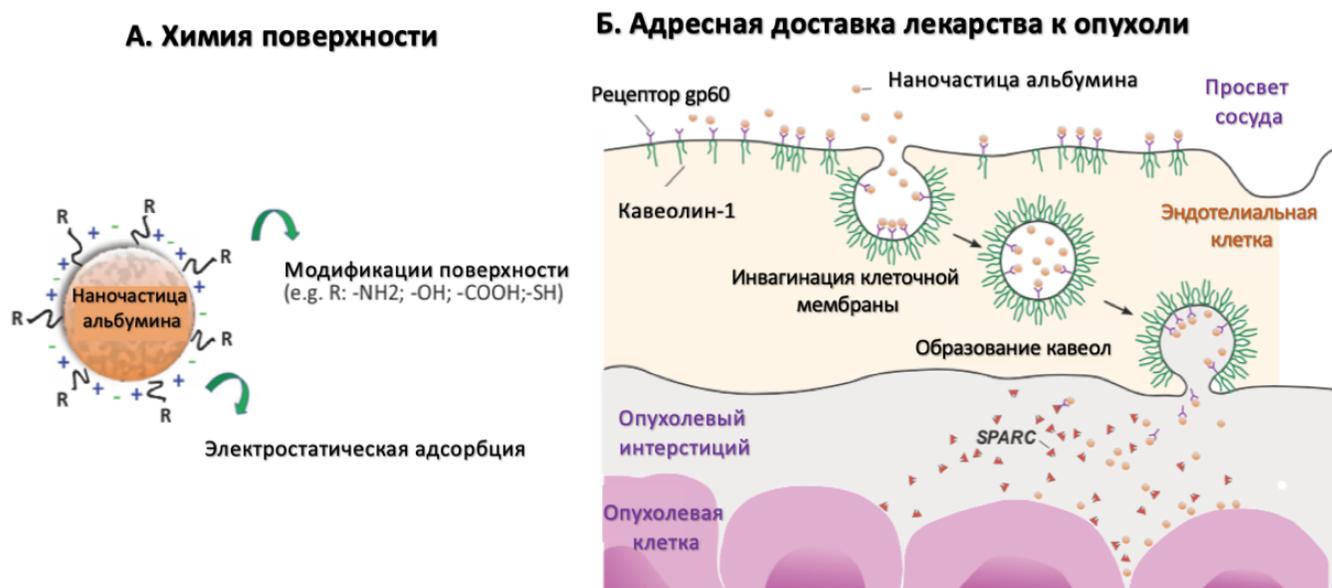


Рисунок 19. Преимущества наночастиц на основе альбумина. (А) химия поверхности наночастиц на основе альбумина, (Б) адресная доставка лекарств к опухоли, опосредованная наночастицами на основе альбумина [9, 94].

Альбумин инициирует эндотелиальный транцитоз путем связывания с рецептором gp60 (альбондином). Впоследствии gp60 связывается с кавеוליном-1, внутриклеточным белком, и инициирует инвагинацию клеточной мембраны с образованием транцитозных везикул [93]. Эти везикулы транспортируют альбумин и другие компоненты плазмы во внесосудистое пространство (рисунок 19Б) [9]. Кроме того, SPARC, является гликопротеином внеклеточного

матрикса, сверхэкспрессируется в различных видах опухолей и, как было показано, связывается с альбумином с высоким сродством, что индуцирует накопление альбумина и конъюгированных с ним препаратов в опухоли интерстиция [9, 93].

Альбумин может быть использован для создания наночастиц для различных применений, выполняя свои функции согласно выбранной стратегии (рисунок 20) [12].

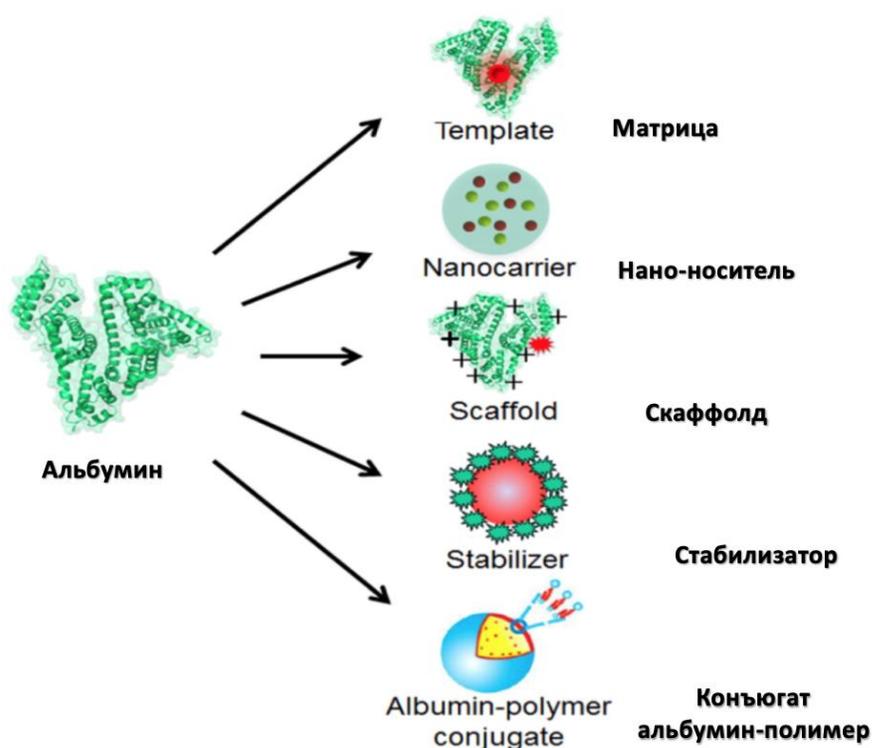


Рисунок 20. Схематическая иллюстрация различных стратегий синтеза наночастиц на основе альбумина [12].

1.5.3. Стабилизация наночастиц альбумином

Наночастицы могут быть стабилизированы альбумином путем образования вокруг этих наночастиц БК из альбумина, что, в свою очередь, маскирует свойства наночастиц и придает им новую биологическую

идентичность, определяемую альбуминовым покрытием (рисунок 21) [12]. Многие белки и особенно альбумин использовались в исследованиях в качестве стабилизаторов наночастиц, чтобы избежать образования БК в кровотоке и продлить время циркуляции наночастиц [95]. Альбуминовое покрытие обычно обеспечивает лучшую растворимость в воде, повышенную биодоступность, повышенную биосовместимость, пониженную токсичность, уменьшенное образование БК, повышенное клеточное поглощение и улучшенное время циркуляции в крови по сравнению с непокрытыми наночастицами [96, 97].

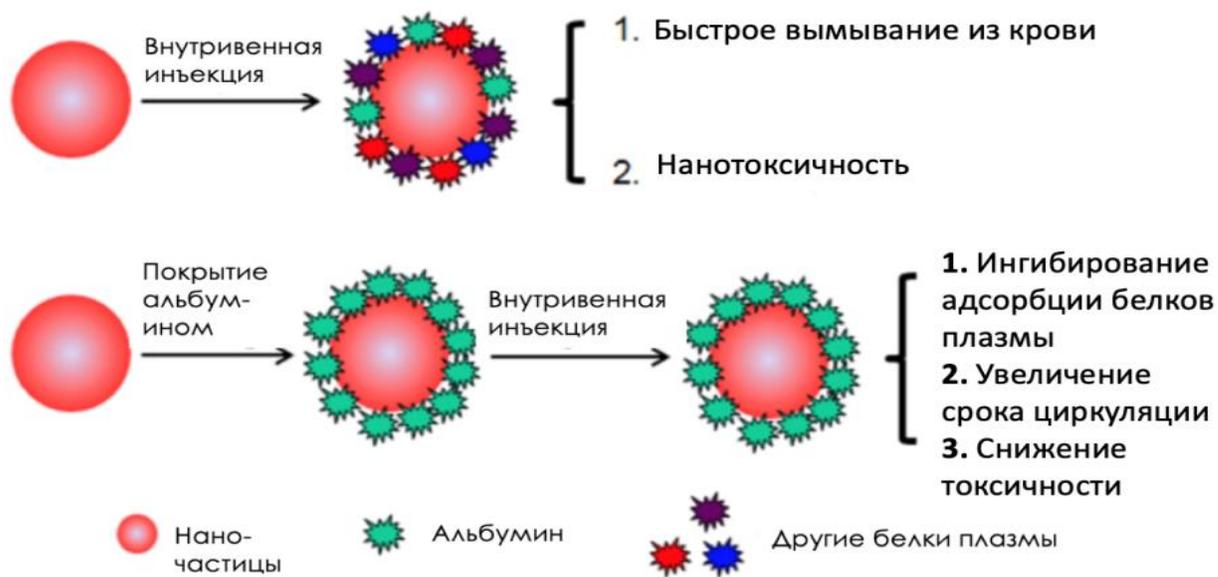


Рисунок 21. Схематическая иллюстрация влияния БК из альбумина на поведение наночастиц *in vivo* [12].

1.5.4. Стабилизирующие свойства БСА и дБСА

Альбумин проявляет относительно слабые взаимодействия с гидрофильными поверхностями. Кроме того, существует возможность вытеснения белками плазмы альбумина с поверхности наночастиц после инъекции в кровь. Поэтому в ряде исследований была предложена и

исследована простая и универсальная стратегия термической денатурации белка перед проведением покрытия наночастиц альбумином [89, 96].

Термическая денатурация белков изменяет третичную и вторичную структуры белков, которые связаны нековалентными связями (ван-дер-Ваальсовы взаимодействия, электростатическое взаимодействие, водородная связь и гидрофобное взаимодействие) [96]. При точной температуре денатурации, эти конформационные изменения белка становятся необратимыми, и он сохраняет только первичную структуру [89]. Термическая денатурация делает цепи белков более гибкими, позволяя воде взаимодействовать с амидным азотом и карбонильным кислородом пептидных связей, образуя новые водородные связи [96]. Как новые группы водородных связей, так и гидрофобные группы увеличивают число молекул воды, связанных с молекулами белка в водном растворе [96]. Кроме того, необратимая термическая денатурация приводит к олигомеризации белка с образованием большего количества адгезивных олигомеров из слабо адгезивных белковых мономеров (рисунок 22) [89].

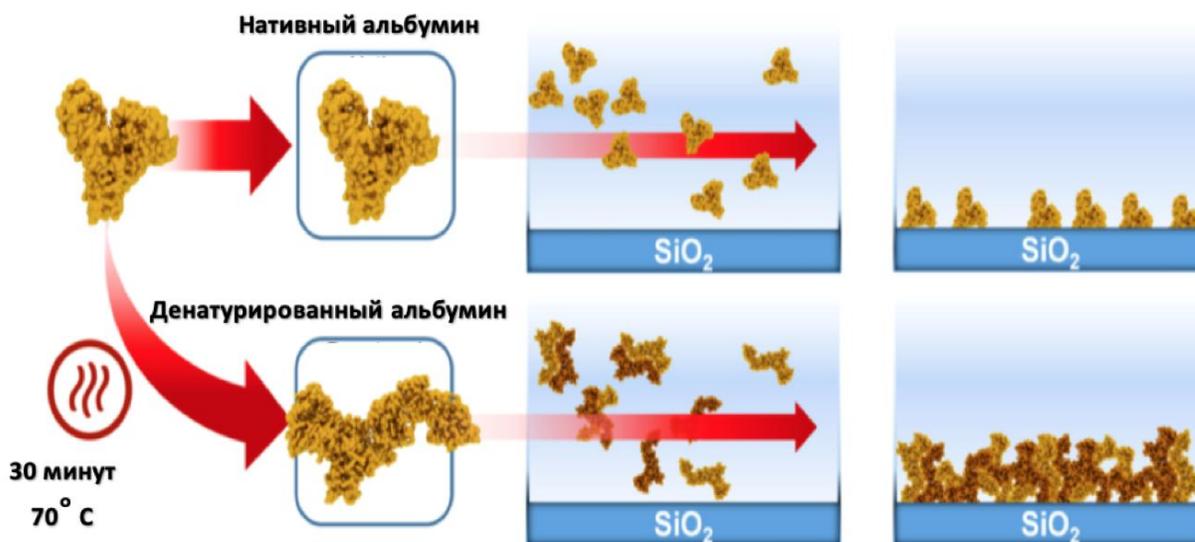


Рисунок 22. Схематическая иллюстрация олигомеризации термически денатурированного БСА и адгезионной адсорбции на поверхности оксида кремния [89].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

Отрицательно заряженные наночастицы НАФ-ПАК и положительно заряженные наночастицы НАФ-ПЭИ были получены в Университете Маккуори, Австралия (состав НАФ $\text{NaY}_{0,72}\text{F}_4\text{Yb}_{0,2}\text{Tm}_{0,08}$). НАФ структуры ядро/оболочка состава $(\text{NaY}_{0,794}\text{F}_4\text{Yb}_{0,2}\text{Tm}_{0,006}/\text{NaYF}_4)$ были получены в ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва. Нитрозония тетрафторборат (NOBF_4) (Sigma-Aldrich, США). Бычий сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich, США). Источники других реактивов, реагентов и материалов, используемых в экспериментах, указываются при их упоминании в следующем разделе. Общий план решения задач исследования представлен на рисунке 23.

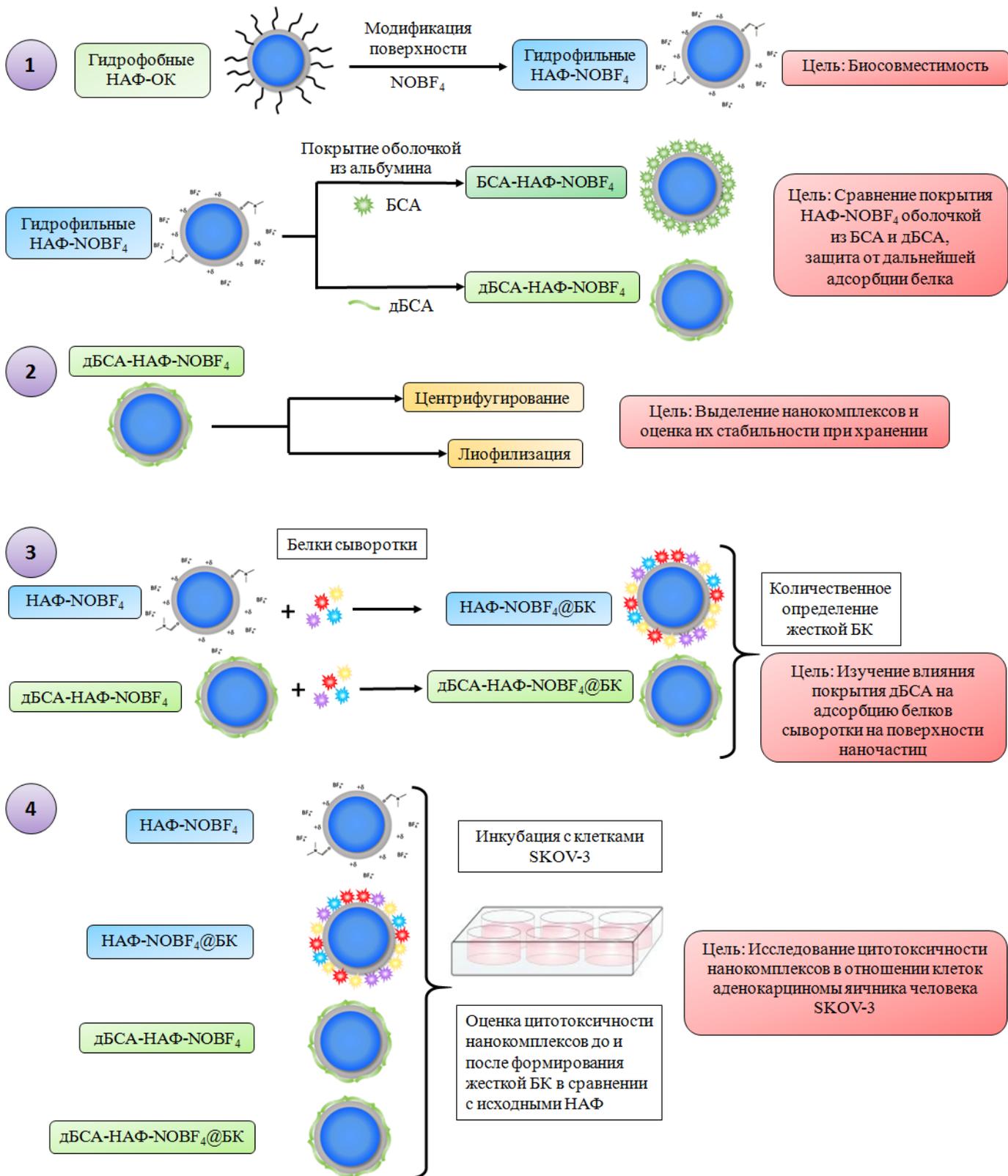


Рисунок 23. Схема последовательного решения задач исследования.

2.2. Методы

2.2.1. Синтез и характеристика НАФ-ОК и НАФ-NOBF₄

2.2.1.1. Синтез гидрофобных НАФ (НАФ-ОК)

Гидрофобные НАФ структуры ядро/оболочка состава (NaY_{0,794}F₄Yb_{0,2}Tm_{0,006}/NaYF₄) синтезировали методом сольватотермического разложения [98, 99]. Навески Y₂O₃ (0,794 mM), Yb₂O₃ (0,2 mM), и Tm₂O₃ (0,006 mM) растворяли в 70% трифторуксусной кислоте в трёхгорлой колбе, затем выпаривали. В колбу вносили трифторацетат натрия до 2,2 mM, 7,5 мл олеиновой кислоты и 7,5 мл 1-октадецена, вакуумировали при нагревании и продувке аргоном. Реакционную смесь инкубировали до помутнения в сплаве Вуда при 343°C, затем при 312°C до восстановления прозрачности. Смесь охлаждали до 210°C и вносили 4 мл 1-октадецена. Кристаллы (ядро) НАФ преципитировали изопропанолом, ресуспендировали в гексане и трижды промывали этанолом.

Для формирования оболочки НАФ к полученной суспензии добавляли 60 мг трифторацетата натрия, 140 мг трифторацетата иттрия, 3 мл олеиновой кислоты и 3 мл 1-октадецена, затем инкубировали в сплаве Вуда последовательно при 100°C, 170°C, 290°C и 210°C. К раствору добавляли 3 мл 1-октадецена, НАФ конфигурации ядро/оболочка преципитировали и промывали, как описано выше и ресуспендировали в хлороформе [100].

2.2.1.2. Синтез водорастворимых НАФ покрытых NOBF_4

НАФ покрытые NOBF_4 , получали с помощью метода обмена лигандов (рисунок 24) [4]. Гидрофобные НАФ (НАФ-ОА) в гексане (“НПК Криохром”, Россия) смешивали с раствором NOBF_4 в N,N-диметилформамиде (DMF) (Sigma-Aldrich, США) в соотношении 60 мг NOBF_4 : 25 мг НАФ-ОА) [4, 101]. Смесь перемешивали в течение ночи на магнитной мешалке при комнатной температуре. Наночастицы центрифугировали при 10000 g в течение 7 мин и повторно ресуспендировали в DMF и добавляли смесь толуол (“ХИМРЕАКТИВ”, Россия) /гексан (1:1) [4, 102]. После этого наночастицы дважды промывали этанолом и ресуспендировали в деионизированной воде, суспензию хранили при 4°C. Концентрацию НАФ- NOBF_4 определяли весовым методом.

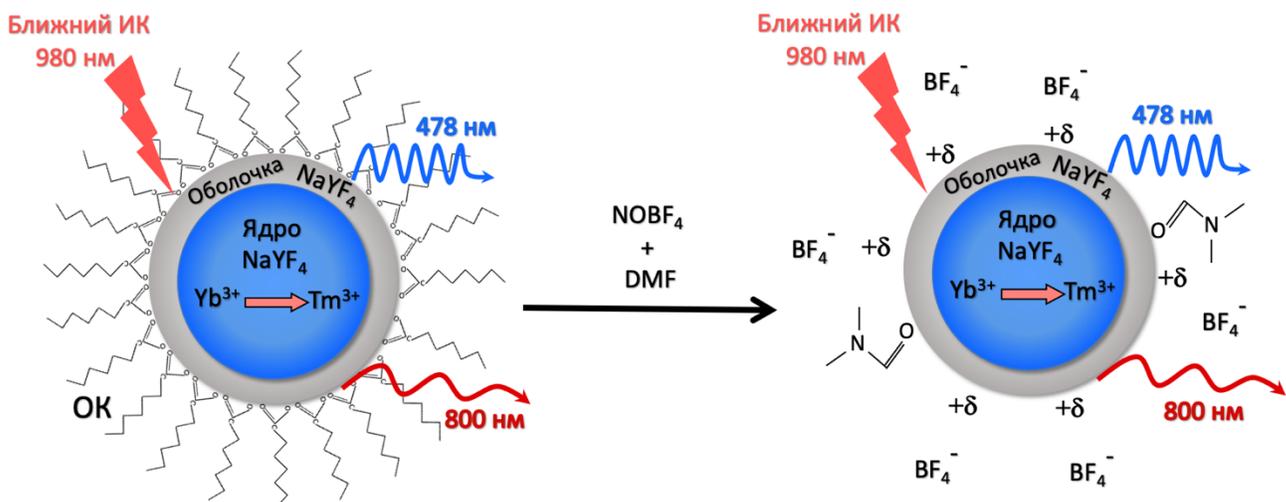


Рисунок 24. Схема получения НАФ- NOBF_4 методом обмена лиганда.

