

Сравнение систем доставки химиотерапевтического препарата доксорубицина с использованием электронно-микроскопических и гидродинамических методов

© Н.Н. Сударева,^{1,2} О.М. Суворова,¹ Е.Г. Коржикова-Влах,¹ И.И. Тарасенко,¹ К.А. Колбе,¹ Н.В. Смирнова,¹ Н.Н. Сапрыкина,¹ Д.Н. Суслов³

¹ Институт высокомолекулярных соединений РАН,
199004 Санкт-Петербург, Россия

² Первый Санкт-Петербургский медицинский университет им. И.П. Павлова,
197376 Санкт-Петербург, Россия

³ Российский научный центр радиологии и хирургических технологий,
197758 Санкт-Петербург, Россия
e-mail: nnsas@mail.ru

Поступило в Редакцию 28 декабря 2021 г.

В окончательной редакции 16 марта 2022 г.

Принято к публикации 1 апреля 2022 г.

Проведено сравнение структурных и функциональных характеристик различных систем доставки противоопухолевого препарата доксорубицина. Системы доставки одного типа — субмикронные пористые кальций карбонатные ядра, покрытые полианионом декстран сульфатом Na. Другие — наночастицы, сформированные на основе статистических амфифильных сополимеров аминокислот. Методами сканирующей и просвечивающей электронной микроскопии, а также динамического рассеяния света определены размеры обоих вариантов систем доставки и их электрокинетический потенциал поверхности. Оценку токсичности систем доставки, содержащих доксорубицин в диапазоне концентраций от 0 до 5 $\mu\text{g/ml}$, по отношению к опухолевым клеткам линии MCF7 определяли на основании измерения электрического импеданса микросенсоров в ячейке с клетками в присутствии систем доставки. Зависимости концентрации доксорубицина от времени в плазме крови крыс после интраперитонеального введения обоих вариантов систем доставки, полученные с использованием высокоэффективной жидкостной хроматографии, демонстрируют существенные различия в процессе поступления в кровь носителей разных размеров.

Ключевые слова: системы доставки, доксорубицин, сканирующая электронная микроскопия, просвечивающая электронная микроскопия, высокоэффективная жидкостная хроматография.

DOI: 10.21883/JTF.2022.07.52646.329-21

Введение

Онкологические заболевания — одна из главных причин смерти в мире. Скорость их роста такова, что они могут занять первое место по смертности, обогнав сердечно-сосудистые заболевания [1]. Используемые в настоящее время методы лечения рака (хирургия, радио- и химиотерапия, иммунотерапия, гормональная терапия) в последние десятилетия пополнились методом с использованием систем доставки (СД) лекарственных соединений. Доксорубицин (ДОХ) — мощный антрациклиновый антибиотик широкого спектра действия. В ряде стран монотерапия ДОХ рассматривается как химиотерапевтическая процедура первой очереди [2]. Действие ДОХ как ингибитора роста раковых клеток основано на разрушении ДНК за счет интеркаляции [3]. Высокая эффективность ДОХ сопровождается дозозависимой кардиотоксичностью, накоплением в печени и быстрым выведением из организма [4]. Использование систем доставки ДОХ уменьшает его негативное воздействие на организм, пролонгируя высвобождение, уменьшая

концентрацию в крови и, таким образом, уменьшая его кардиотоксичность (при сохранении общей дозы).

Разнообразие структур систем доставки ДОХ велико. Как носители ДОХ используют липосомы, мицеллы, наночастицы органической и неорганической природы и др. [5–7]. В онкологической практике используют одобренные в середине 90-х годов препараты Caelyx[®], Doxil[®], содержащие пегилированный липосомальный ДОХ и проявляющие пониженную кардиотоксичность. К сожалению, у этих препаратов обнаружена кожная и оральная токсичность [8].

