

Применение современных методов биофотоники для определения режима дозирования на примере эндоваскулярного введения полимерных микрокапсул при адресной доставке

© О.И. Гуслиякова^{1,2}, Е.С. Прихожденко², В.О. Пластун², О.А. Майорова², Н.А. Шушунова², О.А. Куликов³, А.С. Абдурашитов¹, Д.А. Горин⁴, Г.Б. Сухоруков^{1,5}, О.А. Синдеева¹

¹ Центр нейробиологии и нейрореабилитации им. В. Зельмана, Сколковский институт науки и технологий, 121205 Москва, Россия

² Научно-медицинский центр, Саратовский национальный исследовательский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, 410012 Саратов, Россия

³ Институт медицины Национального исследовательского Мордовского государственного университета им. Огарева, 430005 Саранск, Россия

⁴ Центр фотоники и квантовых материалов, Сколковский институт науки и технологий, 121205 Москва, Россия

⁵ Центр улучшение жизни при помощи технологий будущего, 143025 Сколково, Москва, Россия

e-mail: O.Gusliakova@skoltech.ru, O.Sindeeva@skoltech.ru

Поступила в редакцию 20.12.2023 г.

В окончательной редакции 27.02.2024 г.

Принята к публикации 05.03.2024 г.

Показано как оценка биораспределения флуоресцентного конъюгата, ассоциированного с микрокапсулами, с помощью флуоресцентной томографии помогает определить режим дозирования при внутриартериальном введении, обеспечивающий эффективную аккумуляцию носителей в целевой почке мыши, а лазерная спекл-контрастная система визуализации позволяет отсеять дозировки, ведущие к развитию патологических процессов в органе-мишени.

Ключевые слова: флуоресценция, прижизненная визуализация, биораспределение, лазерная спекл-контрастная визуализация, микрокапсулы.

DOI: 10.61011/OS.2024.03.58147.31-24

Введение

Успех терапии определяется не только правильно подобранным препаратом, но и режимом дозирования. Режим дозирования — широкое понятие, включающее дозу, время между приемами, продолжительность лечения, лекарственную форму и способ введения в организм [1]. Разработка новой лекарственной формы или терапевтической стратегии автоматически требует подбора или корректировки режима дозирования [2,3]. Это особенно важно, когда речь заходит об апробации разработанных подходов на животных или перенесении результатов, апробированных на животных, в реальную клиническую практику [4,5]. Подбор режима дозирования также необходим для корректного и всестороннего тестирования поведения в организме новых капсулированных форм лекарств, обеспечивающих их пролонгированное или контролируемое высвобождение. Это требует применения надежных и информативных методов анализа влияния разрабатываемых лекарственных форм на отдельные органы и системы *in vivo*. Синергетическое развитие биофотоники и техники привело к появлению современных систем визуализации, позволяющих изучать процессы

взаимодействия организма с различными внешними и внутренними факторами, оценивать фармакодинамику, состояние тканей и органов, подбирать диагностические критерии и проводить диагностику заболеваний.

Одной из таких систем по праву может считаться флуоресцентная томография. Этот метод позволяет неинвазивно изучать биораспределение и накопление лекарств в органах в том случае, если они связаны с флуоресцентной меткой [6–8]. Однако из-за большого рассеяния и поглощения света тканями глубина детекции флуорофоров в живых объектах ограничена несколькими сотнями микрометров, что позволяет исследовать накопление флуоресцентного сигнала только в органах мелких лабораторных животных, расположенных близко к поверхности. Второй существенной проблемой является интенсивная автофлуоресценция тканей организма [9]. Обе эти проблемы могут быть в некоторой степени решены за счет использования источников освещения ближнего/среднего инфракрасного диапазона и применения соответствующих флуорофоров [9]. Оптические просветляющие агенты также способны увеличить глубину детекции флуоресцентной томографии благодаря временному снижению коэффициента рассеяния света [10].

Лазерная спекл-контрастная визуализация (ЛСКВ) является многообещающим инструментом для бесконтактного мониторинга потоков крови и лимфы в тканях [11,12]. Она также хорошо зарекомендовала себя для оценки безопасности использования капсулированных форм лекарственных средств при внутривенной [13] и внутриартериальной доставке [14]. Используя ЛСКВ, можно получать полные карты потока в реальном времени без какого-либо сканирующего оборудования и контрастных агентов. Стоит, однако, отметить относительно небольшую глубину проникновения света, связанную с ограничениями проникновения в ткани излучения в видимом спектральном диапазоне [15], что позволяет визуализировать кровоток только в приповерхностных сосудах органа [16]. В то же время надежность системы и низкая стоимость [17] являются решающими преимуществами для широкого использования ЛСКВ [16,18,19].

В настоящей работе описывается принцип исследования и подбора оптимального режима дозирования флуоресцентных микроконтейнеров при нацеленном артериальном введении в сосуды почки с использованием флуоресцентной томографии и ЛСКВ. В качестве микроконтейнеров применялись биосовместимые капсулы, полученные с помощью последовательной адсорбции полиэлектролитов, так как они обладают высокой стабильностью [20,21], могут включать в себя лекарства [22,23] и метки [24], способны обеспечивать пролонгированное высвобождение лекарства [25]. Кроме того, микрокапсулы имеют достаточно большой размер для их механического накопления в мелких капиллярах целевого органа, особенно при артериальной доставке [26]. Однако в отличие от микрочастиц они не содержат жесткого ядра, что позволяет им в некоторой степени изменять форму [27], обеспечивая тем самым постепенную нормализацию кровотока при корректно подобранной дозировке [13].

Целью настоящего исследования стало изучение влияния количества микрокапсул, а также объема вводимой суспензии на накопление флуоресцентного сигнала в почке-мишени методом флуоресцентной томографии, а также оценка гемодинамических изменений целевого органа методом ЛСКВ как способа первичного мониторинга критических концентраций, приводящих к необратимым структурным изменениям органа.

Материалы и методы

Хлорид кальция (дигидрат), карбонат натрия (безводный), динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), натриевая соль декстрансульфата (ДС, MW > 70 000), гидрохлорид поли-L-аргинина (пАрг, MW > 70 000), изотиоцианат родамина Б (РИТЦ), фосфатно-солевой буфер (ФСБ, 0.1 М), бычий сывороточный альбумин (БСА, лиофилизированный порошок), трипсин из поджелудочной железы свиньи

(~ 1500 units/mg) были куплены у компании Sigma-Aldrich (Германия). Соляная кислота была получена от фирмы „Реахим“ (Россия), диметилсульфоксид (ДМСО) — от Merck (Германия), эфир цианина 7 NHS (Ци7) — от Lumiprobe (Россия). Трипсин, 1:250, для клеточных культур был получен от MP Biomedicals (США). Все химические вещества были использованы без дополнительной очистки. На всех этапах эксперимента была использована деионизированная вода, полученная с помощью системы водоочистки Milli-Q (Millipore, США).

Конъюгация БСА и флуоресцентных красителей

В первую очередь были приготовлены растворы отдельных компонентов. Окрашивающие растворы: РИТЦ (7.5 mg) в этаноле (1.5 mL), Ци7 (5 mg) в ДМСО (1.5 mL). БСА (60 mg) был растворен в ФСБ (13.5 mL). рН ФСБ был доведен до значения 8.3 с помощью раствора NaOH (1 М). К раствору БСА был добавлен окрашивающий раствор (либо РИТЦ, либо Ци7). Данная смесь перемешивалась в течение ночи при 4°C. Затем свежеприготовленный конъюгат БСА и флуоресцентного красителя (либо РИТЦ, либо Ци7) подвергался диализу против деионизированной воды в темноте при 4°C в течение 3 дней.

Синтез полиэлектролитных микрокапсул

Микросферы ватерита (CaCO_3) были использованы в качестве основы для формирования микрокапсул с использованием техники послойной адсорбции разноименно заряженных полиэлектролитов, как описано в [28], с некоторыми корректировками. Микрочастицы ватерита были получены при смешивании эквимольных (0.37 М) растворов двух солей равных объемов (2 mL): CaCl_2 и Na_2CO_3 . Для включения конъюгата БСА-Ци7 в состав получаемой ватеритной матрицы флуоресцентный конъюгат (2 mg/mL, 0.5 mL) был добавлен к раствору хлорида кальция. Перемешивание итоговой смеси длилось 1 min. Кристаллизованные микрочастицы с включенным флуоресцентным конъюгатом БСА-Ци7 осаждали центрифугированием при 1000 gcf и трижды промывали деионизированной водой. Формирование полиэлектролитных слоев осуществляли каскадной адсорбцией пАрг и ДС с трехкратной промывкой каждого слоя деионизированной водой. Второй слой сульфата декстрана был заменен на БСА-РИТЦ. Формирование слоев продолжалось до тех пор, пока не были получены 3 бислоя. Итоговая структура оболочки может быть записана как пАрг/ДС/пАрг/БСА-РИТЦ/пАрг/ДС. Затем ядра ватерита растворяли в 0.2 М ЭДТА (рН 7.3) с образованием полых микрокапсул.

Характеризация флуоресцентных микрокапсул

Изучение морфологии получаемых микрокапсул проводили с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на микроскопе MIRA II LMU (TESCAN, Чехия) при рабочем напряжении 30 kV. Каплю суспензии микрокапсул помещали на кремниевую подложку и сушили при нормальных условиях. После этого образцы прикреплялись к углеродной пластинке, приклеенной к алюминиевому держателю образцов, а затем проводилось вакуумное напыление золота на поверхность образцов.

