

02

## Исследование динамики систем доставки лекарственных соединений методами электронной и оптической микроскопии

© Н.Н. Сударева,<sup>1</sup> О.М. Суворова,<sup>1</sup> Н.Н. Сапрыкина,<sup>1</sup> К.А. Колбе,<sup>1</sup> Н.В. Смирнова,<sup>1</sup> Д.Н. Суслов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский центр „Курчатовский институт“,  
199004 Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup> Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им Н.Н. Петрова,  
197758 Санкт-Петербург, Россия  
e-mail: nnsas@mail.ru

Поступило в Редакцию 28 февраля 2024 г.

В окончательной редакции 8 июня 2024 г.

Принято к публикации 8 июля 2024 г.

Методы микроскопии разного разрешения применены для регистрации динамики следующих процессов, происходящих с системами доставки лекарственных соединений *in vitro* и *ex vivo*: изменение во времени структуры систем доставки противоопухолевого антибиотика доксорубицина на базе пористых ватеритов карбоната кальция, допированных полианионом декстрансульфатом, и гидроксипатитов под влиянием плазмы крови (оценивали при помощи сканирующего электронного микроскопа); увеличение в пять раз размеров альгинатных гранул — потенциальных носителей ранозаживляющих препаратов — в среде экссудата (раневой жидкости) (наблюдали в оптическом микроскопе); пространственное распределение флуоресцентно-меченого белка по объему носителя — частиц пористого ватерита  $\text{CaCO}_3$  (представлено в виде оптических срезов, полученных при помощи лазерного сканирующего конфокального микроскопа); воздействие увеличивающейся до  $2 \mu\text{g/ml}$  концентрации доксорубицина, инкапсулированного в частицы пористого ватерита, на клетки дерматокарциномы A431, гибель клеток через четыре дня пребывания в питательной среде с системами доставки (исследовали при помощи светового инвертированного микроскопа); взаимодействие систем доставки с клетками макрофагов, полученных из линии моноцитарных клеток лейкемии человека THP-1 МФ и захват ими систем доставки через 24 h совместной инкубации (продемонстрирован при помощи оптического микроскопа с флуоресцентным детектированием).

**Ключевые слова:** системы доставки, доксорубицин, сканирующая электронная микроскопия, световая инвертированная, флуоресцентная и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия.

DOI: 10.61011/JTF.2024.09.58671.55-24

### Введение

Методы микроскопии с разным разрешением используют для определения параметров систем доставки (СД) лекарственных соединений (ЛС). Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) и атомно-силовая микроскопия (АСМ) могут характеризовать размеры, морфологию, пористость, структуру поверхности объектов [1]. Лазерную сканирующую конфокальную микроскопию (ЛСКМ) применяют для выявления наличия и положения компонентов СД, меченых флуорохромами [2,3]. Получение информации о структурах различных систем доставки — необходимый шаг для понимания их функционирования в организме. Использование методов электронной и оптической микроскопии помогает оценить эффективность действия систем доставки.

Основной объект, чье поведение *in vitro* и *ex vivo* исследовано при помощи микроскопии разного разрешения — системы доставки ЛС на базе карбоната кальция ( $\text{CaCO}_3$ ). Они широко используются в медицине [4,5]. Системы доставки защищают ЛС от воздействия среды организма, пролонгируют их высвобождение и, таким

образом, позволяют вводить большие концентрации ЛС, не опасаясь передозировки. Существуют три морфологические модификации  $\text{CaCO}_3$ , хорошо различимые при помощи СЭМ — сферические пористые ватериты, непористые кальциты и арагониты, трансформирующиеся друг в друга при различных условиях. Вариантов включения ЛС в ватериты несколько: соосаждение, диффузия, центрифугирование. Морфологическая однородность систем доставки влияет на величину включения биологически активных веществ. Например, включение в СД белков методом соосаждения максимально при 100% содержании ватеритов, увеличение доли кальцитов в носителях уменьшает включение [6]. Метод ЛСКМ позволяет определить взаимное расположение компонентов СД. Он демонстрирует наличие белков, меченых флуорохромами, в СД из  $\text{CaCO}_3$  ватеритов, покрытых многослойной полиэлектролитной оболочкой, также с мечеными полимерами [3].

В процессе диффузионного включения противоопухолевого препарата доксорубицина (ДОКС) в форме гидроксида происходит частичное разрушение структуры носителей. При помощи СЭМ было показано, что при включении ДОКС в ватериты  $\text{CaCO}_3$  последние

растворяются с последующей перекристаллизацией в форму непористых кальцитов из-за повышенной кислотности среды, при этом количество включенного ДОКС уменьшается. Для защиты структуры СД ватериты  $\text{CaCO}_3$  были покрыты полианионом декстрансульфатом ( $\text{CaCO}_3$ +ДекС) [7]. Другой вариант защиты частиц ватеритов от воздействия окружающей среды, например, кислотности желудка при пероральном введении СД терапевтических пептидов, — включение ватеритов в кальций-альгинатные гранулы [8].