В работах последних лет, в которых исследовано влияние ДОХ на подавление роста опухоли, модифицировали существующие СД противоопухолевых препаратов не только с целью уменьшить их кардиотоксичность, но и повысить их таргетность, т.е. целенаправленность действия. Для этого применяют функционализацию носителей. Для формирования многих СД ДОХ используют сложные методики и дорогостоящие реактивы. В настоящей работе использованы два типа СД: пористые ватериты карбоната кальция, допированные полианионом декстрансульфатом Na ($\text{CaCO}_3 + \text{DexS}$) и наночастицы,

сформированные на основе статистических амфифильных сополимеров аминокислот. Методики изготовления этих систем доставки [9,10] достаточно просты и экономичны.

Ватерит — единственная пористая структура из трех морфологических модификаций карбоната кальция CaCO_3 . В ватериты инкапсулируют помимо ДОХ [11–13] и другие соединения — низкомолекулярные лекарства [14–17]. Благодаря модулированию локального pH в слабокислотных средах опухолей ватериты обладают незначительной способностью ингибировать рост раковых клеток *in vivo* [18]. Карбонатные СД биодеградируемы. Например, CaCO_3 и $\text{CaCO}_3 + \text{DexS}$ полностью исчезают в мышечной ткани крыс за 2 и 4 недели соответственно [19].

Полимерные наночастицы из биодеградируемых полиаминокислот [10] используют в качестве систем доставки различных гидрофильных и гидрофобных лекарств [15,20].

Целью настоящей работы является выбор оптимальной структуры разработанных систем доставки доксорубина. Для этого было проведено сравнение структурных и функциональных характеристик систем доставки ДОХ по ряду параметров, определяемых при помощи различных физических методов.

1. Результаты и обсуждение

В настоящей работе было проведено сравнение двух типов систем доставки лекарственных соединений, а именно: пористых карбонатных ядер, допированных полианионом декстрансульфатом, $\text{CaCO}_3 + \text{DexS}$ (DCC) и полимерных мицеллоподобных наночастиц на основе статистического сополимера глутаминовой кислоты и фенилаланина P(Glu-co-Phe)4/1–(ANP).

Для того чтобы охарактеризовать СД, определить их характеристики: структурные (размеры и электрокинетический потенциал поверхности); функциональные (выживаемость раковых клеток после кондиционирования с СД+ДОХ и концентрацию высвободившегося в плазму крови ДОХ после интраперитонеального введения СД в тело лабораторного животного) были использованы разные физические методы: сканирующая и просвечивающая электронные микроскопии (СЭМ, ПЭМ), лазерное динамическое светорассеяние, анализ жизнедеятельности клеток в режиме реального времени с использованием клеточного анализатора (системы, основанной на использовании микроэлектронного биосенсора, оценивающего изменение импеданса в процессе жизнедеятельности клеток) и высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

1.1. Структурные характеристики систем доставки ДОХ

Размеры СД, обеспечивающие проникновение в различные области организма, определяли методами СЭМ

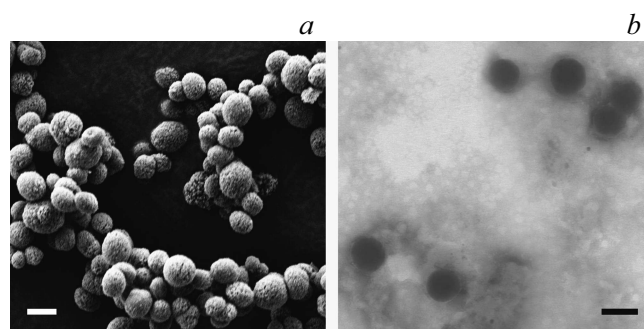


Рис. 1. Микрофотографии систем доставки. *a* — СЭМ изображение карбонатных частиц, допированных DexS (DCC); *b* — ПЭМ изображение наночастиц на основе сополимера P(Glu-co-Phe) (ANP). Маркеры: *a* — $2\ \mu\text{m}$, *b* — $100\ \text{nm}$.

(для субмикрочастиц $\text{CaCO}_3 + \text{DexS}$ размеры в диапазоне $0.6\text{--}2.5\ \mu\text{m}$) и ПЭМ (для наночастиц на основе полиаминокислот). Последние в сухом виде имели сферическую форму и размер около $100\ \text{nm}$. СЭМ и ПЭМ микрофотографии приведены на рис. 1.