Флуоресцентные свойства свежеприготовленных микрокапсул и их распределение по размерам изучали с помощью инвертированного конфокального микроскопа Leica TCS SP8 X (Leica Microsystems), оснащенного источником импульсного лазера белого света (мощность лазера 1.5 mW), фокусируемого через объектив $20 \times / 0.70 \text{ NA}$. Использовались следующие настройки: возбуждение 554 nm с детекцией излучения 570–650 nm (РИТЦ), возбуждение 670 nm с детекцией излучения 700–795 nm (Ци7). Распределение микрокапсул по размерам оценивали с использованием флуоресцентных изображений и свободно распространяемого ПО ImageJ за счет измерения диаметра 100 микрокапсул.

Измерения оптической плотности растворов флуоресцентных конъюгатов были произведены с помощью микропланшетного ридера (Synergy H1, BioTek, США). Спектр поглощения растворов был записан в диапазоне 400–850 nm. Для построения калибровочных прямых были произведены измерения оптической плотности растворов в единичной точке: 525 nm для БСА-РИТЦ и 762 nm для БСА-Ци7. На рис. 1 представлены спектры флуоресцентных конъюгатов и калибровочные прямые, рассчитанные по измерению оптической плотности растворов с известной концентрацией данных конъюгатов.

В дальнейшем измерения всех супернатантов для оценки эффективности иммобилизации и кинетики высвобождения флуоресцентных конъюгатов были произведены при тех же настройках. Значения концентраций конъюгатов в супернатантах рассчитаны по представленным на рис. 1 калибровочным прямым. Под эффективностью иммобилизации подразумевается отношение массы иммобилизованного конъюгата к общей массе конъюгата, добавленного для включения в состав носителя, выраженное в процентах:

$$\text{Эффективность иммобилизации} = \frac{M_{\text{исх}} - M_{\text{с-н}}}{M_{\text{исх}}} \times 100,$$

где $M_{\text{исх}}$ — масса флуоресцентного конъюгата, добавленная при синтезе ватеритных ядер (БСА-Ци7) или формирования слоев (БСА-РИТЦ), $M_{\text{с-н}}$ — масса флуоресцентного конъюгата, вышедшая в раствор на всех этапах приготовления микрокапсул.

Оценка динамики высвобождения флуоресцентных конъюгатов из состава микрокапсул под действием фермента трипсина

Оценка зависимости количества высвобождаемых флуоресцентных конъюгатов при соинкубации микрокапсул с ферментом трипсином была произведена, опираясь на методику, представленную в работе [29]. Был приготовлен раствор трипсина в ФСБ с концентрацией 100 $\mu\text{g/mL}$. К 100 μL суспензии капсул в ФСБ с концентрацией 10⁸ $\mu\text{capsule/mL}$ было добавлено 200 μL раствора фермента. Дальнейшая инкубация была осуществлена при 37°C и постоянном встряхивании (300 rpm). Через 5, 15, 30 min, 1 и 3 h инкубация образцов останавливалась, отбор супернатантов был проведен за счет центрифугирования (1000 rcf) и отбора жидкости под осадком. Для каждой временной точки были приготовлены отдельные исследуемые смеси при трех повторениях. Измерения оптической плотности супернатантов были произведены на длинах волн 525 nm (БСА-РИТЦ) и 762 nm (БСА-Ци7). Расчет высвободившегося количества флуоресцентных конъюгатов был произведен согласно калибровочным прямым.

Исследования, проводимые на животных

Все экспериментальные процедуры выполнены на белых мышках-самцах Balb/c в возрасте 6–8 недель (масса 20–25 g) под общей анестезией (смесь Золетила (40 mg на 1 kg, 50 μL , Virbac SA, Carros, Франция) и 2% раствора Рометара (10 mg на 1, kg, „Спофа“, Чехия)) путем внутрибрюшинного введения. По окончании эксперимента животных подвергали эвтаназии путем передозировки наркоза.

Методика внутриартериального введения микрокапсул

Направленная доставка суспензии микрокапсул в почку была реализована за счет имплантации полиэтиленового катетера (PE-10, Scientific Commodities INC., Лейк-Хавасу-Сити, Аризона, США) с тонкой полиуретановой внутрисосудистой трубкой на конце (40 mm, полиуретановая трубка, 32ga/8Fr, 0.005 \times 0.010 inch, Instech, США) в левую почечную артерию. Тонкую часть наполненного физиологическим раствором катетера имплантировали через правую бедренную артерию в брюшную аорту до места соединения тонкой и толстой частей катетера. В ходе данной процедуры расположение катетера в сосудистом русле проверяли по его наполнению артериальной кровью при вытягивании поршня шприца, соединенного с катетером. Далее животное переворачивали на правый бок и делали небольшой разрез (8–10 mm) на левом боку параллельно позвоночнику (2–3 mm от него) над почкой. На следующем этапе находили место соединения левой почечной артерии с

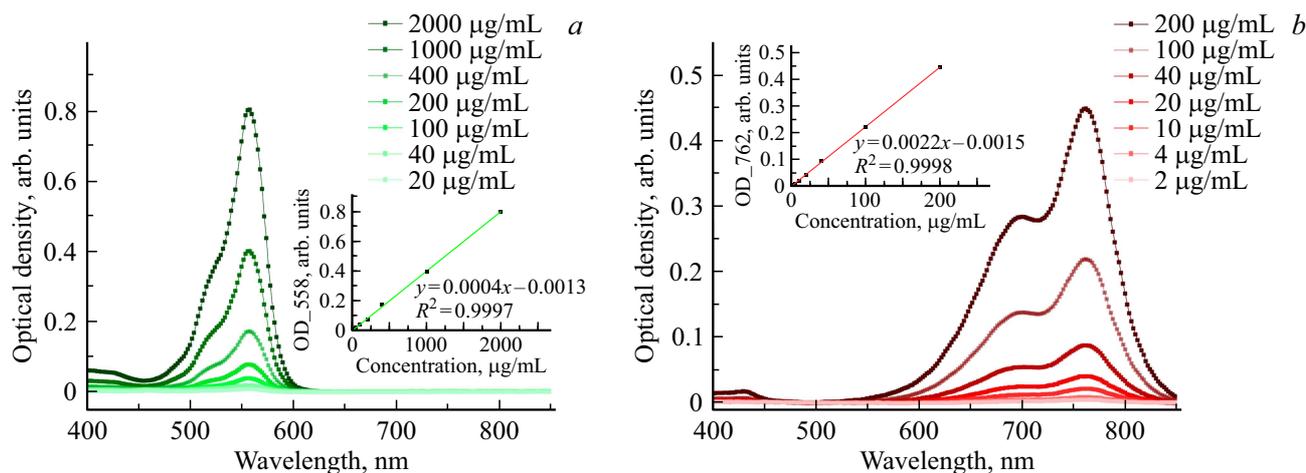


Рис. 1. Результаты спектрофотометрии флуоресцентных конъюгатов: *a* — спектры поглощения растворов БСА-РИТЦ (на вставке представлена калибровочная прямая), *b* — спектры поглощения растворов БСА-Ци7 (на вставке представлена калибровочная прямая).

брюшной аортой, а затем очищали его от жировой и соединительной тканей ватными тампонами для лучшего обзора. Далее убеждались, что катетер находится внутри брюшной аорты и его конец можно осторожно прощупать пинцетом. Затем катетер немного оттягивали от бедренной артерии так, чтобы его конец находился в аорте на 3 мм выше места соединения с почечной артерией. После чего конец катетера осторожно вводили в левую почечную артерию. Следует обратить внимание, что диаметр почечной артерии несколько больше диаметра катетера, благодаря чему кровь может поступать в почку в небольшом количестве во время описанных манипуляций.

На последнем этапе операции в почечную артерию вводили суспензию капсул в выбранной дозировке (с учетом „мертвого объема“ катетера). Процедура введения занимала 10–15 с для обеспечения однородного распределения вводимой суспензии по сосудам почек. В момент введения необходимо плотно прижать стенки почечной артерии к стенкам катетера пинцетом, чтобы избежать попадания капсулы в аорту, но не перекрыть просвет катетера. Через минуту после введения капсул пинцет убрали, аккуратно вытаскивали катетер из сосудов и перевязывали бедренную артерию во избежание кровотечения. В конце операции зашивали мышечный слой и кожу и через 30 мин вводили раствор гепарина через хвостовую вену во избежание тромбоза конечностей. Детальное описание манипуляций при введении в почечную артерию описано в работе [30]. Стоит избегать сильного и длительного механического воздействия на сосуды до имплантации катетера в артерию. Почка должна сохранять нормальный цвет и кровоснабжение на всех этапах операции до этого момента. Только в этом случае можно правильно оценить влияние вводимых лекарств и контейнеров с лекарственными препаратами на почечную ткань.

Биораспределение микрокапсул *in vivo* и *ex vivo*

Систему визуализации IVIS SpectrumCT In Vivo (PerkinElmer, Уолтем, Массачусетс, США) использовали для оценки биораспределения флуоресцентного маркера БСА-Ци7 в организме мышей после инъекции в почечную артерию в свободной форме или в составе микрокапсул. Возбуждение и эмиссия были установлены на 745 и 800 нм соответственно. Постобработка полученных данных была проведена с помощью программного обеспечения Living Image 4.7.3.