Альгинат, как и декстрансульфат, — биоразлагаемый нетоксичный полимер, используемый не только в качестве компонентов СД, но и в процессах ранозаживления. Процесс заживления ран содержит три основных стадии, и в каждой из них возможно введение соответствующего лекарственного средства. На первой стадии — воспалительной — необходимо введение антисептика. Вторая и третья стадии — регенерации и эпителизации — требуют добавления биологически активных веществ (БАВ), стимулирующих соответствующие процессы. Здесь большую роль играют терапевтические пептиды различной структуры [9,10]. Их вводят в рану напрямую или в микрочастицах полилактид-ко-гликолида или гиалуроновой кислоты [11,12]. Ускорение заживления ран происходит при использовании насыщенных фактором роста эмульсионных микросфер из полилактид-ко-гликолида с добавлением альгината [13]. Широкими возможностями использования в медицине обладают гранулы из альгината кальция [14], выпускаемые под названием Мигран [15]. В последние годы расширяется использование носителей БАВ в медикаментозных повязках из гидрогелевых и альгинатных материалов, которые обеспечивают подходящую влажную среду, обладают хорошей биосовместимостью и высокой скоростью набухания для поглощения экссудата [16–18]. Как видим, включение терапевтических пептидов в альгинатные носители повышает эффективность их действия в ранах. Поэтому важно исследовать влияние экссудата — содержимого ран — на альгинатные носители в процессе их взаимодействия в течение времени.

Эксперименты *ex vivo* помогают оценить эффективность СД при их взаимодействии с клетками.

Влияние токсических соединений на клетки обычно оценивают при помощи показателя „жизнеспособности“, отражающего долю жизнеспособных клеток после воздействия определенной концентрации препарата. Для количественной оценки процесса используют метилтетразолиевый тест (МТТ) или систему xCELLigence. МТТ — колориметрический тест, основанный на восстановлении живыми клетками желтого тетразола в пурпурный нерастворимый формазан. Оптическая плотность раствора формазана в диметилсульфоксиде, определяемая на 570 nm, характеризует количество живых клеток [19]. Использование системы xCELLigence, принцип действия которой основан на изменении импеданса золотых сенсоров при отсоединении от них погибающих клеток,

позволяет определять цитотоксичность в режиме реального времени [20]. Пример использования оптической микроскопии для оценки влияния исследуемых медицинских препаратов на морфологическое состояние клеток органа, подвергающегося лечению, приведен в работе [21].

Непосредственное взаимодействие СД с клетками, или их поглощение, можно увидеть благодаря использованию лазерных конфокальных сканирующих микроскопов (ЛСКМ) [1,22]. Эти приборы были созданы для изучения структуры объекта в трехмерном пространстве. Получение изображения клетки под разными углами [23] позволяет понять, включена ли СД в клетку или находится на ее поверхности. Один из немногих недостатков ЛСКМ — необходимость применять флуоресцентные метки. Различные исследуемые объекты должны быть помечены флуорохромами, детектируемыми в разных диапазонах длин волн. Следует упомянуть и специфическую проблему — соединения (в частности белки) с присоединенными флуоресцентными метками могут изменять свою структуру, что может отражаться на их взаимодействии с окружающими объектами [24].

Задача настоящей работы — представить изменение структуры систем доставки лекарственных соединений в процессе их существования. А именно от их создания и загрузки ЛС через препятствия, создаваемые средами организма, до включения в клетки и реализации активности инкапсулированного ЛС. Применение микроскопов с разными способами детектирования и широким диапазоном разрешающей способности позволяет контролировать размеры и структуру систем доставки на разных стадиях их существования.

## 1. Результаты и обсуждение

### 1.1. Изменение во времени структур систем доставки доксорубина в плазме крови

Контроль с помощью СЭМ СД на базе частиц  $\text{CaCO}_3$ , которые были использованы в качестве носителей нуклеиновых кислот, терапевтических белков, пептидов, противоопухолевого препарата доксорубина (ДОКС), проявили свою эффективность как *in vitro*, так и *in vivo* [1,2,8,25]. ДОКС включали также в пористые носители другого состава — гидроксипатиты (ГА), формируемые в процессе обработки  $\text{CaCO}_3$  солями фосфора. Размеры этих носителей близки, пористость несколько выше у ГА, а включение ДОКС в частицы ГА ниже на 30%, чем в частицы  $\text{CaCO}_3$  [26]. Однако профили высвобождения ДОКС в кровь *in vivo* существенно отличаются. Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии не обнаружил ДОКС в плазме крови в течение 25 суток после его внутрибрюшинного введения при помощи ГА. При этом использование  $\text{CaCO}_3$ +ДекС обеспечивает пролонгированное (до 20 суток) высвобождение ДОКС в кровь крыс. Количество введенного ДОКС одинаково в обоих случаях — 4 mg на крысу.