Динамическое рассеяние света (ДРС) позволяет определить гидродинамические диаметры наночастиц, электрокинетический потенциал (ξ -потенциал) их поверхности, а также индекс полидисперсности (ИПД).

В таблице приведены основные характеристики систем доставки ДОХ. А именно состав и размеры $\text{CaCO}_3 + \text{DexS}$ субмикрочастиц, полученные на основании обработки их СЭМ изображений; состав и гидродинамические размеры полиаминокислотных наночастиц, определенные методами ПЭМ и ДРС, а также эффективность включения ДОХ в системы доставки разных структур. Здесь же приведены характеристики наночастиц на основе сополимера P(Glu-co-Phe) с включенным ДОХ.

Как видно из приведенных данных, размеры полиаминокислотных наночастиц, определенные методами ПЭМ и ДРС, существенно отличаются. Метод ДРС позволяет получать структурные характеристики: гидродинамический диаметр (D_H) и ИПД частиц в воде. Расхождение в размерах частиц в сухом состоянии и в воде связано с экспонированием гидрофильного фрагмента в водную фазу вследствие электростатического отталкивания одноименно заряженных групп. В использованной среде гидродинамический размер частиц составлял $230 \pm 30\ \text{nm}$, что превышает размер в сухом состоянии более чем в два раза.

Включение ДОХ в полиаминокислотные наночастицы изменяет их структуру. Полученные данные свидетельствуют о том, что загрузка ДОХ способствует компактизации наночастиц и в то же время увеличению ИПД. Уменьшение гидродинамического диаметра наночастиц может быть обусловлено увеличением гидрофобности ядра наночастицы за счет включения ДОХ и, как следствие, его компактизацией, а также частичной компенса-

Характеристики исследуемых систем доставки ДОХ

| Система доставки | Состав | Диаметр, μm | Метод | ξ -потенциал, mV | ИПД | Эффективность включения ДОХ, % |
|--|--|------------------------|-------|----------------------|------|--------------------------------|
| CaCO ₃ +DexS P(Glu-co-Phe) | CaCO ₃ /DexS = 4/1 Glu/Phe = 4/1 | 0.6–2.5 | СЭМ | -29.0 ± 0.9 | – | 98 ± 2 |
| | | 0.09 ± 0.01 | ПЭМ | -50.0 ± 0.2 | – | 91 ± 3 |
| P(Glu-co-Phe)/ДОХ | (Glu/Phe)/ДОХ = 1.0/0.9 | 0.23 ± 0.03 | ДРС | | 0.27 | |
| | | 0.15 ± 0.02 | | | 0.36 | – |

цией поверхностного заряда, снижающей расталкивание полимерных цепей в гидрофильной короне.

Отрицательный поверхностный потенциал обеих вариантов СД обусловил высокую эффективность включения ДОХ, чья молекула содержит протонированную аминогруппу $-\text{NH}_3^+$ -группу.

1.2. Функциональные характеристики систем доставки ДОХ

Прежде чем использовать исследуемые системы доставки ДОХ *in vivo* необходимо доказать отсутствие цитотоксичности самих носителей. Ранее на предмет отсутствия цитотоксичности были проконтролированы исследуемые в настоящей работе носители для ДОХ. Выживаемость клеток дермальных фибробластов и эпидермоидной карциномы человека (A431) в присутствии CaCO₃+DexS превышала 90% при концентрациях до 0.05 mg/ml [21]. Наночастицы на основе полиаминокислот практически нетоксичны по отношению к следующим клеткам: эмбриональных почек человека (НЕК 293), эмбриона мыши (NIH 3T3) и эпителия легких человека (BEAS 2B) в концентрациях до 0.5 mg/ml.

С помощью культур клеток линии MCF7 была определена эффективность угнетения роста опухолевых клеток системами доставки, содержащими различные количества ДОХ. Для контроля цитотоксичности использовали клеточный анализатор RTCA iCELLigence, позволяющий анализировать состояние клеточных культур MCF7 в динамике по изменению импеданса в результате контакта клеток с разными вариантами СД. В каждой лунке планшета Agilent, использующегося в системе, находится совокупность золотых встречно-штыревых электродов, которая позволяет измерять сопротивление, создаваемое клетками. Адгезия, распластывание и пролиферация клеток на поверхности электродов повышает сопротивление среды и регистрируется как клеточный индекс: отношение импеданса в конкретный момент времени к исходному значению импеданса.