2.2.1.3. Исследование характеристик НАФ-ОК и НАФ- NOBF_4

Размер и форму частиц НАФ-ОК определяли методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с использованием микроскопа LEO-912 AVOMEGA (Carl Zeiss, Германия).

Измерение гидродинамического диаметра и определение ζ -потенциала НАФ проводили методом динамического рассеяния света (DLS) и электрофоретического рассеяния света (ELS) соответственно, с помощью системы Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания) согласно рекомендациям производителя.

ФЛ свойства НАФ исследовали с использованием спектрофлуориметра CM 2203 (SOLAR, Беларусь) и внешнего полупроводникового лазерного модуля АТС-С4000-200АМF-980-5-F200 с длиной волны 980 нм (Полупроводниковые приборы, Россия). Измерения спектров эмиссии ФЛ проводили в диапазоне от 400 до 850 нм в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1 см.

Инфракрасные спектры поглощения (FTIR) регистрировали с использованием инфракрасного спектрофотометра с преобразованием Фурье IRPrestige-21 (Shimadzu, Япония).

2.2.2. Оптимизация концентрации БСА для формирования стабильной БК на поверхности НАФ-ПЭИ

Исходный раствор белка БСА готовили в деионизированной воде с последующей фильтрацией через мембранный фильтр (диаметр пор 0,22 мкм) для удаления кластеризованных белков. Далее, раствор БСА разбавляли деионизированной водой до получения растворов с концентрациями 10, 20, 50, 100, 150, и 200 мкМ. Готовили суспензию НАФ-ПЭИ в деионизированной воде в концентрации 0,4 мг/мл, обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин на льду.

Затем, суспензию НАФ-ПЭИ добавляли по каплям к раствору БСА (v:v; 1:1), и перемешивали. Смеси инкубировали при комнатной температуре в течение 4 ч. Размер и ζ -потенциал каждого образца измеряли без промывки после 15 мин и 4 ч инкубации с помощью системы Zetasizer Nano ZS.

2.2.3. Оптимизация концентрации БСА и дБСА для формирования стабильной БК на НАФ-NOBF₄

Исходный раствор белка БСА в деионизированной воде готовили как описано выше (раздел 2.2.2.) . Раствор разбавляли деионизированной водой до получения растворов с концентрациями 50, 100, 150, 200 и 240 мкМ. Водный раствор дБСА готовили путем нагревания раствора БСА до 70°C в течение 30 мин. Раствор дБСА разбавляли до получения концентраций 10, 20, 50 и 100 мкМ для инкубации с НАФ-NOBF₄. Готовили суспензию НАФ-NOBF₄ в деионизированной воде в концентрации 0,5 мг/ мл, обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин на льду. Суспензию НАФ-NOBF₄ добавляли по каплям к раствору БСА (v:v; 1:1), и перемешивали. Таким же способом готовили смеси НАФ-NOBF₄ с дБСА. Смеси инкубировали при комнатной температуре в течение 4 ч. Размер и ζ-потенциал каждого образца измеряли без промывки после 15 мин и 4 ч инкубации методами DLS и ELS, соответственно. Стратегия определения оптимальной концентрации альбумина и предполагаемая структура стабильной БК из альбумина на поверхности НАФ иллюстрированы на рисунке 25.

2.2.4. Осаждение наноконплексов и исследование их коллоидной стабильности в разных средах

После формирования БК для осаждения НАФ покрытых альбумином использовали два подхода.

2.2.4.1. Центрифугирование

Наноконплексы БСА-НАФ-ПЭИ и дБСА-НАФ-NOBF₄ центрифугировали 7 мин при 10000 g, супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в деионизированной воде. Коллоидную стабильность конплексов оценивали методами DLS и ELS.

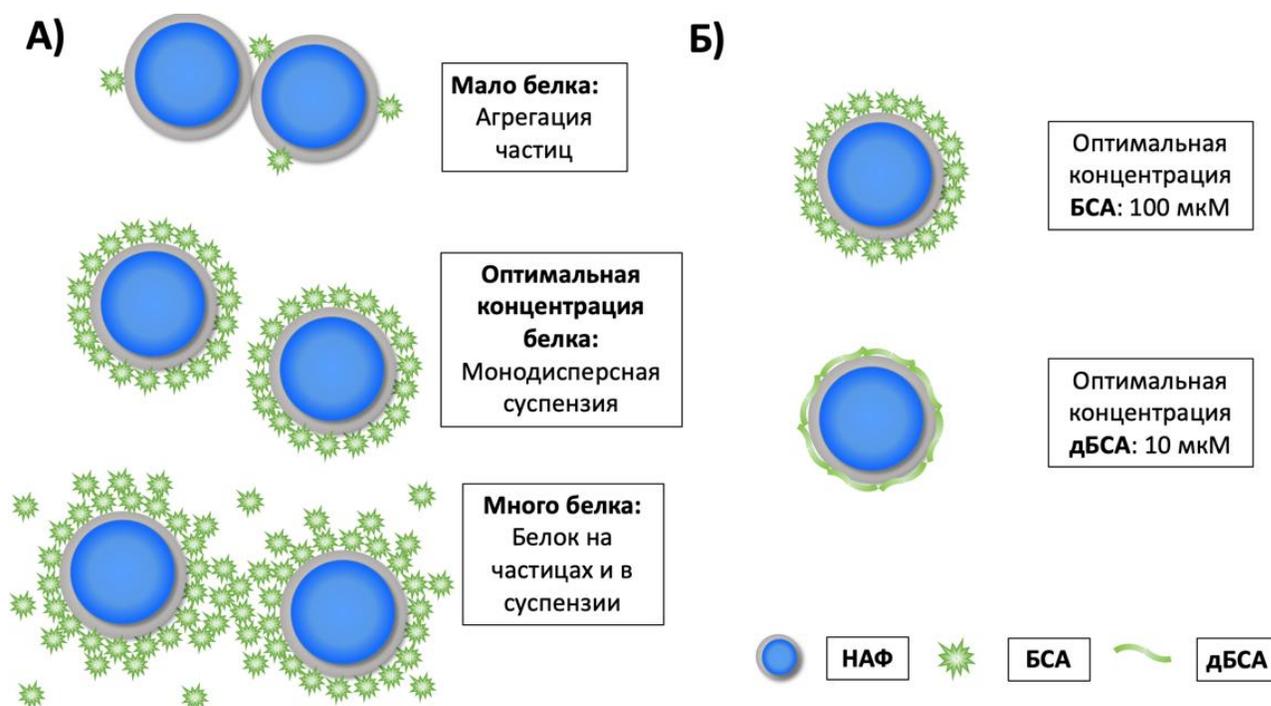


Рисунок 25. А) Схема определения оптимальной концентрации альбумина для формирования стабильной БК на поверхности НАФ; Б) Предполагаемая структура стабильной БК из БСА и дБСА.

2.2.4.2. Лиофилизация

Образцы дБСА-НАФ- NOBF_4 лиофилизировали с помощью установки FreeZone 6L (Labconco, США), помещали в стеклянные флаконы и замораживали при температуре -80°C . Флаконы закрывали резиновыми пробками и укупоривали тефлоном. Образцы помещали в лиофилизационную камеру и выдерживали при -50°C в течение 24 ч до полного удаления воды. Лиофилизированные образцы хранили при температуре 4°C .

Лиофилизированные дБСА-НАФ- NOBF_4 ресуспендировали в различных буферах и клеточных культуральных средах с добавлением эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) (HyClone, США) (деионизированная вода, PBS, DMEM (Панэко, Россия) с 10% FBS, и McCoy's 5A (HyClone, США) с 10% FBS) (рисунок 26). Суспензии обрабатывали ультразвуком в течение 5 мин и

проводили измерения гидродинамического диаметра методом DLS через одну неделю, шесть месяцев и один год после лиофилизации.

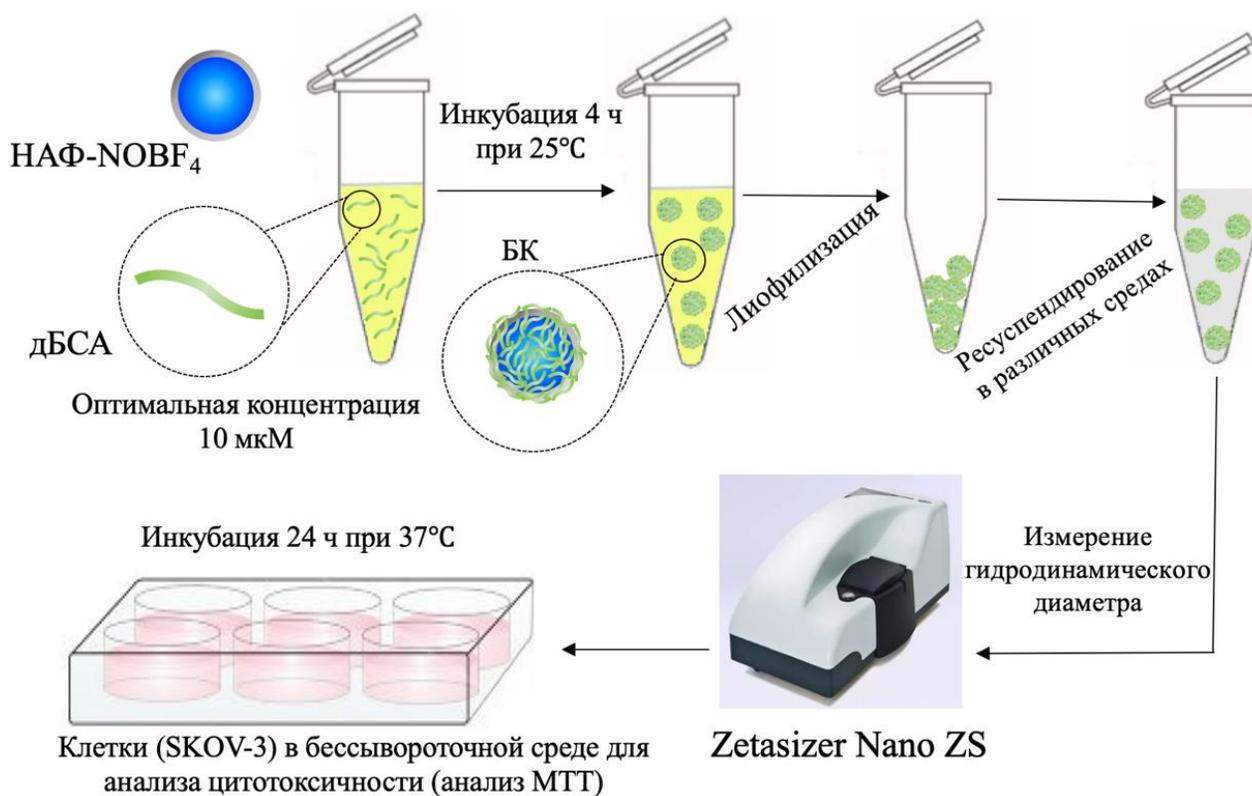


Рисунок 26. Схема метода оценки коллоидной стабильности и цитотоксичности лиофилированных дБСА-НАФ-NOBF₄.

2.2.5. Формирование жесткой БК на поверхности НАФ

Формирование жесткой БК на поверхности НАФ проводили путём инкубации наночастиц в среде для клеточных культур с добавлением 10% FBS (или в растворе БСА в концентрации 30 мг/мл, раздел 2.2.2.) в течение 4 ч при 25°C при перемешивании (Рисунок 27). Суспензию НАФ с адсорбированной «коронай» центрифугировали при 10000 g в течение 7 мин и ресуспендировали в PBS, обрабатывали ультразвуком 30 с. Дважды повторяли отмывку PBS, НАФ ресуспендировали в деионизированной воде.

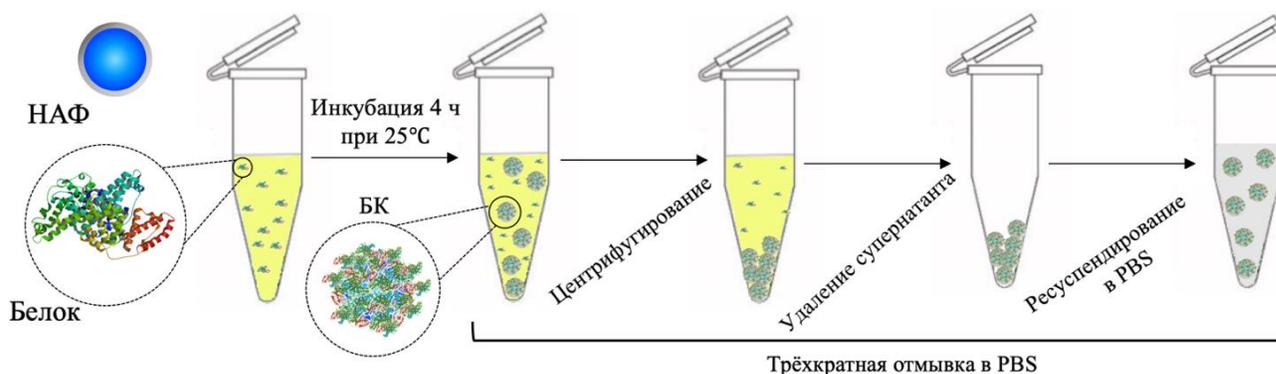


Рисунок 27. Схема формирования жесткой БК на НАФ и отделение комплексов НАФ@БК от не связавшихся белков.

2.2.6. Оценка влияния покрытия НАФ-NOBF₄ денатурированным БСА на адсорбцию белков сыворотки

Для исследования эффективности покрытия НАФ-NOBF₄ оболочкой дБСА и его влияния на адсорбцию белков сыворотки на поверхности дБСА-НАФ-NOBF₄, проводили формирование жесткой БК с помощью инкубации НАФ-NOBF₄ и дБСА-НАФ-NOBF₄ в клеточных культуральных средах (DMEM и McCoys 5A) с добавлением FBS 10%. Дальнейшую обработку наноконструкций с жесткой БК на поверхности (НАФ-NOBF₄@БК и дБСА-НАФ-NOBF₄@БК) проводили, как описано в разделе 2.2.5. (рисунок 27).

Концентрацию белка определяли методом с бицинхониновой кислотой с помощью набора Pierce™ micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно рекомендациям производителя. Готовили серию разведений БСА (0, 5, 10, 25, 50 и 100 мкг/мл) в PBS, смешивали с рабочим реагентом набора в соотношении (v: v; 1: 8) и переносили в лунки 96-луночного планшета (Corning, США) в пяти повторностях. Смесь встряхивали на качалке в течение 5 мин, затем инкубировали при 60°C в течение 60 мин в темноте. После охлаждения планшета до комнатной температуры, оптическую плотность

образцов измеряли с помощью планшетного спектрофотометра Synergy MX (BioTek, США) на длине волны 562 нм. Полученные данные использовали для построения калибровочного графика зависимости поглощения от концентрации белка. Исследуемые образцы обрабатывали аналогичным образом, концентрацию белка рассчитывали с помощью калибровочного графика с учётом предварительного покрытия частиц дБСА. Данные обрабатывали с использованием непарного t-критерия ($n = 5$) с помощью программы Graphpad 9 (Graphpad software, США).

2.2.7. Исследование связывания НАФ-ПАК, НАФ-ПЭИ и НАФ@БК с клетками в культуре

Для визуализации наночастиц и подтверждения образования БК из альбумина на поверхности НАФ на примере НАФ-ПАК и НАФ-ПЭИ, использовали культуру клеток яичника китайского хомячка линии СНО (номер по каталогу ATCC CCL-61). Клетки пересеивали по стандартной методике по достижению монослоя (два раза в неделю) с использованием раствора трипсина (ПанЭко, Россия) и культивировали в среде McCoy's 5A с добавлением L-глутамина (ПаЭко, Россия) и 10% FBS при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Для приготовления микроскопических образцов 2 мл клеточной суспензии с концентрацией $2,5 \times 10^5$ кл/мл высевали на покровные стекла, обработанные 0,01% раствором полилизина (Sigma-Aldrich, США), помещенные в лунки 6-и луночного планшета (Corning, США). Клетки подращивали на протяжении 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Формирование жесткой БК на поверхности НАФ-ПАК / НАФ-ПЭИ проводили как описано в разделе 2.2.5. и рис 20. Затем в инкубационную среду вносили суспензию НАФ (НАФ-ПАК,

НАФ-ПАК@БК, НАФ-ПЭИ, и НАФ-ПЭИ@БК) до конечной концентрации в среде 25 мкг/мл.

Для предотвращения эндоцитоза наночастиц клетками, клетки инкубировали в присутствии наночастиц при 4°C на протяжении 1 ч. Клетки трижды отмывали PBS и фиксировали 4% раствором формальдегида (Panreac, Испания) в течение 30 мин при 24°C в темноте. Формальдегид удаляли, клетки трижды отмывали PBS и один раз деионизованной водой. Покровные стекла вынимали из лунок планшета, подсушивали, помещали в каплю глицерина на предметные стекла, после чего запаивали.

Препараты анализировали с помощью лабораторной системы широкопольной флуоресцентной микроскопии, собранной на основе микроскопа Axio Observer.A.1 с иммерсионным масляным объективом C Plan Aplanachromat 63x/1,4 Oil (Carl Zeiss, Германия), фильтра Semrock FF01-890/SP и камеры EMCCD iXon3 897 (Andor, Великобритания). ФЛ НАФ возбуждали с помощью диодного лазера LDD-10N с длиной волны 978 нм (Полупроводниковые приборы, Россия), интенсивность света $\sim 1,5$ кВт/см², ФЛ сигнал НАФ регистрировали в диапазоне 420 – 840 нм.

2.2.8. Анализ цитотоксичности лиофилизированных дБСА-НАФ-NOBF₄

Для исследования цитотоксичности НАФ-NOBF₄ и наноконплексов дБСА-НАФ-NOBF₄ в отношении клеток аденокарциномы яичника человека SKOV-3 (номер по каталогу ATCC HTB-77). Эта клеточная линия была выбрана как возможная модель будущих исследования действия тераностических комплексов на основе НАФ. Клетки пересевали по стандартной методике по достижению монослоя (два раза в неделю) с использованием раствора Версена (ПанЭко, Россия) и культивировали в среде McCoу's 5A с добавлением и 10%

FBS. Далее, клетки CHO инкубировали в CO₂ инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Для определения влияния отсутствия сыворотки на жизнеспособность клеток SKOV-3, клетки в концентрации 10⁴ клеток/лунку помещали в лунки 96-луночного планшета (Corning, США), культивировали 24 ч. Затем заменяли среду на свежую бессывороточную среду или свежую среду с добавлением 10% FBS. Жизнеспособность клеток оценили методом МТТ-теста [103]. культуральную среду заменяли на свежую (100 мкл), содержащую реагент МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий бромид) (ПанЭко, Россия) в концентрации 0,5 мг/мл. Клетки инкубировали в течение 4 ч в 5% атмосфере CO₂ при 37°C. После этого среду с МТТ заменяли на ДМСО (ПанЭко, Россия). Планшет встряхивали на орбитальном шейкере OS-20 (Biosan, Латвия) в течение 5 мин до полного растворения кристаллов формазана. Измеряли оптическую плотность раствора в каждой лунке с помощью планшетного спектрофотометра Synergy MX (BioTek, США) на длине волны 570 нм. Полученные данные анализировали с использованием программы GraphPad Prism 9.0. (GraphPad Software, США).

Для оценки влияния НАФ-NOBF₄ на жизнеспособность клеток, после инкубации клеток в течение 24 ч, среду заменяли свежей бессывороточной средой с добавлением НАФ-NOBF₄ в разных концентрациях (0 – 650 мкг/мл) и оценивали жизнеспособность клеток с помощью МТТ-теста, как описано выше.