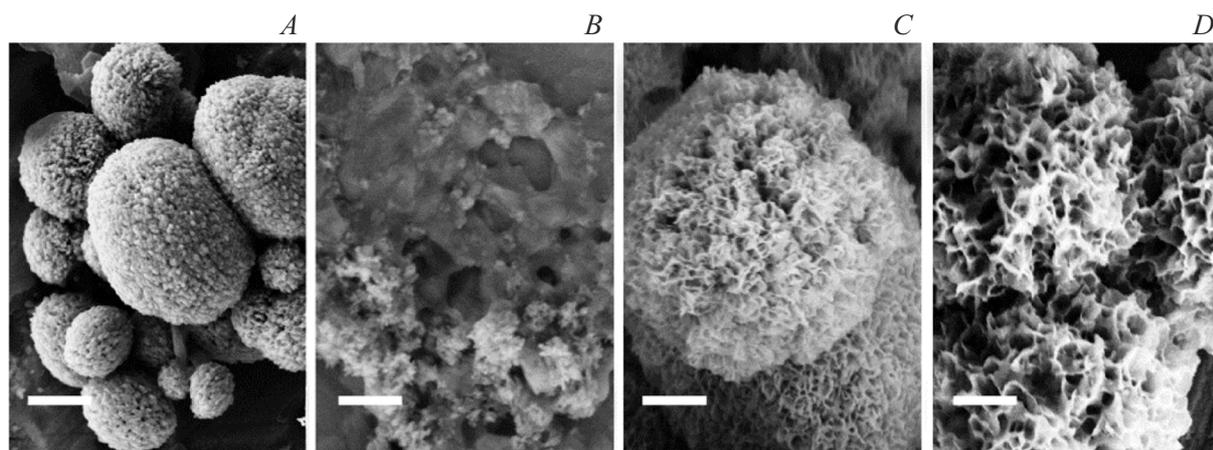


Рис. 1. Исходные СД: А —  $\text{CaCO}_3$ +ДекС; С — ГА. После 7 дней в плазме крови: В —  $\text{CaCO}_3$ +ДекС; D — ГА. Маркер —  $1\ \mu\text{m}$ .

Напомним, что свободный ДОКС высвобождается в кровь крысы за трое суток после внутрибрюшинного введения. Причину различий помогли определить СЭМ фото обеих структур, по-разному изменяющихся со временем пребывания в крови. Рис. 1 демонстрирует структуры  $\text{CaCO}_3$ +ДекС и ГА — интактные (А и С) и после их взаимодействия с плазмой крови в течение недели *in vitro* (В и D). На рис. 1 видны различия в интенсивности деструкции обеих СД, чем можно объяснить различия в результатах *in vivo* экспериментов. Частицы ватеритов разрушаются на мелкие фрагменты, полиэлектролитная оболочка ДекС уже не покрывает ядра  $\text{CaCO}_3$  полностью. Это позволяет высвободиться ДОХ в плазму крови. Частицы ГА практически не увеличивают свои размеры за семь дней пребывания в плазме крови. Пористость структуры повышается. ДОХ не высвобождается из частиц ГА, что может быть объяснено сорбцией.

## 1.2. Включение белков в $\text{CaCO}_3$ ватериты. Контроль с помощью ЛСКМ

Пространственная динамика расположения белка в объеме носителя продемонстрирована на рис. 2. Включение бычьего сывороточного альбумина (БСА), меченого флуоресцеин изотиоцианатом (FITC) в соотношении (БСА:FITC = 1:15), в частицы  $\text{CaCO}_3$  ватеритов методом соосаждения контролировали с использованием методики оптических срезов на ЛСКМ. Шаг среза  $0.20\ \mu\text{m}$  — больше разрешающей способности микроскопа  $0.16\ \mu\text{m}$  (см. Приложение), что позволяет получить наиболее информативные срезы [27].

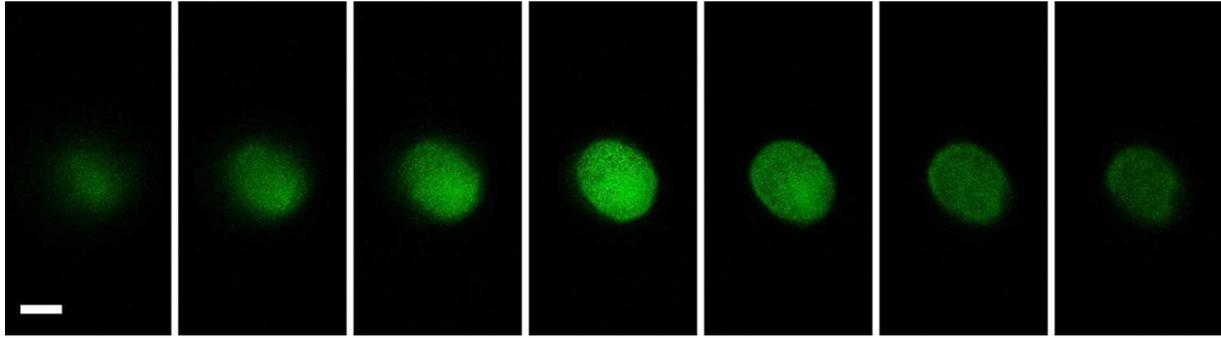
На серии фото (рис. 2) видно, что белок наполняет весь объем частиц ватеритов, иногда неравномерно. В публикациях, где приведены ЛСКМ фото ЛС, инкапсулированных в  $\text{CaCO}_3$ , их распределение выглядит поразному. В одном случае [2] siRNA (малые интерферирующие рибонуклеиновые кислоты) с флуоресцентным маркером (PA-1630-FAM) распределены в части-

цах  $\text{CaCO}_3$  ватерита очень неравномерно. ЛСКМ фото  $\text{CaCO}_3$  частиц с инкапсулированным сывороточным альбумином человека, меченным FITC, демонстрирует равномерное распределение белка [3]. В обоих случаях включение меченых объектов происходило с использованием метода соосаждения. Увеличения в цитируемых работах близки, что позволяет сравнивать приведенные в них изображения.

