

Влияние структурных различий систем доставки доксорубина на их функциональные характеристики

© Н.Н. Сударева, О.М. Суворова, Н.Н. Сапрыкина, Н.Н. Шевченко, В.К. Лаврентьев, Е.Н. Попова, Е.Н. Власова, К.А. Колбе, Н.В. Смирнова

Национальный исследовательский центр „Курчатовский институт“ — Петербургский институт ядерной физики — Институт высокомолекулярных соединений,
199004 Санкт-Петербург, Россия
e-mail: nnsas@mail.ru

Поступило в Редакцию 27 февраля 2026 г.

В окончательной редакции 28 июля 2026 г.

Принято к публикации 31 июля 2026 г.

Методами сканирующей электронной микроскопии, N_2 -сорбционного анализа, рентгеноструктурного анализа, термогравиметрического анализа и инфракрасной спектроскопии исследованы структуры двух вариантов систем доставки противоракового антибиотика доксорубина — ватеритов карбоната кальция и допированных систем — ватеритов карбоната кальция, покрытых полианионом декстрансульфатом Na. Сравнительные функциональные характеристики систем (помимо загрузки и высвобождения) определяли, используя колориметрический метод для оценки пролиферации клеток в присутствии систем доставки. Захват обоих вариантов систем доставки клетками разного типа (макрофагами, раковыми клетками и фибробластами) определяли с помощью оптической микроскопии с флуоресцентным детектированием. Установлено, что поглощение клетками допированных систем доставки происходит интенсивнее, чем ватеритов карбоната кальция, что должно обеспечить высокую противораковую активность допированных карбонатов кальция с инкапсулированным доксорубином.

Ключевые слова: декстрансульфат Na, N_2 -сорбционный анализ, термогравиметрия, рентгеноструктурный анализ, ИК-фурье спектроскопия, пролиферация, поглощение клетками.

DOI: 10.61011/JTF.2026.11.63767.44-26

Введение

В медицине давно и успешно используют системы доставки (СД) биологически активных веществ (БАВ), основные задачи которых — защитить БАВ от окружающей среды, пролонгировать его высвобождение, уменьшить дозу вводимого вещества, и, таким образом, уменьшить его негативное воздействие на здоровые ткани. Разработано множество вариантов СД: липосомы, дендримеры, полиаминокислотные наночастицы, полимерные нано- и микрочастицы, неорганические (нанотрубки, SiO_2 , гааллозиты) носители и даже макрофаги [1–7]. Большой интерес в качестве СД представляют кристаллы карбоната кальция ($CaCO_3$), которые существуют в трех морфологических формах — пористые сферические ватериты, непористые кальциты и арагониты. Доступность, дешевизна, простота изготовления, биodeградируемость, высокая пористость, регулируемые свойства, отсутствие токсичности более двадцати лет привлекают внимание исследователей к ватеритам $CaCO_3$, как к СД [8–10]. Ватериты $CaCO_3$ используют для контролируемой доставки самых разных БАВ: пептидов, ферментов, нуклеиновых кислот, антибиотиков, противоонкологических препаратов, том числе доксорубина (ДОКС) [11–15]. В последнее время носители на основе $CaCO_3$ с флуоресцентными агентами используют для биоимиджинга, что позволяет контролировать распределение СД по организму [16]. Сочетание диагностики

и терапии возможно с использованием радионуклидных препаратов [17,18] или фотосенсибилизаторов [19], включенных в $CaCO_3$.

В работе [8], помимо методики синтеза и использования ядер — ватеритов $CaCO_3$, предложена методика формирования капсул из пар слоев полиэлектролитов, нанесенных на поверхность ядра с последующим его растворением. Использованию многослойных капсул в качестве СД посвящен ряд работ [20,21], в том числе и с инкапсулированным ДОКС [22]. Отметим, что последовательное нанесение на $CaCO_3$ ядра от 3 до 6 пар полимерных слоев — процедура малотехнологичная, в ряде случаев приводящая к значительным потерям инкапсулированного соединения. В некоторых работах использованы комплексные структуры — полиэлектролитные оболочки на сохранных $CaCO_3$ ядрах. Уменьшение системной токсичности в ходе альфа терапии ^{225}Ac продемонстрировано *in vivo* при использовании комплексной СД — ($CaCO_3$ ядро)+оболочка [23]. Использование комплексных структур дает возможность множественной загрузки диагностическими и лечебными препаратами. Например, в работе [24] перорально вводили супероксиддисмутазу (СОД) в $CaCO_3$ ядрах, покрытых альгинатной оболочкой, содержащей ингибиторы трипсина. Альгинат защищает $CaCO_3$ в кислой среде желудка; растворяясь в щелочной среде кишечника, он высвобождает ингибиторы протеолитических желудочных ферментов, сохраняя структуру и актив-

ность СОД. В работе [25] при совместном включении препаратов (ДОКС и паклитаксел) в комплексную СД — CaCO_3 + альгинат — величина загрузки каждого из них меньше, чем при индивидуальном включении.

ДОКС — надежный противораковый цитостатик, включающийся в структуру ДНК в процессе ее деления и, таким образом, нарушающий процесс репликации и транскрипции. Молекула ДОКС существует в форме гидроксида, что приводит при контакте с ватеритами CaCO_3 к их растворению и перекристаллизации в непористые кальциты. В работах, посвященных использованию CaCO_3 в качестве систем доставки ДОКС, всегда присутствуют полимерные компоненты (альгинат [25], ДНК [26], полистирол сульфат + желатин [27] и др.), о защите структуры ватеритов ни в одной из работ не было упомянуто. Исключение составляет работа [28], в которой композитные карбонатные ядра, полученные синтезом в присутствии карбогидратных биополимеров, не перекристаллизуются в кальциты в процессе включения ДОКС.

Для сохранения пористой структуры ватеритов CaCO_3 в процессе включения ДОКС методом диффузии в течение 24 h было использовано допирование — покрытие ватеритов полианионом декстрансульфатом Na (ДекС). Такая обработка позволяет повысить стабильность CaCO_3 в биологических жидкостях, в частности, в плазме крови [29]. В работе [30] показано, что в раковых HeLa-клетках незащищенные ватериты CaCO_3 перекристаллизуются в кальциты. Допирование ватеритов CaCO_3 полимерами служит пролонгированию высвобождения инкапсулированных соединений [21]. Полимерное покрытие уменьшает неспецифическое связывание белков крови с частицами СД, что способствует уменьшению опсонизации и продлению циркуляции в кровотоке [31]. После интраперитонеального введения ДОКС в ватеритах, допированных ДекС, он детектируется в плазме крысы в течение 15 дней, тогда как свободный ДОКС исчезает из плазмы через 3 дня после введения [32].

Цель настоящей работы — выявить структурные различия двух вариантов систем доставки и объяснить их связь с изменением функциональных характеристик систем доставки ДОКС.

1. Материалы и методы

Использованы соли $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, Na_2CO_3 и полианион декстран сульфат Na (ДекС) с ММ = 20 kDa производства Sigma-Aldrich (США). ДОКС в форме препарата производства Actavis (Исландия), содержал 17 % ДОКС с протонированной аминогруппой и 83 % лактозы. Плазма крови получена в Отделении переливания крови Первого Санкт-петербургского государственного медицинского университета. Клетки эпидермоидной карциномы A431, аденокарциномы молочной железы MCF7 и фибробластов кожи человека HDF предоставлены

Институтом цитологии РАН. Клетки макрофагов, дифференцированных из клеток лейкемии человека THP-1 МФ, получены по стандартному протоколу. Монокитарные клетки THP-1 дифференцировали в макрофагоподобный фенотип (THP-1 МФ) с использованием РМА по стандартному протоколу. Дифференцированные клетки применяли в дальнейших исследованиях.