На первом этапе исследований количество вводимых капсул было неизменным (10^6 микрокапсул), варьировали лишь объем введения (200, 100, 50, 20, 10 μL) до достижения преимущественной локализации флуоресцентного сигнала в целевой почке при *in vivo* визуализации животного, лежащего на животе (спиной, обращенной к детекторам). Далее проводили исследование влияния количества вводимых капсул ($0.25 \cdot 10^6$, $0.5 \cdot 10^6$, 10^6 , $5 \cdot 10^6$, $10 \cdot 10^6$, $20 \cdot 10^6$ капсул в 10 μL). Фотографии с совмещенными флуоресцентными изображениями были получены сразу после окончания всех манипуляций (15 мин после введения микрокапсул) *in vivo* и после умерщвления животных и диссекции органов (левая и правая почки, печень, легкие, селезенка и сердце) для *ex vivo* визуализации распределения флуоресцентной метки, ассоциированной с микрокапсулами, в указанных органах.

Общая излучающая эффективность (total radiant efficiency, TRE) для каждого органа измерялась в пределах их границ. Параметр TRE выражает общее количество фотонов в секунду из выбранной области с нормализацией интенсивности освещения. Доля флуоресценции конкретного органа была рассчитана как соотношение TRE данного органа к суммарному значению TRE по всем исследуемым органам животного, выраженное в процентах. Круговые диаграммы, построенные

по рассчитанным данным, были получены с помощью интернет ресурса <https://piechartmaker.co>. При подборе объема введения анализировали две области интереса, соответствующие расположению в организме целевой (левой) почки и печени.

Оценка перфузии целевой (левой) почки методом прижизненной спекл-визуализации

Оценку изменений кровотока левой почки после введения микрокапсул проводили *in vivo* в режиме реального времени на оригинальной системе лазерной спекл-контрастной визуализации (ЛСКВ). Разрез на спине мыши, сделанный параллельно позвоночнику в области левой почки, освобождали от окружающих тканей и фиксировали. Измерения проводились под общей анестезией и непосредственно с поверхности левой почки до и через 15 min, 24 и 120 h после введения микрокапсул в почечную артерию. Сбор данных о кровотоке начинался после стабилизации гемодинамических параметров. Изменение кровотока оценивали на 6 группах мышей: животные без инъекции (контрольная группа), после введения физиологического раствора (ложнооперированная группа), после введения суспензии микрокапсул в следующих дозах: $0.25 \cdot 10^6$, $0.5 \cdot 10^6$, 10^6 , $5 \cdot 10^6$, $10 \cdot 10^6$, $20 \cdot 10^6$ капсул в $10 \mu\text{L}$. Значения кровотока, измеренные перед инъекцией, были приняты за базовые значения. Базовые значения были рассчитаны для каждой мыши отдельно. Все измерения кровотока были нормализованы по индивидуальным базовым значениям, а изменения были рассчитаны в процентах.

Лазерный диод Thorlabs CPS635S с помощью рассеивающей линзы из матового стекла (Thorlabs DG10-220-MD) и собирающей линзы (Thorlabs LA1131-ML) равномерно освещал поверхность целевой почки. Для съемки субъективной картины спеклов были использованы цифровая камера Basler a2A2600-64ucBAS и фотообъектив Navitar MVL25M1. Анализируя пространственный спектр спекл-рисунка, диафрагма линзы была настроена так, чтобы она удовлетворяла критерию Найквиста. Линейный поляризатор был помещен перед фотолинзой и настроен так, чтобы соответствовать поляризации лазерного источника. Время экспозиции и частота кадров цифровой камеры были установлены на 10 ms и 30 кадров в секунду соответственно. Специально разработанное программное обеспечение на базе Python было использовано для управления системой ЛСКВ и обработки полученных спекл-изображений. Пространственный спекл-контраст был рассчитан как отношение стандартного отклонения интенсивности пикселей к их среднему значению в скользящем окне $5 \times 5 \text{ mm}$ [31]. Для увеличения отношения сигнал/шум в вычисленных спекл-контрастных изображениях проводили усреднение по 25 последовательным кадрам спекл-контрастности. Каждая карта кровотока была сглажена фильтром Гаусса с $\sigma = 7$ в пространственном измерении, чтобы устранить высокочастотные колебания

и оставить только грубые изменения кровотока. Для каждого набора данных была выбрана область интереса размером $200 \times 200 \text{ pixel}$; среднее значение и стандартное отклонение были рассчитаны в выбранной области интереса. Обработка данных была проведена с помощью пакетов NumPy v.1.16.5. и SciPy v.1.3.1. базовой версии Python 3.6.

Гистологическое исследование целевой (левой) почки

Почки подвергали гистологическому исследованию через 120 h (5 дней) после введения в левую почечную артерию микрокапсул в дозах $5 \cdot 10^6$ и $20 \cdot 10^6$ капсул в $10 \mu\text{L}$ физиологического раствора. Образцы тканей фиксировали в нейтральном формалине. Затем органы высушивали дегидратированным изопропиловым спиртом и заливали в парафин. Слайды толщиной $5 \mu\text{m}$ окрашивали гематоксилином и эозином. Морфологический анализ гистологических образцов проводили с использованием системы анализа цифровых изображений Olympus.

Результаты и дискуссия

Эффективность и безопасность доставки препаратов в свободной или инкапсулированной форме в почку через почечную артерию во многом зависит от правильности процедуры их введения. Колоссальное значение имеет каждая деталь, начиная от скорости и аккуратности хирургических манипуляций до размеров используемых носителей. Как было показано ранее [30], увеличение размера микрокапсул на 29% ведет к необходимости снижать количество вводимых капсул наполовину для сохранения безопасного режима дозирования. Преимуществом использования систем доставки лекарственных средств является возможность их механического удержания за счет адгезии к эндотелию кровеносных сосудов и последующее высвобождение инкапсулированного вещества [32]. Таким образом, в области интереса формируется источник терапевтического или биологически активного вещества до момента полной деградации матрицы или ее смывания со стенки кровеносного сосуда потоком крови.

В данном исследовании были использованы микрокапсулы, которые состоят из полиаргинина и сульфата декстрана с оценочным диаметром $3.7 \mu\text{m}$ ($\pm 0.6 \mu\text{m}$). На рис. 2, а показано изображение микрокапсул, полученное с помощью сканирующего электронного микроскопа. Из морфологии объектов на данном изображении можно сделать вывод, что микрокапсулы имеют сферическую форму и содержат полость внутри (складки на поверхности капсул свидетельствуют о том, что оболочка, имеющая толщину около 50 nm [14] и не имеющая твердого основания, не сохраняет свою форму и схлопывается при высушивании). Возможность иммобилизации

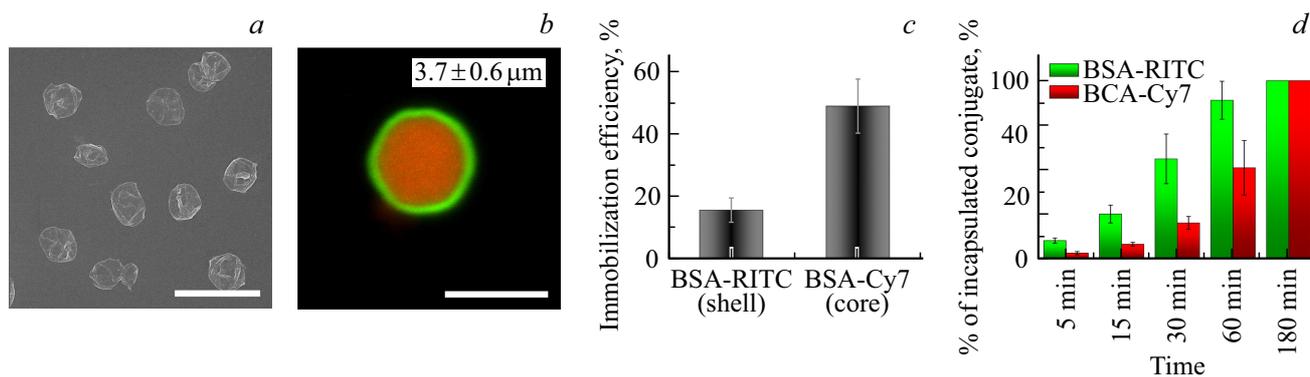


Рис. 2. Визуализация микрокапсул и схемы внутриартериального введения: *a* — СЭМ-изображение микрокапсул из полиаргинина и сульфата декстрана, масштабный отрезок $10\ \mu\text{m}$; *b* — флуоресцентное изображение микрокапсулы, полученное с помощью лазерного конфокального сканирующего микроскопа Leica TCS SP8 X, красный цвет визуализирует конъюгат БСА-Ци7, зеленый цвет — БСА-РИТЦ, масштабный отрезок $5\ \mu\text{m}$, в верхнем правом углу представлены средний диаметр и стандартное отклонение, рассчитанные по измерению диаметров 100 микрокапсул с помощью свободно распространяемого программного обеспечения ImageJ; *c* — гистограмма эффективности иммобилизации флуоресцентных конъюгатов БСА-РИТЦ в оболочку в ходе формирования полиэлектrolитных слоев и БСА-Ци7 в процессе синтеза ватеритных ядер; *d* — динамика высвобождения флуоресцентных конъюгатов из состава микрокапсул при ферментативной деградации носителей.