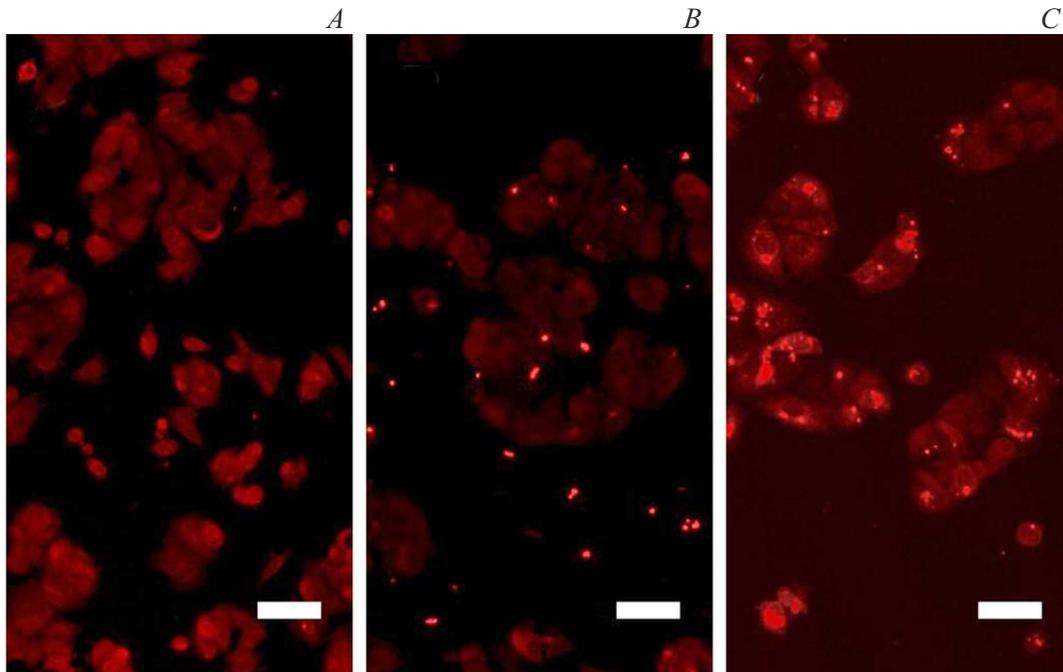
## 1.3. Захват систем доставки $\text{CaCO}_3$ +ДекС клетками

Противоопухолевый антибиотик доксорубин проявляет цитотоксичность именно на стадии деления клеток. ДОКС, включаясь между цепями дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), нарушает процессы репликации и транскрипции и, таким образом, тормозит рост опухоли. Захват клетками ТНР-1 МФ систем доставки ДОКС на базе ватеритов  $\text{CaCO}_3$ +ДекС продемонстрирован при помощи прямого флуоресцентного микроскопа. Фотографии обработаны с помощью программного обеспечения ZEN (blue edition). Сравнение фотографий на рис. 3 свидетельствует о включении СД на базе  $\text{CaCO}_3$ +ДекС в клетки в течение суток.

Для детектирования клеток и их взаимодействия с системами доставки использовали различные флуоресцентные красители. До добавления СД клетки были обработаны флуоресцентным красителем Texas Red-X, который контрастно окрашивает цитоскелет клетки. Системы доставки окрашивали красителем PKH26. Их использовали без добавления ДОКС, чтобы его собственная флуоресценция не затрудняла трактовку результатов. В течение 20 min после добавления СД к клеткам захвата еще не произошло, а СД распространены по всему объему (рис. 3 В), тогда как через 24 h СД проникли в клетки (рис. 3, С). Клетки после контакта с СД в течение суток тщательно промывали. По отсутствию СД вокруг клеток можно предположить, что все незакрепившиеся СД были удалены, остались только



**Рис. 2.** ЛСКМ фото оптических срезов  $\text{CaCO}_3$  ватеритов с инкапсулированным БСА, меченым FITC. Маркер —  $2\ \mu\text{m}$ .



**Рис. 3.** Фото клеток ТНР-1 МФ до добавления СД (А) и после добавления СД и совместного их инкубирования в течение 20 min (В) и 24 h (С). Маркер —  $50\ \mu\text{m}$ .

те, что попали внутрь клеток. Таким образом, можно считать, что совмещенные изображения клеток и СД на рис. 3, С отражают включение СД в клетки.

