

УДК 541.64:539.2:547.466.48

ВЛИЯНИЕ ХИРАЛЬНОСТИ ФЕНИЛАЛАНИНА В СОСТАВЕ СОПОЛИМЕРА С L-ЛИЗИНОМ НА САМООРГАНИЗАЦИЮ И СВОЙСТВА ПОЛУЧЕННЫХ НАНОЧАСТИЦ

© 2024 г. Е. Г. Коржикова-Влах^{а,*}, А. Ю. Джужа^{а,б}, В. Д. Матвиенко^а,
Г. А. Платонова^а, Т. Б. Тенникова^б

^аИнститут высокомолекулярных соединений Российской академии наук
199004 Санкт-Петербург, Большой пр., 31, Россия

^бСанкт-Петербургский государственный университет, Институт химии
198504 Санкт-Петербург, Петергоф, Университетский пр., 26, Россия

*e-mail: vlakh@hq.macro.ru

Поступила в редакцию 18.01.2024 г.

После доработки 31.01.2024 г.

Принята к публикации 07.02.2024 г.

Амфифильные сополимеры аминокислот, способные к самосборке в водных средах в наночастицы, представляют собой интерес в качестве потенциальных систем доставки лекарств. В рамках данной работы получена и охарактеризована серия амфифильных сополимеров лизина и фенилаланина с различной хиральностью, а также содержанием мономерных звеньев. Проведено изучение влияния состава сополимеров на характеристики, а также физико-химические и биологические свойства наночастиц, формируемых за счет самосборки. В частности, определены гидродинамические характеристики наночастиц, оценены их средние диаметры в сухом состоянии, определены критические концентрации агрегации, изучено влияние pH среды и времени инкубирования на стабильность дисперсий наночастиц, а также получены данные о цитотоксичности наносистем в зависимости от хиральности гидрофобной аминокислоты.

DOI: 10.31857/S2308112024010047 EDN: NLLFTL

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день биосовместимые амфифильные сополимеры, способные к самоорганизации в водных средах, имеют широкие перспективы применения в качестве систем доставки лекарств [1, 2]. Использование подобных систем повышает биодоступность лекарств, сохраняет их от преждевременной инактивации, способствует снижению системной токсической нагрузки от приема цитостатических лекарств, а также при определенном составе сополимера может обеспечивать внутриклеточный транспорт лекарств [3–5].

Среди большого многообразия биосовместимых сополимеров синтетические полипептиды имеют ряд особенностей, определяющих перспективность их биомедицинского применения [5–7]. Прежде всего полипептиды представляют собой биосовместимые макромолекулы, способные к биodeградации до простых и легко выводимых из организма метаболитов — аминокислот. Многообразие аминокислот позволяет варьировать свойства сополимеров в широких пределах,

а именно получать сополимеры с заданным гидрофильно-гидрофобным балансом, реакционной функциональностью, скоростью деградации, и т.д. Кроме того, в отличие от многих других синтетических (со)полимеров полипептиды способны формировать упорядоченные стабильные структуры. В зависимости от заместителей боковой цепи аминокислот возможно формирование таких вторичных структур, как, например, α -спирали или β -складки [8], или же неупорядоченных конформаций.

В настоящее время одним из наиболее удобных методов синтеза гомо- и сополимеров аминокислот (полипептидов с незаданной аминокислотной последовательностью) является полимеризация с раскрытием цикла *N*-карбоксиангидридов (КА) α -аминокислот [6, 9]. В качестве инициаторов для полимеризации КА обычно используют различные нуклеофилы (амины) или основания (алкоксид-анионы) [10, 11]. Полимеризация с раскрытием цикла КА, инициируемая первичными аминами, протекает по так называемому механизму нормального типа (normal amine mechanism),

который в случае отсутствия побочных реакций характеризуется линейным ростом молекулярной массы полимера с конверсией мономера. Стерически незамещенные первичные амины, такие как *n*-бутиламин или *n*-гексиламин, взятые в качестве инициатора, приводят к получению полипептидов с молекулярной массой, близкой к заданной, и узкому распределению по молекулярным массам. В свою очередь третичные амины, алкоксиды и другие инициаторы, являющиеся в большей степени основаниями, чем нуклеофилами, применяются для синтеза полимеров с очень высокой молекулярной массой, которые не могут быть получены при использовании первичных аминов.