полезного груза как в ядре, так и в оболочке микрокапсулы показана за счет первичной копреципитации флуоресцентного конъюгата (БСА-Ци7) во время синтеза ватеритных ядер и адсорбции другого флуоресцентного конъюгата (БСА-РИТЦ) во время формирования слоев соответственно. В итоговых капсулах флуоресцентные конъюгаты не смешиваются и наглядно визуализируют структурные элементы: внутреннее пространство и оболочку (рис. 2, *b*). Иммобилизация во внутреннем пространстве и оболочке имеет различную эффективность (рис. 2, *c*) и профиль высвобождения при деградации микрокапсул (рис. 2, *d*), что может быть использовано при планировании стратегии терапии. В *in vivo* экспериментах в настоящем исследовании БСА-Ци7 был использован в качестве модельного макромолекулярного груза, чью локализацию возможно визуализировать методом флуоресцентной томографии благодаря возбуждению и эмиссии, находящихся в окне оптической прозрачности биологических тканей.

Микрокапсулы на основе полиаргинина и сульфата декстрана были использованы для доставки в почку, поскольку обладают рядом уникальных свойств, таких как (i) способность к механической деформации из-за отсутствия твердого ядра, что, как ожидалось, помогло бы сохранить нормальный кровоток в сосудах, где бы они накапливались [33,34], (ii) крайне низкая токсичность [35], (iii) полная биodeградация в течение нескольких недель [36] и (iv) возможность функционализации оболочки микрокапсул за счет использования флуоресцентных агентов [37] и наночастиц [38].

Эндоваскулярный метод позволяет локально повысить концентрацию вводимых веществ в сосудах целевых органов как для диагностики [39], так и для терапии [40]. Однако высокая концентрация свободного вещества сохраняется всего несколько секунд. Возможность про-

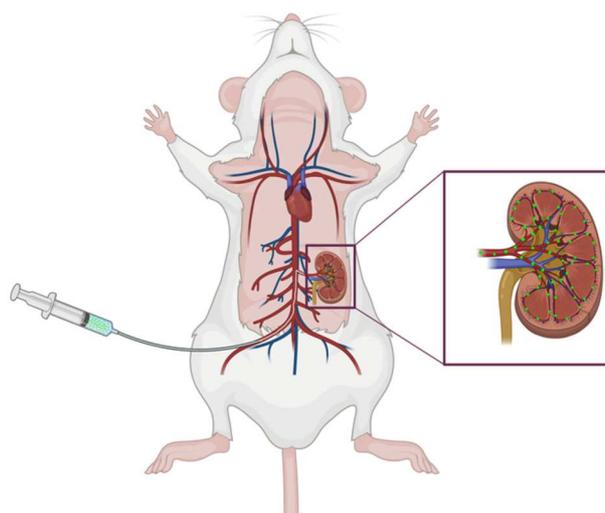


Рис. 3. Схема имплантации катетера через бедренную артерию и достижения почечной артерии для последующей инъекции суспензии микрокапсул в физиологическом растворе. Изображение получено с помощью Biorender.com.

длить присутствие терапевтического/диагностического вещества может быть реализована благодаря использованию систем доставки, таких как микрокапсулы. Однако существует риск эмболизации — длительной или необратимой закупорки сосудов почек, приводящей к различным осложнениям. Хотя необратимая эмболизация обычно используется в экспериментальной наномедицине и клинической практике перед тотальной нефрэктомией, в большинстве случаев она не подходит для лечения заболеваний почек из-за отсутствия возможности вернуть органу нормальное кровоснабжение и правильное функционирование.

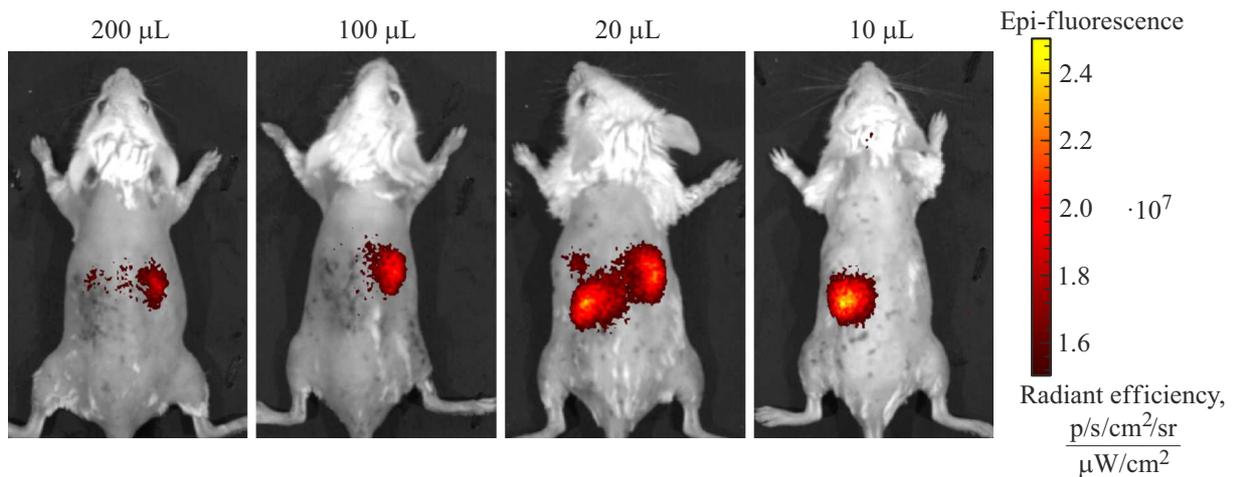


Рис. 4. Совмещенные прижизненные фотографии и флуоресцентные изображения животных через 15 min после внутриаптериальной инъекции 10^6 капсул, содержащих флуоресцентный конъюгат БСА-Ци7, в различных объемах физиологического раствора, полученные с помощью системы визуализации IVIS SpectrumCT In Vivo.

На рис. 3 представлена схема проведения хирургических манипуляций с целью подведения конца катетера ко входу левой почечной артерии в целевой орган (левую почку) через бедренную артерию для инъекции микрокапсул непосредственно в левую почку. В момент, когда суспензия микрокапсул уже введена, но пинцет все еще блокирует кровоток, наибольшее количество капсул находятся в сосудах целевой почки и может адгезировать к эндотелию пока нет движения кровотока. В клинической практике для временной блокировки кровотока можно использовать стандартные эндоваскулярные катетеры с баллонами [41]. В наших экспериментах мы не блокировали кровоток более чем на 1 min, что, как покажем далее, позволило сохранить нормальное морфологическое состояние тканей почки-мишени. На последнем этапе операции катетер полностью вытягивали из сосудов, восстанавливая перфузию органа таким образом.

На первом этапе исследований был подобран оптимальный объем инъекции в почечную артерию так, чтобы *in vivo* визуализация животного, лежащего на животe, демонстрировала локализацию флуоресцентного агента (БСА-Ци7) преимущественно в целевом органе (рис. 4). Первым протестированным объемом была инъекция 10^6 микрокапсул в $200 \mu\text{L}$. Данный объем близок к верхнему краю допустимых объемов при внутривенном введении без провоцирования нежелательных последствий, таких как тахикардия, вследствие чрезмерной гемодилюции [3]. В то же время из соображений логики большой объем инъекции выглядел предпочтительнее во избежание необратимой эмболизации, так как фиксированное количество микрокапсул в большем объеме распределено разрежено и вероятность закупорки кровеносного сосуда агрегатом капсул ниже. После введения 10^6 капсул в $200 \mu\text{L}$ физиологического раствора на IVIS-изображении заметно преобладающее распре-

деление флуоресцентного сигнала в противоположной почке. Постепенное возрастание сигнала от обеих почек при уменьшении объема наглядно показано на рис. 4. Предположительно при большом объеме введения суспензия микрокапсул замещает кровь не только в целевом органе, но и в сосудах, сообщающихся или находящихся ниже по руслу кровотока, а микрокапсулы разносятся по всему организму в дальнейшем. Сосуды противоположной почки наиболее близко расположены к целевому органу, и большая часть введенных микрокапсул наиболее вероятно проходит через них, формируя тот сигнал, что показан на рис. 4. С уменьшением объема введения все меньше микрокапсул покидает целевой орган, и минимальное значение в $10 \mu\text{L}$ обеспечивает преимущественную локализацию вводимых микрокапсул в левой почке.