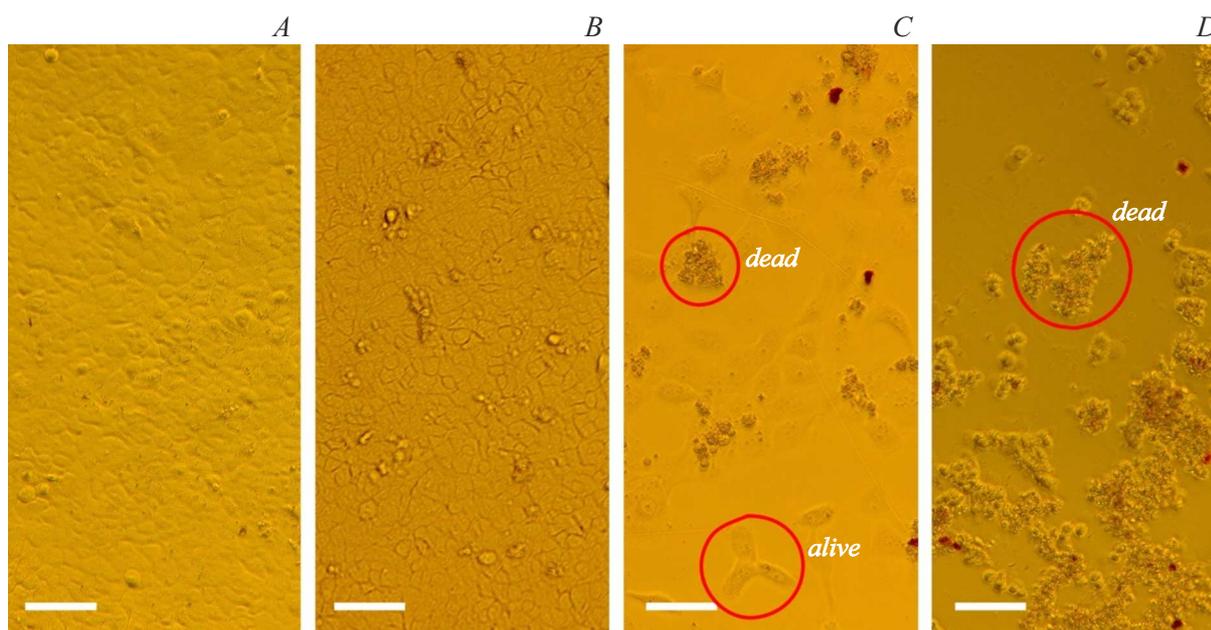
В дальнейшем необходимо будет провести сравнение захвата СД на базе  $\text{CaCO}_3$ +ДекС не только макрофагами, но и другими клетками — раковыми — МСF7 или А431 и фибробластами. Подбор необходимых флуорофоров поможет определить захват клетками СД с ДОКС.

#### 1.4. Воздействие инкапсулированного противоопухолевого антибиотика доксорубицина на клетки

Взаимодействие клеток с СД, содержащими ДОКС, приводит к нарушению их функционирования. В клеточной среде световой микроскоп позволяет оценить концентрационную динамику токсичности ДОКС, ин-

капсулированного в системы доставки  $\text{CaCO}_3$ +ДекС, по отношению к клеткам эпидермоидной карциномы А431 (рис. 4). Под воздействием все увеличивающейся концентрации ДОКС меняется морфология клеток.

На рис. 4 приведены оптические фотографии раковых клеток (эпидермоидной карциномы) А431 на третий день их контакта с ДОКС, введенным при помощи  $\text{CaCO}_3$ +ДекС, при увеличении концентрации препарата до  $2.0\ \mu\text{g/ml}$ . На рис. 4, А видны распластанные на поверхности субстрата исходные здоровые клетки, которые образуют клеточный монослой. При увеличении концентрации ДОКС до  $0.50\ \mu\text{g/ml}$  (рис. 4, С) из-за уменьшения количества жизнеспособных клеток увеличивается расстояние между ними, клетки изменяют морфологию (область „*alive*“ на рис. 4, С). Часть мертвых клеток открепилась от поверхности и агрегировала (область „*dead*“ на рис. 4, С). При максимальной из использован-



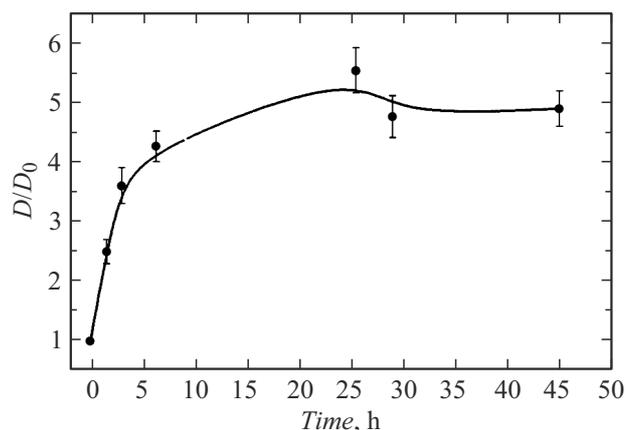
**Рис. 4.** Изменение морфологии клеток эпидермоидной карциномы А431 после их контакта с СД, содержащих ДОКС. Концентрация ДОКС 0.05 (B), 0.50 (C) до 2.0 (D)  $\mu\text{g/ml}$ . A — клетки без СД. Маркер — 100  $\mu\text{m}$ .

ных концентраций ДОКС (2.0  $\mu\text{g/ml}$ ) все клетки погибли, открепились от поверхности, и слиплись (рис. 4, D).

### 1.5. Изменение структуры альгинатной гранулы — потенциального носителя ЛС в экссудате во времени

Добавление альгината повышает эффективность процесса лечения ран при использовании носителей ЛС или ранозаживляющих повязок. Если в гранулы из альгината кальция включены ЛС, например пептиды, то их высвобождение зависит от изменения структуры носителя в окружающей раневой среде. Экссудат — жидкость, накапливающаяся в ранах при воспалительном процессе. Ее состав может быть различным в зависимости от стадии процесса воспаления. В настоящей работе использовали образовавшийся после ожога экссудат, величина рН которого около 7. Воздействие экссудата на альгинат оценивали по набуханию альгинатных гранул в течение двух суток на основании их фотографий, полученных при помощи светового инвертированного микроскопа (рис. 5). В гранулах не содержалось лекарственных соединений. Высвобождение ЛС из кальций-альгинатных гранул продемонстрировано в работе [28].