Оценивали динамику пролиферации клеток MCF7 при их кондиционировании с носителями CaCO₃+DexS и полиаминокислотными наночастицами, как пустыми, так и содержащими различное количество ДОХ, по величине клеточного индекса на 4 сутки кондиционирования. В настоящей работе продемонстрировано практическое отсутствие токсичности носителей субмикроско-

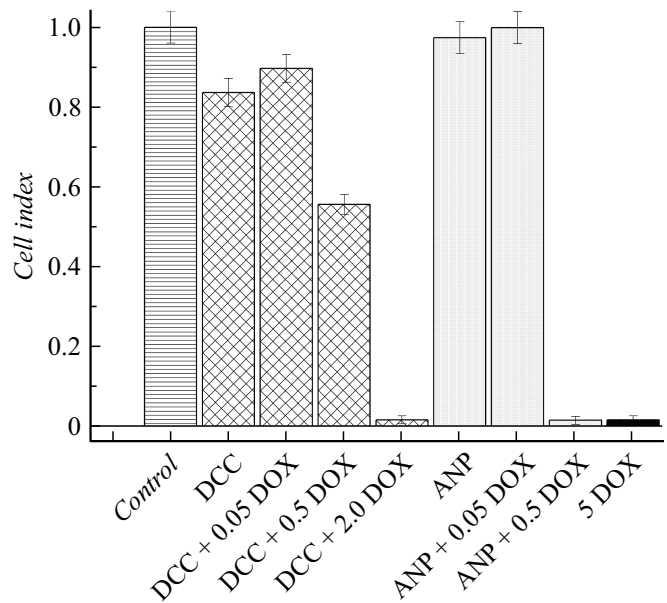


Рис. 2. Клеточный индекс линии MCF7 после 4-х суток кондиционирования с системами доставки ДОХ разной структуры: DCC — допированные карбонатные ядра CaCO₃+DexS, и ANP — полиаминокислотные наночастицы P(Glu-co-Phe) как пустые, так и с разным содержанием ДОХ от 0.05 до 5 $\mu\text{g/ml}$.

частиц допированных карбонатных ядер CaCO₃+DexS и полиаминокислотных наночастиц по отношению к клеткам MCF7. Незначительную противораковую активность карбонатных ядер наблюдали и ранее в работе [18]. Подавление роста опухолевых клеток MCF7 исследовали в диапазоне концентраций ДОХ в носителях от 0.05 до 2.0 $\mu\text{g/ml}$ в зависимости от структуры носителей и 5.0 $\mu\text{g/ml}$ чистого ДОХ (рис. 2). Для облегчения восприятия данных клеточный индекс клеток MCF7 без всяких добавок принимали за единицу.

Поскольку размеры наночастиц P(Glu-co-Phe) значительно меньше размеров допированных карбонатных ядер (см. таблицу), естественно, что они легче проникают в клетки, доставляя ДОХ непосредственно к ДНК для интеркаляции и прерывания роста клеток хозяина. В результате сходное угнетение роста клеток линии MCF7 наблюдали при введении 0.5 $\mu\text{g/ml}$ ДОХ при помощи носителей на основе полиаминокислот, 2 $\mu\text{g/ml}$ ДОХ при помощи носителей CaCO₃+DexS и при введении свободного ДОХ. В настоящей работе