Синтез ватеритов карбоната кальция (СС) и допированных декстрансульфатом натрия (ДекС) ватеритов (ДСС) проводили по методикам, приведенным в [33]. Ватериты СС получали следующим образом: соосаждали 1М растворы $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и Na_2CO_3 при перемешивании 2000 rpm в течение 30 s, промывали, сушили. Ватериты СС допировали ДекС в процессе совместного перемешивания суспензии СС и раствора полимера (5 mg/ml) в течение 1 h, промывали, сушили.

2. Структурные характеристики СД

2.1. СЭМ

Для определения изменения структуры пористых ватеритов CaCO_3 в процессе допирования ДекС и в результате включения ДОКС в обе структуры СД использовали сканирующий электронный микроскоп Supra 55VP (Carl Zeiss, Германия). Поверхность образца перед измерением покрывали тонким слоем платины.

2.2. N_2 сорбционный анализ (БЭТ)

Характеристики пористой структуры исходных СС и ДСС были определены методом Брунауэра–Эммета–Теллера (БЭТ), заключающемся в сорбции–десорбции азота при 77.3 К. Данные получены при помощи анализатора площади поверхности и размеров пор Nova 1200 (Quantochrome Instruments, США). Обработку данных осуществляли при помощи Quantachrome NovaWin для Nova Instruments. Погрешность не превышает 3 %.

2.3. Рентгеноструктурный анализ (РСА)

Анализ проводили с помощью дифрактометра ДРОН-3М (НПО „Буревестник“ СПб., Россия). Дифрактограммы получены в режиме трансмиссии. Использовано рентгеновское излучение $\text{CuK}\alpha$. Монохроматизацию осуществляли при помощи Ni-фильтра.

2.4. Термогравиметрический анализ (ТГА)

Анализы проводили с использованием прибора TG 209 F1 (Netzsch, Германия) в диапазоне температур 30 °C–800 °C со скоростью нагрева 10 °C/min в инертной среде (аргон 40 ml/min). Массы образцов 2–3 mg. Определяли остаточные массы образцов, а также температуры, соответствующие максимальным интенсивностям разрушения образцов. Последние получены из диф-

ференциальных кривых температурных зависимостей потери массы образцов.

2.5. ИК-фурье-спектроскопия (FTIR)

ИК-спектры были получены с использованием Vertex-70 FTIR спектрометра (Bruker, Bellerika, США), оснащенного устройством неполного внутреннего отражения с использованием кристалла ZnSe (PIKE Technologies).

3. Функциональные характеристики СД

3.1. Включение и высвобождение ДОКС для СД разной структуры

Включение ДОКС в ДСС и СС проводили методом диффузии при совместном перемешивании суспензии ДСС с водным раствором ДОКС в течение 24 h. Концентрация суспензии СД равна 5 mg/ml, концентрация раствора ДОКС равна 1 mg/ml. Объем суспензии 5 ml. Включение ДОКС определяли с использованием калибровки растворов ДОКС при $\lambda = 480$ nm по разнице поглощения исходного раствора и суммы растворов не включившегося ДОКС. Высвобождение ДОКС из обоих вариантов СД осуществляли в разные среды: плазму крови, 0.05 М фосфатный буфер (ФБ) со значениями pH = 7.4 (моделирующий здоровую среду организма) и pH = 5.0 (моделирующий область раковых опухолей). Использовали СД разных структур, но с близким значением включения ДОКС.

3.2. Пролиферация клеток

До контакта с клетками СД были простерилизованы при 120 °C в течение 40 min. Пролиферацию клеток дермальных фибробластов человека HDF и карциномы штаммов A431 и MCF7 определяли при помощи стандартного метода MTT [34], используя $20 \cdot 10^3$ клеток в пластинках с 96 лунками. Клетки взаимодействовали со следующими объектами: СС+ДОКС; ДСС+ДОКС; СС; ДСС и ДОКС в течение четырех дней. Концентрация ДОКС в разных объектах равна 5 μ g/ml. Концентрация свободных СД (СС и ДСС) равна концентрации СД в СД+ДОКС, где загружено 5 μ g/ml. По окончании периода взаимодействия в лунки был добавлен раствор МТТ. После инкубации с ДМСО поглощение раствора определяли при $\lambda = 570$ nm при помощи Spectro STAR Nano plate reader (BMG Labtech, Германия). Величина поглощения пропорциональна количеству клеток с метаболической активностью. Результаты, полученные для трех лунок, усредняли.

3.3. Поглощение СД клетками

Для исследования поглощения клетками разного типа СД разной структуры использовали световой микроскоп

Zeiss Scope A1 (Carl Zeiss, Германия) с флуоресцентным детектированием. Все использованные в эксперименте клетки окрашивали флуоресцентным красителем Texas Red-X (λ возбуждения = 561 nm, эмиссии — 615 nm). Системы доставки метили флуоресцентным красителем RKN26 (λ возбуждения = 550 nm, эмиссии — 567 nm). СД использовали без включенного ДОКС, чтобы его собственная флуоресценция не мешала интерпретации результатов. Поглощение СД обеих структур различными клетками проводили следующим образом. Клетки в количестве $20 \cdot 10^3$ на лунку культивировали в питательной среде в течение 24 h. Затем к клеткам добавляли суспензию СД (концентрация 10 μ g/ml). Через сутки взаимодействия клетки тщательно отмывали от культурной среды и непоглощенных СД и получали цветные снимки, сделанные с использованием программы обработки данных используемого микроскопа (ZEN blue).

Для количественной оценки флуоресцентного сигнала изображения анализировали в программе ImageJ. Во время обработки выполняли вычитание локального диффузного фона, соответствующего собственной флуоресценции клеток. Порог выделения ярких точечных объектов определяли по контрольному изображению клеток без частиц и затем без изменений применяли к изображениям клеток после инкубации с СС и ДСС. Для каждого поля определяли количество ярких флуоресцентных объектов (N) и их суммарную интегральную интенсивность (I).

4. Результаты и обсуждение

4.1. Структурные характеристики

Для определения структурных различий обоих типов СД — ватеритов карбоната кальция (СС) и ватеритов карбоната кальция, допированных полианионом декстрасульфатом натрия (ДСС), были использованы следующие методы: СЭМ; N₂-сорбционный анализ (БЭТ); РСА; ТГА и метод инфракрасной спектроскопии (FTIR).

4.1.1. СЭМ

На рис. 1 приведены СЭМ фото обеих структур, как интактных (рис. 1, *a, b*), так и после включения в них ДОКС (рис. 1, *c, d*). СЭМ фото подтверждают защитную функцию покрытия поверхности СС полианионом ДекС.

При помощи анализа СЭМ фото исходных СС получены зависимости распределения частиц по размерам (рис. 2).

При использовании СД ДОКС для лечения опухолей важно иметь в виду, что аномальные ткани, такие как солидные опухоли, в отличие от нормальных тканей, имеют капилляры размером до 2 μ m [35]. Следовательно, стерические препятствия не должны тормозить проникновение СД с лекарством в ткани опухолей.