Для исследования цитотоксичности НАФ-NOBF₄ и дБСА-НАФ-NOBF₄ клетки SKOV-3 в концентрации 10⁴ клеток/лунку помещали в лунки 96-луночного планшета, культивировали 24 ч. Формирование жесткой БК на поверхности НАФ-NOBF₄ /дБСА-НАФ-NOBF₄ проводили как описано в разделе 2.2.5. и рисунок 27. НАФ-NOBF₄ и дБСА-НАФ-NOBF₄ инкубировали в культуральной среде McCoy's 5A с 10% FBS в течение 4 ч. Среду в лунках

заменяли ростовой средой с НАФ-NOBF₄/дБСА-НАФ-NOBF₄ и НАФ с жесткой БК на их поверхности (НАФ-NOBF₄@БК /дБСА-НАФ-NOBF₄@БК) в концентрации 25 – 200 мкг/мл, инкубировали в течение 24 ч в 5% атмосфере CO₂ при 37°C. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста, как описано выше.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Синтез и характеристика НАФ-ОК и НАФ-NOBF₄

НАФ-ОК, состава $\text{NaY}_{0,794}\text{F}_4\text{Yb}_{0,2}\text{Tm}_{0,006}/\text{NaYF}_4$ и структуры (ядро/оболочка) и покрытие олеиновой кислотой (ОК), синтезировали со строго контролируемым размером и формой методом сольватотермического разложения [98, 99]. Легирование матрицы NaYF_4 ионами трехвалентных лантаноидов Yb^{3+} и Tm^{3+} позволяет получать НАФ с максимумами эмиссии ФЛ в синей и ИК областях [99]. Предшественники лантаноидов и фтора нагревали в бескислородной среде и затем стабилизировали в растворе ОК, в результате чего были получены кубические наноразмерные кристаллы НАФ (α -фаза). Для получения более стабильных гексагональных кристаллов НАФ (β -фаза) была применена дополнительная термообработка. Переход от α - к β -фазе и последующее формирование инертной оболочки NaYF_4 значительно увеличивают яркость ФЛ НАФ, что позволяет повысить эффективность их применения для биоимиджинга [104].

Размер НАФ-ОК по данным просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) составил $35 \pm 2,8$ нм (рисунок 28А). Гидродинамический диаметр НАФ-ОК и индекс полидисперсности (PDI) говорят о стабильности и средней полидисперсности суспензии в гексане (рисунок 28Е и таблица 2) [105]. НАФ-ОК являются гидрофобными из-за присутствия олеиновой кислоты на их поверхности и неподходящими для биологических применений, поэтому для придания им биосовместимости требуется модификации поверхности. Поверхность НАФ была модифицирована неорганическим соединением NOBF_4 с молекулярной массой 116,81 г/моль методом обмена лигандов. Когда раствор NOBF_4 в DMF добавляется к НАФ-ОК в гексане, последние выпадают в осадок после перемешивания, что указывает на резкое изменение их растворимости в

результате изменения свойств поверхности [102]. После центрифугирования НАФ- NOBF_4 могут быть легко ресуспендированы в различных полярных растворителях, таких как DMF, и образуют коллоидные суспензии. В частности, суспензия НАФ- NOBF_4 в DMF остается стабильной в течение нескольких лет без какой-либо заметной агрегации или осаждения [4].

В результате были получены гидрофильные НАФ со стабильным распределением по размерам и умеренной полидисперсностью в водном растворе (рисунок 28Е и таблица 2). Значения PDI в таблице 2 были ниже 0,3, что указывает на однородность размера и небольшой уровень агрегации [105]. НАФ- NOBF_4 имели положительный ζ -потенциал, так как они окружены ионами NO^+ на поверхности и BF_4^- в качестве противоионов (рисунок 28В) [4, 106]. Их ζ -потенциал составлял $+57,2 \pm 2,04$ мВ при pH 7,0 что говорит о высокой коллоидной стабильности в водной суспензии, поскольку электростатическое отталкивание между положительно заряженными частицами превосходит Ван-дер-Ваальсовы силы притяжения, что уменьшает возможность образования агрегатов [105].

Пики эмиссии ФЛ НАФ-ОК и НАФ- NOBF_4 находятся в синей (478 нм) и ближней ИК (800 нм) областях, соответствующих переходам $^1\text{G}_4 \rightarrow ^3\text{H}_6$ и $^3\text{H}_4 \rightarrow ^3\text{H}_6$ ионов Tm^{3+} , соответственно, при возбуждении светом с длиной волны 980 (рисунок 28Б,Д). Высокий пик излучения этих наночастиц на 800 нм в ближней ИК области спектра, попадающий в окно прозрачности биоткани (700 – 1100 нм), делает их эффективными агентами для биоимиджинга [32, 46]. Интенсивность ФЛ НАФ- NOBF_4 в воде снижается относительно НАФ-ОК в гексане, но остаётся достаточно высокой для целей биоимиджинга.

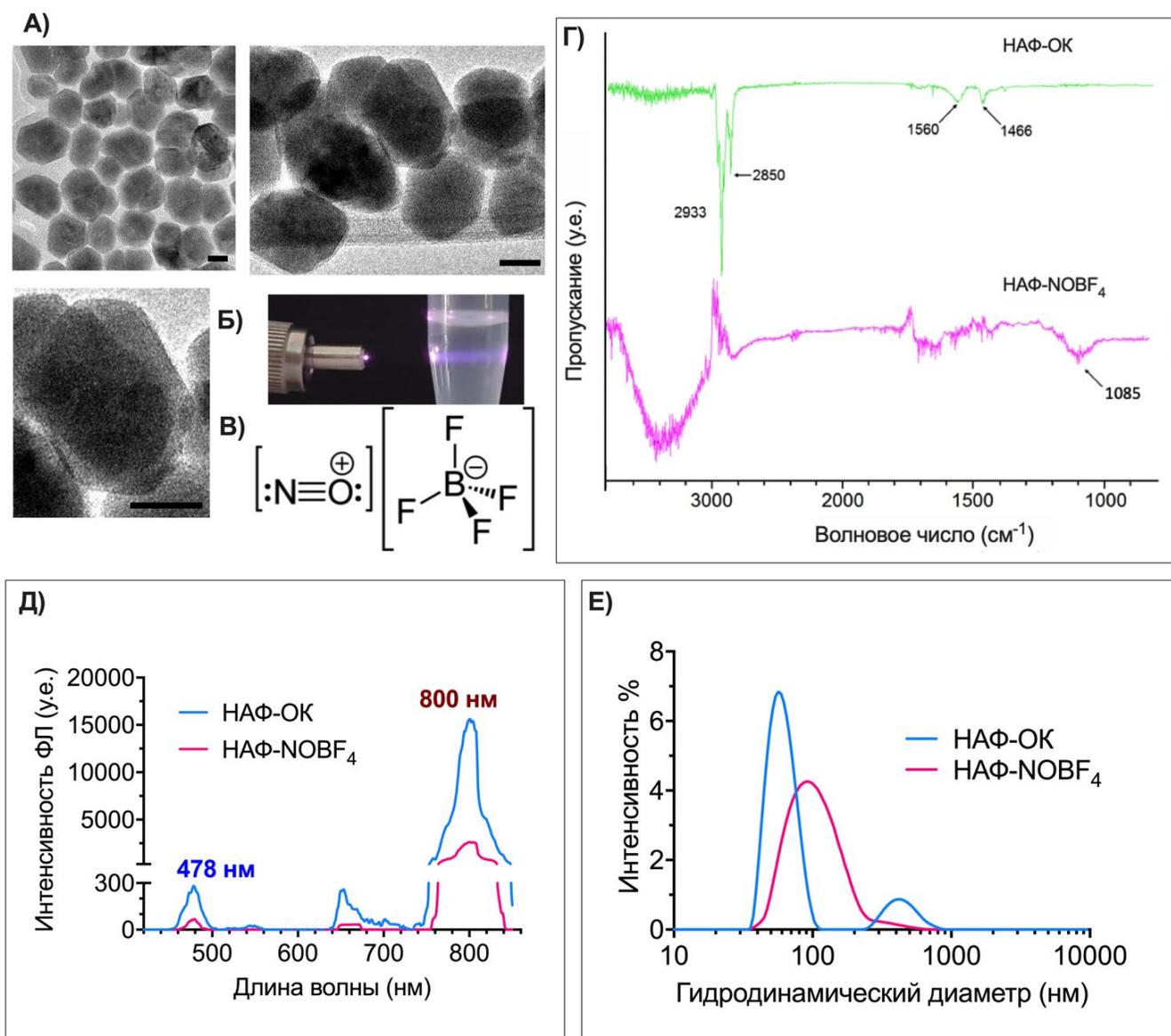


Рисунок 28. Характеризация HAФ-OK и HAФ-NOBF₄: А) ПЭМ изображение HAФ-OK состава ($\text{NaY}_{0,794}\text{F}_4\text{Yb}_{0,2}\text{Tm}_{0,006}/\text{NaYF}_4$), масштабный отрезок 20 нм; Б) HAФ-NOBF₄ в суспензии, освещенные лазером с длиной волны 980 нм; В) Формула тетрафторбората нитрозония (NOBF₄); Г) Спектры поглощения FTIR HAФ-OK и HAФ-NOBF₄; Д) Спектр эмиссии ФЛ HAФ при возбуждении светом с длиной волны 980 нм; Е) Гидродинамический диаметр HAФ-OK и HAФ-NOBF₄ в гексане и деионизированной воде, соответственно.

Таблица 2

Гидродинамический диаметр НАФ-ОК и НАФ-NOBF₄

НАФ	Гидродинамический диаметр (нм)	PDI
НАФ-ОК	67,94 ± 0,38	0,254 ± 0,011
НАФ-NOBF ₄	93,91 ± 1,03	0,171 ± 0,020

Данные FTIR спектроскопии также подтверждают удаление остатков ОК с поверхности НАФ и присоединение NOBF₄ (рисунок 28Г). Появление пиков 2933 см⁻¹ и 2850 см⁻¹ соответствует асимметричным и симметричным валентным колебаниям групп -CH₂ олеиновой кислоты, соответственно. Пики 1560 и 1466 см⁻¹ относятся к асимметричному и симметричному участку COO⁻ олеиновой кислоты соответственно. Обработка НАФ молекулами NOBF₄ вызвала уменьшение интенсивности пиков при 2933 и 2850 см⁻¹ и появление новой полосы при 1085 см⁻¹, связанной с анионами BF₄⁻.

3.2. Исследование образования жесткой БК на поверхности НАФ-ПАК и НАФ-ПЭИ и их связывания с клетками в культуре

Было проведено исследование образования жесткой БК из альбумина на поверхности наночастиц на примере гидрофильных НАФ, покрытых положительно заряженным полиэтиленимином (НАФ-ПЭИ) и отрицательно заряженной полиакриловой кислотой (НАФ-ПАК). НАФ получали методом сольватотермического разложения с последующей модификацией поверхности полимерами ПАК и ПЭИ (рисунок 29 А,Б) [107, 108]. Размер и ζ-потенциал НАФ-ПЭИ и НАФ-ПАК до и после формирования БК измеряли с использованием прибора Zetasizer Nano ZS. Измерения показали увеличение гидродинамического диаметра НАФ@БК относительно исходных НАФ после

образования БК (рисунок 30А), а ζ -потенциал как положительных, так и отрицательных наночастиц стал более отрицательным после формирования БК (рисунок 30Б), поскольку заряд альбумина составляет -17 при нормальном физиологическом рН [109].

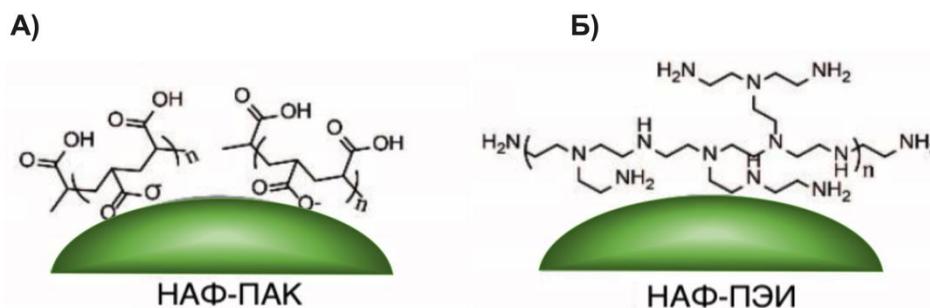


Рисунок 29. Сборка (А) НАФ-ПАК и (Б) НАФ-ПЭИ [107].

При инкубации в среде, содержащей 10% FBS, положительно заряженные НАФ, то есть НАФ-ПЭИ, проявляли большую адсорбцию белков на своей поверхности. Электростатические взаимодействия играют ключевую роль в формировании БК, особенно потому, что сывороточные белки обычно обладают отрицательным зарядом, тем самым заставляя большое количество белков адсорбироваться на положительно заряженных поверхностях [108, 110]. Альбумин в биологических жидкостях имеет отрицательный заряд, что позволяет предположить его значительную адсорбцию на поверхности НАФ-ПЭИ с помощью электростатических связей. Тем не менее, альбумин способен к адсорбции на поверхности отрицательно заряженных НАФ-ПАК благодаря содержанию большого количества заряженных аминокислот (лизина, аргинина, аспартата и глутамата) (рисунок 19) и действию различных сил, способствующих адсорбции белков на поверхности НАФ, в том числе Ван-дер-Ваальсовых и водородных взаимодействий [9, 63].

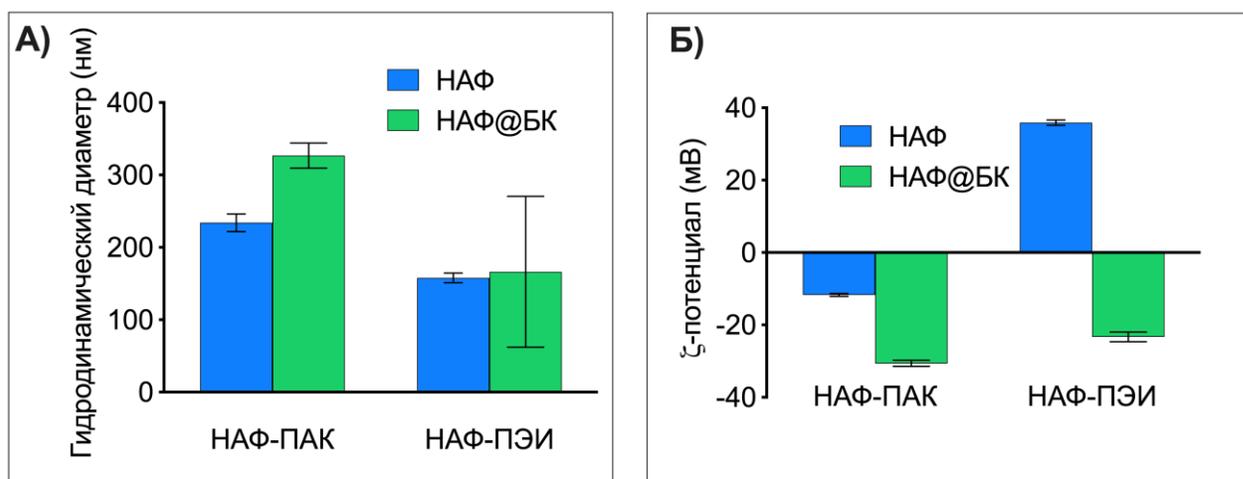


Рисунок 30. Формирование БК вокруг HAФ-ПАК и HAФ-ПЭИ: А) Гидродинамический диаметр частиц HAФ-ПАК и HAФ-ПАК@BK; HAФ-ПЭИ и HAФ-ПЭИ@BK, определенный методом DLS; Б) ζ-потенциал HAФ-ПАК, HAФ-ПАК@BK, HAФ-ПЭИ и HAФ-ПЭИ@BK, определенный методом ELS.

Для исследования взаимодействия наночастиц (HAФ-ПАК, HAФ-ПАК@BK, HAФ-ПЭИ, и HAФ-ПЭИ@BK) с эукариотическими клетками использовали культуру клеток яичника китайского хомячка линии СНО. Клетки СНО имеют эпителиальное происхождение и обладают рецепторами к альбумину [111]. Клетки инкубировали с HAФ при 4°C в течение 1 ч, затем фиксировали и готовили препараты для микроскопии. Низкая температура инкубации клеток с наночастицами предотвращает клеточное поглощение наночастиц и позволяет наблюдать связывание наночастиц с клетками [107]. Препараты исследовали с помощью системы широкопольной флуоресцентной микроскопии, оптимизированной для регистрации ФЛ сигнала HAФ. Микроскопия клеточной линии (рисунок 31) не показала накопления HAФ внутри клеток. HAФ, покрытые белковой короной, эффективнее связывались с поверхностью клеток СНО.

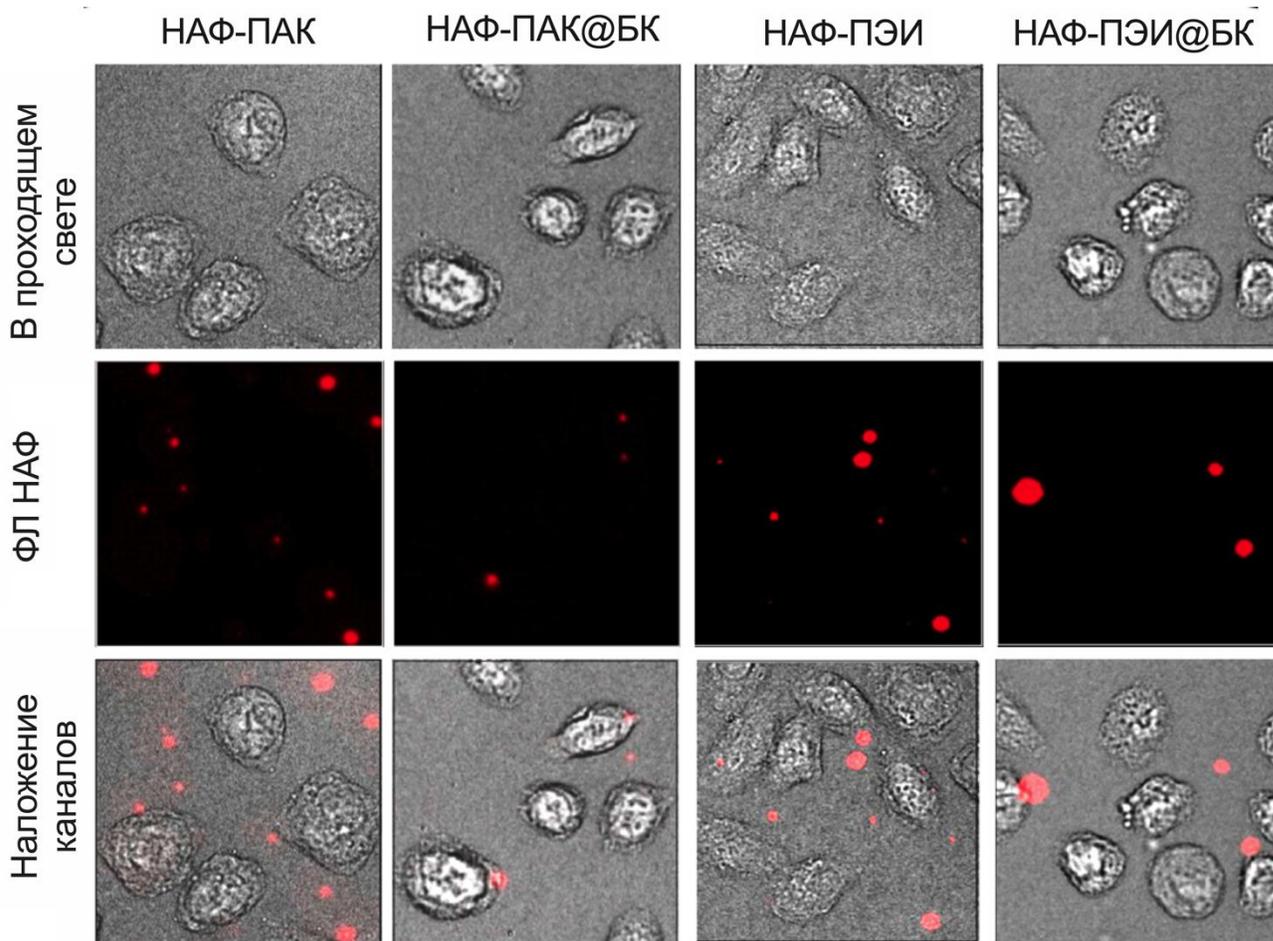


Рисунок 31. Микроскопия клеток СНО, инкубированных с НАФ и с комплексом НАФ@БК. ФЛ сигнал НАФ в диапазоне 420-840 нм при возбуждении светом с длиной волны 978 нм.

3.3. Определение оптимальной концентрации альбумина для формирования стабильной БК на поверхности НАФ

Ряд исследований показали способность БСА увеличивать стабильность наночастиц и уменьшать образование БК в физиологических условиях [12, 89]. На первом этапе исследования стабилизации наночастиц молекулами альбумина, размер и ζ -потенциал бычьего сывороточного альбумина

анализировали методами DLS и ELS до и после термообработки при 70°C в течение 30 мин.