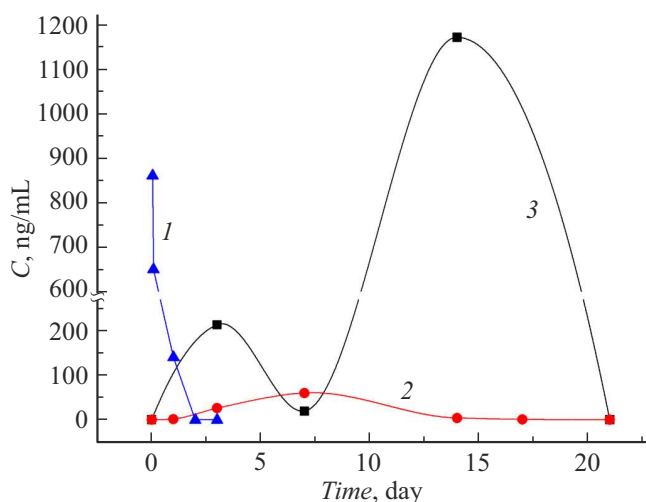


Рис. 3. Зависимость от времени концентрации ДОХ в плазме крови крыс после интраперитонеального введения 4 мг ДОХ: 1 — в свободном виде; в системах доставки: 2 — $\text{CaCO}_3 + \text{DexS}$, 3 — $\text{P}(\text{Glu-co-Phe})$. Погрешность — менее 10% от среднего значения концентрации.

сравнивали выживаемость клеток после четырех дней контакта с СД. Прибор позволяет детектировать изменение количества клеток в реальном времени, начиная с первого часа контакта. Целью введения СД в организм является пролонгирование высвобождения ДОХ, поэтому мы определяли проявление токсичности ДОХ, высвободившегося из СД разной структуры в достаточно удаленный временной период.

Концентрацию ДОХ в плазме крови крыс после интраперитонеального введения СД разной структуры, содержащих по 4 мг ДОХ, определяли методом ВЭЖХ. Различия в размерах СД сказываются на динамике их поступления в кровь и, следовательно, на концентрации ДОХ в плазме крови (рис. 3).

Показано, что обе СД пролонгируют пребывание ДОХ в плазме крыс до 2–3 недель, тогда как свободный ДОХ при аналогичном способе введения и дозе выводится из плазмы через 2 дня (рис. 3, кривая 1). Зависимость от времени концентраций ДОХ в плазме нано- и субмикроносителей (рис. 3, кривые 3 и 2 соответственно) сильно разнятся из-за различий в размерах. Повышение концентрации ДОХ в плазме в первые несколько дней после введения ANP обусловлено высвобождением молекул ДОХ с поверхности ANP. Молекулы из „ядра“ ANP высвобождаются медленнее. Следует отметить, что терапевтическая, не вызывающая кардиотоксичности, концентрация ДОХ в крови человека после разных вариантов парентерального введения препарата лежит в диапазонах 10–600 ng/ml [22]. Из чего следует, что доза введения ДОХ в наночастицах на основе $\text{P}(\text{Glu-co-Phe})$ должна быть уменьшена, по крайней мере, в два раза.

Заключение

Показано, что исследованные систем доставки ДОХ разной структуры и размеров

1) по-разному подавляют рост клеток MCF7 при равных концентрациях ДОХ;

2) демонстрируют разную зависимость концентрации ДОХ от времени в плазме крови после интраперитонеального введения СД с равным количеством ДОХ.

Оба варианта носителей практически не обладают токсичностью, тогда как ДОХ в этих носителях в ряде случаев проявляет токсичность, равную свободному ДОХ в больших концентрациях. Наноразмерные полиаминокислотные частицы интенсивнее, чем субмикрочастицы $\text{CaCO}_3 + \text{DexS}$ проникают в раковые клетки, соответственно, токсичность систем доставки ДОХ на основе $\text{P}(\text{Glu-co-Phe})$ по отношению к MCF7 выше. Однако при интраперитонеальном введении ДОХ в разных системах доставки носители на основе $\text{P}(\text{Glu-co-Phe})$ демонстрировали взрывное высвобождение с 7 по 20 сутки. Это требует тщательного подбора вводимой концентрации ДОХ для достижения максимального эффекта *in vivo*. Определить, как распределяется ДОХ в организме при разных способах введения — первоочередная задача дальнейших исследований. Следующая важная задача — получить понимание механизмов проникновения в клетки ДОХ, включенного в носители разной структуры.