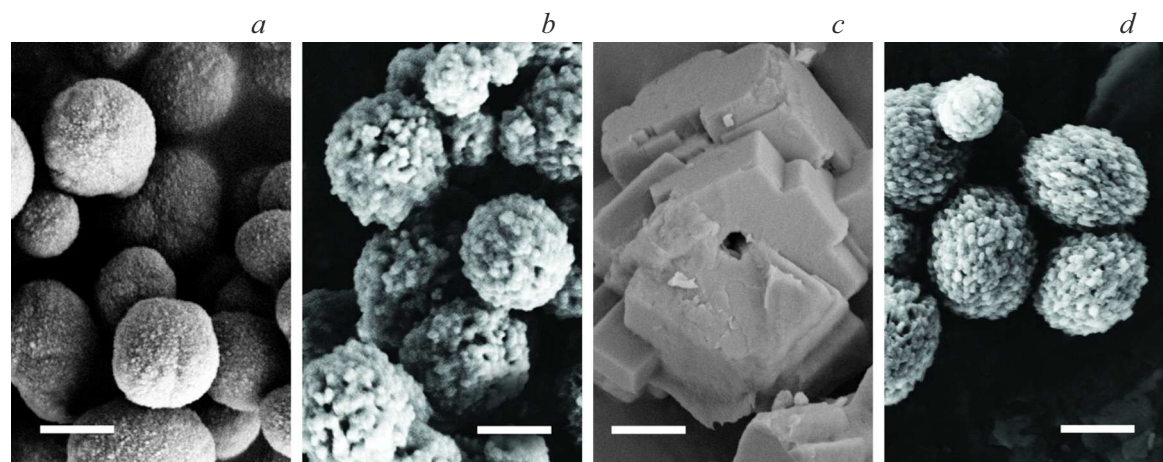


Рис. 1. Интактные системы доставки: *a* — СС; *b* — ДСС; системы доставки после включения ДОКС методом диффузии: *c* — СС; *d* — ДСС. Маркер — 1 μm.

Таблица 1. Пористая структура систем доставки СС и ДСС

Образец	Площадь поверхности, m ² /g	Размер пор, nm	Диапазон размеров пор, nm
СС (CaCO ₃)	8.98–0.05	12.8–0.1	1.8–19.0
ДСС (CaCO ₃ +ДекС)	9.98–0.05	12.1–0.1	1.6–17.0

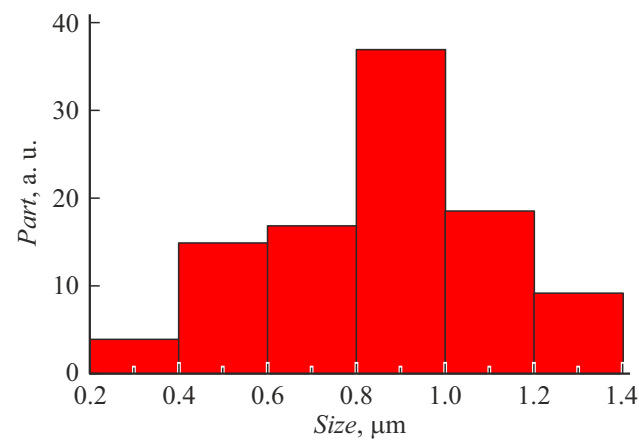


Рис. 2. Распределение частиц СС по размерам.

4.1.2. N₂-сорбционный анализ (метод БЭТ)

Как видно из табл. 1, характеристики пористых структур СС и ДСС частиц, полученные методом сорбции N₂, не демонстрируют значительных различий, явившихся следствием покрытия поверхности СС полианионом ДекС. Наблюдается незначительное уменьшение среднего размера пор ДСС. Более рельефная поверхность частиц ДСС по сравнению с СС, что видно на СЭМ фото (рис. 1, *a, b*), объясняет увеличение площади поверхности допированных систем доставки.

4.1.3. PCA

На рис. 3, *a* (кривая 2) приведена дифракционная кривая образца СС, полностью совпадающая с эталонной кривой рассеяния ватерита (CaCO₃) [36], что позволяет уверенно идентифицировать образец. Параметры кристаллической ячейки: $a = 7.29 \text{ \AA}$, $\alpha = 90.0^\circ$; $b = 7.29 \text{ \AA}$, $\beta = 90.0^\circ$; $c = 25.302 \text{ \AA}$, $\gamma = 120.0^\circ$. На рис. 3, *a* (кривая 1) приведена дифракционная кривая образца CaCO₃, допированного ДекС (ДСС). Кривые PCA практически идентичны, очевидно, что обработка ДекС не приводит к изменению кристаллической структуры образцов CaCO₃. Рефлекс $2\theta = 29.5^\circ$ отражает тригональную структуру кальцита. Оба образца содержат не более 5% кальцитов. Повышение интенсивности рассеяния в области $2\theta = 20\text{--}30^\circ$ является частью аморфного гало и свидетельствует о наличии ДекС в аморфной фазе. На рис. 3, *b* приведены данные PCA систем доставки обеих структур после введения в них ДОХ методом диффузии. Очевидно, что непокрытые ватериты СС преобразуются в кальциты (рис. 3, *b*, кривая 2). Структура ДСС в процессе включения ДОХ практически не изменяется, что подтверждено сравнением рис. 3, *a* (кривая 1) и рис. 3, *b* (кривая 1).

4.1.4. ТГА

Исследование структуры СД методом термогравиметрии (сжигание объекта в N₂ при температурах до 800 °C), казалось бы, не имеет особого смысла, поскольку

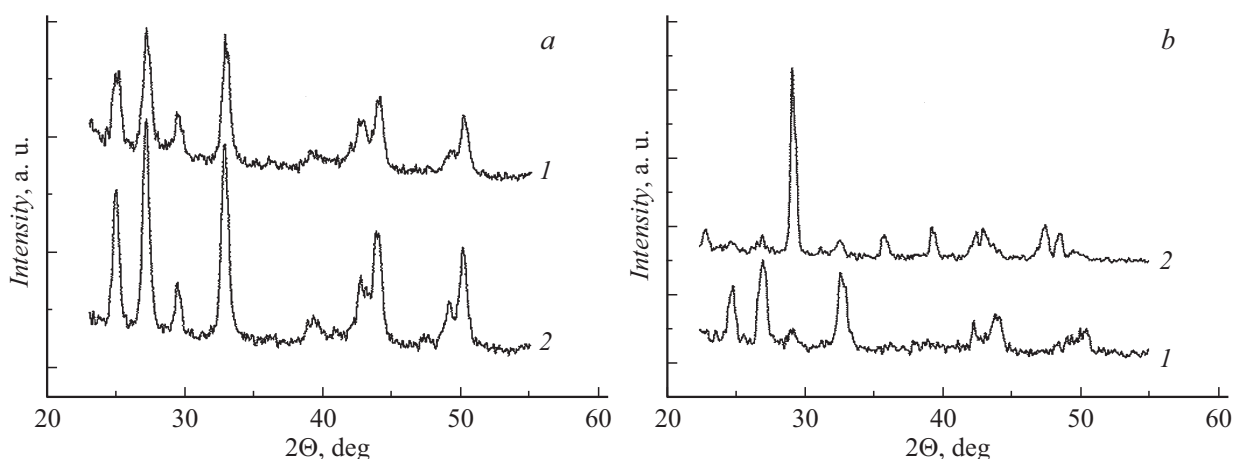


Рис. 3. Дифрактограммы образцов: *a* — ДСС (1) и СС (2); *b* — ДСС+ДОКС (1) и СС+ДОКС (2).

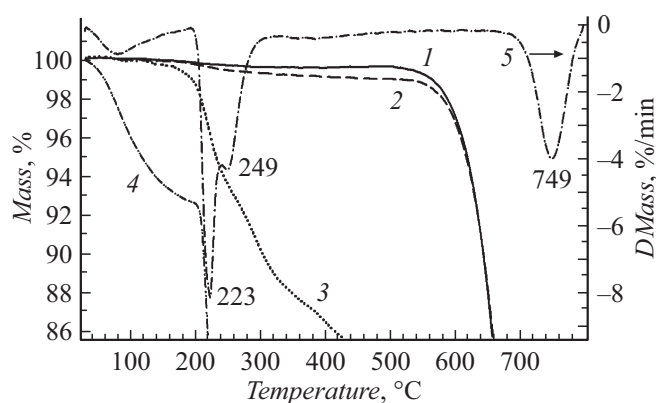


Рис. 4. Температурная зависимость потери массы образцов: СС (1); ДСС (2); ДСС+ДОКС (3); ДекС (4) и дифференциальная кривая потери массы ДекС (5).