Молекулы БСА имеют средний размер диаметра ~2 нм (пик от 1 до 4 нм), однако при диспергировании в воде они демонстрируют разворачивание молекул, увеличивающее их средний размер примерно в 10 раз (пик от 10 до 40 нм), а также некоторую агрегацию (> 500 нм) (рисунок 32А). Термическая денатурация БСА вызывает диссоциацию и дальнейшее разворачивание почти всех кластеров агрегатов, и белок (термически денатурированный БСА, дБСА) демонстрирует максимальное значение гидродинамического диаметра примерно ~20 нм (рисунок 32А). Тем не менее, небольшая часть БСА не полностью раскрывается при термической обработке, так как пик монодисперсных молекул БСА и дБСА (менее 10 нм) четко показывает увеличение размера после термической денатурации (рисунок 32А). Кроме того, разворачивание третичной структуры БСА при 70°C является необратимым [89, 112].

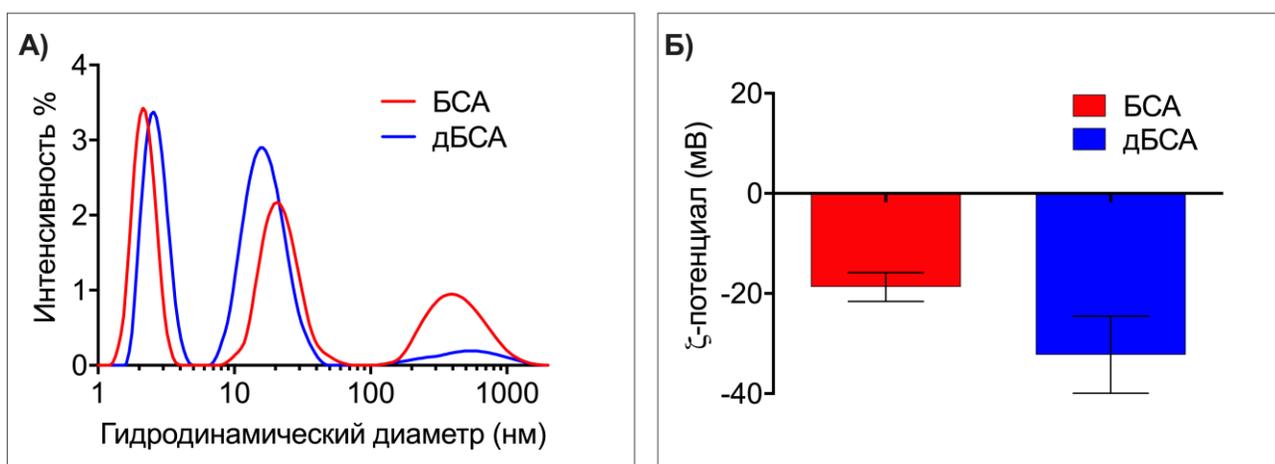


Рисунок 32. Характеристика БСА и дБСА в деионизированной воде: А) Гидродинамический диаметр БСА и дБСА определенны методом DLS; Б) ζ-потенциала БСА и дБСА измерили методом ELS.

ζ -потенциал БСА в воде показывает отрицательные значения, которые становятся еще более отрицательным после денатурации из-за экспонирования большего количества отрицательно заряженных аминокислот (рисунок 32Б).

Таким образом, полученные нами результаты продемонстрировали увеличение гидродинамического диаметра и снижение ζ -потенциала БСА после денатурации, что способствует усилению электростатического взаимодействия между молекулами альбумина и положительно заряженными наночастицами в суспензии при физиологическом значении pH.

Процесс формирования БК на поверхности НАФ при их инкубации с альбумином зависит от ряда факторов (таблица 1). Альбумин может быть использован для блокирования образования нежелательной БК вокруг НАФ, что помогает повысить их стабильность и увеличить время циркуляции в кровотоке [12, 113]. Для стабилизации полученных НАФ-ПЭИ и НАФ-NOBF₄ необходимо было определить оптимальное соотношение концентраций альбумина и наночастиц.

Цель состояла в том, чтобы получить стабильный слой БК из альбумина, сформированный вокруг наночастиц, добиться отсутствия их агрегации и избытка белка в суспензии. Формирование БК зависит от фактора концентрации, который некоторое время игнорировался, но был недавно установлен [114].

Результаты подбора оптимального соотношения концентраций альбумина и наночастиц суммированы на рисунках 33, 34 и 35 и в таблицах 3, 4 и 5. На рисунках 33А, 34А и 35А видно, что низкие концентрации БСА/дБСА вызывают относительно высокую агрегацию наночастиц, тогда как высокие концентрации БСА/дБСА приводят к сохранению избытка несвязанных белковых молекул. В рисунках 33Д, 34Д и 35Д также видно, как ζ -потенциал возрастает по абсолютной величине при увеличении концентрации альбумина до достижения насыщения. Размер, ζ -потенциал и коллоидная стабильность НАФ инкубированных с

альбумином в суспензии при всех концентрациях сохранялись при комнатной температуре (25°C) в течение 4 ч (рисунок 33, 34 и 35 Б – Е), демонстрируя стабильность и целостность наноконплекса с течением времени. Концентрация БСА 75 мкМ для НАФ-ПЭИ и концентрации БСА 100 мкМ и дБСА 10 мкМ для НАФ-NOBF₄ позволили зарегистрировать единственный пик распределения гидродинамического диаметра частиц с умеренной полидисперсностью в относительно стабильном состоянии в коллоидных суспензиях (рисунок 33Г, 34Г и 35Г, и таблица 3,4 и 5).

Таблица 3

Гидродинамический диаметр НАФ- ПЭИ, инкубированных с БСА

НАФ-ПЭИ (0,2 мг / мл) инкубированные с БСА	Гидродинамический диаметр (нм)	PDI
Время инкубации: 15 мин		
5 мкМ	684 ± 51,6	0,25 ± 0,037
10 мкМ	146,3 ± 0,9815	0,279 ± 0,018
25 мкМ	169,4 ± 1,301	0,424 ± 0,008
50 мкМ	137,1 ± 1,2	0,35 ± 0,043
75 мкМ	134,2 ± 1,656	0,289 ± 0,041
100 мкМ	129,4 ± 2,594	0,369 ± 0,023
Время инкубации: 4 ч		
5 мкМ	902,1 ± 48,81	0,228 ± 0,034
10 мкМ	148,8 ± 2,57	0,255 ± 0,01
25 мкМ	130 ± 2,248	0,263 ± 0,008
50 мкМ	130,5 ± 0,8737	0,266 ± 0,004
75 мкМ	130,7 ± 1,38	0,256 ± 0,004
100 мкМ	229 ± 3,347	0,43 ± 0,012

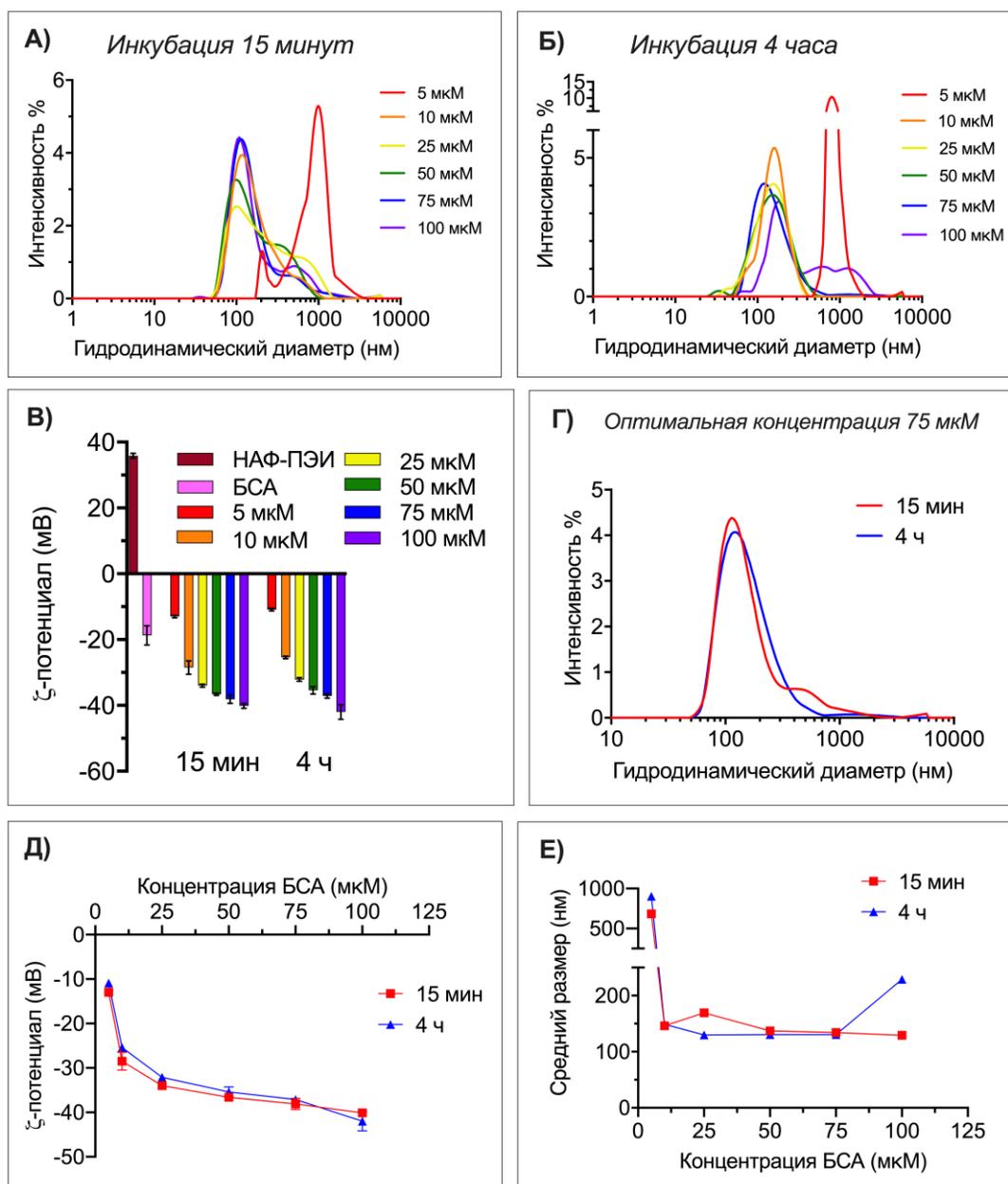


Рисунок 33. Определение оптимальной концентрации БСА для формирования стабильной БК на НАФ-ПЭИ: А и Б) гидродинамический диаметр БСА-НАФ- ПЭИ после инкубации НАФ- ПЭИ с БСА в разных концентрациях в течение 15 мин и 4 ч, соответственно; В) ζ -потенциал БСА-НАФ-ПЭИ в сравнении с ζ -потенциалом НАФ-ПЭИ и БСА; Г) гидродинамический диаметр БСА-НАФ- ПЭИ после инкубации с БСА в оптимальной концентрации (75 мкМ); Д) ζ -потенциал БСА-НАФ- ПЭИ при различных концентрациях БСА в течение 15 мин и 4 ч; Е) Среднее значение гидродинамического диаметра БСА-НАФ-ПЭИ при различных концентрациях БСА в течение 15 мин и 4 ч.

Таблица 4

Гидродинамический диаметр НАФ-NOBF₄, инкубированных с БСА

НАФ-NOBF₄ (0,25 мг / мл) инкубированные с БСА	Гидродинамический диаметр (нм)	PDI
Время инкубации: 15 мин		
25 мкМ	116,5 ± 1,361	0,271 ± 0,009
50 мкМ	120,6 ± 0,9849	0,42 ± 0,006
75 мкМ	121,7 ± 5,551	0,342 ± 0,046
100 мкМ	119,9 ± 0,7572	0,322 ± 0,004
120 μМ	108,7 ± 2,946	0,423 ± 0,071
Время инкубации: 4 ч		
25 мкМ	118,5 ± 1,986	0,279 ± 0,012
50 мкМ	119,4 ± 2,312	0,435 ± 0,012
75 мкМ	131,6 ± 8,9	0,413 ± 0,026
100 мкМ	123,9 ± 1,553	0,369 ± 0,055
120 мкМ	108,9 ± 2,042	0,488 ± 0,006

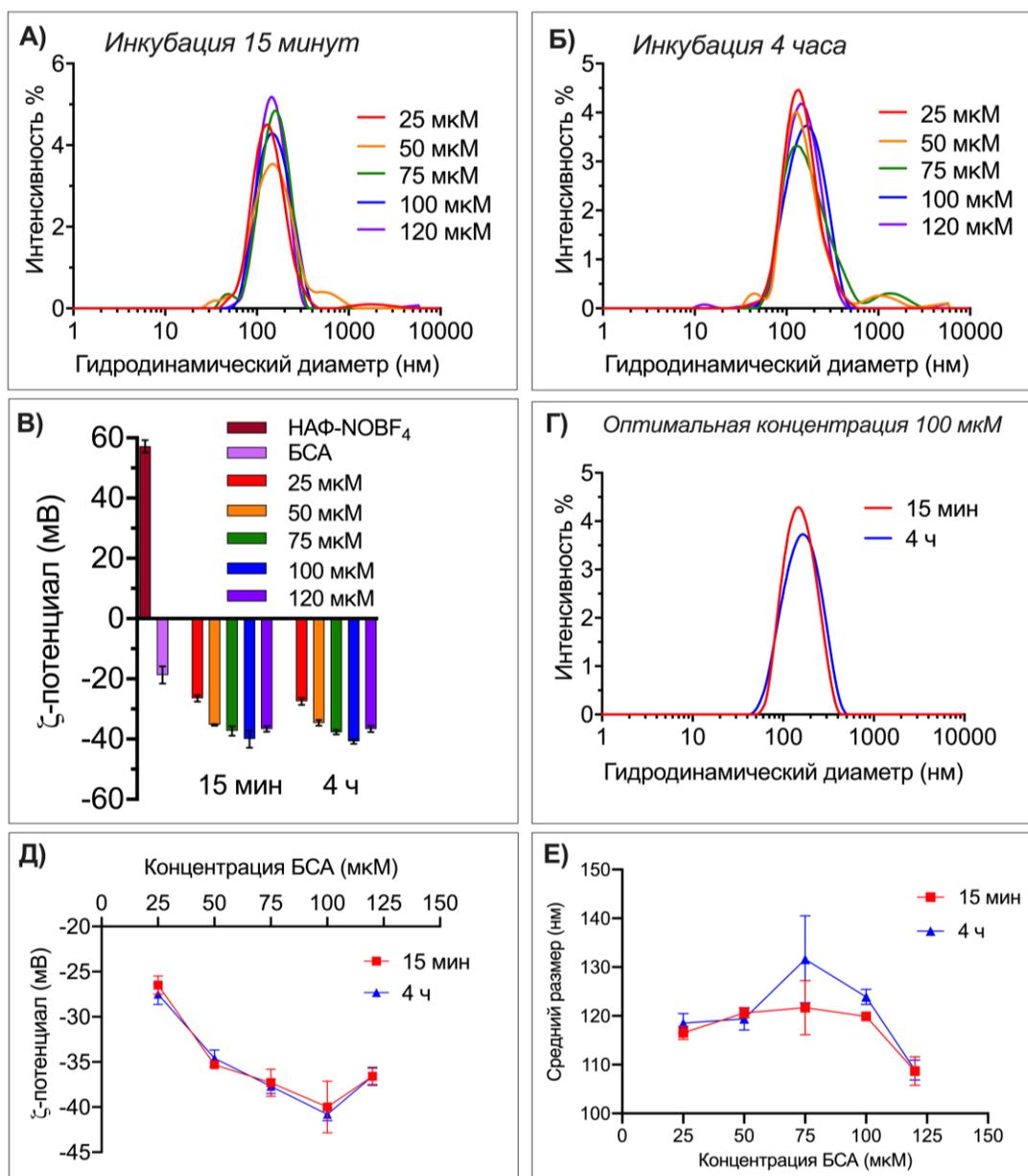


Рисунок 34. Определение оптимальной концентрации БСА для формирования стабильной БК на НАФ-NOBF₄: А и Б) гидродинамический диаметр БСА-НАФ-NOBF₄ после инкубации НАФ-NOBF₄ с БСА в разных концентрациях в течение 15 мин и 4 ч, соответственно; В) ζ -потенциал БСА-НАФ-NOBF₄ в сравнении с ζ -потенциалом НАФ-NOBF₄ и БСА; Г) гидродинамический диаметр БСА-НАФ-NOBF₄ после инкубации с БСА в оптимальной концентрации (100 мкМ); Д) ζ -потенциал БСА-НАФ-NOBF₄ при различных концентрациях БСА в течение 15 мин и 4 ч; Е) Среднее значение гидродинамического диаметра БСА-НАФ-NOBF₄ при различных концентрациях БСА в течение 15 мин и 4 ч.

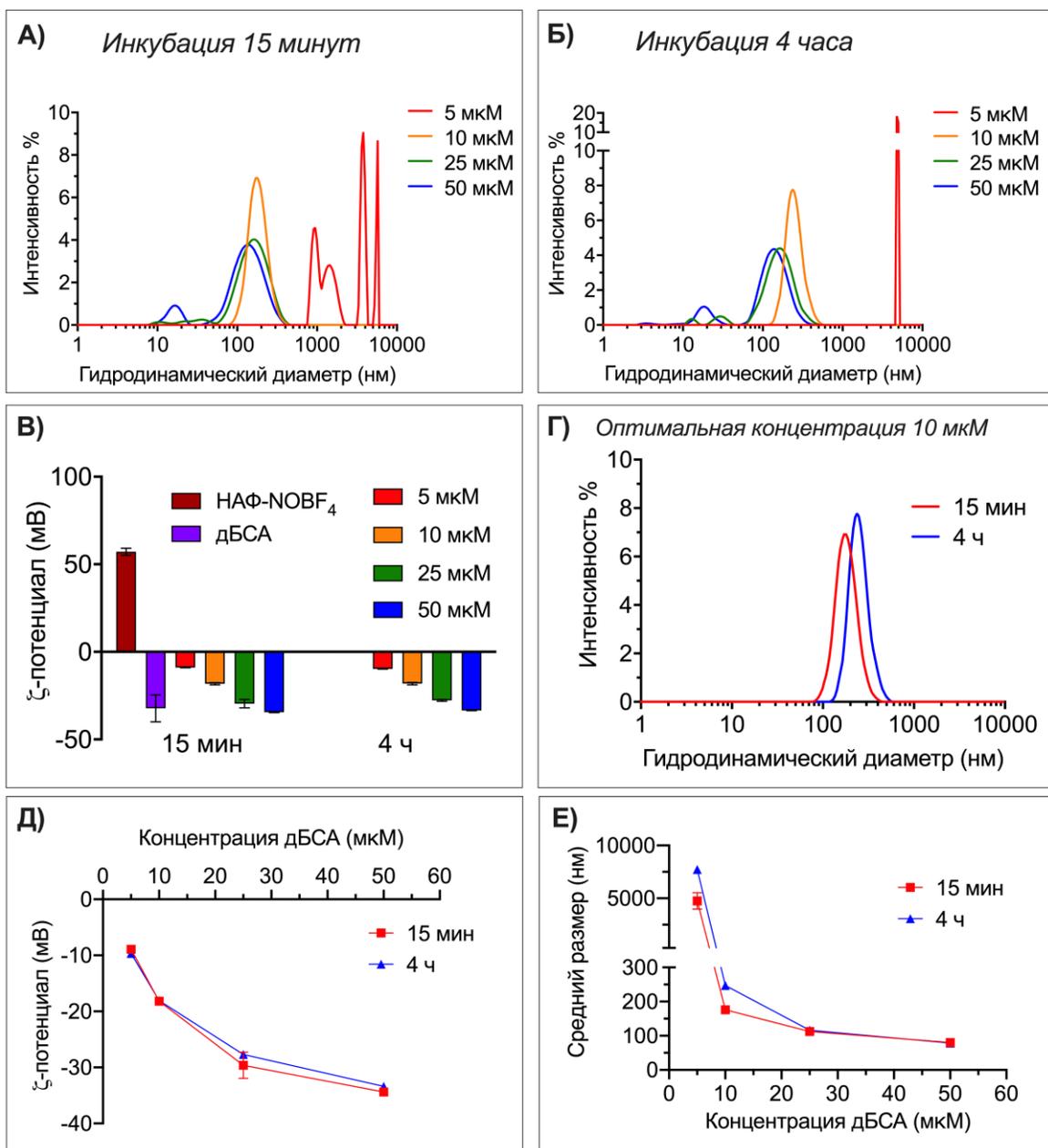


Рисунок 35. Определение оптимальной концентрации дБСА для формирования стабильной БК на НАФ- NOBF_4 : А и Б) гидродинамический диаметр дБСА-НАФ- NOBF_4 после инкубации НАФ- NOBF_4 с дБСА в разных концентрациях в течение 15 мин и 4 ч, соответственно; В) ζ -потенциал дБСА-НАФ- NOBF_4 в сравнении с ζ -потенциалом НАФ- NOBF_4 и дБСА; Г) гидродинамический диаметр дБСА-НАФ- NOBF_4 после инкубации с дБСА в оптимальной концентрации (10 мкМ); Д) ζ -потенциал дБСА-НАФ- NOBF_4 при различных концентрациях дБСА в течение 15 мин и 4 ч; Е) Среднее значение гидродинамического диаметра дБСА-НАФ- NOBF_4 при различных концентрациях дБСА в течение 15 мин и 4 ч.