В качестве систем доставки лекарств значительный интерес представляют амфифильные сополимеры, различие свойств фрагментов которых приводит к микрофазной гетерогенности, что в свою очередь в определенных условиях индуцирует самосборку сополимера в надмолекулярные структуры (наночастицы) [12–14]. В зависимости от структуры и состава сополимера возможно формирование наночастиц различной морфологии, а именно мицелл, полимерсом или наногелей [15, 16]. Первые два типа структур формируются из амфифильных блок-сополимеров, тогда как последний — из амфифильных сополимеров других типов [5].

На сегодняшний день в зависимости от состава и структуры амфифильного сополимера для получения наночастиц могут быть использованы те или иные методы, индуцирующие самосборку [5, 17]. Среди них можно выделить прямое растворение, градиентную инверсию фаз (диализ), наноосаждение или регидратацию пленок. Кроме того, одновременно с процессом самоорганизации амфифильных сополимеров возможно проведение инкапсулирования лекарственных веществ за счет их захвата формирующимися частицами.

Ранее, было показано, что амфифильные полипептиды могут быть успешно использованы для инкапсулирования низкомолекулярных веществ [18–21], пептидов [22] и нуклеиновых кислот [23, 24]. При этом лекарства, инкапсулированные в наночастицы на основе полипептидов, сохраняли биологическую активность. Амфифильные сополимеры на основе лизина показали способность как к инкапсулированию низкомолекулярных лекарств, так и к внутриклеточной доставке различных нуклеиновых кислот [23, 24]. Кроме того, известно, что самоорганизация пептидов зависит не только от их аминокислотного состава, но и от хиральности аминокислот, входящих в пептиды [25]. Частичная замена *L*-аминокислот на их *D*-энантиомеры в структуре (поли)пептида может оказывать влияние на морфологию и физические свойства надмолекулярных структур, формируемых за счет самосборки, а также

на их биологическую активность и стабильность в биологических средах [26, 27].

В данной работе был проведен синтез сополимеров *L*-лизина (**Lys**) с *L/D,L/D*-фенилаланином (**LPhe/D,LPhе/DPhe**) в условиях вариации содержания фенилаланина в пределах 10–50 мол. %. Увеличение доли гидрофобной аминокислоты в составе сополимера, а также вариация ее оптического изомера могут оказывать влияние на вторичную структуру сополимера, и, как следствие, на гидродинамический диаметр и свойства наночастиц. Все синтезированные сополимеры были охарактеризованы (относительная молекулярная масса, дисперсность, состав), на их основе получены наночастицы, изучены их характеристики и физико-химические свойства, а также биологические свойства *in vitro*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы

Для синтеза полимеров использовали следующие реактивы: трифосген (98%), ϵ -карбоксибензил-*L*-лизин (**Lys(Z)**, $\geq 99.0\%$), α -пинен (99.0%), *n*-гексиламин (99.0%), трифторметансульфоновую кислоту (**ТФМСК**, $\geq 98.0\%$) и трифторуксусную кислоту (**ТФУК**, $\geq 98.0\%$) — все получены от “Sigma-Aldrich” (Германия); *L*-фенилаланин и *D*-фенилаланин ($\geq 97.0\%$) — продукты компании “Bide Pharmatech Ltd.” (Китай).

Растворители — диоксан, тетрагидрофуран, петролейный эфир, этилацетат, диэтиловый эфир, диметилформамид и ацетонитрил, а также соли, использованные для приготовления буферных растворов, были приобретены в компании Общество с ограниченной ответственностью “Вектон” (Россия). Буферные растворы готовили растворением солей в деионизованной воде и дополнительно фильтровали через мембранные фильтры Millipore (“Merck”, Германия) с размером пор 0.22 мкм. Папаин из *Carica papaya* (ЕС 3.4.22.2) был получен от компании “Sigma-Aldrich” (Германия).