ку их использование в живых организмах не предполагает температуры выше 42°. Однако метод позволяет определить количественный состав СД, содержащих компоненты разной термоустойчивости. С этой целью метод использован в работе [37], где температурный профиль CaCO_3 сходен с графиком, приведенным на рис. 4.

Рис. 4 иллюстрирует результаты ТГА анализа образцов СС, ДСС и ДСС с инкапсулированным ДОКС. Температурные профили потери массы получены в инертной атмосфере. Диапазон основной потери массы для этих образцов лежит в области температур 620 °С–700 °С. Потерю массы на 1 % наблюдают для образца ДСС по сравнению с образцом СС, начиная с 200 °С, где происходит расхождение кривых 1 и 2. В этой области происходит разрушение ДекС (кривая 4), что подчеркнуто экстремумом на дифференциальной кривой зависимости массы полимера ДекС от температуры (кривая 5). На пиках дифференциальной кривой указаны значения тем-

Таблица 2. Характеристики процесса термической потери массы образцов СС, ДСС и ДСС+ДОКС

Образец	Остаточная масса w/w, %	Температура максимальной деструкции, °С
СС (CaCO_3)	56.4 ± 0.5	713.1 ± 0.2
ДСС (CaCO_3 +ДекС)	57.2 ± 0.5	701.6 ± 0.1
ДСС+ДОКС (CaCO_3 +ДекС+ДОКС)	46.6 ± 0.7	685.3 ± 0.3

ператур. Разрушение образца ДСС с инкапсулированным ДОКС начинается с 120 °С (кривая 3).

В табл. 2 приведены основные характеристики процесса термического разрушения трех исследованных образцов. Температуры максимальной деструкции образцов получены из дифференциальных зависимостей потери массы (не приведены для сохранения выразительности изображения на рис. 4).

Кальцинация CaCO_3 ($M_w = 100$) и испарение CO_2 оставляют от образца CaO ($M_w = 56$), т.е. остаточная масса равна примерно 56 %. Сравнивая величины потери масс трех образцов из табл. 2 мы видим, что максимальная потеря массы для трехкомпонентной системы ДСС+ДОКС наступает раньше — при меньшей температуре по сравнению с двухкомпонентной ДСС и однокомпонентными образцами СС — наиболее стабильными структурами. Следовательно, допирование СС и, тем более, инкапсулирование ДОКС уменьшает их термостабильность. В работе [38] при помощи результатов ТГА показано, что термостабильность разных морфологических вариантов CaCO_3 уменьшается при добавлении полимера и/или белка. Профили ТГА кривых для микрочастиц CaCO_3 ватеритов сходны с профилями СС, полученными в указанной работе.

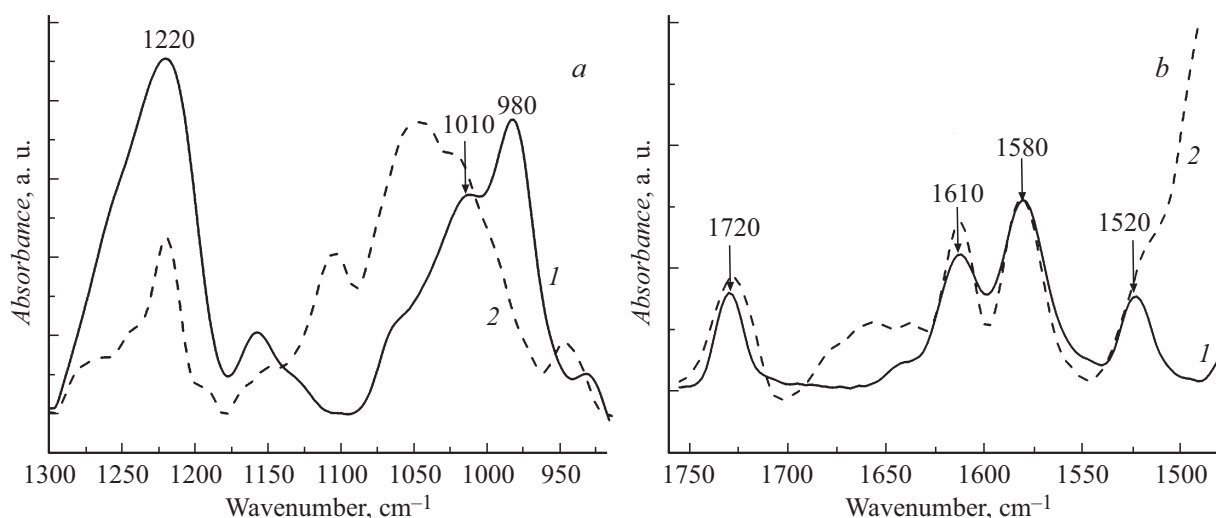


Рис. 5. FTIR спектры: *a* — спектр ДекС (кривая 1) и разностный спектр, полученный путем вычитания спектра СС из спектра ДСС (кривая 2); *b* — спектр ДОКС (кривая 1), спектр ДОКС+ДСС (кривая 2).

4.1.5. FTIR

При сравнении спектров СС и ДСС видны незначительные различия в области волновых чисел 1300–900 cm^{-1} . В полном FTIR-спектре СС (не приведен) присутствует характерный адсорбционный пик 743 cm^{-1} . Взаимодействие с ДекС не изменяет его в спектре ДСС, зато пик 875 cm^{-1} (характеризующий морфологическую структуру) расширяется. Кроме того, в спектре ДСС наблюдается изменение контуров полосы в области 1450–1300 cm^{-1} . Вместо полных FTIR-спектров СС и ДСС приведены разностные спектры, на которых различия выглядят более ярко. При сравнении спектра ДекС (рис. 5, *a*, кривая 1) и разностного спектра, полученного путем вычитания спектра СС из спектра ДСС (рис. 5, *a*, кривая 2), видны изменения в области 1300–950 cm^{-1} , что подтверждает наличие взаимодействия СС с полимерным покрытием ДекС.

В спектре образца ДСС+ДОКС (рис. 5, *b*, кривая 2) имеются все полосы, характерные для ДОКС (рис. 5, *b*, кривая 1): 1720 cm^{-1} — C=O кето-группа; 1610 и 1520 cm^{-1} — C=C колебания ароматического кольца; 1580 cm^{-1} — NH_3^+ группа [39]. Изменение формы и полуширины полосы 1580 cm^{-1} может происходить за счет взаимодействия ДОКС с частицами ДСС. Возможно, наряду с гидрофобными взаимодействиями, проявляются ионные взаимодействия полианиона ДекС с СС, несущими при pH ниже 8.5 избыточный положительный заряд, а также с NH_3^+ группой ДОКС. FTIR-спектры ДОКС, ДОКС+СС (приведен в [40]) и ДОКС+ДСС имеют существенные отличия в частоте полосы поглощения, характерной для кето-группы ДОКС. Для чистого ДОКС полоса имеется на 1720 cm^{-1} , в ДОКС+ДСС полоса смещается в сторону 1710 cm^{-1} , а в ДОКС+СС наблюдаем еще более сильное смещение до 1705 cm^{-1} . Смещение полосы поглощения свидетельствует о наличии

взаимодействия между ДОКС и ДСС или СС соответственно. Разницу во взаимодействии можно отнести за счет различной природы взаимодействующих частиц — в случае СС ДОКС взаимодействует с молекулой CaCO_3 , а в случае с ДСС — с группой SO_3^- .