Таблица 5

Гидродинамический диаметр НАФ-NOBF₄, инкубированных с дБСА

НАФ-NOBF ₄ (0,25 мг / мл) инкубированные с дБСА	Гидродинамический диаметр (нм)	PDI
Время инкубации: 15 мин		
5 мкМ	4755 ± 786.6	0.281 ± 0.159
10 мкМ	176.2 ± 2.937	0.127 ± 0.006
25 мкМ	112.3 ± 4.994	0.375 ± 0.071
50 мкМ	80.27 ± 0.6862	0.56 ± 0.008
Время инкубации: 4 ч		
5 мкМ	7721 ± 383.9	0.13 ± 0.024
10 мкМ	247 ± 5.918	0.139 ± 0.016
25 мкМ	116.3 ± 2.468	0.333 ± 0.003
50 мкМ	78.82 ± 0.8603	0.569 ± 0.005

3.4. Оценка коллоидной стабильности БСА-НАФ-ПЭИ и дБСА-НАФ-NOBF₄, осажденных центрифугированием

Для осаждения и последующего ресуспендирования БСА-НАФ-ПЭИ и дБСА-НАФ-NOBF₄ использовали подход центрифугирования при 10000 g, в течение 7 мин. Осадок НАФ, покрытых альбумином, ресуспендировали в деионизированной воде.

Центрифугирование как метод осаждения полученных наноконплексов оказалось неэффективным, поскольку оно способствовало высокому уровню агрегации и седиментации в деионизированной воде. Гидродинамический диаметр наноконплексов составлял 600 – 1000 нм (рисунок 36 и таблица 6). Большая часть дБСА была удалена центрифугированием, а оставшаяся часть

альбумина вызвала отклонение значения ζ -потенциала от не покрытых НАФ (рисунок 36, таблица 6) и сделала коллоиды склонными к агрегации [105].

Таблица 6
Характеристики БСА-НАФ-ПЭИ и дБСА-НАФ-NOBF₄, осажденных центрифугированием

НАФ	Гидродинамический диаметр (нм)	PDI	ζ -потенциал
БСА-НАФ-ПЭИ	947,6 ± 53,44	0,276 ± 0,03	-11,3 ± 0,265
дБСА-НАФ-NOBF ₄	747,5 ± 76,71	0,292 ± 0,015	+6,74 ± 1,21

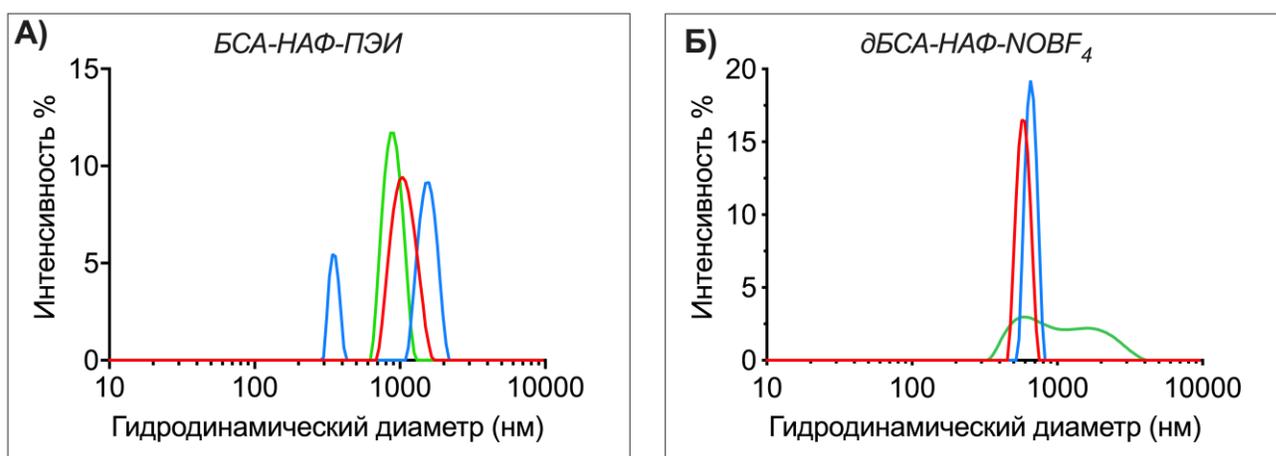


Рисунок 36. Гидродинамический диаметр наноконплексов, осажденных центрифугированием, по результатам трех измерений (показаны синим, красным и зелёным) методом DLS: А) БСА-НАФ-ПЭИ и Б) дБСА-НАФ-NOBF₄.

3.5. Оценка коллоидной стабильности лиофилизированных дБСА-НАФ-NOBF₄

В качестве альтернативного подхода к осаждению дБСА-НАФ-NOBF₄ использовали лиофилизацию. Затем образцы ресуспендировали при обработке

ультразвуком в течение 5 мин в деионизированной воде, PBS и средах для культивирования клеток содержащих 10% FBS. Лиофилизация обеспечивала сохранение целостности и стабильности полученных дБСА-НАФ-NOBF₄. Эмиссия ФЛ НАФ-NOBF₄ не подавлялась покрытием дБСА, напротив, наблюдалось небольшое увеличение сигнала ФЛ после покрытия дБСА. Дополнительный слой дБСА может снизить эффект тушения ФЛ молекулами воды, что приводит к более высокому сигналу ФЛ (рисунок 37А). Гидродинамический диаметр подтверждает образование БК из альбумина вокруг наночастиц, поскольку диаграмма смещается в сторону большего размера (рисунок 37Б). Появление небольшого пика, соответствующего размеру молекул дБСА (около 10 нм) является следствием лиофилизации и обработки ультразвуком. FTIR-спектр лиофилизированных дБСА-НАФ-NOBF₄ показывает уменьшение пика 1085 см⁻¹, соответствующего анионам BF₄⁻, и изменение полосы при 1397 см⁻¹, относится к амиду III дБСА, растяжению связи C≡N и изгибу связи N–H (рисунок 37В). Эти данные свидетельствуют о блокировании сигнала BF₄⁻ и взаимодействии между альбумином и наночастицами, что говорит об их успешном покрытии дБСА.

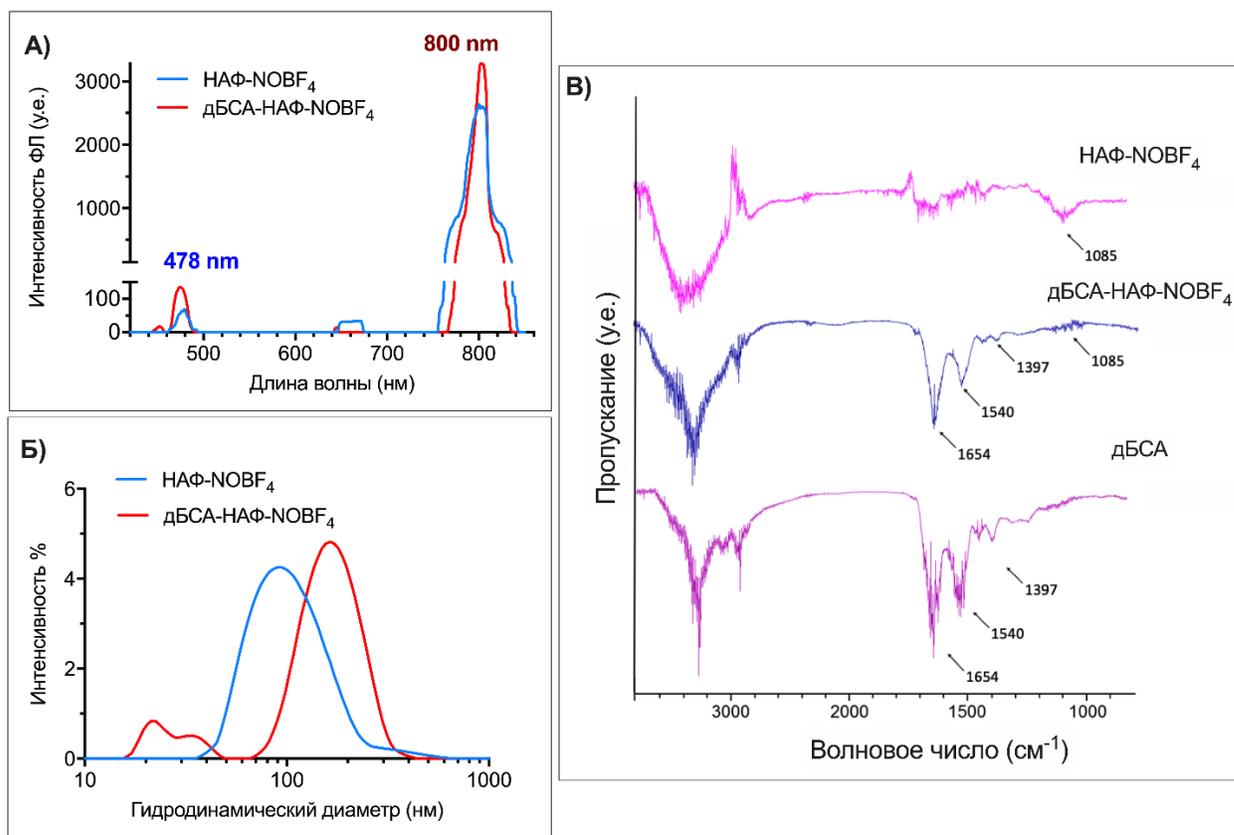


Рисунок 37. Характеризация HAФ-NOBF₄ и лиофилизированных dBСA-HAФ-NOBF₄: А) спектр эмиссии ФЛ HAФ-NOBF₄ и лиофилизированных dBСA-HAФ-NOBF₄ при возбуждении светом с длиной волны 980 нм; Б) Гидродинамический диаметр HAФ-NOBF₄ и лиофилизированных dBСA-HAФ-NOBF₄; В) Спектры поглощения FTIR HAФ-NOBF₄ и лиофилизированных dBСA-HAФ-NOBF₄.

dBСA-HAФ-NOBF₄ демонстрировали высокую стабильность в деионизированной воде, PBS и средах DMEM и McCoy's 5A с добавлением 10% FBS по результатам трех повторных измерений методом DLS (рисунок 38). Пики малого размера (меньше 100 нм) (рисунок 38А,Б) соответствуют небольшому уровню отслоения и агрегации dBСA в результате лиофилизации и обработки ультразвуком. Множественные пики (ниже 100 нм) на (рисунок 38В,Г) объясняются соответствующим сигналом белков сыворотки и агрегатов белков с гидродинамическим диаметром около 10 – 60 нм в присутствии 10% FBS. Пики

более 300 нм относятся к небольшому количеству агрегатов частиц (рисунок 38А,Г), составляющих менее 0,5% от общего количества. Значения гидродинамического диаметра дБСА-НАФ-NOBF₄ во всех случаях находились в диапазоне 100 – 300 нм.

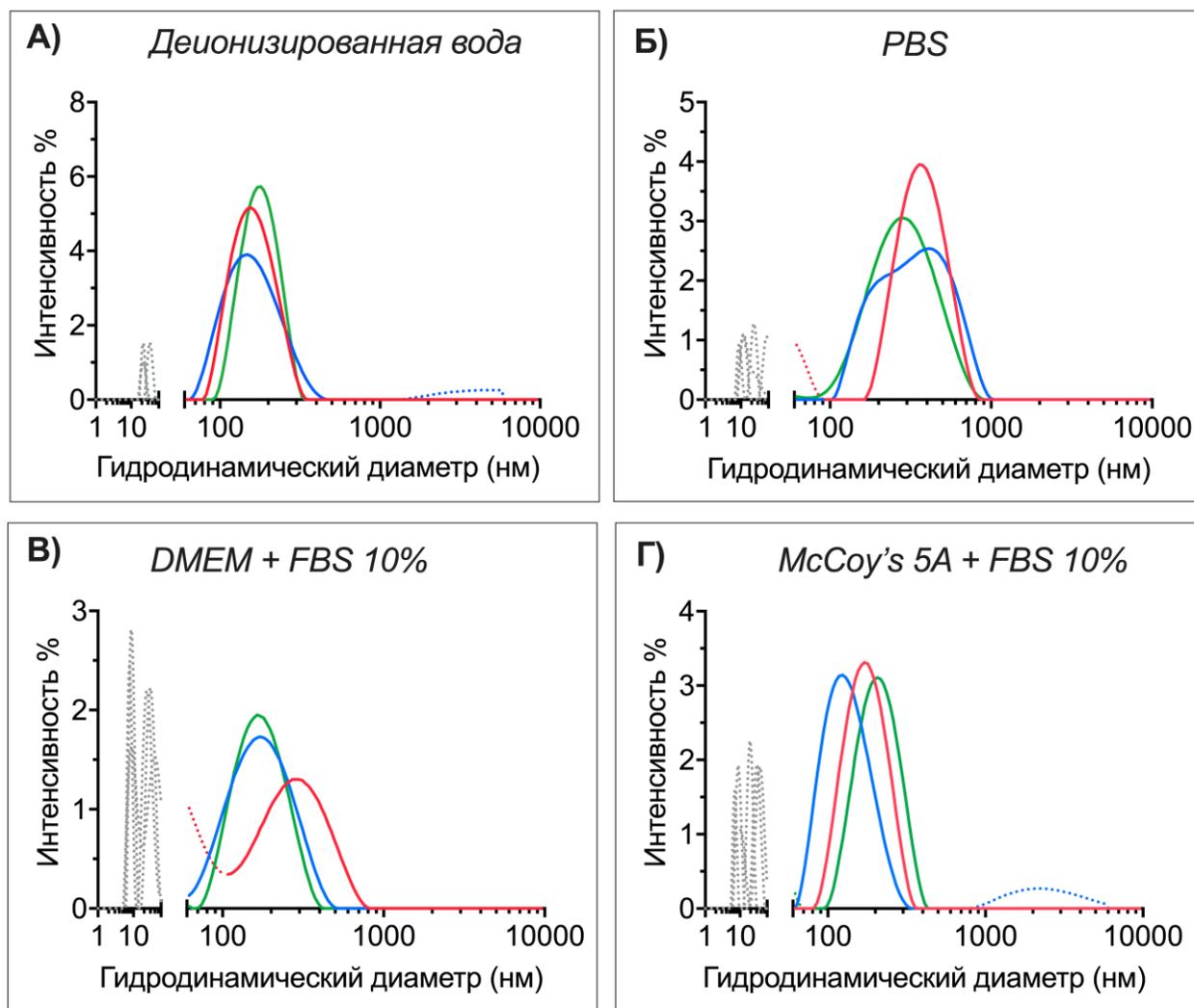


Рисунок 38. Оценка коллоидной стабильности лиофилизированных дБСА-НАФ-NOBF₄ в разных буферах, ресуспендированных встряхиванием с последующей обработкой ультразвуком в течение 5 минут в течение недели после лиофилизации по результатам трех повторных измерений (показаны синим, красным и зелёным): А) в деионизированной воде; Б) в PBS; В и Г) в средах для культивирования клеток DMEM и McCoy's 5A с добавлением 10% FBS, соответственно. Серые и/или пунктирные линии ниже 100 нм соответствуют молекулам белков и агрегатов белков; пунктирные линии более 300 нм – агрегатам НАФ.

Таким образом, в сравнении с подходом центрифугирования (рисунок 36), лиофилизация показала себя эффективной в поддержании стабильности НАФ-NOBF₄, покрытых дБСА в присутствии белков сыворотки, что подтверждает лиопротекторные свойства альбумина [92].

3.6. Оценка долговременной коллоидной стабильности лиофилизированных дБСА-НАФ-NOBF₄

Исследование наноконплексов проводили повторно через шесть месяцев после лиофилизации, при этом образцы ресуспендировали встряхиванием без обработки ультразвуком. Результаты согласуются с полученными ранее данными (рисунок 38) и подтверждают коллоидную стабильность дБСА-НАФ-NOBF₄. Лиофилизация сама по себе приводила к некоторому отслоению дБСА от наночастиц (рисунок 39), в то время как обработка ультразвуком не влияла ни на коллоидную стабильность наноконплексов, ни на их целостность, но без ультразвуковой обработки уровень агрегации частиц (кластеры более 300 нм) несколько увеличивался в различных буферах (рисунок 39).

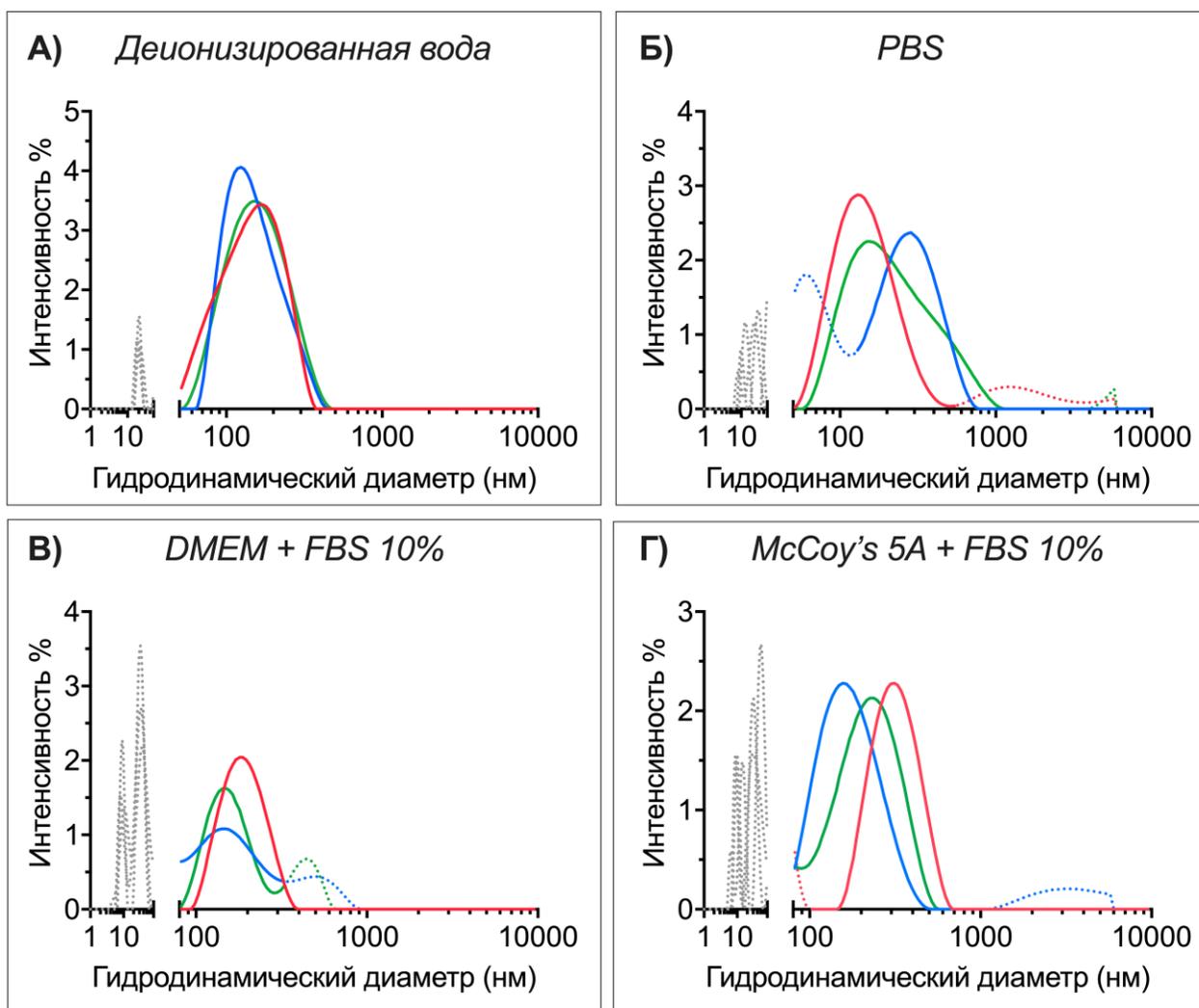


Рисунок 39. Оценка коллоидной стабильности лиофилизированных дБСА-НАФ- NOBF_4 в разных буферах, ресуспендированных встряхиванием и без обработки ультразвуком в течение 6 месяцев после лиофилизации по результатам трех повторных измерений (показаны синим, красным и зелёным): А) в деионизированной воде; Б) в PBS; В и Г) в средах для культивирования клеток DMEM и McCoy's 5A с добавлением 10% FBS, соответственно. Серые и/или пунктирные линии ниже 100 нм соответствуют молекулам белков и агрегатов белков; пунктирные линии более 300 нм – агрегатам НАФ.