Мембранные пробирки для ультрафильтрации Amicon (MWCO 3000 и 10000) были продуктами компании “Merck” (Германия), а диализные мешки Spectra/Pore® (MWCO 1000) — компании “Fisher Scientific” (США).

Для исследования цитотоксичности брали клетки почек эмбриона человека (НЕК 293) и эпителиальные клетки легких человека (BEAS-2B). В экспериментах использовали 96-луночные планшеты и базальную среду ДМЕМ (“Диаэм”, Россия), эмбриональную бычью сыворотку (“Biochrom”, Германия), растворы пеницилли-

на (10000 ЕД/мл) и стрептомицина (10 мг/мл) (“Biochrom”, Германия).

Методы

Синтез мономеров и сополимеров. Мономеры — *N*-карбоксиангидриды соответствующих α -аминокислот синтезировали как описано ранее с использованием диоксана для синтеза *N*-карбоксиангидрида LLys(Z) и ТГФ для синтеза *N*-карбоксиангидрида L/DPhе [28]. Очистку проводили перекристаллизацией из системы этилацетата–*n*-гексан. Выход *N*-карбоксиангидрида LLys(Z) составил 85%, *N*-карбоксиангидрида LPhе — 58%, а *N*-карбоксиангидрида DPhе — 64%. Структуру и чистоту мономеров подтверждали методом спектроскопии ЯМР¹H (“Bruker 400 MHz Avance”) при 25°C в CDCl₃: *N*-карбоксиангидрид Lys(Z): 1.34–1.65 (m, 4H, CH₂CH₂), 1.73–2.03 (m, 2H, CH₂), 3.16–3.27 (m, 2H, NHCH₂), 4.28 (t, *J* = 4.8 Гц, 1H, CH), 4.97 (s, 1H, NH), 5.12 (s, 2H, C₆H₅CH₂O), 6.97 (s, 1H, NH), 7.28–7.44 (m, 5H, C₆H₅); *N*-карбоксиангидрид Phе/DPhе: 2.94–3.35 (m, 2H), 4.55 (m, 1H), 6.12 (s, 1H), 7.19–7.41 (m, 5H).

Для синтеза сополимеров методом полимеризации с раскрытием цикла в качестве инициатора использовали *n*-гексилламин. Мольное соотношение КА лизина и фенилаланина составляло 90 : 10, 80 : 20 и 50 : 50. Соотношение мономеры : инициатор было равно 100. Для синтеза сополимеров готовили 4%-ный раствор мономеров в диоксане. Полимеризацию проводили при температуре 30°C в течение 24 ч. Полученный продукт осаждали трех–пятикратным избытком диэтилового эфира. Осадок отделяли центрифугированием при 7000 об./мин в течение 10 мин. После декантации раствора осадок промывали избытком диэтилового эфира. Полученные сополимеры сушили на воздухе при температуре 22°C. Выход сополимеров варьировался в диапазоне 62–86%. ЯМР¹H (DMSO-*d*₆, 25°C), δ (м.д.): HexA: 0.84 (CH₃); Lys(Z): 4.10–4.34 (CH), 2.97 (NH–CH₂), 5.0 (O–CH₂–C₆H₅), 7.08–7.42 (O–CH₂–C₆H₅); Phе: 7.17 (C₆H₅) и 4.55 (CH–CH₂–C₆H₅).

Деблокирование боковых защитных групп сополимеров проводили с использованием смеси 5%-ного раствора ТФМСК в ТФУК при температуре 22°C в течение 4 ч. После удаления защитных групп продукты осаждали избытком диэтилового эфира. Осадок отделяли центрифугированием и сушили на воздухе при температуре 25°C. Успешность удаления Z-защиты контролировали по исчезновению в спектрах ЯМР¹H (DMSO-*d*₆) сигнала при 5.0 м.д. (OCH₂C₆H₅).