Анализ FTIR-спектров свидетельствует о различных типах взаимодействий между различными компонентами обеих структур СД, а также с инкапсулированным ДОКС. Эти различия проявятся в дальнейшем при изучении функциональных характеристик СД, в основном во взаимодействии с различными типами клеток в экспериментах *ex vivo*.

4.2. Функциональные характеристики

4.2.1. Эксперименты *in vitro*. Включение — высвобождение ДОКС

За счет полиэлектролитных взаимодействий между протонированными аминогруппами ДОКС гидрохлорида (ДОКС·HCl в дальнейшем — ДОКС) и анионным полиэлектролитом (ПЭ) декстрансульфатом Na (ДекС) на поверхности СД достигается высокое включение препарата в допированные полиэлектролитом CaCO_3 ядра (ДСС) — 97%. ДСС (рис. 1, *b*) после контакта с раствором ДОКС не перекристаллизуются (рис. 1, *d*). Если включать ДОКС в существующие изначально кальциты, не обладающие пористостью, то включение ДОКС составляет только 30% от исходного количества. Если включать ДОКС в непокрытые ДекС ватериты СС (рис. 1, *a*), то в процессе включения в них ДОКС методом диффузии в течение 24 h они перекристаллизуются в кальциты (рис. 1, *c*). Включение ДОКС в такие структуры не превышает 80%. Включение ДОКС во все структуры осуществляли методом диффузии при одинаковых исходных концентрациях ДОКС и СД.

Таблица 3. Высвобождение ДОКС из СД разной структуры

Среда	Высвобождение ДОКС, %	
	ДСС	СС
Плазма крови pH = 7.4	55	24
ФБ pH = 7.4	10	9
ФБ pH = 5.0	17	16

Перекристаллизация СС связана с повышением растворимости карбонатных ядер в кислой среде в присутствии ДОКС, тогда как полианион ДекС создает защитную пленку на поверхности ядер, которая препятствует их растворению и дальнейшей перекристаллизации.

Доля ДОКС, высвободившаяся за 300 h из СД разной структуры в различные среды, приведена в табл. 3. В плазму ДСС высвобождает около 60 % инкапсулированного ДОКС. СС при такой же загрузке высвобождают 20 за 80 h, не увеличивая в дальнейшем высвобождения. Незначительное высвобождение ДОКС из ДСС в ФБ объясняется плохой растворимостью препарата в этой среде. Сходное взаимное расположение профилей высвобождения в разные среды было продемонстрировано для CaCO_3 , допированных поливинилсульфонатом и альгинатом Na [40], где наибольшее высвобождение ДОКС наблюдали в плазму крови, компоненты которой интенсифицируют разрушение структуры носителей. Увеличение высвобождения ДОКС при уменьшении величины pH демонстрирует наличие направленности СД на среду опухоли, объяснимое разрушением структуры носителя в кислой среде опухоли [41].

Непокрытые ДекС СС демонстрируют свою непригодность в качестве СД для ДОКС, они характеризуются низким включением и незначительным высвобождением препарата даже в плазму крови.

4.2.2. Эксперименты *ex vivo*. Влияние систем доставки на пролиферацию клеток

Поскольку охарактеризованные выше системы доставки ДОКС предполагается использовать для введения в организм лабораторных животных, важно оценить их влияние на пролиферацию различных клеток. Эксперименты *ex vivo* предназначены для определения жизнеспособности клеток при их взаимодействии с системами доставки ДОКС. Условия взаимодействия клеток и СД могут различаться в экспериментах *ex vivo* и *in vivo*. Тем не менее в литературе [42] приведены данные о корреляции цитотоксичности ДОКС по отношению к клеткам рака молочной железы 4T1 и подавлением у мышей роста опухолей, содержащих 4T1 клетки.

В литературе существует мнение о биосовместимости и биodeградируемости частиц CaCO_3 , они не проявляют токсичности и иммуногенности и, таким обра-

зом, хорошо переносятся организмом реципиента [43]. Утверждение основано на отсутствии воспаления после инъекции суспензии 10 mg/ml CaCO_3 в глаз кролика. CaCO_3 проявляет токсичность по отношению к раковым клеткам, окружающая среда которых более кислая, чем у нормальных клеток [44]. При растворении CaCO_3 в кислой среде окружения опухоли раствор делается более щелочным, что ингибирует рост опухоли [45].

Поверхность клеток обычно несет отрицательный заряд, у раковых клеток этот заряд больше по абсолютной величине [46]. Катионы проявляют по отношению к ним цитотоксичность [47]. Поверхностный заряд СС при pH ниже 8.5 положителен [8]. Покрытие поверхности частиц полианионом ДекС уменьшает их избыточный положительный заряд. Пролиферация клеток в присутствии ДСС (без инкапсулированного лекарства) происходит интенсивнее, чем в присутствии СС. Для раковых клеток A431 разница в пролиферации после четырех дней контакта с системами доставки разных структур (СС и ДСС) в диапазоне концентраций 4–50 mg/ml превосходит 10 % (рис. 6, а).

На рис. 6, б приведены результаты сравнения цитотоксичности по отношению к фибробластам (HDF) и клеткам аденокарциномы MCF7 следующих структур: СС+ДОКС, ДСС+ДОКС, СС, ДСС и свободного ДОКС в одной экспериментальной схеме.

Угнетающее воздействие ДОКС в системах доставки на рост раковых клеток несколько интенсивнее (столбцы 2, 4), чем у свободного ДОКС (10). Пустые носители не обладают существенной токсичностью по отношению к клеткам обоих штаммов (5–8). Воздействие на рост фибробластов ДОКС в системах доставки (1, 3), как и свободного ДОКС (9) незначительно.

4.2.3. Эксперименты *ex vivo*. Поглощение систем доставки различными клетками

Исследуемые здесь субмикрометровые СД (чьи размеры не превышают $1.5 \mu\text{m}$) могут взаимодействовать с клетками через различные механизмы клеточного захвата, наиболее вероятными для частиц данного диапазона являются фагоцитоз и макропиноцитоз, однако в настоящей работе механизмы захвата специально не дифференцировали. Первый механизм основан на поглощении частиц размером более $0.5 \mu\text{m}$ [48], второй обеспечивает доставку в клетку жидкостей с растворенными или суспендированными частицами в диапазоне размеров $0.07\text{--}2.0 \mu\text{m}$ [49]. Размеры СС и ДСС практически одинаковы (рис. 1, а, б), следовательно, различие в поглощении разных СД клетками одного типа может объясняться силами взаимодействия поверхностей СД и клеток, а также различиями в возможных рецептор-опосредованных взаимодействиях. Кроме того, допирование ДекС частиц СС обеспечивает частицам отрицательный заряд и гидрофильную поверхность, что снижает агрегацию и улучшает стабильность суспензии.