Материалы и методы

Соли, используемые для синтеза пористых карбонатных ядер $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и Na_2CO_3 , как и полианион декстран сульфат Na, используемый для их покрытия, произведены Sigma-Aldrich (США). N-карбоксиангидрид γ -бензил-L-глутамат ($\text{p}(\text{Glu-co-DPhe})$) также производства Sigma-Aldrich (США). D-фенилаланин (Вектон, Россия). Синдроксоцин производства Actavis (Hafnarfjordur, Исландия) содержал 17% ДОХ в форме соли с протонированной аминогруппой и 83% лактозы.

Цитотоксичность СД различного состава детектировали по отношению к клеткам MCF7, выделенным из клеточной линии, полученной из инвазивной аденокарциномы протоков молочной железы человека. Клетки предоставлены Институтом цитологии РАН из Российской Коллекции клеточных культур позвоночных.

Синтез CaCO_3 пористых ватеритов осуществляли по модифицированной методике [9], приведенной в [21]. Соосаждение 1 М растворов $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и Na_2CO_3 проводили при интенсивном перемешивании в течение 30 с, центрифугировали, осадок промывали, сушили. Покрытие ядер полианионом декстрансульфатом происходило при перемешивании в течение 1 h суспензии CaCO_3 ватеритов в водном растворе полимера с концентрацией 2 mg/ml с последующим центрифугированием, промывкой и сушкой.

Амфифильный сополимер (p(Glu-co-DPhe)) — основу наночастиц — синтезировали методом полимеризации с раскрытием цикла N-карбоксихидридов γ -бензил-L-глутамата и D-фенилаланина, взятых в соотношении 4/1 (mass/mass). Мицеллярные частицы были сформированы методом инверсии фаз с органической (ацетонитрил) на водную (0.01 M натрий фосфатный буферный раствор, pH 7.4).

Размеры допированных пористых ватеритов $\text{CaCO}_3 + \text{DexS}$ оценивали при помощи сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) Supra 55VP (Carl Zeiss, Германия). Исследуемые объекты помещали на предметный столик с токопроводящим скотчем и для повышения контрастности покрывали платиной. Толщина покрытия порядка 10 nm.

Морфологию полученных полиаминокислотных наночастиц определяли методом ПЭМ на приборе JEM-1400 STEM (Jeol, Япония). Образцы помещали на карбонированную медную сетку с покрытием из формвара (поливинилформальдегида). Контрастирующий агент — 2% уранил ацетат.

Гидродинамический диаметр и индекс полидисперсности наночастиц, полученных в воде, определяли при помощи метода ДРС с использованием прибора Malvern Zetasizer Nano-ZS (Великобритания) при 25°C. Концентрация наночастиц в дисперсионной среде составляла 0.1 mg/ml.

Включение ДОХ в СД проводили методом диффузии при совместном перемешивании в течение суток суспензии $\text{CaCO}_3 + \text{DexS}$ (4 mg/ml) и раствора ДОХ (1 mg/ml). В суспензию наночастиц на основе полиаминокислот (2 mg/ml) добавляли раствор ДОХ (1 mg/ml), перемешивали в течение 30 min, затем оставляли на 12 h в холодильнике.

Загрузку ДОХ в СД определяли по разнице исходного количества ДОХ и количества невключившегося ДОХ, находящегося в супернатанте после окончания процедуры включения. Разницу делили на вес носителей после их промывки и сушки. Концентрацию ДОХ определяли спектрофотометрически при длине волны $\lambda = 480$ nm.

Отсутствие цитотоксичности носителей и эффективность угнетения роста раковых клеток в присутствии СД, содержащих ДОХ, определяли при помощи клеточного анализатора RTCA iCELLigence System (ACEA Biosciences, США). Оценивали динамику пролиферации клеток MCF7 при их кондиционировании с носителями $\text{CaCO}_3 + \text{DexS}$ и полиаминокислотными наночастицами как пустыми, так и содержащими различное количество ДОХ. Клетки культивировали в полной питательной среде ДМЕМ (Панэко, Россия) с добавлением 1% L-глутамина 200 mM, 10% бычьей эмбриональной сыворотки и 1% антибиотиков (100 u/ml пенициллин, 100 mg/ml стрептомицин), 1% антимицотика (амфотерицин В 250 mg/ml) (все реактивы Thermo Fisher Scientific, США). Культивирование проводили в CO_2 -инкубаторе (Thermo Fisher Scientific, США) при температуре 37°C,