По прошествии года хранения лиофилизированных нанокмплексов при 4°C их коллоидная стабильность была повторно исследована, как описано выше, до и после обработки ультразвуком (рисунок 40 и 41). В обоих случаях

результаты были аналогичны таковым после 1 недели и 6 месяцев хранения (рисунок 38 и 39). Сохранение свойств наноконплексов открывает возможности для дальнейших исследований и применения их как визуализирующих агентов. Ультразвуковая обработка снижает уровень агрегации частиц, но не является необходимым этапом для процедуры ресуспендирования наноконплексов.

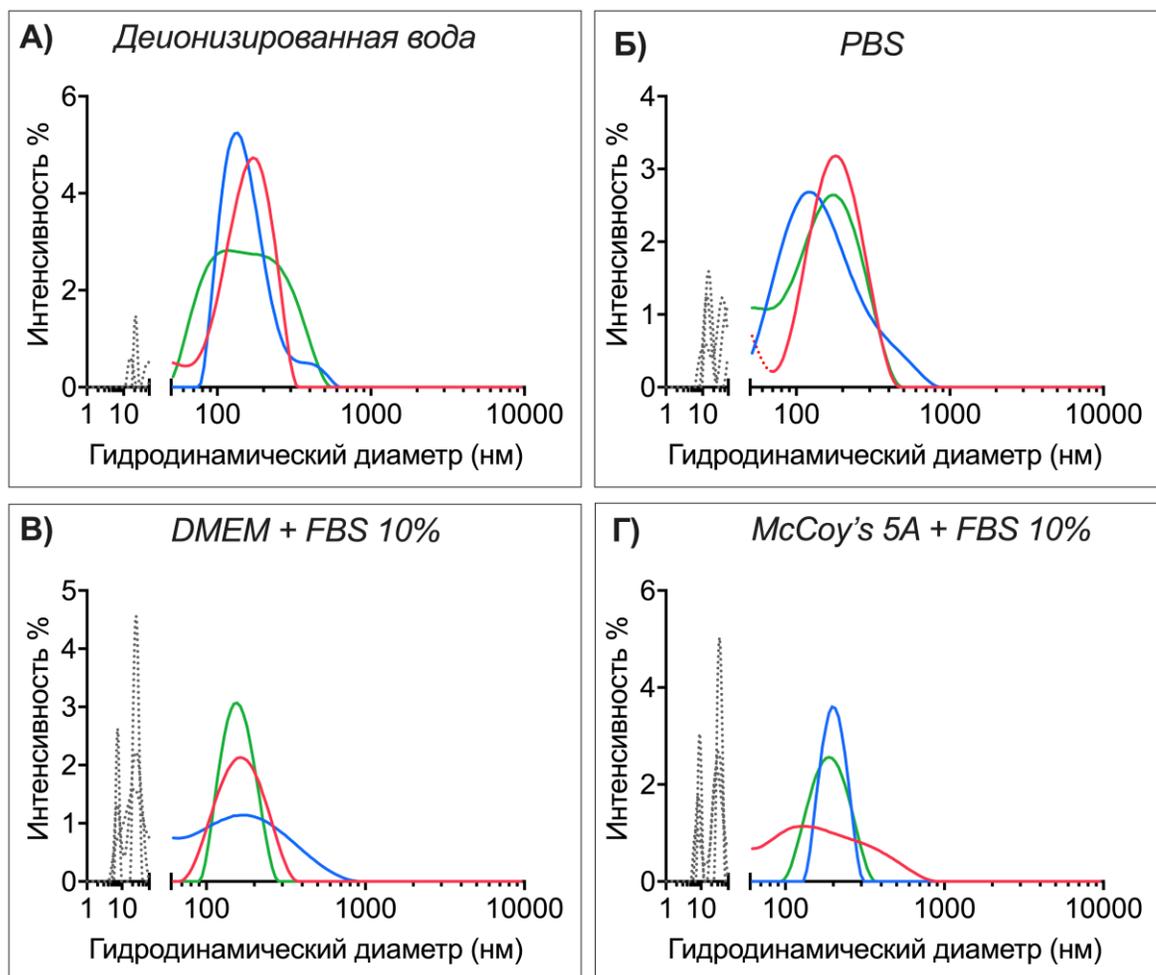


Рисунок 40. Оценка коллоидной стабильности лиофилизированных дБСА-НАФ- NOBF_4 в разных буферах, ресуспендированных встряхиванием и без обработки ультразвуком в течение 1 год после лиофилизации по результатам трех повторных измерений (показаны синим, красным и зелёным): А) в деионизированной воде; Б) в PBS; В и Г) в средах для культивирования клеток DMEM и McCoy's 5A с добавлением 10% FBS, соответственно. Серые и/или пунктирные линии ниже 100 нм соответствуют молекулам белков и агрегатов белков; пунктирные линии более 300 нм – агрегатам НАФ.

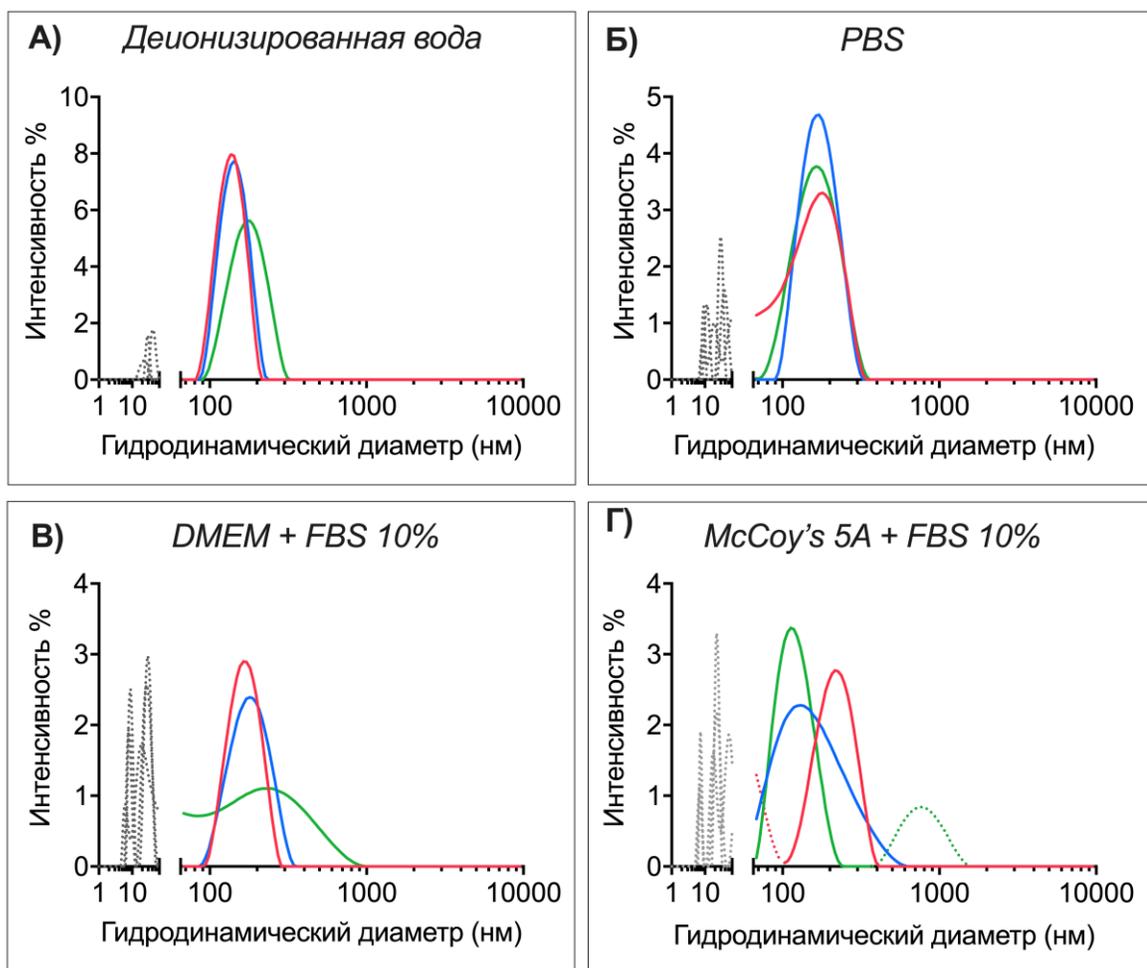


Рисунок 41. Оценка коллоидной стабильности лиофилизированных дБСА-НАФ- NOBF_4 в разных буферах, ресуспендированных встряхиванием с обработкой ультразвуком в течение 5 минут в течение 1 год после лиофилизации по результатам трех повторных измерений (показаны синим, красным и зелёным): А) в деионизированной воде; Б) в PBS; В и Г) в средах для культивирования клеток DMEM и McCoy's 5A с добавлением 10% FBS, соответственно. Серые и/или пунктирные линии ниже 100 нм соответствуют молекулам белков и агрегатов белков; пунктирные линии более 300 нм – агрегатам НАФ.

Средние результаты всех четырех наборов данных оценки стабильности в совокупности показывают, что соответствующие пики дБСА-НАФ- NOBF_4 (100 – 300 нм) перекрываются во всех буферах (рисунок 42). Анализ данных на всех трех контрольных точках дает одинаковый вывод: лиофилизация и дальнейшее

хранение при 4°C в течение года не влияют на уровень отслоения дБСА, целостность или коллоидную стабильность полученных комплексов. Кроме того, гидродинамический диаметр НАФ незначительно отличался в отсутствии и присутствии сыворотки, что свидетельствует о способности покрытия альбумина снижать дальнейшую адсорбцию белков на поверхности частиц.

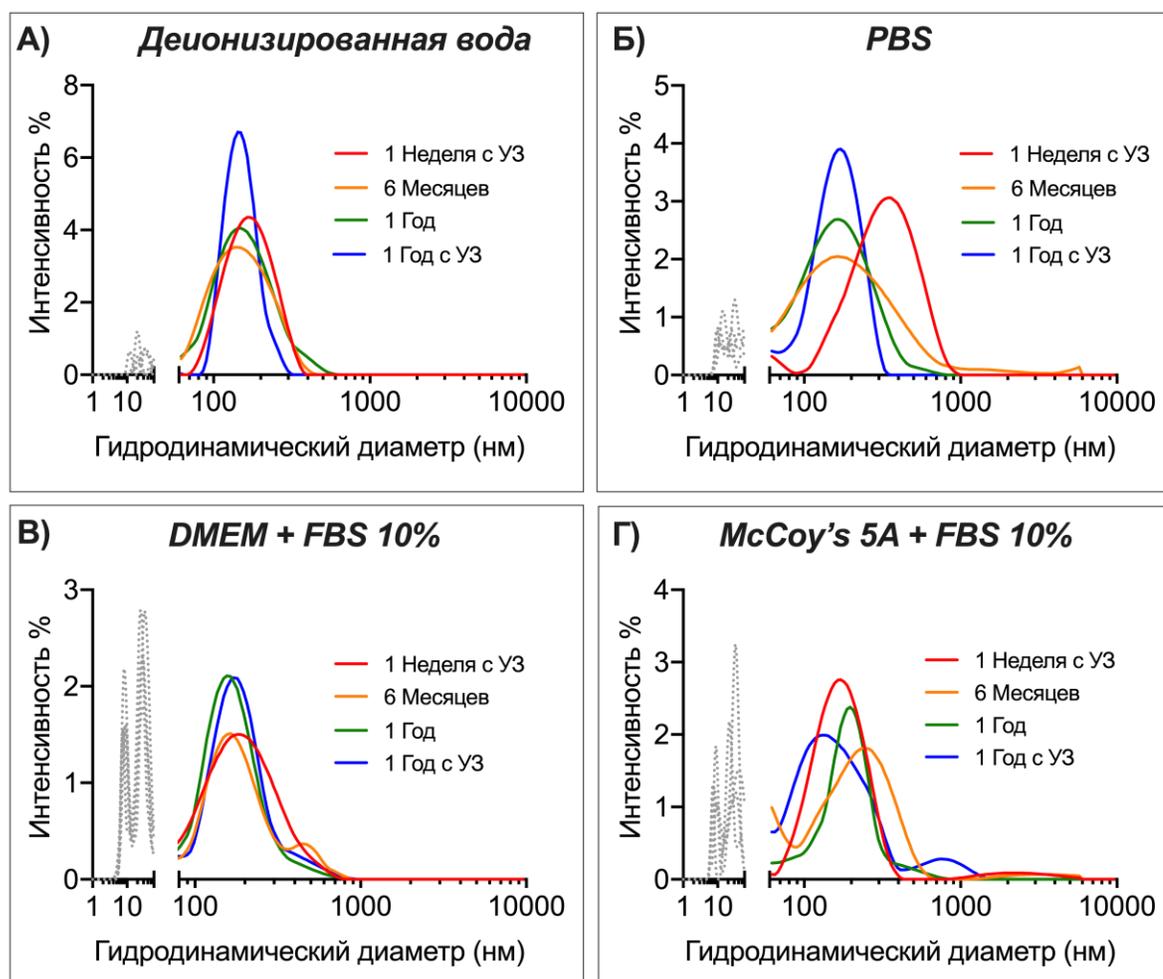


Рисунок 42. Оценка коллоидной стабильности лиофилизированных дБСА-НАФ-NOBF₄ в разных буферах, в трех временных точках на основе средних результатов трех повторных измерений гидродинамического диаметра: А) в деионизированной воде; Б) в PBS; В) в среде для культивирования клеток DMEM с добавлением 10% FBS; Г) в среде для культивирования клеток McCoy's 5A с добавлением 10% FBS; Серые и/или пунктирные линии ниже 100 нм соответствуют молекулам белков и агрегатов белков.

3.7. Оценка способности покрытия дБСА ингибировать формирование жесткой БК на НАФ-NOBF₄

В нескольких исследованиях изучалась способность предварительного покрытия наночастиц альбумином ингибировать образование БК в физиологических растворах. В 2018-ом году всеобъемлющее исследование, проведенное Парком и др., продемонстрировало существенное преимущество дБСА над БСА. Согласно этому исследованию дБСА имел повышенную липкость к поверхности кремния, что приводило к почти 10-кратному улучшению предотвращения дальнейшей адсорбции белков и образования БК [89].

Нами было исследовано влияние покрытия НАФ-NOBF₄ дБСА на адсорбцию белков в средах для культивирования клеток. Жесткую БК на поверхности наноконструкций, образующуюся при инкубации в средах для культивирования клеток с 10% FBS, количественно оценивали с помощью анализа микро ВСА в сравнении с исходным НАФ-NOBF₄, принимая во внимание наличие покрытия дБСА. Концентрацию белка в каждом образце определяли по предварительно построенному калибровочному графику (рисунок 43). Исходная концентрация дБСА в каждом лиофилизированном образце составляла 10 мкМ, а концентрация дБСА после трех циклов промывки PBS составляла ~7 мкг/мл. Анализ микро ВСА показал значительное снижение адсорбции белка на поверхности НАФ-NOBF₄, покрытых дБСА, по сравнению с исходными НАФ-NOBF₄ при инкубации в двух разных средах для культивирования клеток (рисунок 44).

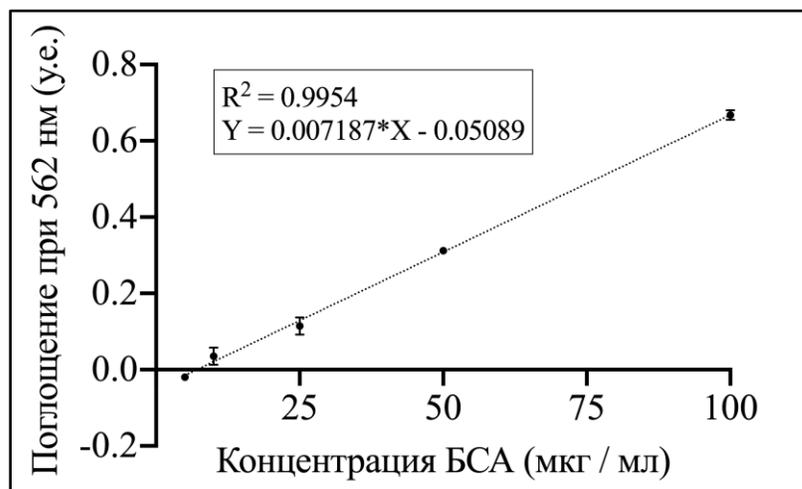


Рисунок 43. Калибровочный график для определения концентрации белка методом микро ВСА.

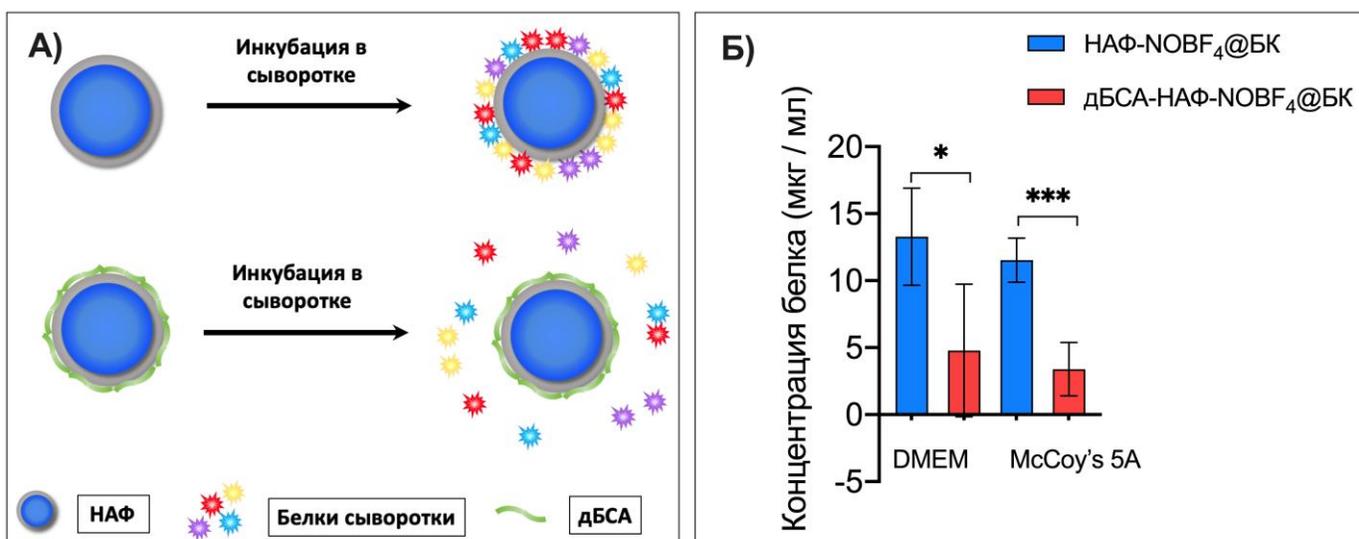


Рисунок 44. А) Схема процесса адсорбции белков на поверхности HAФ-NOBF₄ и дБСА-НАФ-NOBF₄; Б) Количественное определение жесткой БК с помощью анализа микро ВСА. Для дБСА-НАФ-NOBF₄ приведены значения концентрации белка за вычетом концентрации дБСА. Результаты анализировали с помощью непарного t-критерия (n = 5; *: p < 0.05, ***: p < 0.001).

3.8. Анализ цитотоксичности лиофилизированных дБСА-НАФ-NOBF₄

Во многих исследованиях было обнаружено, что цитотоксичность НАФ зависит от их поверхностных модификаций [115, 116]. Для исследования влияния покрытия дБСА на цитотоксичность НАФ-NOBF₄ использовали клетки аденокарциномы яичника человека SKOV-3. Эта клеточная линия была выбрана как возможная модель будущих исследования действия тераностических комплексов на основе НАФ. Предварительное исследование показало, что отсутствие в среде сыворотки (FBS) не оказывает статистически значимого влияния на жизнеспособность клеток (жизнеспособность клеток снизилась на 10%) (рисунок 45А). НАФ-NOBF₄ в концентрациях до 250 мкг/мл также не вызывали цитотоксического эффекта (рисунок 45Б).