Определение молекулярной массы и состава сополимера. Относительную молекулярную массу сополимеров оценивали методом эксклюзион-

ной жидкостной хроматографии (ЭЖХ), которую проводили с использованием хроматографической системы “Shimadzu LC-10 Prominence” с рефрактометрическим детектированием RID 10-A (Япония). Прибор был оснащен колонкой, содержащей тандем из двух колонок Agilent PLgel MIXED-D (7.5 × 300 мм, 5 мкм, США). Анализ выполняли при температуре 60°C с использованием в качестве элюента 0.1 М LiBr в ДМФА. Скорость подвижной фазы составляла 0.3 мл/мин. Относительную молекулярную массу (*M*_w и *M*_n) и дисперсность (*D*) рассчитывали с помощью программы GPC LC Solutions software Shimadzu (Япония) и калибровочной зависимости, построенной по стандартам полиметилметакрилата.

Для определения состава сополимера навески сополимера массой 2 мг подвергали полному кислотному гидролизу с использованием 6 М HCl, содержащей 0.0001% фенола. Последний вводится в раствор для гидролиза в качестве поглотителя кислорода для минимизации побочных реакций окисления аминокислот [29]. Запаянный в ампулу раствор полимера (0.5 мг/мл) инкубировали в течение двух суток при температуре 110°C. Растворы кислоты отгоняли на роторном испарителе, остаток растворяли в воде, которую снова отгоняли. Процедуру повторяли несколько раз до достижения раствором нейтрального значения pH. Аминокислотный анализ проводили с использованием хроматографической системы ВЭЖХ-MS-8030 Shimadzu с тройным квадрупольным масс-спектрометрическим детектированием (Япония). Прибор был оснащен колонкой Luna C18 column, размером 2 мм × 150 мм и упакованной частицами диаметром 5 мкм. Элюентом служила 6 мМ Н₃РО₄. Скорость подвижной фазы составляла 1.0 мл/мин. Количественное определение концентраций аминокислот проводили с использованием предварительно построенной калибровочной зависимости в диапазоне концентраций аминокислот 0.005–0.5 мкг/мл.

Определение относительной активности мономеров. Сополимеризацию осуществляли при мольном избытке мономеров к инициатору, равному 100. В качестве инициатора полимеризации использовали *n*-гексилламин. Реакцию проводили в диоксане течение 3 ч при температуре 30°C. Время полимеризации выбирали таким образом, чтобы конверсия мономеров не превышала 20%. Мольное соотношение мономеров в исходной смеси [KA₁] : [KA₂] варьировали от 10 : 90 до 90 : 10. Состав сополимеров рассчитывали по спектрам ЯМР¹H. Реперными сигналами служили интегральные интенсивности ароматических протонов защитных карбоксибензильной групп и фенилаланина (C₆H₅, 7.06–7.66 м.д.), протонов защитной карбоксибензильной группы лизина (OCH₂C₆H₅, 5.00 м.д.), метильных протонов инициатора (CH₃, 0.83 м.д.).

Относительную активность мономеров определяли методом Файнемана–Росса, используя уравнение

$$\frac{F}{f}(f-1) = r_1 \frac{F^2}{f} - r_2, \quad (1)$$

где r_1 и r_2 — относительная активность мономеров M_1 и M_2 соответственно, F — отношение мольных долей мономеров в исходной смеси, f — отношение мольных долей звеньев соответствующих мономеров в сополимере. Угловой коэффициент линейной зависимости соответствует r_1 , отрезок, отсекаемый прямой на оси ординат — r_2 .

Получение наночастиц. Наночастицы получали методом градиентной инверсии фаз. Для этого сополимеры, выделенные осаждением и высушенные, растворяли в ДМФА и проводили диализ против воды через мембрану с отсекаемой массой 1000 в течение 48 ч.