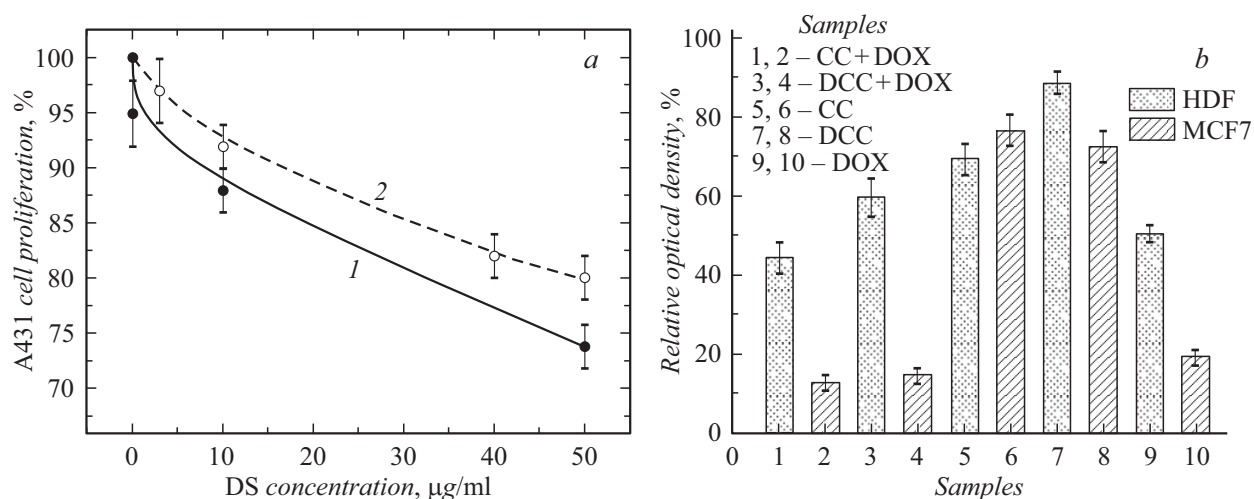


Рис. 6. *a* — зависимость пролиферации клеток A431 после 4 дней контакта с СД без ДОКС: СС (1) и ДСС (2) от концентрации СД; *b* — пролиферация клеток HDF и MCF7 после 3 дней контакта с СД разной структуры, содержащими ДОКС, без ДОКС и ДОКС без СД. Концентрация ДОКС в образцах 1–4 и 10 равна 5 μg/ml.

Таблица 4. Интенсивность флуоресценции поглощенных клетками систем доставки разной структуры, меченых флуоресцентным красителем РКН 26

Клетки	Исходные клетки		Клетки+СС		Клетки+ДСС	
	<i>N</i>	<i>I</i>	<i>N</i>	<i>I</i>	<i>N</i>	<i>I</i>
Фибробласты HDF	20	11 000	210	117 000	231	103 000
Макрофаги THP-1	10	13 000	150	115 000	290	150 000
Аденокарцинома MCF7	10	10 000	20	108 000	220	142 000

Примечание*: *N* — число светящихся объектов (шт.), *I* — суммарная интенсивность флуоресценции (у.е.).

Более стабильные и равномерные суспензии обычно эффективнее поглощаются клетками за счет однородного распределения и меньшего размера агломератов.

Цитостатическая активность противоракового антибиотика ДОКС проявляется только на стадии деления клеток. Поглощение СД на основе СС и ДСС, осуществленное клетками разного типа и зарегистрированное при помощи флуоресцентной микроскопии, отражено на рис. 7, столбцы *B* (СС) и рис. 7, столбцы *C* (ДСС). В эксперименте использовали СД без включения ДОКС, чтобы его собственная флуоресценция не осложняла интерпретацию результатов поглощения. На рис. 7 приведены фотографии, демонстрирующие исходные клетки разных штаммов (столбцы *A*) и эти же клетки после 24 h контакта клеток с обеими структурами доставки: СС (столбцы *B*) и ДСС (столбцы *C*). Тщательная промывка клеток после суток контакта с СД обеспечивает удаление неприсоединившихся СД. Яркие точки на фотографиях в столбцах *B* и *C* — системы доставки СС или ДСС, более блеклые структуры — клетки.

Первое, что бросается в глаза — минимальное количество поглощенных раковыми клетками MCF 7 не допированных СД — СС (ряд 3, столбец *B*). Макрофаги

поглощают СС, но в меньшем количестве, чем ДСС. Сравнение изображений на рис. 7 демонстрирует более активное поглощение допированных CaCO_3 раковыми клетками по сравнению с CaCO_3 . Таким образом, модификация поверхности CaCO_3 декстрансульфатом усиливает взаимодействие частиц ДСС с MCF-7 и повышает вероятность их внутриклеточной доставки, что может приводить к более выраженному цитостатическому эффекту при загрузке ДОКС.

Изначально в каждую ячейку, содержащую по $20 \cdot 10^3$ клеток, добавлено по 10 μg/ml СД. При ориентировочной оценке соотношения СД/клетки следует учитывать не только уровень поглощения клетками СД, но также интенсивность деления клеток за время инкубации, поскольку изменение числа клеток влияет на „нагрузку на клетку“ при постоянной дозе на лунку. Макрофаги THP-1 не делятся, их функция — захватывание инородных объектов. Следовательно, на рис. 7 (ряд 2, столбцы *B* и *C*) мы видим большое количество поглощенных клетками СД обеих структур. Фибробласты делятся медленнее, чем раковые клетки MCF7, однако различия в наблюдаемом сигнале определяются не только пролиферацией, но и особенностями вза-

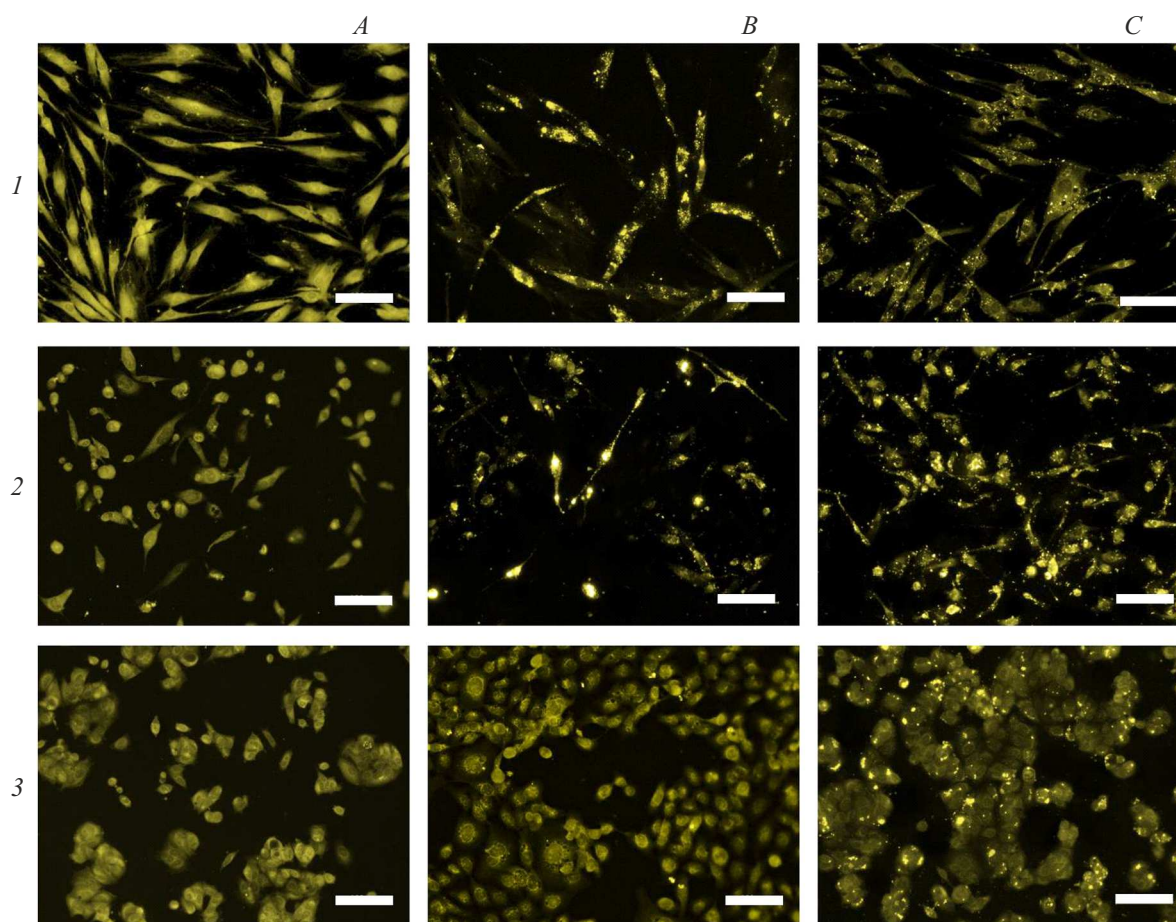


Рис. 7. Поглощение клетками разных типов СД разных структур. Столбец *A* — исходные клетки; столбец *B* — клетки после контакта с СС в течение 24 h; столбец *C* — клетки после контакта с ДСС в течение 24 h. Ряд *1* — фибробласты HDF; ряд *2* — макрофаги THP-1; ряд *3* — клетки денокарциномы MCF7.