После определения оптимального объема введения, обеспечивающего локализацию преимущественно в целевом органе в первые минуты после введения, было изучено влияние количества вводимых микрокапсул на эффективность их распределения в левой почке. Как видно из представленных на рис. 5, *a* изображений и гистограммы на рис. 5, *c*, с увеличением количества вводимых микрокапсул возрастала интенсивность детектируемого флуоресцентного сигнала (БСА-Ци7) в области левой почки, ассоциированного с носителями. Вставки на рис. 5, *a* и *b* демонстрируют пространственные расположения микрокапсул в инъектируемых суспензиях соответствующих концентраций. Самая низкая концентрация оказалась неэффективной с точки зрения обеспечения адгезии к эндотелию кровеносных сосудов левой почки. Таким образом, в случае введения $0.25 \cdot 10^6$ микрокапсул после восстановления кровоснабжения целевого органа основная часть носителей вымылась и задерживалась в печени как все микроразмерные системы доставки [36]. С возрастанием концентрации мик-

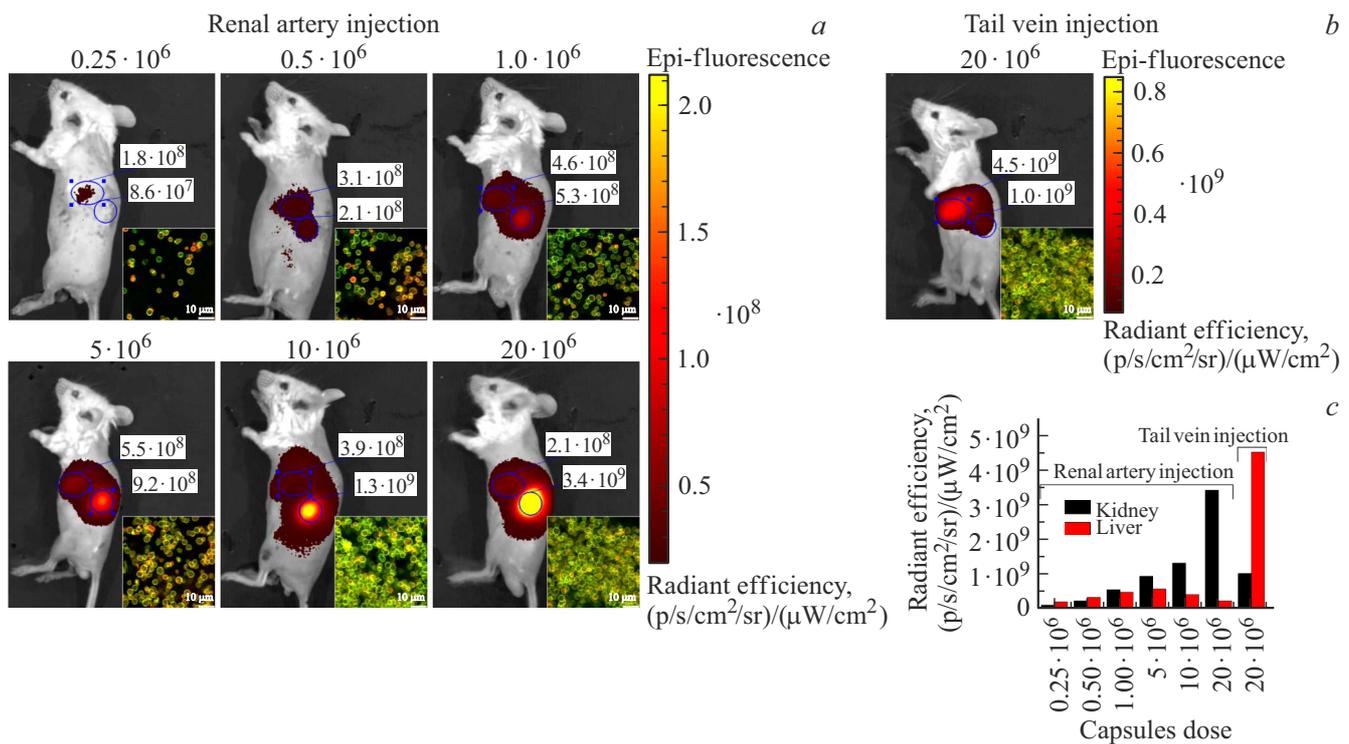


Рис. 5. Определение количества вводимых микрокапсул, обеспечивающих эффективную аккумуляцию в целевой почке: *a* — совмещенные прижизненные фотографии и флуоресцентные изображения животных через 15 min после внутриартериального введения $0.25 \cdot 10^6$, $0.5 \cdot 10^6$, 10^6 , $5 \cdot 10^6$, $10 \cdot 10^6$, $20 \cdot 10^6$ капсул в $10 \mu\text{L}$ физиологического раствора; *b* — совмещенные прижизненные фотографии и флуоресцентные изображения животного через 15 min после внутривенного введения $20 \cdot 10^6$ капсул в $10 \mu\text{L}$ физиологического раствора, на изображениях приведены значения TRE для области печени (область, очерченная верхним овалом) и левой почки (область, очерченная нижней окружностью), в нижнем правом углу представлены флуоресцентные изображения микрокапсул в концентрациях, соответствующих вводимым в животных, масштабный отрезок составляет $10 \mu\text{m}$; *c* — гистограмма достигаемых значений общей излучающей эффективности (TRE) левой почки и печени при введении различных доз микрокапсул.

рокапсул кровеносные сосуды плотнее были „набиты“ ими, что способствовало тесному взаимодействию большего числа микрокапсул с внутренней поверхностью кровеносных сосудов и увеличению вероятности и силы адгезии к ней настолько, что при восстановлении потока крови носители смогли удержаться в левой почке. Сравнение эффективности распределения флуоресцентного конъюгата в составе микрокапсул при внутриартериальном и внутривенном введениях показало возможность сокращения вводимой дозы в 4 раза для обеспечения близких значений TRE (рис. 5, *c*). В результате внутриартериального введения $5 \cdot 10^6$ микрокапсул были достигнуты значения TRE, близкие значениям, получаемым при внутривенном введении $20 \cdot 10^6$ микрокапсул.

Детальное исследование биораспределения флуоресцентного агента (BCA-Ци7), иммобилизованного в микрокапсулы, через 15 min после завершения всех хирургических манипуляций было проведено *ex vivo*, результаты расчетов значений TRE отдельных органов представлены на рис. 6. Полученные данные подтверждают ранее представленные выводы: (i) чем выше концентрация введения, тем больший процент от введенной дозы

задерживается в целевом органе, (ii) чем разреженнее вводимая суспензия (малые концентрации введения), тем больше микрокапсул накапливается в печени. По результатам флуоресцентной визуализации *in vivo* и *ex vivo* внутриартериальное введение $20 \cdot 10^6$ капсул позволяет получить наиболее эффективную адресацию микрокапсул в левую почку.

Вероятным механизмом накопления микрокапсул в почках является их механическое застревание в области изгибов и бифуркаций капилляров, где имеются участки с низкой скоростью кровотока. Попадая в такие зоны, капсулы замедляются и накапливаются в случае высокой концентрации вводимой суспензии, что приводит к частичной (временной) или полной (необратимой, как будет показано далее) закупорке капилляров. Микронный размер капсул, сопоставимый с диаметром капилляров мышей [42], в данном случае является преимуществом, поскольку обеспечивает их застревание при первом прохождении через целевой орган. Этим в работе [14] объясняется большое скопление капсул в капиллярной сети клубочков, которая сильно разветвлена и первой встречается на пути вводимых капсул. Прошлые иссле-

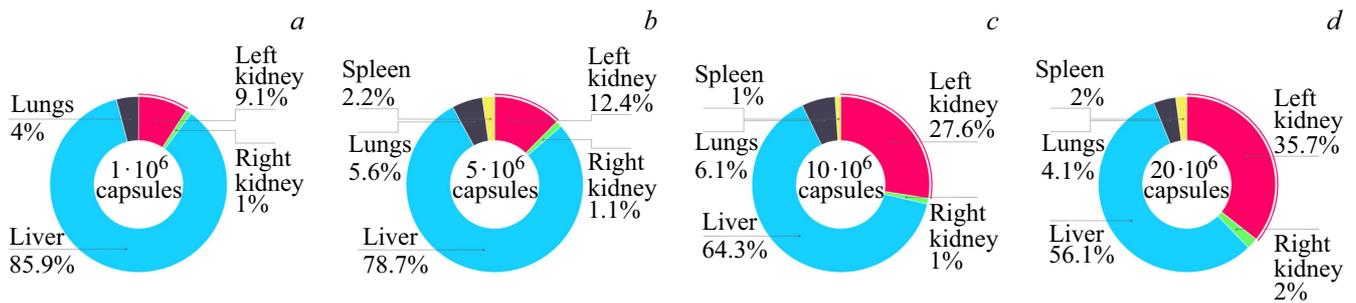


Рис. 6. Биораспределение флуоресцентного сигнала от конъюгата БСА-Ци7, ассоциированного с микрокапсулами, через 15 мин после внутриартериального введения 10^6 , $5 \cdot 10^6$, $10 \cdot 10^6$, $20 \cdot 10^6$ капсул в $10 \mu\text{L}$ физиологического раствора.

дования также показали, что во многом архитектура сосудистого русла позволяла удерживать микрокапсулы в том или ином месте [33].

Благодаря системе визуализации IVIS SpectrumCT In Vivo удалось быстро подобрать два методически важных параметра: объем введения ($10 \mu\text{L}$) и количество вводимых микрокапсул ($20 \cdot 10^6$ капсул). Однако такой метод исследования не дает представления о вреде, наносимом целевому органу. С этой целью были проведены измерения кровотока левой почки мышей, выполненные с помощью системы ЛСКВ (рис. 7), после введения в левую почечную артерию суспензии микрокапсул в тех же дозах, какие были использованы в экспериментах по оценке биораспределения *in vivo* (рис. 5). Регистрация данных и их запись были осуществлены в некоторой области (рис. 7, b), так как поверхность почки имеет одинаковое строение на всей площади, а сосудистая сеть изотропна. Данные регистрировали перед инъекцией, а также через 15 min, 24 и 120 h после инъекции для каждого животного. Результаты представлены как разность значений базального кровотока (до манипуляций) и после введения в конкретной временной точке, нормированная на базальное значение. Чтобы отличить эффект от введения микрокапсул от эффекта хирургического вмешательства, были сформированы две дополнительные группы: контрольная группа (регистрация кровотока без инъекции в те же моменты времени с учетом среднего времени операции (40 min) и группа ложноперированных животных (внутриартериальное введение $10 \mu\text{L}$ физиологического раствора).