концентрации CO_2 5% и повышенной влажности. В каждую ячейку с питательной средой (объем 0.2 ml) помещали по 35 тыс. клеток MCF7. Через сутки добавляли в ячейки пустые СД (носители $\text{CaCO}_3 + \text{DexS}$ и P(Glu-co-Phe)), а также СД содержащие разное количество ДОХ. В дальнейшем определяли увеличение количества клеток на основании измерения электрического импеданса микросенсоров в ячейках. Усреднение проводили по данным, полученным из трех ячеек. Приведены данные, полученные на протяжении четырех суток контакта клеток MCF7 с разными вариантами СД.

Для определения концентрации ДОХ в плазме крови крыс использовали беспородных крыс, вес 256–312 g, разведения „Питомник лабораторных животных „Рапполово“, 15 голов обоих полов. Все манипуляции с животными проводили под наркозом: Sol. Zoletil 50 по 0.05 ml на 0.1 kg массы животного. Животным интраперитонеально вводили по 2 ml 5% раствора глюкозы, содержащего по 4 mg ДОХ в СД или в свободном состоянии. Наркоз Sol. Zoletil 50 по 0.05 ml на 0.1 kg массы животного. Забор 1.0 ml крови из хвостовой вены осуществляли через 24 h после введения, далее на 4-е, 7-е, 14-е, 17-е и 21-е сутки. При взятии крови животное обезболивали и фиксировали в фиксаторе для грызунов. Далее из отобранного образца крови получали плазму следующим образом. Через 10 min после забора крови ее центрифугировали в течение 15 min при 1 500 rpm. Супернатант замораживали и хранили в закрытом объеме при -40°C до дальнейшего анализа.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ). Содержание ДОХ в плазме крови крыс определяли с использованием хроматографа Prominence-I LC 2030C 3D Plus instrument (Shimadzu, Япония), снабженным флуориметрическим RF-20A детектором и 5 mg Luna C18 колонкой Phenomenex (США). Длина волны возбуждения 475 nm, испускания 555 nm. Анализ проводили в градиентном режиме (с ацетонитрилом) в 0.01 N Na-форматном буфере при pH 3.68. Продолжительность эксперимента 20 min. Предел детектирования 1 ng/ml. Все измерения проводили трижды.

Финансирование работы

Работа выполнена согласно бюджетной теме № АААА-А20-120022090044-2, Институт высокомолекулярных соединений РАН.