имодействия частиц СД с конкретным типом клеток (адгезия к мембране, механизмы клеточного захвата), а также распределением частиц на поверхности лунки. В частности, на изображениях MCF7 (ряд 3, столбец *C*) наблюдается более выраженное накопление ДСС по сравнению с HDF (ряд 1, столбец *C*), что указывает на клеточно-специфические различия во взаимодействии с частицами, модифицированными декстрансульфатом. Эти выводы поддержаны количественно — по определению интенсивности флуоресцентного сигнала (табл. 4).

Как следует из данных суммарной эффективности флуоресценции, приведенных в табл. 4, фибробласты (здоровые клетки организма) лучше поглощают СС, чем ДСС. Раковые клетки MCF7 (ряд 3) лучше поглощают ДСС, чем СС (число светящихся объектов в 10 раз больше). Сходная картина наблюдается для макрофагов, чья функция — захват чужеродных тел. Эти данные свидетельствуют в пользу ДСС, как СД противоракового лекарства.

Следует отметить, что обе исследованные системы доставки можно использовать для других биологически активных веществ (БАВ) — белков, ферментов, пептидов,

нуклеиновых кислот, антибактериальных препаратов, а также для противораковых лекарственных соединений, не подкисляющих окружающую среду в ходе инкапсулирования, например, фторурацила, оксалиплатина, цитарабина, хлонизола. Согласно [50], присутствие включений стабилизирует структуру ватеритов CaCO_3 . В работе [51] показано, что при инкапсулировании белка (бычьего сывороточного альбумина) методом соосаждения формируются гомогенные структуры ватеритов CaCO_3 без присутствия кальцитов. Если структура ватеритов не нарушается при инкапсулировании лекарств, то она более устойчива в биологических средах, чем интактные CaCO_3 . Следовательно, если учитывать химические особенности предназначенных для инкапсулирования БАВ, то полученные в настоящей работе характеристики CaCO_3 могут быть полезны и при их использовании в качестве СД.

Заключение

Успешное использование ватеритов карбоната кальция CaCO_3 в качестве систем доставки лекарственных

соединений ограничено лабильностью морфологии носителя. Перекристаллизация пористых ватеритов в непористые кальциты в кислой среде служит препятствием их использования для инкапсулирования противоракового препарата ДОКС в форме гидроксида. Покрытие поверхности ватеритов полианионом декстрансульфатом служит сохранению пористости ватеритов CaCO_3 . Проведенное сравнение структур обоих вариантов СД с использованием ряда физических методов — СЭМ, N_2 -сорбционного анализа, РСА и ТГА — не выявило значительных структурных различий. Различная природа взаимодействий между компонентами обеих СД и ДОКС обнаружена на основании анализа инфракрасных спектров. Изменившиеся поверхностные характеристики ДСС по сравнению с СС объясняют разницу в величинах включения ДОКС, а самое главное — разницу интенсивности поглощения клетками разных типов двух вариантов СД. Итак, высокое включение ДОКС, стабильность структуры в средах организма, предпочтительное поглощение раковыми клетками — все это может обеспечить системам доставки ДОКС на базе допированных CaCO_3 противораковую активность.

Финансирование работы

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания национального исследовательского центра „Курчатовский институт“ — ПИЯФ — ИВС по теме „Полимеры для биомедицины“, регистрационный номер 1023031700036-2-1.4.4.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] A. Gonzalez Gomez, Z. Hosseinidoust. ACS Infect. Dis., **6**, 896 (2020). DOI: 10.1021/acsinfectdis.9b00357
- [2] E.G. Korzhikova-Vlakh, A.Y. Dzhuzha, V.D. Matvienko, G.A. Platonova, T.B. Tennikova. Pol. Sci. A, **66** (1), 57 (2024). DOI: 10.1134/S0965545X24600194
- [3] I. Negut, V. Grumezescu, G. Dorcioman, G. Socol. Syst. Design Fabr., (2017). DOI: 10.1016/B978-0-323-52727-9.00001-7
- [4] B. Singh, J. Na, M. Konarova, T. Wakiyara, Y. Yamauchi, C. Salomon, M.B. Gawande. Bull. Chem. Soc. Jpn., **93** (12), 1459 (2020). DOI: 10.1246/bcsj.20200136
- [5] R. Tan, D. Tian, J. Liu, C. Wang, Y. Wan. Intern. J. Nanomed., **16**, 4527 (2021). DOI: 10.2147/IJN.S314705
- [6] T. Husain, M. Shoaib, F. Ahmed, R. Yousuf, S. Farooqi, F. Siddiqui, M. Imtiaz, M. Maboos, S. Jabeen. Intern. J. Nanomed., **16**, 1725 (2021). DOI: 10.2147/IJN.S299261
- [7] T. Liang, R. Zhang, X. Liu, Q. Ding, S. Wu, C. Li, Y. Lin, Y. Ye, Z. Zhong, M. Zhou. Intern. J. Nanomed., **16**, 2703 (2021). DOI: 10.2147/IJN.S298159
- [8] D.V. Volodkin, A.I. Petrov, M. Prevot, G.B. Sukhorukov. Langmuir, **20** (8), 3398 (2004). DOI: 10.1021/la036177z
- [9] S.V. German, M.V. Novoselova, D.N. Bratashov, P.A. Demina, V.S. Atkin, D.V. Voronin, B.N. Khlebtsov, B.V. Parakhonskiy, G.B. Sukhorukov, D.A. Gorin. Sci. Rep., **8**, 1 (2018). DOI: 10.1038/s41598-018-35846-x
- [10] F. Aguilar, B. Dusemund, P. Galtier, J. Gilbert, D.M. Gott, S. Grilli, R. Gürtler, J. König, C. Lambré, J.-C. Larsen, J.-C. Leblanc, A. Mortensen, D. Parent-Massin, I. Pratt, I.M.C.M. Rietjens, I. Stankovic, P. Tobback, T. Verguieva, R.A. Woutersen. EFSA J., **9**, 1 (2011). DOI: 10.2903/j.efsa.2011.2318
- [11] N. Sudareva, O. Suvorova, N. Saprykina, N. Smirnova, P. Bel'tyukov, S. Petunov, A. Radilov, A. Vilesov. J. Microencaps., **35** (8), 619 (2018). DOI: 10.1080/02652048.2018.1559247
- [12] S. Chen, F. Li, R. Zhuo, S. Mol. BioSyst., **7**, 2841 (2011). DOI: 10.1039/c1mb05147d
- [13] A.M. Ferreira, A.S. Vikulina, D. Volodkin. J. Contr. Release., **328**, 470 (2020). DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.08.061
- [14] D.B. Trushina, T.N. Borodina, S. Belyakov, M.N. Antipina. Mater. Today Adv., **14**, 100214 (2022). DOI: 10.1016/j.mtadv.2022.100214
- [15] N.N. Sudareva, O.M. Suvorova, V.Y. Elokhovsky, A.S. Krasova, E.R. Gasilova, E.N. Vlasova, N.N. Saprykina, O.V. Ostreyko. Cell. Ther. Transplant., **14** (3), 74 (2025). DOI: 10.18620/ctt-1866-8836-2025-14-3-74-81
- [16] A.S. Timin, A.S. Postovalova, T.E. Karpov, D. Antuganov, A.S. Bukreeva, D.R. Akhmetova, A.S. Rogova, A.R. Muslimov, S.A. Rodimova, D.S. Kuznetsova, M.V. Zyuzin. J. Contr. Release., **344**, 1 (2022). DOI: 10.1016/j.jconrel.2022.02.021
- [17] M.V. Zyuzin, D. Antuganov, Y.V. Tarakanchikova, T.E. Karpov, T.V. Mashel, E.N. Gerasimova, O.O. Peltek, N. Alexandre, S. Bruyere, Y.A. Kondratenko, A.R. Muslimov, A.S. Timin. ACS Appl. Mater. Interfaces., **12** (28), 31137 (2020). DOI: 10.1021/acsami.0c06996
- [18] S. Westrøm, T.B. Bønsdorff, S. Bruland, R.H. Larsen. Transl. Oncol., **11** (2), 259 (2018). DOI: 10.1016/j.tranon.2017.12.011
- [19] Д.Б. Трушина, Т.Н. Бородин, В.В. Артемов, Т.В. Букреева. ЖТФ, **88** (9), 1387 (2018). DOI: 10.21883/JTF.2018.09.46426.52-18 [D.B. Trushina, T.N. Borodina, V.V. Artemov, T.D. Bukreeva. Tech. Phys., **63** (9), 1345 (2018). DOI: 10.1134/S1063784218090220]
- [20] D. Volodkin. Adv. Coll. Interface Sci., **207**, 306 (2014). DOI: 10.1016/j.cis.2013.11.011
- [21] S. Taheri, D.V. Volodkin, G. Skirtach, B.V. Parakhonskiy. Expert Opinion Drug Deliv., (2025). DOI: 10.1080/17425247.2025.2587907
- [22] Q. Zhao, B. Han, Z. Wang, C. Gao, C. Peng, J. Shen. Nanomed: Nanotechnol, Biol., Med., **3**, 63 (2007). DOI: 10.1016/j.nano.2006.11.007
- [23] A.R. Muslimov, D. Antuganov, Y.V. Tarakanchikova, T.E. Karpov, M.V. Zhukov, M.V. Zyuzin, A.S. Timin. J. Contr. Rel., **330**, 726 (2021). DOI: 10.1016/j.jconrel.2021.01.008
- [24] N. Sudareva, O. Suvorova, N. Saprykina, A.D. Vilesov, P. Bel'tyukov, S. Petunov. J. Microencapsul., **33** (5), 487 (2016). DOI: 10.1080/02652048.2016.1206146
- [25] J.L. Wu, C.Q. Wang, R.X. Zhuo, S.X. Cheng. Colloids Surf. B: Biointerfaces, **123** (1), 498 (2014). DOI: 10.1016/j.colsurfb.2014.09.047
- [26] S. Chen, D. Zhao, F. Li, R. Zhuo, S. Cheng. RSC Adv., **2**, 1820 (2012). DOI: 10.1039/c1ra00527h