Незначительное изменение кровотока, в пределах 20%, детектируемое в контрольной группе, является физиологически нормальным явлением и может быть обусловлено влиянием наркоза. В результате введения микрокапсул уровень кровотока изменился значительно. Через 15 min после инъекции кровоток снижался в среднем на 50% при дозах $0.25 \cdot 10^6$, $0.5 \cdot 10^6$, 10^6 и $5 \cdot 10^6$ микрокапсул и на 60–80% при дозах $10 \cdot 10^6$ и $20 \cdot 10^6$. Также наблюдалось снижение кровотока в группе ложноперированных животных на 30–50%, что позволяет предположить, что изменения кровотока до 50% являются скорее реакцией на введение некоторого объема жидкости ($10 \mu\text{L}$), чем непосредственно на

введение капсул, и стремятся к минимуму уже через 24 h. Однако через 24 и 120 h после инъекции характер изменения кровотока был различным для экспериментальных групп животных. У животных, получивших дозу $0.25 \cdot 10^6$, $0.5 \cdot 10^6$, 10^6 и $5 \cdot 10^6$ микрокапсул, уровень кровотока стремился вернуться к базальному значению (детектируемое снижение не превышает 20% на временных точках 24 и 120 h). В группе животных с дозой $10 \cdot 10^6$ и $20 \cdot 10^6$ микрокапсул уровень кровотока оставался патологически низким через 24 h и даже 120 h после инъекции (менее 50% относительно базальных значений). Более длительная временная окклюзия отдельных капилляров, которая, вероятно, сопровождает введение $10 \cdot 10^6$ и $20 \cdot 10^6$ микрокапсул, замедляет процесс реперфузии, что отмечают и другие авторы [43].

После удаления катетера из артерии кровь постепенно начинает поступать в почку, но капсулы в капиллярах не позволяют сделать это сразу. Данная гипотеза была подтверждена снижением кровотока через 15 min после инъекции (рис. 7). Тем не менее капсулы предположительно со временем выталкиваются из капилляров под давлением крови. Вероятно, это связано со способностью к механической деформации, как было показано ранее *in vitro* с использованием сужающихся стеклянных капилляров [44]. Капсулы, вытесненные кровью, поступают в выносящие артериолы, но их концентрация в капиллярной сети канальцев ниже, что снижает вероятность их скопления и прилипания к эндотелию. Далее с током крови капсулы распространяются по большому кругу кровообращения и накапливаются в печени, как и при обычном системном введении. Однако если доза носителей очень велика, то микрокапсулы необратимо закупоривают клубочки.

В современной литературе есть ряд работ, посвященных изучению явления адгезии носителей разного размера, формы, жесткости к эндотелию при движении в кровотоке. Так, в работе [45] выделяют следующие параметры, влияющие на адгезию носителей: свойства самих носителей (геометрия, плотность лигандов на поверхности носителей, аффинность лигандов к рецепторам эндотелия) и биофизические свойства стенки кровеносного сосуда (эндотелиальная скорость сдвига, плотность рецепторов на поверхности эндотелия). Таким образом,

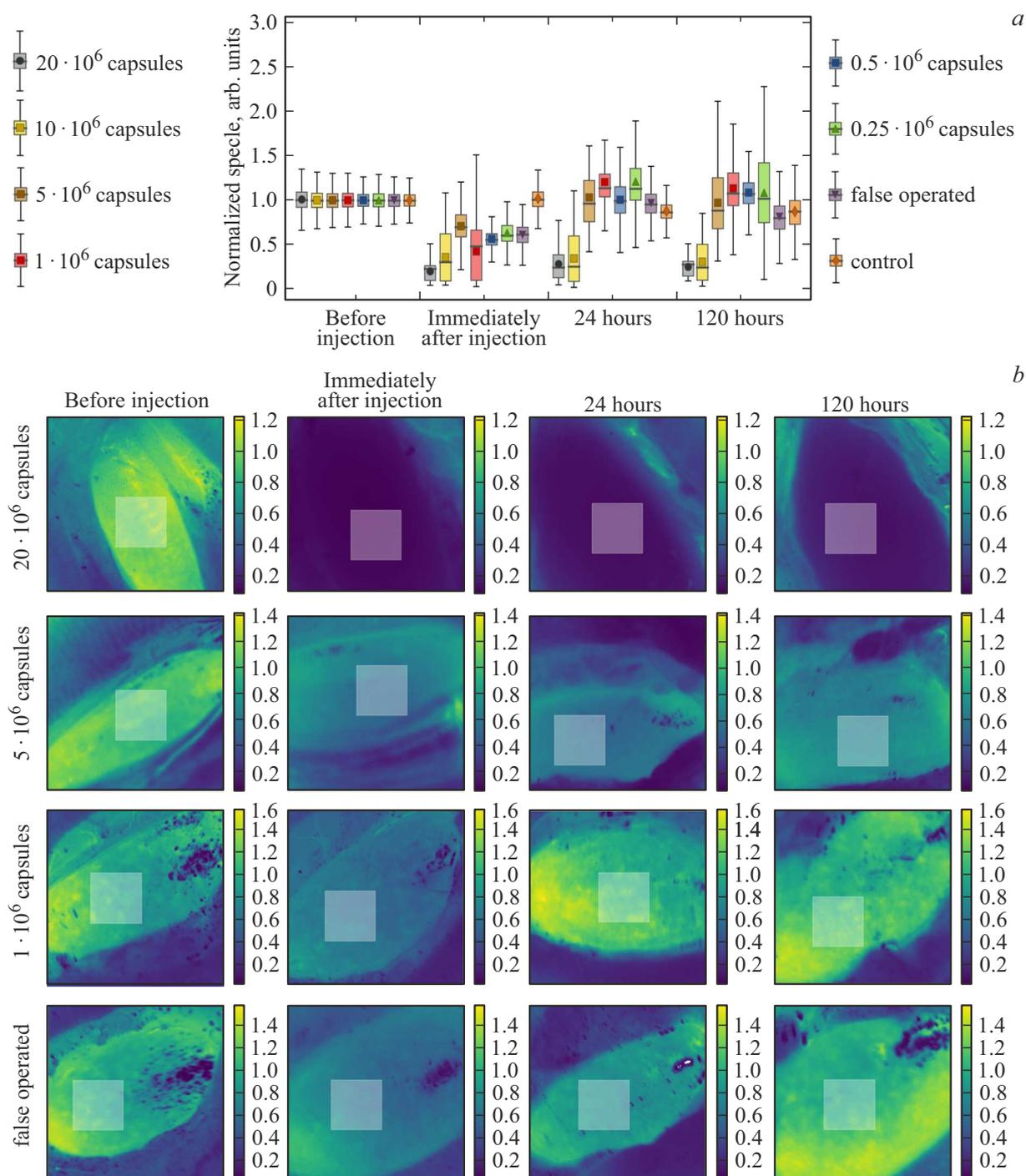


Рис. 7. Наблюдение изменений кровотока в целевой почке при введении микрокапсул в различной дозе с помощью ЛСКВ: *a* — результаты анализа спекл-картин поверхности почки до, сразу и через 24, 120 h после внутриартериальной инъекции микрокапсул в различных дозировках и чистого физиологического раствора, в качестве контрольной была рассмотрена группа животных без введения микрокапсул с учетом среднего времени операции (40 min); *b* — визуализация интенсивности кровообращения в приповерхностных сосудах органа, нормированная на базальный уровень в псевдоцветах, представлены характерные спекл-картины из следующих групп: ложноперированные животные и животные, получившие внутриартериальную инъекцию микрокапсул в дозе 10⁶, 5 · 10⁶ и 20 · 10⁶ микрокапсул.

есть параметры, обеспечивающие пассивную и активную адгезию носителей к эндотелию. Пассивные параметры адгезии применимы к носителям, полученным из любого

материала. Также в работе группы профессора Paolo Decuzzi показана математическая модель [46], доказывающая большую устойчивость прикрепления именно

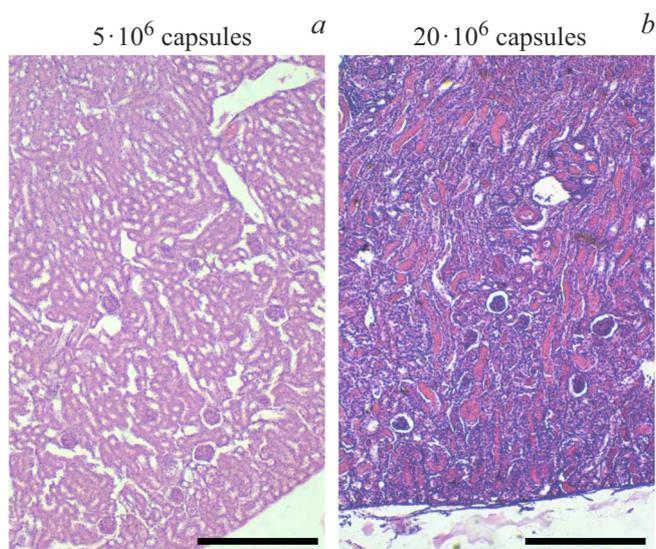


Рис. 8. Гистологические препараты целевых почек через 5 дней после внутриартериального введения (а) $5 \cdot 10^6$ и (б) $20 \cdot 10^6$ микрокапсул. Окрашивание гематоксилином и эозином. Масштабный отрезок $100 \mu\text{m}$.