Из графика на рис. 5 видно, что за два дня происходит пятикратное увеличение размеров гранул. Помимо высвобождения инкапсулированного ЛС при набухании гранул происходит эффективное поглощение экссудата, т. е. осушение мокнущей раны.



**Рис. 5.** Динамика увеличения размеров альгинатной гранулы в экссудате.

## Заключение

Микроскопия различного разрешения сопровождает системы доставки ЛС *in vitro* от момента их формирования и включения в них лекарств до их разрушения под действием различных сред организма, таких, как плазма крови или среды желудочно-кишечного тракта. Микроскопия также позволяет *ex vivo* контролировать воздействие СД на клетки различной природы (как здоровые, так и раковые) и учитывать длительность взаимодействия клеток с СД и количество ЛС, высвобождающегося из СД. Совокупность такой информации помогает оценить эффективность разрабатываемых систем доставки.

## Приложение. Материалы и методы

Соли, использованные для синтеза пористых карбонатных ядер  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , полианион декстран-сульфат произведены Sigma-Aldrich (США). Синдроксоцин производства Actavis (Hafnarfjordur, Исландия) содержал 17% ДОКС в форме соли с протонированной аминогруппой и 83% лактозы. Натриевая соль альгината (для медицинского использования, ММ около 300 kDa) произведена Архангельским водорослевым экспериментальным заводом (Россия). Экссудат, в котором определяли набухание альгинатных гранул в течение двух суток, получен из НИИ скорой помощи им. И.И. Джанелидзе.

Альгинатные гранулы как наполнители ожоговых ран производили методом ионной сшивки, а именно 4% водный раствор альгината прикапыванием добавляли в осадительную ванну с 5% хлористого кальция, после 30 min перемешивания суспензию фильтровали на воронке Бюхнера, промывали водой и сушили на воздухе.

Синтез  $\text{CaCO}_3$  пористых ватеритов осуществляли согласно модифицированной методике [29], а именно соосаждение 1 М растворов  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  проводили при перемешивании механической мешалкой при 2000 rpm в течение 30 s, троекратно промывали осадок с использованием центрифугирования и сушкой. Декстрансульфат наносили на поверхность ватеритов в процессе перемешивания суспензии  $\text{CaCO}_3$  в водном растворе полимера с концентрацией 2 mg/ml в течение 1 h. Далее следовали тщательная промывка и сушка.

Гидроксиапатиты, использованные в настоящей работе, изготавливали следующим образом.

Добавляли навеску 0.5 М  $\text{CaCO}_3$  (в форме частиц ватеритов, изготовленных по вышеприведенной методике) к 0.1 М раствору  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  в молярном соотношении 1:1. Суспензию обрабатывали 20 s ультразвуком, затем перемешивали 24 h, центрифугировали в течение 5 min при  $8 \cdot 10^3$  rpm, осадок трижды промывали водой и сушили до постоянного веса.

Включение ДОКС в СД проводили методом диффузии при перемешивании в течение суток суспензии  $\text{CaCO}_3 + \text{DexS}$  и раствора ДОКС. Соотношение компонентов варьировали в зависимости от необходимого количества ДОКС в СД. Количество включившегося ДОКС определяли спектрофотометрически по разнице исходного и не включенного в СД ДОКС на основании калибровки при  $\lambda = 480$  nm.

### П1. Работа с клетками

Клетки эпидермоидной карциномы A431 и клетки макрофагов, полученных из линии моноцитарных клеток лейкоми человека ТНР-1 МФ, предоставлены Институтом цитологии РАН из Российской коллекции клеточных культур позвоночных.

Динамику пролиферации клеток A431 оценивали при их кондиционировании с носителями  $\text{CaCO}_3 + \text{DexC}$ , содержащими различное количество ДОКС. Клетки культивировали в полной питательной среде ДМЕМ (Панэко, Россия) с добавлением 1% L-глутамина 200 mM, 10% бычьей эмбриональной сыворотки и 1% антибиотиков (100 units/ml пенициллин, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  стрептомицин), 1% антимикотика (амфотерицин В 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) (все реактивы Thermo Fisher Scientific, США). Культивирование проводили в  $\text{CO}_2$  инкубаторе (Thermo Fisher Scientific, США) при температуре 37°C, концентрации  $\text{CO}_2$  5% и повышенной влажности. В каждую ячейку с питательной средой (объем 0.2 ml) помещали по 35 тыс. клеток A431. Через сутки добавляли в ячейки пустые СД а также СД, содержащие разное количество ДОКС, полученные на протяжении трех суток контакта клеток A431 с разными вариантами СД. Взаимодействие СД, содержащих разное количество ДОКС, с клетками A431 отражают прижизненные микрофотографии, полученные при помощи светового инвертированного микроскопа Primo Vert (Carl Zeiss, Германия). Увеличение 100 х.

По фотографиям, полученным с помощью этого же микроскопа в разные промежутки времени, определяли увеличение размера альгинатных гранул под воздействием среды экссудата.