Соблюдение этических стандартов

Работа с животными выполнена в соответствии с правилами использования экспериментальных животных (согласно принципам Европейской конвенции, Страсбург, 1986 г. и Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными, 1996 г.).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, P. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal. *CA Cancer J. Clin.*, **68**, 394 (2018). DOI: 10.3322/caac.21492
- [2] I.S. Basin. *Probl. Practical Oncology*, **9**, 216 (2008).
- [3] B. Gao, J. Luo, Y. Liu, S. Su, S. Fu, X. Yang, B. Li. *Int. J. Nanomed.*, **6**, 4073 (2021). DOI: 10.2147/IJN.S308057
- [4] G. Minotti, P. Menna, E. Salvatorelli, G. Cairo, L. Gianni. *Pharmacol. Rev.*, **56**, 185 (2004). DOI: 10.1124/pr.56.2.6
- [5] B. Matyszevska. *Inst. Civil Eng. Surf. Innovat.*, **2**, 201 (2014). <https://doi.org/10.1680/si.13.00040>
- [6] Y. Jiang, Y. Zhou, C. Zhang, T. Fang. *Int. J. Nanomed.*, **15**, 3319 (2020). DOI: 10.2147/IJN.S249144
- [7] U. Ruman, S. Fakurazi, M. Masarudin, M. Hussein. *Int. J. Nanomed.*, **15**, 1437 (2020). DOI: 10.2147/IJN.S236927
- [8] N. Yokomichi, T. Nagasawa, A. Coler-Reilly, H. Suzuki, Y. Kubota, R. Yoshioka, A. Tozawa, N. Suzuki, Y. Yamaguchi. *Hum. Cell.*, **26**, 8 (2013). DOI: 10.1007/s13577-012-0057-0
- [9] D. Volodkin, A. Petrov, M. Prevot, G. Sukhorukov. *Langmuir*, **20**, 3398 (2004). DOI: 10.1021/la036177z
- [10] N. Zashikhina, V. Sharoyko, M. Antipchik, I. Tarasenko, Y. Anufrikov, A. Lavrentieva, T. Tennikova, E. Korzhikova-Vlakh. *Pharmaceutics*, **11**, 27 (2019). DOI: 10.3390/pharmaceutics11010027
- [11] M. Dizaj, M. Barzegar-Jalali, M. Zarrintan, K. Adibkia, F. Lotfipour. *Expert Opin. Drug Del.*, **12**, 1649 (2015). DOI: 10.1517/17425247.2015.1049530
- [12] R. Mydin, I. Zahidi, N. Ishak, N. Ghazali, S. Moshawih, S. Siddiquee. *Malayas J. Med. Health Sci.*, **14**, 201 (2018).
- [13] A. Trofimov, A. Ivanova, M. Zyuzin, A. Timin. *Pharmaceutics*, **10**, 167 (2018). DOI: 10.3390/pharmaceutics10040167
- [14] Y. Svenskaya, B. Parakhonskiy, A. Haase, V. Atkin, E. Lukyanets, D. Gorin, R. Antolini. *Biophys Chem.*, **182**, 11 (2013). DOI: 10.1016/j.bpc.2013.07.006
- [15] N.N. Sudareva, O.M. Suvorova, I.I. Tarasenko, N.N. Saprykina, N.V. Smirnova, S.G. Petunov, A.S. Radilov, A.S. Timin, E.G. Korzhikova-Vlakh, A.D. Vilesov. *Mend Commun.*, **30**, 25 (2020). DOI: 10.1016/j.mencom.2020.01.008
- [16] P.V. Binevski, N.G. Balabushevich, V.I. Uvarova, A.S. Vikulina, D. Volodkin. *Coll. Surf. B: Biointerfaces.*, **181**, 437 (2019). DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.05.077
- [17] M. Dizaj, S. Sharifi, E. Ahmadian, A. Eftekhari, K. Adibkia, F. Lotfipour. *Expert Opin. Drug Deliv.*, **16**, 331 (2019). DOI: 10.1080/17425247.2019.1587408
- [18] A. Som, R. Raliya, L. Tian, W. Akers, J. Ippolito, S. Singamaneni, P. Biswas, S. Achilefu. *Nanoscale*, **8**, 12639 (2016). DOI: 10.1039/C5NR06162H
- [19] P.V. Popryadukhin, N.N. Sudareva, O.M. Suvorova, G.Yu. Yukina, E.G. Sukhorukova, N.N. Saprykina, O.V. Galibin, A.D. Vilesov. *Cell. Ther. Transpl.*, **9**, 78 (2020). DOI: 10.18620/ctt-1866-8836-2020-9-4-78-84
- [20] N.N. Zashikhina, M.V. Volokitina, V.A. Korzhikov-Vlakh, I.I. Tarasenko, A. Lavrentieva, T. Scheper, E. Rhuel, R.V. Orlova, T.B. Tennikova, E.G. Korzhikova-Vlakh. *Europ. J. Pharm. Sci.*, **109**, 1 (2017). DOI: 10.1016/j.ejps.2017.07.022
- [21] N. Sudareva, O. Suvorova, N. Saprykina, N. Smirnova, P. Bel'tyukov, S. Petunov, A. Radilov, A. Vilesov. *J. Microencaps.*, **35**, 619 (2018). DOI: 10.1080/02652048.2018.1559247
- [22] Y. Harahap, P. Ardinarsih, A.C. Winarti, D.J. Purwanto. *Drug Design, Devel. Therapy*, **14**, 3469 (2020). DOI: 10.2147/DDDT.S251144