деформируемых носителей, таких как микрокапсулы, не содержащие твердого ядра. Данные эффекты описаны для случая движения кровотока. Однако в настоящей статье предложена методика введения микрокапсул, при которой на очень короткий срок (не более 90 с) ток крови в целевом органе полностью прекращается, а сама кровь заменяется на суспензию микрокапсул. Дизайн методики введения подразумевает создание на малый промежуток времени условий, благоприятных для адгезии микрокапсул к эндотелию. То есть в кровеносных сосудах почки в течение примерно 90 с после введения микрокапсул отсутствуют силы, препятствующие взаимодействию микрокапсул с эндотелием. После удаления катетера из ренальной артерии кровь снова заходит в орган и стремится смыть все, что не имеет плотной связи с эндотелием. В данной методике очень важно найти баланс в количестве вводимых микрокапсул в целевой орган. Так как в ходе первого этапа (адгезии носителей к эндотелию) чем больше микрокапсул введено, тем больше их придет в плотное соприкосновение со стенкой кровеносного сосуда. Однако в ходе второго этапа операции (восстановления кровотока) в случае, когда доза введенных капсул чрезмерна, происходит механическое забивание мелких сосудов и их необратимая закупорка.

Гистологическое исследование тканей целевого органа через 5 дней после внутриартериального введения (рис. 8) показало сохранение нормальной морфологии всех структур почек мышей, получивших инъекцию не более $5 \cdot 10^6$ микрокапсул, и выявило признаки нарушения перфузии крови, острой ишемии и некроза в левой почке у животных после введения самых больших доз ($10 \cdot 10^6$ и $20 \cdot 10^6$ капсул). На рис. 8 представлены

характерные микрофотографии тканей с ненарушенной и поврежденной структурой.

Морфологические признаки ишемического повреждения левой почки были выявлены практически у всех животных после инъекции $10 \cdot 10^6$ и $20 \cdot 10^6$ капсул, но были выражены в разной степени. Эпителий канальцев находился в отечном состоянии. Контуры и ядра нефроцитов были размыты. Просвет канальцев имел красное содержимое (клеточный лизат и эритроциты) или был полностью закупорен. По периферии зон некроза наблюдалась гиперемия сосудов и капилляров в сохранившихся клубочках. Капсулы Боумена не были равномерно расширены. Капиллярные клубочки имели разные размеры, что, вероятнее всего, обусловлено повреждением и отеком эндотелиальных клеток. В строме наблюдалась очаговая лейкоцитарная инфильтрация (демаркационная зона), ограничивающая нормальные и некротические участки почечной ткани. Важно отметить, что противоположная почка (правая почка) имела абсолютно нормальное морфологическое строение. Таким образом, классический метод выявления патологических процессов подтвердил результаты, полученные с помощью ЛСКВ. Отсутствие восстановления кровотока к базальным значениям свидетельствует о серьезных нарушениях, вызванных введением чрезмерно большой дозы микрокапсул.

Доза в $20 \cdot 10^6$ микрокапсул, определенная с помощью флуоресцентной томографии как наиболее эффективная, на деле оказалась небезопасной и влекущей за собой патологические изменения органа-мишени. По результатам ЛСКВ, верифицированных методом классического гистологического анализа, доза в $5 \cdot 10^6$ микрокапсул является верхней границей безопасных дозировок. Таким образом, именно $5 \cdot 10^6$ микрокапсул в $10 \mu\text{L}$ является предпочтительным режимом дозирования, обеспечивающим наибольшее накопление в целевом органе при сохранении нормального состояния и функций органа.

Выводы

Применение современных методов биофотоники на самых ранних этапах определения стратегии терапии с помощью новых систем доставки лекарственных средств позволяет быстро и точно подобрать режим дозирования, что в дальнейшем помогает избежать нежелательных негативных последствий, обусловленных нерационально подобранными параметрами введения лекарственной формы в организм. На примере адресной доставки микрокапсул в левую почку мыши были показаны преимущества использования системы визуализации IVIS SpectrumCT In Vivo для подбора оптимальных параметров вводимой суспензии микрокапсул (объем и концентрация), обеспечивающих эффективную локализацию носителей в целевом органе. В то время как определение безопасности подобранных параметров с точки зрения сохранения нормального кровотока было

быстро и наглядно проведено с помощью лазерной спекл-контрастной визуализации. Комбинация двух указанных методов может заменить достаточно длительный и трудоемкий процесс приготовления и анализа гистологических препаратов в скрининговых исследованиях.

Соблюдение этических стандартов

Все действия с лабораторными мышами были проведены в соответствии с правилами Саратовского государственного медицинского университета (протокол Комитета по этике № 7 от 02.02.2021), Женевской конвенции 1985 г. (Международные руководящие принципы биомедицинских исследований с участием животных).

Финансирование работы

Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант РНФ 23-75-10070).

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] A.J. Claxton, J. Cramer, C. Pierce. *Clinical Therapeutics*, **23** (8), 1296–1310 (2001). DOI: 10.1016/S0149-2918(01)80109-0
- [2] C. Chen, M. Xie, J. Gong, N. Yu, R. Wei, L. Lei, S. Zhao, R. Li, X. Dong. *Frontiers in Pharmacology*, **14**, 1132367 (2023). DOI: 10.3389/fphar.2023.1132367
- [3] K. Diehl, R. Hull, D. Morton, R. Pfister, Y. Rabemampianina, D. Smith, J. Vidal, C. VanDe Vorstenbosch. *J. Applied Toxicology: Intern. J.*, **21** (1), 5–23 (2001). DOI: 10.1002/jat.727
- [4] S. Francisco. *J. Pharmaceutical Sciences*, **75** (9), 852–857 (1986). DOI: 10.1002/jps.2600750906
- [5] I. Du, C.T. Ion. *Pharmacometrics & Systems Pharmacology*, **10** (11), 1276–1280 (2021). DOI: 10.1002/psp4.12701
- [6] T. Betz, A. Wunder. *J. Biomedical Optics*, **13** (4), 041311–041311 (2021). DOI: 10.1002/psp4.12701
- [7] S. Biffi, C. Garrovo, P. Macor, C. Tripodo, S. Zorzet, E. Secco. *Molecular Imaging*, **7** (6), 7290 (2008). DOI: 10.2310/7290.2008.00028
- [8] M. Novoselova, V. Chernyshev, A. Schulga, E. Konovalova, R. Chuprov-Netochin, T. Abakumova, S. German, V. Shipunova, M. Mokrousov, E. Prikhozhenko, D. Bratashov, D. Nozdriukhin, A. Bogorodskiy, O. Grishin, S. Kosolobov, B. Khlebtsov, O. Inozemtseva, T. Zatsepin, S. Deyev, D. Gorin. *ACS Applied Bio Materials*, **5** (6), 2976–2989 (2022). DOI: 10.1021/acsabm.2c00289
- [9] Y.W. Jun, H.R. Kim, Y.J. Reo, M. Dai, K.H. Ahn. *Chemical Science*, **8** (11), 7696–7704 (2017). DOI: 10.1039/c7sc03362a
- [10] V.V. Tuchin, E.A. Genina, E.S. Tuchina, A.V. Svetlakova, Y.I. Svenskaya. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **180**, 114037 (2022). DOI: 10.1016/j.addr.2021.114037
- [11] V.V. Tuchin. *Handbook of coherent-domain optical methods*, 2nd ed. (Springer Science & Business Media, 2013). DOI: 10.1007/978-1-4614-5176-1
- [12] D.A. Boas, A.K. Dunn. *J. Biomedical Optics*, **15** (1), 011109 (2010). DOI: 10.1117/1.3285504
- [13] O.A. Sineeveva, R.A. Verkhovskii, A.S. Abdurashitov, D.V. Voronin, O.I. Gusliakova, A.A. Kozlova, O.A. Mayorova, A.V. Ermakov, E.V. Lengert, N.A. Navolokin, V.V. Tuchin, D.A. Gorin, G.B. Sukhorukov, D.N. Bratashov. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, **6** (1), 389–397 (2019). DOI: 10.1021/acsbiomaterials.9b01669
- [14] E.S. Prikhozhenko, O.I. Gusliakova, O.A. Kulikov, O.A. Mayorova, N.A. Shushunova, A.S. Abdurashitov, D.N. Bratashov, N.A. Pyataev, V.V. Tuchin, D.A. Gorin, G.B. Sukhorukov, O.A. Sineeveva. *J. Controlled Release*, **329**, 175–190 (2021). DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.11.051
- [15] M.A. Davis, S.S. Kazmi, A.K. Dunn. *J. Biomedical Optics*, **19** (8), 086001–086001 (2014). DOI: 10.1117/1.JBO.19.8.086001
- [16] J. Senarathna, S. Member, A. Rege, N. Li, N.V. Thakor. *IEEE Rev. Biomed. Engineering*, **6**, 99–110 (2013). DOI: 10.1109/RBME.2013.2243140
- [17] L.M. Richards, S.M.S. Kazmi, J.L. Davis, K.E. Olin, A.K. Dunn. *Biomedical Optics Express*, **4** (10), 2269–2283 (2013). DOI: 10.1364/BOE.4.002269
- [18] C. Linkous, A.D. Pagan, C. Shope, L. Andrews, A. Snyder, T. Ye, M. Valdebran. *JID Innovations*, **3** (5), 100187 (2023). DOI: 10.1016/j.xjidi.2023.100187
- [19] W. Heeman, E.C. Boerma, W. Heeman, W. Steenbergen, G.M. Van Dam, E.C. Boerma. *J. Biomedical Optics*, **24** (8), 080901 (2019). DOI: 10.1117/1.JBO.24.8.080901
- [20] A.V. Ermakov, R.A. Verkhovskii, I.V. Babushkina, D.B. Trushina, O.A. Inozemtseva, E.A. Lukyanets, V.I. Ulyanov, D.A. Gorin, S. Belyakov, M.N. Antipina. *Pharmaceutics*, **12** (7), 610 (2020). DOI: 10.3390/pharmaceutics12070610
- [21] O.A. Inozemtseva, D.V. Voronin, A.V. Petrov, V.V. Petrov, S.A. Lapin, A.A. Kozlova. *Colloid J.*, **80**, 771–782 (2018). DOI: 10.1134/S1061933X19010071
- [22] P.A. Demina, A.A. Abalymov, D.V. Voronin, A.V. Sadovnikov, M.V. Lomova. *Materials Chemistry Frontiers*, **5** (5), 2007–2018 (2021). DOI: 10.1039/d0qm00732c
- [23] N.A. Shushunova, O.A. Mayorova, E.S. Prikhozhenko, O.A. Goryacheva, O.A. Kulikov, V.O. Plastun, O.I. Gusliakova, A.R. Muslimov, O.A. Inozemtseva, N.A. Pyataev, A.A. Shirokov, D.A. Gorin, G.B. Sukhorukov, O.A. Sineeveva. *International J. Molecular Sciences*, **24** (3), 2784 (2023). DOI: 10.3390/ijms24032784
- [24] Y. Svenskaya, F. Garello, E. Lengert, A. Kozlova, R. Verkhovskii, V. Bitonto, M.R. Ruggiero, S. German, D. Gorin, E. Terreno. *Nanotheranostics*, **5** (3), 362 (2021). DOI: 10.7150/ntno.59458
- [25] O. Kopach, K. Zheng, L. Dong, A. Sapelkin, N. Voitenko, G. Sukhorukov, D.A. Rusakov. *Drug Delivery*, **25** (1), 435–447 (2018). DOI: 10.1080/10717544.2018.1431981
- [26] O.A. Mayorova, O.A. Sineeveva, M.V. Lomova, O.I. Gusliakova, Y.V. Tarakanchikova, E.V. Tyutyayev, S.I. Pinyayev, O.A. Kulikov, S.V. German, N.A. Pyataev, D.A. Gorin, G.B. Sukhorukov. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **28**, 102184 (2020). DOI: 10.1016/j.nano.2020.102184
- [27] A. Fery, R. Weinkamer. *Polymer*, **48** (25), 7221–7235 (2007). DOI: 10.1016/j.polymer.2007.07.050