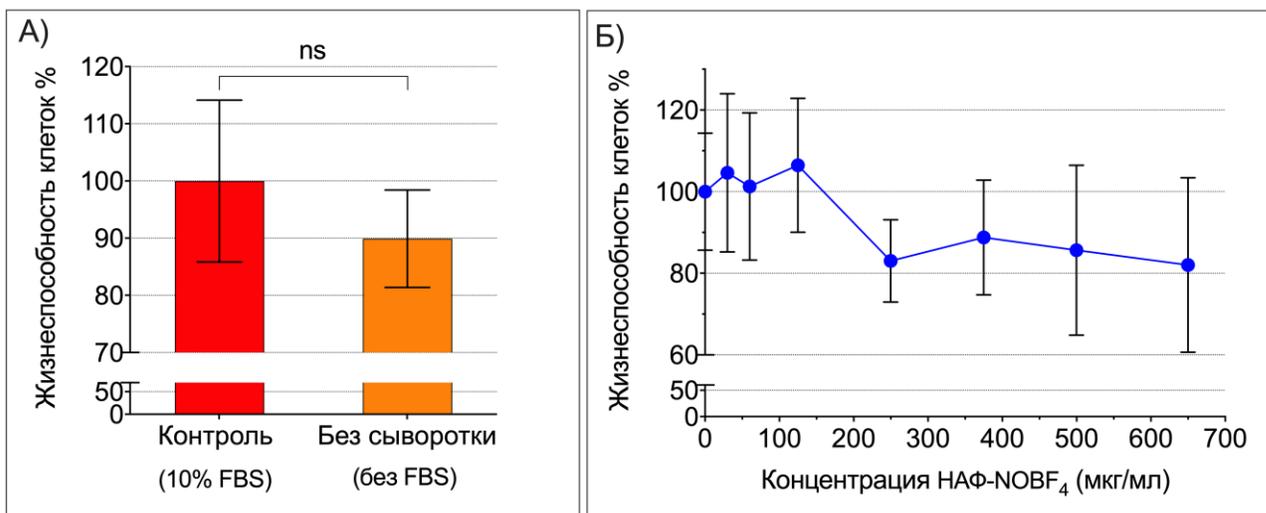


Рисунок 45. А) Жизнеспособность клеток SKOV-3 при отсутствии в среде сыворотки (FBS), анализ с помощью непарного t-критерия ($n = 30$; $p > 0,05$; ns: не значимо); Б) Жизнеспособность клеток SKOV-3 при разных концентрациях НАФ-NOBF₄ (0 – 650 мкг/мл), анализ с использованием критерия Даннета ($n=3$; $p > 0.05$).

Клетки инкубировали в бессывороточной среде McCoy's 5A в присутствии НАФ-NOBF₄, дБСА-НАФ-NOBF₄, НАФ-NOBF₄@БК и дБСА-НАФ-NOBF₄@БК в течение 24 ч. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью метода МТТ (рисунок 46). Наблюдалось некоторое увеличение жизнеспособности клеток в присутствии частиц с БК, которое может объясняться действием белков сыворотки, которые защищают клетки от стрессового воздействия бессывороточной среды и цитотоксического действия НЧ. В предыдущих исследованиях было показано, что покрытие БСА не оказывает значительного влияния на цитотоксичность НАФ [57]. Наблюдаемое небольшое снижение жизнеспособности клеток в присутствии дБСА-НАФ-NOBF₄ может объясняться усилением поглощения клетками частиц, покрытых дБСА. Исследования, проведенные в 2014-ом году, продемонстрировали, что дБСА усиливает поглощение наночастиц клетками, что может привести к повышению цитотоксичности [117], чем можно объяснить показанное некоторое повышение токсичности при увеличении концентрации дБСА-НАФ-NOBF₄. Наблюдалось небольшое снижение жизнеспособности клеток в присутствии наноконплексов в наибольших концентрациях. Сравнение средних значений жизнеспособности клеток по группам с использованием критерия Даннета не показали статистически значимого влияния наноконплексов и наночастиц всех типов на жизнеспособность клеток SKOV-3 при концентрациях от 0 до 200 мкг/мл.

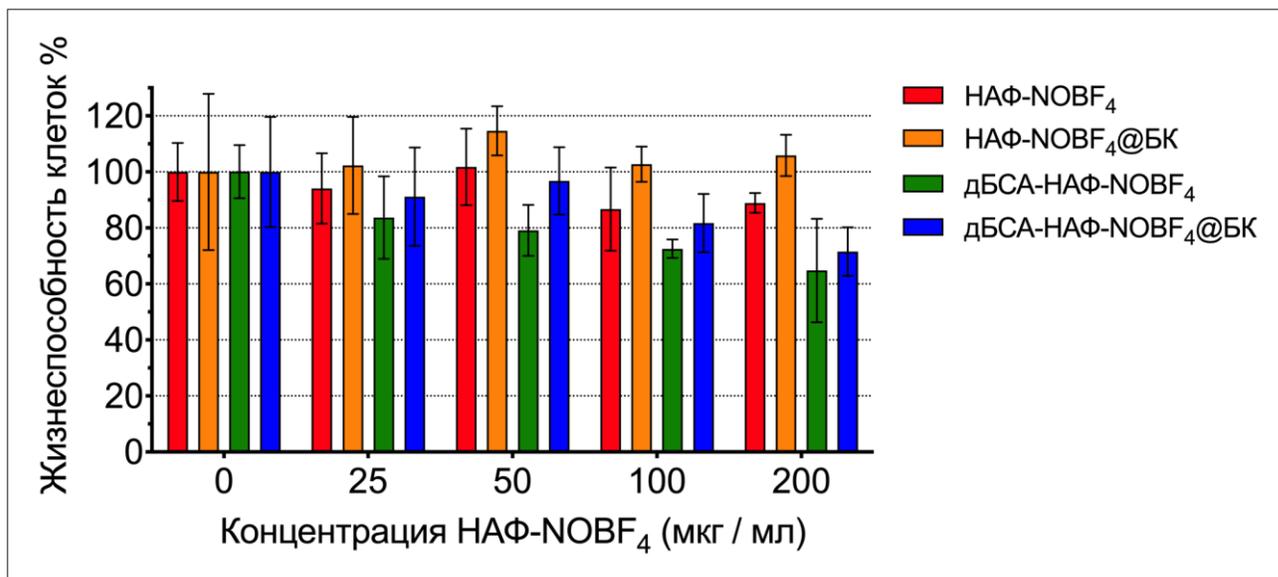


Рисунок 46. Зависимость жизнеспособности клеток SKOV-3 от концентрации наночастиц НАФ-NOBF₄ в среде в сравнении с наночастицами покрытыми альбумином, до и после формирования жесткой БК. Время инкубации 24 ч. Планки погрешностей представлены стандартным отклонением. Статистический анализ с использованием критерия Даннета (n=3; p >0.05).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние два десятилетия разработки в области нанобиомедицины прошли долгий путь, тем не менее множество задач остаются не решенными. Разработка терапевтических агентов на основе наноматериалов, в частности, НАФ, и создание эффективных тераностических наносистем являются актуальными потребностями современной онкологии.

В ходе настоящего исследования были получены гидрофильные НАФ, покрытые оболочкой из неорганического соединения NOBF_4 . Малый размер и положительный заряд молекул NOBF_4 позволяют получить монодисперсную суспензию НАФ, обладающую высоким ζ -потенциалом и коллоидной устойчивостью. Исследование формирования белковой короны из нативного и термически денатурированного БСА показало, что дБСА позволяет получить более монодисперсные суспензии комплексов. Анализ полученных данных с позиций биофизики позволяет интерпретировать их как результат взаимодействия большего количества отрицательно заряженных аминокислот в расплетённой цепи дБСА с положительно заряженной поверхностью НАФ- NOBF_4 , а также взаимным притяжением гидрофобных участков аминокислотной цепи молекул дБСА, оказавшихся доступными после потери третичной и вторичной структуры белка. Результатом этого может быть образование более тонкой и стабильной белковой короны вокруг НАФ по сравнению с нативным БСА. Существующие биофизические модели, рассматривающие аффинность белка к поверхности наночастиц, подтверждают полученные результаты. Добавление этапа лиофилизации в процесс формирования белковой короны способствует ещё большему уплотнению слоя дБСА за счет удаления молекул воды, что способствует сохранению размера и

коллоидной стабильности комплексов при последующей солюбилизации и снижает нежелательную адсорбцию белков, содержащихся в среде. Результаты настоящего исследования вносят вклад в развитие подходов к получению коллоидно-стабильных биосовместимых комплексов на основе НАФ, что способствует повышению эффективности создаваемых на их основе тераностических агентов.

ВЫВОДЫ

1. Исследовано формирование белковой короны из бычьего сывороточного альбумина (БСА) вокруг положительно заряженных НАФ- NOBF_4 ; показано, что белковая корона из термически денатурированного БСА (дБСА) обеспечивает лучшую дисперсность коллоидов по сравнению с нативным БСА; показано, что оптимальными концентрациями БСА и дБСА для образования стабильной белковой короны вокруг НАФ- NOBF_4 являются концентрации 100 мкМ и 10 мкМ, соответственно.
2. Добавление этапа лиофилизации в процесс формирования белковой короны из дБСА на поверхности НАФ- NOBF_4 позволяет получать комплексы, сохраняющие стабильность при их последующей солюбилизации в присутствии белков сыворотки.
3. Наличие исходно сформированной белковой короны из дБСА на поверхности НАФ- NOBF_4 препятствует адсорбции белков, находящихся в среде, позволяет сохранить размер и коллоидную устойчивость комплексов, что потенциально увеличивает их эффективность как таргетных агентов.
4. НАФ- NOBF_4 , покрытые стабильной белковой короной из дБСА, обладают низкой цитотоксичностью что делает возможным их использование для создания визуализирующих агентов и систем доставки.

ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. Fan, W. On the Latest Three-Stage Development of Nanomedicines based on Upconversion Nanoparticles / W. Fan, W. Bu, J. Shi // *Advanced Materials*. – 2016. – Vol. 28, N. 21. – P. 3987-4011.
2. Wang, F. Direct Evidence of a Surface Quenching Effect on Size-Dependent Luminescence of Upconversion Nanoparticles / F. Wang, J. Wang, X. Liu // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2010. – Vol. 49, N. 41. – P. 7456-7460.
3. Zheng, X. High-Contrast Visualization of Upconversion Luminescence in Mice Using Time-Gating Approach / X. Zheng, X. Zhu, Y. Lu, J. Zhao, W. Feng, G. Jia, F. Wang, F. Li, D. Jin // *Analytical Chemistry*. – 2016. – Vol. 88, N. 7. – P. 3449-3454.
4. Dong, A. A Generalized Ligand-Exchange Strategy Enabling Sequential Surface Functionalization of Colloidal Nanocrystals / A. Dong, X. Ye, J. Chen, Y. Kang, T. Gordon, J. M. Kikkawa, C. B. Murray // *Journal of the American Chemical Society*. – 2011. – Vol. 133, N. 4. – P. 998-1006.
5. Cedervall, T. Understanding the nanoparticle-protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles / T. Cedervall, I. Lynch, S. Lindman, T. Berggard, E. Thulin, H. Nilsson, K. A. Dawson, S. Linse // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2007. – Vol. 104, N. 7. – P. 2050-2055.
6. Dominguez-Medina, S. Adsorption and Unfolding of a Single Protein Triggers Nanoparticle Aggregation / S. Dominguez-Medina, L. Kisley, L. J. Tauzin, A. Hoggard, B. Shuang, A. S. Indrasekara, S. Chen, L. Y. Wang, P. J. Derry, A. Liopo, E. R. Zubarev, C. F. Landes, S. Link // *ACS Nano*. – 2016. – Vol. 10, N. 2. – P. 2103-2112.

7. Nguyen, V. H. Protein corona: a new approach for nanomedicine design / V. H. Nguyen, B. J. Lee // *International Journal of Nanomedicine*. – 2017. – Vol. 12. – P. 3137-3151.
8. Safi, M. The effects of aggregation and protein corona on the cellular internalization of iron oxide nanoparticles / M. Safi, J. Courtois, M. Seigneuret, H. Conjeaud, J.-F. Berret // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32, N. 35. – P. 9353-9363.
9. Loureiro, A. Albumin-Based Nanodevices as Drug Carriers / A. Loureiro, N. G. Azoia, A. C. Gomes, A. Cavaco-Paulo // *Current Pharmaceutical Design*. – 2016. – Vol. 22, N. 10. – P. 1371-1390.
10. Digiacomio, L. An apolipoprotein-enriched biomolecular corona switches the cellular uptake mechanism and trafficking pathway of lipid nanoparticles / L. Digiacomio, F. Cardarelli, D. Pozzi, S. Palchetti, M. A. Digan, E. Gratton, A. L. Capriotti, M. Mahmoudi, G. Caracciolo // *Nanoscale*. – 2017. – Vol. 9, N. 44. – P. 17254-17262.
11. Suk, J. S. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery / J. S. Suk, Q. Xu, N. Kim, J. Hanes, L. M. Ensign // *Advanced drug delivery reviews*. – 2016. – Vol. 99, N. Pt A. – P. 28-51.
12. An, F.F. Strategies for Preparing Albumin-based Nanoparticles for Multifunctional Bioimaging and Drug Delivery / F. F. An, X. H. Zhang // *Theranostics*. – 2017. – Vol. 7, N. 15. – P. 3667-3689.
13. Freitas, R. A. What is nanomedicine? / R. A. Freitas // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. – 2005. – Vol. 1, N. 1. – P. 2-9.
14. Karimi, M. Albumin nanostructures as advanced drug delivery systems / M. Karimi, S. Bahrami, S. B. Ravari, P. S. Zangabad, H. Mirshekari, M. Bozorgomid, S. Shahreza, M. Sori, M. R. Hamblin // *Expert opinion on drug delivery*. – 2016. – Vol. 13, N. 11. – P. 1609-1623.

15. Farokhzad, O. C. Impact of nanotechnology on drug delivery / O. C. Farokhzad, R. Langer // ACS Nano. – 2009. – Vol. 3, N. 1. – P. 16-20.
16. Chrastina, A. Overcoming in vivo barriers to targeted nanodelivery / A. Chrastina, K. A. Massey, J. E. Schnitzer // Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology. – 2011. – Vol. 3, N. 4. – P. 421-437.
17. Aires, A. BSA-coated magnetic nanoparticles for improved therapeutic properties / A. Aires, S. M. Ocampo, D. Cabrera, L. Cueva, G. Salas, F. J. Teran, A. L. Cortajarena // Journal of Materials Chemistry B. – 2015. – Vol. 3, N. 30. – P. 6239-6247.
18. Funkhouser, J. Reinventing pharma: The theranostic revolution / J. Funkhouser // Current Drug Discovery. – 2002. Vol. 2. – P. 17-19.
19. Jeelani, S. Theranostics: A treasured tailor for tomorrow / S. Jeelani, R. C. Jagat Reddy, T. Maheswaran, G. S. Asokan, A. Dany, B. Anand // Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences. – 2014. – Vol. 6, N. SUPPL. 1. – P. S6-8.
20. Chen, G. Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy / G. Chen, I. Roy, C. Yang, P. N. Prasad // Chemical Reviews. – 2016. – Vol. 116, N. 5. – P. 2826-2885.
21. Zhang, P. Recent progress in light-triggered nanotheranostics for cancer treatment / P. Zhang, C. Hu, W. Ran, J. Meng, Q. Yin, Y. Li // Theranostics. – 2016. – Vol. 6, N. 7. – P. 948-968.
22. Chen, G. Upconversion nanoparticles: Design, nanochemistry, and applications in Theranostics / G. Chen, H. Qiu, P. N. Prasad, X. Chen // Chemical Reviews. – 2014. – Vol. 114, N. 10. – P. 5161-5214.
23. Wang, M. Upconversion nanoparticles: Synthesis, surface modification and biological applications / M. Wang, G. Abbineni, A. Clevenger, C. Mao, S. Xu // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. – 2011. – Vol. 7, N. 6. – P. 710-729.

24. Raman, C. V. The negative absorption of radiation / C. V. Raman, K. S. Krishnan // Nature. – 1928. – Vol. 122, N. 3062. – P. 12-13.
25. Stokes, G.G. XXX. On the change of refrangibility of light / Stokes G.G. XXX. // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. – 1852. – Vol. 142. – P. 463-562.
26. Zhu, X. Anti-Stokes shift luminescent materials for bio-applications / X. Zhu, Q. Su, W. Feng, F. Li // Chemical Society Reviews. – 2017. – Vol. 46, N. 4. – P. 1025-1039.
27. Bloembergen, N. Solid state infrared quantum counters / N. Bloembergen // Physical Review Letters. – 1959. – Vol. 2, N. 3. – P. 84-85.
28. Auzel, F. Upconversion and Anti-Stokes Processes with f and d Ions in Solids / F. Auzel // Chemical Reviews. – 2004. – Vol. 104, N. 1. – P. 139-173.
29. Haase, M. Upconverting Nanoparticles / M. Haase, H. Schäfer // Angewandte Chemie International Edition. – 2011. – Vol. 50, N. 26. – P. 5808-5829.
30. Auzel, F. Materials and Devices Using Double-Pumped Phosphors with Energy Transfer / F. Auzel // Proceedings of the IEEE. – 1973. – Vol. 61, N. 6. – P. 758-786.
31. Menyuk, N. NaYF₄: Yb,Er - An efficient upconversion phosphor / N. Menyuk, K. Dwight, J. W. Pierce // Applied Physics Letters. – 1972. – Vol. 21, N. 4. – P. 159-161.
32. Звягин, А.В. Применение фотолюминесцентных наноматериалов и лазерных технологий для оптической визуализации биологических систем: дисс. на соискание ученой степени докт. физ.-мат. наук.: 03.01.02 – Саратов, 2015. – 198 С. - Режим доступа: <https://www.sgu.ru/sites/default/files/dissertation/2015/06/17/dissertaciyaZvyagin5iyun2015.pdf>

33. Hehlen, M. P. Dynamics of infrared-to-visible upconversion in $\text{Cs}_3\text{Lu}_2\text{Br}_9:1\%\text{Er}^{3+}$ / M. P. Hehlen, G. Frei, H. U. Güdel // *Physical Review B*. – 1994. – Vol. 50, N. 22. – P. 16264-16273.
34. Joubert, M. F. Photon avalanche upconversion in rare earth laser materials / M. F. Joubert // *Optical Materials*. – 1999. – Vol. 11, N. 2-3. – P. 181-203.
35. Chivian, J. S. The photon avalanche: A new phenomenon in Pr^{3+} -based infrared quantum counters / J. S. Chivian, W. E. Case, D. D. Eden // *Applied Physics Letters*. – 1979. – Vol. 35, N. 2. – P. 124-125.
36. Wang, F. Recent advances in the chemistry of lanthanide-doped upconversion nanocrystals / F. Wang, X. Liu // *Chemical Society Reviews*. – 2009. – Vol. 38, N. 4. – P. 976-989.
37. Zhou, J. Upconversion luminescent materials: Advances and applications / J. Zhou, Q. Liu, W. Feng, Y. Sun, F. Li // *Chemical Reviews*. – 2015. – Vol. 115, N. 1. – P. 395-465.
38. Xue, M. Highly Enhanced Cooperative Upconversion Luminescence through Energy Transfer Optimization and Quenching Protection / M. Xue, X. Zhu, X. Qiu, Y. Gu, W. Feng, F. Li // *ACS Applied Materials and Interfaces*. – 2016. – Vol. 8, N. 28. – P. 17894-17901.
39. Page, R. H. Upconversion-pumped luminescence efficiency of rare-earth-doped hosts sensitized with trivalent ytterbium / R. H. Page, K. I. Schaffers, P. A. Waide, J. B. Tassano, S. A. Payne, W. F. Krupke, W. K. Bischel // *Journal of the Optical Society of America B*. – 1998. – Vol. 15, N. 3. – P. 996.
40. Vetrone, F. Near-infrared-to-blue upconversion in colloidal $\text{BaYF}_5:\text{Tm}^{3+}$, Yb^{3+} nanocrystals / F. Vetrone, V. Mahalingam, J. A. Capobianco // *Chemistry of Materials*. – 2009. – Vol. 21, N. 9. – P. 1847-1851.