- [27] L. Li, Y.L. Yang, P. Yin, T. Lei. Coll. Surf. B: Biointerfaces, **186**, 110720 (2020). DOI: 10.1016/j.colsurfb.2019.110720
- [28] A.V. Mikheev, P.I. Mishin, T.N. Pallaeva, V.V. Artemov, I.A. Kasyanov, D.V. Mosievich, A.A. Abalymov, N.G. Balabushevich, D.B. Trushina, T.V. Bukreeva. Intern. J. Biol. Macromol., **373**, 153152 (2026). DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2026.153152
- [29] N. Sudareva, O. Suvorova, N. Saprykina, N. Tomson, D. Suslov, O. Galibin, A. Vilesov. Cell Ther. Transpl., **10** (1), 79 (2021). DOI: 10.18620/ctt-1866-8836-2021-10-1-79-85
- [30] A. Abalymov, R. Verkhovskii, M. Novoselova, B. Parakhonskiy, D. Gorin, A. Yashchenok, G. Sukhorukov. Biotechnol. J., **13**, 18000712018 (2018). DOI: 10.1002/biot.201800071
- [31] K. Cho, X. Wang, S. Nie, Z. (G.) Chen, D.M. Shin. Clin. Canc. Res., **14**, 1310 (2008). DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1441
- [32] N. Sudareva, O. Suvorova, K. Kolbe, D. Suslov, O. Galibin, A. Vilesov, G. Yukina, E. Sukhorukova. Cell Ther. Transplant., **11** (3–4), 87 (2022). DOI: 10.18620/ctt-1866-8836-2022-11-3-4-87-92
- [33] Н.Н. Сударева, О.М. Суворова, Н.Н. Сапрыкина, К.А. Колбе, Н.В. Смирнова, Д.Н. Суслов. ЖТФ, **94** (9), 1509 (2024). DOI: 10.61011/JTF:2024.09.58671.55-24
- [34] T. Mosmann. J. Immunol. Methods, **65**, 55 (1983). DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
- [35] D. Kalyane, N. Raval, R. Maheshwari, V. Tambe, K. Kalia, R.K. Tekade. Mater. Sci. Engin. C, **98**, 1252 (2019). DOI: 10.1016/j.msec.2019.01.066
- [36] A. Chichagov. Crystall Reports., **35** (3), 610 (1990).
- [37] V.L. Kudryavtseva, L. Zhao, S.I. Tverdokhlebov, G.B. Sukhorukov. Coll. Surf. B: Biointerfaces, **157** (1), 481 (2017). DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.06.011
- [38] V. Lauth, M. Maas, K. Rezwan. Mater. Sci. Engin. C, **78**, 305 (2017). DOI: 10.1016/j.msec.2017.04.037
- [39] L.J. Bellamy. *The infrared spectra of complex molecules* (Chapman and Hall, London, 1975)
- [40] N. Sudareva, O. Suvorova, N. Saprykina, H. Vlasova, A. Vilesov. J. Microencapsul, **38** (3), 164 (2021). DOI: 10.1080/02652048.2021.1872724
- [41] S. Sharma, A. Verma, B.V. Teja, G. Pandey, N. Mittapelly, R. Trivedi, P.R. Mishra. Coll. Surf. B: Biointerfaces, **133**, 120 (2015). DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.05.014
- [42] J. Yu, L. Wang, X. Xie, W. Zhu, Z. Lei, L. Lv, H. Yu, J. Xu, J. Ren. Intern. J. Nanomed., **18**, 323 (2023). DOI: 10.2147/IJN.S394896
- [43] 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
- [44] D. Neri, C.T. Supuran. Nature Rev. Drug Discovery, **10**, 767 (2011). DOI: 10.1038/nrd3554
- [45] A. Som, R. Raliya, L. Tian, W. Akers, J. Ippolito, S. Singamanenid, P. Biswas, S. Achilefu. Nanoscale, **8** (25), 12639 (2016). DOI: 10.1039/x0xx00000x
- [46] J. Finean, R. Colemanand, R. Michell. *Membranes and their cellular functions* (Blackwell Science Publication, Oxford, 1974)
- [47] E. Frohlich. Int. J. Nanomed., **7**, 5577 (2012). DOI: 10.2147/IJN.S36111
- [48] N. Doshi, S. Mitragotri. PLOS One., **5**, e10051 (2010). DOI: 10.1371/journal.pone.0010051
- [49] X.P. Lin, J.D. Minterm, P.A. Gleeson. Membranes (Basel), **10**, 177 (2020). DOI: 10.3390/membranes10080177
- [50] C.S. Hurlbut, C. Klein. *Manual of mineralogy*. (John Wiley and Sons, NY., 1985)
- [51] N. Sudareva, H. Popova, N. Saprykina, S. Bronnikov. J. Microencapsul, **31** (4), 333 (2014). DOI: 10.3109/02652048.2013.858788