- [28] D.V. Volodkin, N.I. Larionova, G.B. Sukhorukov. *Biomacromolecules*, **5** (5), 1962–1972 (2004). DOI: 10.1021/bm049669e
- [29] M.V. Lomova, A.I. Brichkina, M.V. Kiryukhin, E.N. Vasina, A.M. Pavlov, D.A. Gorin, G.B. Sukhorukov, M.N. Antipina. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **7** (22), 11732–11740 (2015). DOI: 10.1021/acsami.5b03263
- [30] O.I. Gusliakova, E.S. Prikhozhenko, V.O. Plastun, O.A. Mayorova, N.A. Shushunova, A.S. Abdurashitov, O.A. Kulikov, M.A. Abakumov, D.A. Gorin, G.B. Sukhorukov, O.A. Sindeeva. *Pharmaceutics*, **14** (5), 1056 (2022). DOI: 10.3390/pharmaceutics14051056
- [31] D.D. Duncan, S.J. Kirkpatrick, M. Larsson, T. Stromberg, O.B. Thompson. *J. Biomedical Optics*, **18** (6), 066018–066018 (2023). DOI: 10.1117/1.JBO.18.6.066018
- [32] B.V. Parakhonskiy, N.Y. Shilyagina, O.I. Gusliakova, A.B. Volovetskiy, A.B. Kostyuk, I.V. Balalaeva, L.G. Klapshina, S.A. Lermontova, V. Tolmachev, A. Orlova, D.A. Gorin, G.B. Sukhorukov, A.V. Zvyagin. *Appl. Materials Today*, **25**, 101199 (2021). DOI: 10.1016/j.apmt.2021.101199
- [33] D.V. Voronin, O.A. Sindeeva, M.A. Kurochkin, O.A. Mayorova, I.V. Fedosov, O.V. Semyachkina-Glushkovskaya, D.A. Gorin, V.V. Tuchin, G.B. Sukhorukov. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **9** (8), 6885–6893 (2017). DOI: 10.1021/acsami.6b15811
- [34] A.A. Abdurashitov, E.S. Prikhozhenko, O.A. Mayorova, P.O. Plastun, O.I. Gusliakova, N.S. Shushunova, O.A. Kulikov, V.V. Tuchin, G.B. Sukhorukov, O.A. Sindeeva. *Biomedical Optics Express*, **12** (7), 4467–4477 (2021). DOI: 10.1364/BOE.430393
- [35] D.B. Trushina, R.A. Akasov, A.V. Khovankina, T.N. Borodina, T.V. Bukreeva, E.A. Markvicheva. *J. Molecular Liquids*, **284**, 215–224 (2019). DOI: 10.1016/j.molliq.2019.03.152
- [36] N.A. Navolokin, S.V. German, A.B. Bucharskaya, O.S. Godage, V.V. Zuev, G.N. Maslyakova, N.A. Pyataev, P.S. Zamyshliaev, M.N. Zharkov, G. STerentyuk, D.A. Gorin, G.B. Sukhorukov. *Nanomaterials*, **8** (10), 1–14 (2018). DOI: 10.3390/nano8100812
- [37] P.A. Demina, O.A. Sindeeva, A.M. Abramova, E.S. Prikhozhenko, R.A. Verkhovskii, E.V. Lengert, A.V. Sapelkin, I.Y. Goryacheva, G.B. Sukhorukov. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **13** (17), 19701–19709 (2021). DOI: 10.1021/acsami.1c02767
- [38] I.A. Burmistrov, M.M. Veselov, A.V. Mikheev, T.N. Borodina, T.V. Bukreeva, M.A. Chuev, S.S. Starchikov, I.S. Lyubutin, V.V. Artemov, D.N. Khmelenin, N.L. Klyachko, D.B. Trushina. *Pharmaceutics*, **14** (1), 65 (2021). DOI: 10.3390/pharmaceutics14010065
- [39] J. Miller, D. Edward, P. Ruben, A. Nelson, D. Luers, A. Sherry, F.P. Lawrence, E. Anderson, A. Kruger. *Radiology*, **148** (1), 273–278 (1983). DOI: 10.1148/radiology.148.1.6407063
- [40] X.I.P. Doulamis, A. Guariento, T. Duignan, T. Kido, A. Orfany, M.Y. Saeed, V.H. Weixler, D. Blitzer, B. Shin, E.R. Snay, J.A. Inkster, A.B. Packard, D. Zurakowski, T. Rousselle, A. Bajwa, S.M. Parikh, I.E. Stillman, P.J. Nido, J.D. McCully. *Am. J. Physiology. Renal Physiology*, **319** (3), 403–413 (2020). DOI: 10.1152/ajprenal.00255.2020
- [41] B. Tesfamariam. *J. Controlled Release*, **238**, 149–156 (2016). DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.07.041
- [42] S. Lang, M. Dominietto, M. Rudin, G. Schulz, H. Deyhle, M. Germann, F. Pfeiffer, C. David, T. Weitkamp. *Proceedings Developments in X-Ray Tomography VI*, **7078**, 89–98 (2008). DOI: 10.1117/12.794157
- [43] D.N. Granger, P.R. Kvietys. *Redox Biology*, **6**, 524–551 (2015). DOI: 10.1016/j.redox.2015.08.020
- [44] S. She, C. Xu, X. Yin, W. Tong, C. Gao. *Langmuir*, **28** (11), 5010–5016 (2012). DOI: 10.1021/la3003299
- [45] A.L. Van De Ven, P. Kim, O.H. Haley, J.R. Fakhoury, G. Adriani, J. Schmulen, P. Moloney, F. Hussain, M. Ferrari, X. Liu, S. Yun, P. Decuzzi. *J. Controlled Release*, **158** (1), 148–155 (2012). DOI: 10.1016/j.jconrel.2011.10.021
- [46] A. Coclite, G. Pascazio, M.D. De Tullio, P. Decuzzi. *J. Fluidsand Structures*, **82**, 638–650 (2018). DOI: 10.1016/j.jfluidstructs.2018.08.001