41. Thoma, R. E. The Sodium Fluoride-Lanthanide Trifluoride Systems / R. E. Thoma, H. Insley, G.M. Hebert // *Inorganic Chemistry*. – 1966. – Vol. 5, N. 7. – P. 1222-1229.
42. Mai, H. X. High-quality sodium rare-earth fluoride nanocrystals: Controlled synthesis and optical properties / H. X. Mai, Y. W. Zhang, R. Si, Z. G. Yan, L. D. Sun, L. P. You, C. H. Yan // *Journal of the American Chemical Society*. – 2006. – Vol. 128, N. 19. – P. 6426-6436.
43. Peng, X. Epitaxial growth of highly luminescent CdSe/CdS core/shell nanocrystals with photostability and electronic accessibility / X. Peng, M. C. Schlamp, A. V. Kadavanich, A. P. Alivisatos // *Journal of the American Chemical Society*. – 1997. – Vol. 119, N. 30. – P. 7019-7029.
44. Chen, G. (α -NaYbF₄:Tm³⁺)/CaF₂ core/shell nanoparticles with efficient near-infrared to near-infrared upconversion for high-contrast deep tissue bioimaging / G. Chen, J. Shen, T. Y. Ohulchansky, N. J. Patel, A. Kutikov, Z. Li, J. Song, R. K. Pandey, H. Agren, P. N. Prasad, G. Han // *ACS Nano*. – 2012. – Vol. 6, N. 9. – P. 8280-8287.
45. Zhou, J. Upconversion nanophosphors for small-animal imaging / J. Zhou, Z. Liu, F. Li // *Chemical Society Reviews*. – 2012. – Vol. 41, N. 3. – P. 1323-1349.
46. Li, X. Lab on upconversion nanoparticles: Optical properties and applications engineering via designed nanostructure / X. Li, F. Zhang, D. Zhao // *Chemical Society Reviews*. – 2015. – Vol. 44, N. 6. – P. 1346-1378.
47. Chatterjee, D. K. Upconversion fluorescence imaging of cells and small animals using lanthanide doped nanocrystals / D. K. Chatterjee, A. J. Rufaihah, Y. Zhang // *Biomaterials*. – 2008. – Vol. 29, N. 7. – P. 937-943.
48. Song, Z. Background free imaging of upconversion nanoparticle distribution in human skin / Z. Song, Y. G. Anissimov, J. Zhao, A. V. Nechaev, A.

Nadort, D. Jin, T. W. Prow, M. S. Roberts, A. V. Zvyagin // *Journal of Biomedical Optics*. – 2012. – Vol. 18, N. 6. – P. 061215.

49. Wang, C. Near-infrared light induced in vivo photodynamic therapy of cancer based on upconversion nanoparticles / C. Wang, H. Tao, L. Cheng, Z. Liu // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32, N. 26. – P. 6145-6154.

50. Xu, J. T. Highly emissive dye-sensitized upconversion nanostructure for dual-photosensitizer photodynamic therapy and bioimaging / J. T. Xu, P. P. Yang, M. D. Sun, H. T. Bi, B. Liu, Y. Dan, S. L. Gai, F. He, J. Lin // *ACS Nano*. – 2017. – Vol. 11, N. 4. – P. 4133–4144.

51. Achatz, D. E. Luminescent sensing of oxygen using a quenchable probe and upconverting nanoparticles / D. E. Achatz, R. J. Meier, L. H. Fischer, O. S. Wolfbeis // *Angew Chem Int Ed Engl*. – 2011. – Vol. 50, N. 1. – P. 260-3.

52. Chen, G. Light upconverting core–shell nanostructures: nanophotonic control for emerging applications / G. Chen, H. Agren, T. Y. Ohulchanskyy, P. N. Prasad // *Chemical Society Reviews*. – 2015. – Vol. 44, N. 6. – P. 1680-1713.

53. Sedlmeier, A. Photon upconverting nanoparticles for luminescent sensing of temperature / A. Sedlmeier, D. E. Achatz, L. H. Fischer, H. H. Gorris, O. S. Wolfbeis // *Nanoscale*. – 2012. – Vol. 4, N. 22. – P. 7090-7096.

54. Kang, D. Lanthanide-Doped Upconversion Nanomaterials: Recent Advances and Applications / D. Kang, E. Jeon, S. Kim, J. Lee // *BioChip Journal*. – 2020. – Vol. 14, N. 1. – P. 124–135.

55. Shen, J. Lanthanide-doped upconverting luminescent nanoparticle platforms for optical imaging-guided drug delivery and therapy / J. Shen, L. Zhao, G. Han // *Adv Drug Deliv Rev*. – 2013. – Vol. 65, N. 5. – P. 744-55.

56. Chen, Q. Protein modified upconversion nanoparticles for imaging-guided combined photothermal and photodynamic therapy / Q. Chen, C. Wang, L. Cheng, W. He, Z. Cheng, Z. Liu // *Biomaterials*. – 2014. – Vol. 35, N. 9. – P. 2915-23.

57. Sabri, T. Dual Activity of Rose Bengal Functionalized to Albumin-Coated Lanthanide-Doped Upconverting Nanoparticles: Targeting and Photodynamic Therapy / T. Sabri, P. D. Pawelek, J. A. Capobianco // ACS Appl Mater Interfaces. – 2018. – Vol. 10, N. 32. – P. 26947-26953.
58. Bangham, A. D. The charged groups at the interface of some blood cells / A. D. Bangham, B. A. Pethnica, G. V. Seaman // The Biochemical journal. – 1958. – Vol. 69, N. 1. – P. 12-19.
59. Vroman, L. Effect of adsorbed proteins on the wettability of hydrophilic and hydrophobic solids / L. Vroman // Nature. – 1962. – Vol. 196, N. 4853. – P. 476-477.
60. Ke, P. C. A Decade of the Protein Corona / P. C. Ke, S. Lin, W. J. Parak, T. P. Davis, F. Caruso // ACS Nano. – 2017. – Vol. 11, N. 12. – P. 11773-11776.
61. Barua, S. Challenges associated with penetration of nanoparticles across cell and tissue barriers: A review of current status and future prospects / S. Barua, S. Mitragotri // Nano Today. – 2014. – Vol. 9, N. 2. – P. 223-243.
62. Dean, L. Blood and the cells it contains. / Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2005. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2263/>
63. Hadjidemetriou, M. Nanomedicine: Evolution of the nanoparticle corona / M. Hadjidemetriou, K. Kostarelos // Nature Nanotechnology. – 2017. – Vol. 12, N. 4. – P. 288-290.
64. Walkey, C. D. Understanding and controlling the interaction of nanomaterials with proteins in a physiological environment / C. D. Walkey, W. C. W. Chan // Chemical Society Reviews. – 2012. – Vol. 41, N. 7. – P. 2780-2799.
65. Lundqvist, M. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts / M. Lundqvist, J. Stigler, G. Elia, I. Lynch, T. Cedervall, K. A. Dawson // Proceedings of the National

Academy of Sciences of the United States of America. – 2008. – Vol. 105, N. 38. – P. 14265-14270.

66. Rahman M., Laurent S., Tawil N., Yahia L., Mahmoudi M. (2013) Nanoparticle and Protein Corona. In: Protein-Nanoparticle Interactions. Springer Series in Biophysics, vol 15. Springer, Berlin, Heidelberg – 2013. 94 P.

67. Kononenko, V. Nanoparticle interaction with the immune system / V. Kononenko, M. Narat, D. Drobne // Arhiv za Higijenu Rada i Toksikologiju. – 2015. – Vol. 66, N. 2. – P. 97-108.

68. Zolnik, B. S. Minireview: Nanoparticles and the immune system / B. S. Zolnik, A Gonzalez-Fernandez., N. Sadrieh, M. A. Dobrovolskaia // Endocrinology. – 2010. – Vol. 151, N. 2. – P. 458-465.

69. Allen, T. M. Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo / T. M. Allen, C. Hansen, F. Martin, C. Redemann, A. Yau-Young // BBA - Biomembranes. – 1991. – Vol. 1066, N. 1. – P. 29-36.

70. Matsumura, Y. General mechanism of intratumor accumulation of macromolecules: Advantage of macromolecular therapeutics / Y. Matsumura, T. Oda, H. Maeda // Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy. – 1987. – Vol. 14, N. 3 II. – P. 821-829.

71. Almeida, J. P. M. In vivo biodistribution of nanoparticles / J. P. M. Almeida, A. L. Chen, A. Foster, R. Drezek // Nanomedicine. – 2011. – Vol. 6, N. 5. – P. 815-835.

72. Hadjidemetriou, M. In Vivo Biomolecule Corona around Blood-Circulating, Clinically Used and Antibody-Targeted Lipid Bilayer Nanoscale Vesicles / M. Hadjidemetriou, Z. Al-Ahmady, M. Mazza, R. F. Collins, K. Dawson, K. Kostarelos // ACS Nano. – 2015. – Vol. 9, N. 8. – P. 8142-8156.

73. Jain, R. K. Transport of Molecules in the Tumor Interstitium: A Review / R. K. Jain // *Cancer Research*. – 1987. – Vol. 47, N. 12. – P. 3039-51.
74. Sindhwani, S. The entry of nanoparticles into solid tumours / S. Sindhwani, A. M. Syed, J. Ngai, B. R. Kingston, L. Maiorino, J. Rothschild, P. MacMillan, Y. Zhang, N. U. Rajesh, T. Hoang, J. L. Y. Wu, S. Wilhelm, A. Zilman, S. Gadde, A. Sulaiman, B. Ouyang, Z. Lin, L. Wang, M. Egeblad, W. C. W. Chan // *Nat Mater*. – 2020. – Vol. 19, N. 5. – P. 566-575.
75. Галагудза, М. М. Направленная доставка лекарственных препаратов - итоги последних лет и перспективы / М. М. Галагудза, Д. В. Королев, Д. Л. Сонин, И. В. Александров, Г. В. Папаян, Е. В. Шляхто, В. Н. Постнов // *Нанотехнологии. Экология. Производство*. – 2010. – N. 1. – С. 132-138.
76. Галагудза, М. М. Пассивная направленная доставка лекарственных препаратов в ишемизированный миокард с использованием наночастиц кремнезема / М. М. Галагудза, Д. В. Королев, Д. Л. Сонин, И. В. Александров, В. Н. Постнов, Г. В. Папаян, Е. В. Шляхто // *Российские нанотехнологии*. – 2010. – Т. 5, N. 11-12. – С. 125-130.
77. Постнов, В.Н. Наноразмерные носители для доставки лекарственных препаратов / В. Н. Постнов, Е. Б. Наумышева, Д. В. Королев, М. М. Галагудза // *Биотехносфера*. – 2013. – Т. 6, N. 30. – С. 16-27.
78. Fang, J. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect / J. Fang, H. Nakamura, H. Maeda // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2011. – Vol. 63, N. 3. – P. 136-151.
79. Adjei, I. M. Nanoparticles: Cellular uptake and cytotoxicity / I. M. Adjei, B. Sharma, V. Labhasetwar // *Advances in Experimental Medicine and Biology*. – 2014. – Vol. 811. – P. 74-91.

80. Buono, C. Fluorescent pegylated nanoparticles demonstrate fluid-phase pinocytosis by macrophages in mouse atherosclerotic lesions / C. Buono, J. J. Anzinger, M. Amar, H. S. Kruth // *Journal of Clinical Investigation*. – 2009. – Vol. 119, N. 5. – P. 1373-1381.
81. Ehrlich, M. Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits / M. Ehrlich, W. Boll, A. Van Oijen, R. Hariharan, K. Chandran, M. L. Nibert, T. Kirchhausen // *Cell*. – 2004. – Vol. 118, N. 5. – P. 591-605.
82. Sorkin, A. Cargo recognition during clathrin-mediated endocytosis: A team effort / A. Sorkin // *Current Opinion in Cell Biology*. – 2004. – Vol. 16, N. 4. – P. 392-399.
83. Nabi, I. R. Caveolae/raft-dependent endocytosis / I. R. Nabi, P. U. Le // *Journal of Cell Biology*. – 2003. – Vol. 161, N. 4. – P. 673-677.
84. Stan, R. V. Structure and function of endothelial caveolae / R. V. Stan // *Microscopy Research and Technique*. – 2002. – Vol. 57, N. 5. – P. 350-364.
85. Gustafson, H. H. Nanoparticle Uptake: The Phagocyte Problem / H. H. Gustafson, D. Holt-Casper, D. W. Grainger, H. Ghandehari // *Nano Today*. – 2015. – Vol. 10, N. 4. – P. 487-510.
86. Zhao Y., Sultan D., Liu Y. 2 - Biodistribution, Excretion, and Toxicity of Nanoparticles. In: *Theranostic Bionanomaterials*, W. Cui and Xin Zhao (Eds.) – 2019, Elsevier, Amsterdam. 504 P.
87. Kratz, F. Albumin as a drug carrier: Design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles / F. Kratz // *Journal of Controlled Release*. – 2008. – Vol. 132, N. 3. – P. 171-183.
88. Roche, M. The antioxidant properties of serum albumin / M. Roche, P. Rondeau, N. R. Singh, E. Tarnus, E. Bourdon // *FEBS Letters*. – 2008. – Vol. 582, N. 13. – P. 1783-1787.

89. Park, J. H. Temperature-Induced Denaturation of BSA Protein Molecules for Improved Surface Passivation Coatings / J. H. Park, J. A. Jackman, A. R. Ferhan, G. J. Ma, B. K. Yoon, N. J. Cho // *ACS Applied Materials & Interfaces*. – 2018. – Vol. 10, N. 38. – P. 32047-32057.
90. Majorek, K. A. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins / K. A. Majorek, P. J. Porebski, A. Dayal, M. D. Zimmerman, K. Jablonska, A. J. Stewart, M. Chruszcz, W. Minor // *Molecular immunology*. – 2012. – Vol. 52, N. 3-4. – P. 174-82.
91. Babcock, J. J. Bovine serum albumin oligomers in the E- and B-forms at low protein concentration and ionic strength / J. J. Babcock, L. Brancalion // *International Journal of Biological Macromolecules*. – 2013. – Vol. 53. – P. 42-53.
92. Tong, R. The formulation of aptamer-coated paclitaxel–polylactide nanoconjugates and their targeting to cancer cells / R. Tong, L. Yala, T. M. Fan, J. Cheng // *Biomaterials*. – 2010. – Vol. 31, N. 11. – P. 3043-3053.
93. Elzoghby, A. O. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems / A.O. Elzoghby, W. M. Samy, N.A. Elgindy // *Journal of Controlled Release*. – 2012. – Vol. 157, N. 2. – P. 168-182.
94. Elsadek, B. Impact of albumin on drug delivery — New applications on the horizon / B. Elsadek, F. Kratz // *Journal of Controlled Release*. – 2012. – Vol. 157, N. 1. – P. 4-28.
95. Mariam, J. Albumin corona on nanoparticles – a strategic approach in drug delivery / J. Mariam, S. Sivakami, P. M. Dongre // *Drug Delivery*. – 2015. – Vol. 23, N. 8. – P. 1-9.
96. Jung, S. H. Increased stability in plasma and enhanced cellular uptake of thermally denatured albumin-coated liposomes / S. H. Jung, S. K. Kim, S. H. Jung, E. H. Kim, S. H. Cho, K. S. Jeong, H. Seong, B.C. Shin // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2010. – Vol. 76, N. 2. – P. 434-440.

97. Chen, Q. Albumin Carriers for Cancer Theranostics: A Conventional Platform with New Promise / Q. Chen, Z. Liu // *Advanced Materials*. – 2016. – Vol. 28, N. 47. – P. 10557-10566.
98. Mai, H. X. Highly efficient multicolor up-conversion emissions and their mechanisms of monodisperse NaYF₄:Yb,Er core and core/shell-structured nanocrystals / H. X. Mai, Y. W. Zhang, L. D. Sun, C. H. Yan // *Journal of Physical Chemistry C*. – 2007. – Vol. 111, N. 37. – P. 13721-13729.
99. Гурьев, Е. Л. Мультифункциональные комплексы на основе наночастиц с антистоксовой фотолюминесценцией для тераностики HER2 положительных опухолей / Е. Л. Гурьев, А. С. Смышляева, Н. Ю. Шилягина, С. Шанвар, А. Б. Костюк, А. А. Шульга, Е. В. Коновалова, А. В. Звягин, С. М. Деев, Р. В. Петров // *Доклады Российской академии наук. – Науки о жизни*. 2020. – Т. 491, N. 1. – С. 137-140.
100. Guryev, E. L. UCNP-based Photoluminescent Nanomedicines for Targeted Imaging and Theranostics of Cancer / E. L. Guryev, A. S. Smyshlyayeva, N. Y. Shilyagina, E. A. Sokolova, S. Shanwar, A. B. Kostyuk, A. V. Lyubeshkin, A. A. Schulga, E. V. Konovalova, Q. Lin, I. Roy, I. V. Balalaeva, S. M. Deyev, A. V. Zvyagin // *Molecules*. – 2020. – Vol. 25, N. 18. – P. 4302.
101. Han, G. Coated Up-Conversion Nanoparticles / G. Han, J. Shen // *World Intellectual Property Organization I International Bureau*. – 2013. – P. 73.
102. Liang, L. Deep-penetrating photodynamic therapy with KillerRed mediated by upconversion nanoparticles / L. Liang, Y. Lu, R. Zhang, A. Care, T. A. Ortega, S. M. Deyev, Y. Qian, A. V. Zvyagin // *Acta Biomaterialia*. – 2017. – Vol. 51. – P. 461–470.
103. Фрешни, Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство / Р. Я. Фрешни // М.: БИНОМ. Лаборатория знаний. – 2010. – 691 с.

104. Generalova, A. N. Multicomponent nanocrystals with anti-Stokes luminescence as contrast agents for modern imaging techniques / A. N. Generalova, B. N. Chichkov, E.V. Khaydukov // *Advances in Colloid and Interface Science*. – 2017. – Vol. 245. – P. 1–19.
105. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? / S. Bhattacharjee // *Journal of Controlled Release*. – 2016. – Vol. 235. – P. 337-351.
106. PubChem Compound Summary for CID 11137142, Nitrosonium tetrafluoroborate: National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information – 2004. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Nitrosonium-tetrafluoroborate>
107. Liang, L. Biofunctional Upconversion Nanoparticles for Cancer Theranostics / L. Liang // PhD Thesis – Sidney, 2016. Available from: <https://www.mq.edu.au/about/campus-services-and-facilities/library>
108. Kostyuk, A. Protein corona formation on polymer-coated nanoparticles / A. Kostyuk, L. Liang, R. Zhang, A. A. Tretyakov, A. V. Zvyagin // *Proceedings of the “Science of the Future” Conference, “Inconsult-K” LLC, Kazan*. – 2016. – P. 250-252.
109. Martin, L., Human albumin solutions in the critical patient / L. Martin // *IVECCS Proc*. – 2004. – P. 274-278.
110. Calatayud, M. P. The effect of surface charge of functionalized Fe₃O₄ nanoparticles on protein adsorption and cell uptake / M. P. Calatayud, B. Sanz, V. Raffa, C. Riggio, M. R. Ibarra, G. F. Goya // *Biomaterials*. – 2014. – Vol. 35, N. 24. – P. 6389-6399.
111. Bern, M. The role of albumin receptors in regulation of albumin homeostasis: Implications for drug delivery / M. Bern, K. M. K. Sand, J. Nilsen, I.

Sandlie, J. T. Andersen // *Journal of Controlled Release*. – 2015. – Vol. 10, N. 211. – P. 144-162.

112. Bakshi, M. S. Stabilization of PbS Nanocrystals by Bovine Serum Albumin in its Native and Denatured States / M. S. Bakshi, P. Thakur, G. Kaur, H. Kaur, T. S. Banipal, F. Possmayer, N. O. Petersen // *Advanced Functional Materials*. – 2009. – Vol. 19, N. 9. – P. 1451–1458.

113. Mirshafiee, V. Impact of protein pre-coating on the protein corona composition and nanoparticle cellular uptake / V. Mirshafiee, R. Kim, S. Park, M. Mahmoudi, M. L. Kraft // *Biomaterials*. – 2016. – Vol. 75. – P. 295-304.

114. Zhang, T. X. Concentration-dependent protein adsorption at the nano-bio interfaces of polymeric nanoparticles and serum proteins / T. X. Zhang, G. Y. Zhu, B. Y. Lu, C. L. Zhang, Q. Peng // *Nanomedicine*. – 2017. – Vol. 12, N. 22. – P. 2757-2769.

115. Jin, J. Polymer-coated $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ upconversion nanoparticles for charge-dependent cellular imaging / J. Jin, Y. J. Gu, C. W. Y. Man, J. Cheng, Z. Xu, Y. Zhang, H. Wang, V. H. Y. Lee, S. H. Cheng, W. T. Wong // *ACS Nano*. – 2011. – Vol. 5, N. 10. – P. 7838-7847.

116. Guller, A. E., Cytotoxicity and non-specific cellular uptake of bare and surface-modified upconversion nanoparticles in human skin cells / A. E. Guller, A. N. Generalova, E. V. Petersen, A. V. Nechaev, I. A. Trusova, N. N. Landyshev, A. Nadort, E. A. Grebenik, S. M. Deyev, A. B. Shekhter, A. V. Zvyagin // *Nano Research*. – 2015. – Vol. 8, N. 5. – P. 1546-1562.

117. Fleischer, C. C. Nanoparticle-cell interactions: molecular structure of the protein corona and cellular outcomes / C. C. Fleischer, C. K. Payne // *Acc Chem Res*. 2014. Vol. 47, N. 8. P. 2651-9.