Флуоресцентное детектирование. До добавления СД клетки ТНР-1МФ были окрашены флуоресцентным красителем Texas Red-X ( $\lambda$  возбуждения= 561 nm, эмиссии= 615 nm). СД метили красным флуоресцентным красителем РКН 26 ( $\lambda$  возбуждения= 550 nm, эмиссии= 567 nm) с использованием реактивов и методики из набора для мечения (Sigma-Aldrich, США). Захват клетками систем доставки происходил при следующих условиях. После культивирования клеток в количестве 35 тыс. на ячейку в полной питательной среде в течение суток к ним добавляли  $\text{CaCO}_3 + \text{DexC}$  в концентрации 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Через сутки взаимодействия клеток с СД их тщательно промывали от среды культивирования, содержащей СД, и делали снимки при помощи светового микроскопа ZEISS Axio Scope A1 (Carl Zeiss, Германия) с флуоресцентным детектированием.

### П2. Микроскопия

Для определения изменения микроструктур систем доставки разного состава, а именно пористых карбонатно-кальциевых ватеритов и гидроксиапатитов, контактировавших с плазмой крови человека, использовали сканирующий электронный микроскоп СЭМ Supra 55VP (Carl Zeiss, Германия) в режиме вторичных электронов. Перед измерением на поверхность образца наносили тонкий слой платины.

Серия оптических срезов  $\text{CaCO}_3$ , содержащих БСА с меткой FITC ( $\lambda$  возбуждения= 495 nm, эмиссии= 519 nm), получена на ЛСКМ LSM 5 PASCAL (Leica Microsystems, Германия) в

режиме Z-stack с использованием аргонового лазера. Толщина оптического среза равна  $0.2\ \mu\text{m}$ . Разрешение ( $d$ ), согласно формуле Гельмгольца, равно  $(0.61 \cdot \lambda)/(n \cdot \sin \alpha)$ . При использованном лазере ( $\lambda = 405\ \text{nm}$ ) и конструкции микроскопа (апертурный угол  $\alpha = \pi/2$ ; масляная иммерсия  $n = 1.5$ ) разрешение равнялось  $0.16\ \mu\text{m}$ , что меньше толщины оптического среза и составляет около 5% от среднего размера частиц ватеритов  $\text{CaCO}_3$ , равного  $2\text{--}4\ \mu\text{m}$ .

### ПЗ. Работа с лабораторными животными

В экспериментах по внутрибрюшинному введению в кровь животных различных систем доставки доксорубина использованы здоровые крысы из питомника лабораторных животных Рапполово. Все манипуляции с крысами проводили под общей анестезией. Работа с животными выполнена в соответствии с правилами использования экспериментальных животных (согласно принципам Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации о гуманном обращении с животными, 1996 г.).

### Финансирование работы

Работа проведена в рамках выполнения государственного задания научного исследовательского центра „Курчатовский институт“ по теме „Полимеры для биомедицины“, регистрационный номер 124013000730-3.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### Список литературы

- [1] Y.V. Tarakanchikova, D.S. Linnik, T. Mashel, A.R. Muslimov, S. Pavlov, K.V. Lepik, M.V. Zyuzin, G.B. Sukhorukov, A.S. Timin. *Mater. Sci. Eng. C*, **126**, 112161 (2021). DOI: 10.1016/j.msec.2021.112161
- [2] A.S. Timin, A.R. Muslimov, A.V. Petrova, K.V. Lepik, M.V. Okilova, A.V. Vasin, B.V. Afanasyev, G.B. Sukhorukov. *Sci. Rep.*, **7**, 102 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-00200-0
- [3] 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**, 31137 (2020). DOI: 10.1021/acsmami.0c06996
- [4] D.B. Trushina, T.V. Bukreeva, M.V. Kovalchuk, M.N. Antipina. *Mater. Sci. Eng. C*, **45**, 644 (2014). DOI: 10.1016/j.msec.2014.04.050
- [5] A.D. Trofimov, A.A. Ivanova, M.V. Zyuzin, A.S. Timin. *Pharmaceutics*, **10**, 167 (2018). DOI: 10.3390/pharmaceutics10040167
- [6] Н.Н. Сударева, Е.В. Попова, Н.Н. Сапрыкина. *Физико-химия полимеров. Синтез, свойства и применение*, **20**, 139 (2014).
- [7] N. Sudareva, O. Suvorova, N. Saprykina, H. Vlasova, A. Vilesov. *J. Microencaps.*, **38** (3), 164 (2021). DOI: 10.1080/02652048.2021.1872724
- [8] N. Sudareva, O. Suvorova, N. Saprykina, N. Smirnova, P. Bel'tiukov, S. Petunov, A. Radilov, A. Vilesov. *J. Microencaps.*, **35** (7–8), 619 (2019). DOI: 10.1080/02652048.2018.1559247
- [9] L. Chan, S. Gunasekera, S. Henriques, N. Worth, S. Le, R. Clark. *Blood*, **118**, 6709 (2011). DOI: 10.1182/blood-2011-06-359141
- [10] K. Ito, Y. Matsuda, A. Mine, N. Shikida, K. Takahashi, K. Miyairi. *Commun. Biol.*, **5**, 56 (2022). DOI: 10.1038/s42003-022-03015-6
- [11] К. Сташевская, Е. Марквичева, С. Струкова, А. Русанова, А. Макарова, Л. Горбачева, И. Прудченко, В. Зубов, К. Грандфис. *Биомед. химия*, **52** (10), 83 (2006). [K. Stashevskaya, E. Markvicheva, S. Strukova, A. Rusanova, A. Makarova, L. Gorbacheva, I. Prudchenko, V. Zubov, K. Grandfis. *Biochem. Moscow Suppl. Ser. B*, **1**, 147 (2007). DOI: 10.1134/S1990750807020072]
- [12] S. Kang, J. Choi, H. Kim, J. Seo, S. Park, E. Kim, S. Park, K. Huh, H.-M. Chung, H.-Y. Chung, S. Moon. *Part. Part. Syst. Charact.*, **34**, 1600320 (2017). DOI: 10.1002/ppsc.201600320
- [13] G. Gainza, J. Aguirre, J. Pedraz, R. Hernández, M. Igartua. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **50** (3–4), 243 (2013). DOI: 10.1016/j.ejps.2013.07.003
- [14] Т. Фуджимура, А.Д. Вилесов. Пат. РФ № 2420350 *Микрокапсулы, содержащие воду или водный раствор, (варианты) и способы их получения (варианты)*. Заявл. 09.02.2009. Оpubл. 10.06.2011.
- [15] Раздел сайта ООО „ДиаТех“: МИГРАН — новое средство для обработки ран в полевых условиях при чрезвычайных ситуациях. Текст: электронный. URL: <http://www.diathenn.ru>
- [16] Y.J. Lee, B. Javdan, A. Cowan, K. Front. *Cell Dev. Biol., Sec. Molecular and Cellular Pathology*, **11**, (2023). DOI: 10.3389/fcell.2023.1195600
- [17] R. Ghomi, S. Khalili, S. Khorasani, E. Neisiany, S. Ramakrishna. *Appl. Polym. Sci.*, **136**, 47738 (2019). DOI: 10.1002/app.4773
- [18] Т.А. Кузнецова, С.Ф. Половов. *Морская медицина*, **9** (4), 16 (2023). DOI: 10.22328/2413-5747-2023-9-4-16-25 [T.A. Kuznetsova, S.V. Polovov. *Marine Medicine*, **9** (4), 16 (2023). DOI: 10.22328/2413-5747-2023-9-4-16-25]
- [19] T. Mosmann. *J. Immunol. Methods*, **65**(1–2), 55 (1983). DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4
- [20] Roche Diagnostics GmbH. *Introduction of the RTCA SP Instrument. RTCA SP Instrument Operator's Manual* (ACEA Biosciences, Inc. 2008)
- [21] О.И. Александрова, И.Н. Околов, Ю.И. Хорольская, И.Е. Панова, М.И. Блинова. *Офтальмология*, **15** (2), 167 (2018). DOI: 10.18008/1816-5095-2018-2-167-175 [O.I. Aleksandrova, I.N. Okolov, Y.I. Khorolskaya, I.E. Panova, M.I. Blinova. *Ophthalmology in Russ.*, **15** (2), 167 (2018). DOI: 10.18008/1816-5095-2018-2-167-175]
- [22] D.B. Trushina, R.A. Akasov, A.V. Khovankina, T.N. Borodina, T.V. Bukreeva, E.A. Markvicheva. *J. Mol. Liquids*, **284**, 215 (2019). DOI: 10.1016/j.molliq.2019.03.152
- [23] A.A. Abalymov, R.A. Verkhovskii, M.V. Novoselova, B.V. Parakhonskiy, D.A. Gorin, A.M. Yashchenok, G.B. Sukhorukov. *Biotechnol. J.*, **13** (11), 1800071 (2018). DOI: 10.1002/biot.201800071

- [24] Н.Н. Сударева, О.М. Суворова, В.Д. Паутов. Вестник ТвГУ. Сер. Химия, **35** (1), 147 (2019). DOI: 10.26456/vtchem2019.1.18
- [25] A.S. Timin, A.R. Muslimov, K.V. Lepik, O.S. Epifanovskaya, A.I. Shakirova, B.V. Afanasyev, B. Fehse, G.B. Sukhorukov. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, **14** (1), 97 (2018). DOI: 10.1016/j.nano.2017.09.001
- [26] N.N. Sudareva, O.M. Suvorova, N.N. Saprykina, N.N. Shevchenko, K.A. Kolbe, V.K. Lavrentiev. *In: The Chemistry of Calcium Carbonate*. Ed. G.H.Hood. (Nova Sci. Publishers Inc., NY., 2022), p. 199.
- [27] Г.И. Штейн. *Руководство по конфокальной микроскопии* (Изд-во Политех. ун-та Петра Великого, СПб., 2007)
- [28] А.Д. Вилесов, О.В. Галибин, Э.Э. Звартау, Е.М. Крупицкий, Е.Ф. Панарин, В.В. Томсон, И.В. Белозерцева, О.Г. Геньбач, О.А. Драволина, Л.П. Чукова. Пат. РФ № 2462235. *Лекарственная форма дисульфирама пролонгированного действия и способ ее получения*. Заявл. 10.05.2011. Оpubл. 27.09.2012.
- [29] D.V. Volodkin, A.I. Petrov, M. Prevot, G.B. Sukhorukov. *Langmuir*, **20** (8), 3398 (2004). DOI: 10.1021/la036177z