В процессе градиентной инверсии органической фазы на водную происходила самосборка амфифильных макромолекул в наночастицы. После этого водная дисперсия наночастиц была заморожена и лиофильно высушена. Сухие наночастицы хранили при температуре 4°C. В дальнейшем в зависимости от задачи навеску нужной массы (1–2 мг) редиспергировали в воде или буферной среде с выбранным pH под кратковременным действием ультразвука (30 с) с использованием УЗ-зонда UP 50H Hielscher Ultrasonics (Германия).

Анализ наночастиц. Средний гидродинамический диаметр и индекс полидисперсности наночастиц измеряли методом динамического рассеяния света (ДРС), а ζ -потенциал — методом электрофоретического рассеяния света с использованием прибора “Malvern Zetasizer Nano-ZS” (Великобритания). Концентрация наночастиц в дисперсионной среде составляла 0.2 мг/мл. В зависимости от задач эксперимента гидродинамический диаметр измеряли в воде или 0.01 М натрий фосфатном буферном растворе, pH 7.4. ζ -потенциал измеряли для дисперсий с концентрацией 0.1 мг/мл, приготовленных в дистиллированной воде, содержащей фоновый электролит (0.001 моль/л NaCl). pH в диапазоне от 3 до 12 задавался доведением до нужного значения с помощью 0.1 М HCl/NaOH. Все измерения проводили не менее трех раз. Гидродинамический диаметр наночастиц, обсуждаемый в работе, измеряли для дисперсий, полученных в результате редиспергирования навески сухого образца в воде/буферном растворе.

Морфологию частиц исследовали методом просвечивающей электронной микроскопии

(ПЭМ) с использованием микроскопа “Jeol JEM-2100” (Япония) при ускоряющем напряжении 160 кВ. Образцы наносили на поверхность медных сеток с углеродным напылением и покрытием formvar и контрастировали 2%-ным раствором уранил ацетата.

Исследование стабильности наночастиц *in vitro*. Стабильность изучали при температуре 37°C с использованием 0.01 М фосфатного буферного раствора, pH 7.4, и того же фосфатного буферного раствора, содержащего фермент папаин. В случае использования фосфатного буферного раствора с добавлением папаина к 0.5 мл суспензии частиц (2 мг/мл) в фосфатный буферный раствор добавляли 0.5 мл раствора, содержащего фермент с концентрацией 0.1 мг/мл. Мониторинг стабильности наночастиц проводили методом динамического рассеяния света, определяя изменение гидродинамического диаметра частиц в течение 30 дней. Средний диаметр частиц в сухом состоянии рассчитывали по микрофотографиям ПЭМ с помощью программного обеспечения ImageJ (v.1.53n, открытый доступ), разработанного Национальным институтом психического здоровья (США).

Определение критической концентрации агрегации. Критическую концентрацию агрегации определяли кондуктометрическим методом с использованием кондуктометра “SevenCompact S230” (“Mettler Toledo”, США). Измерения проводили в воде в диапазоне концентраций полимера от 0.1 до 30 мкг/мл при 25°C. Критическую концентрацию агрегации определяли в точке пересечения двух линейных участков зависимости электропроводности от концентрации полимера. Из экспериментальных данных критическую концентрацию агрегации определяли в единицах массовой концентрации (мкг/мл). Для пересчета значений критической концентрации агрегации в единицы молярной концентрации (мкМ) использовали значения среднемассовой молекулярной массы деблокированного сополимера.

Исследование цитотоксичности наночастиц. Выживаемость клеток оценивалась с использованием СТВ-теста (CellTiter-Blue), основанного на способности живых клеток метаболически преобразовывать резазурин во флуоресцентный продукт резорурфин. Для эксперимента использовали 96-луночные планшеты. В каждую лунку высевали 8000 клеток в 100 мкл культуральной среды и культивировали в течение 24 ч. Затем культуральную среду удаляли и добавляли 200 мкл культуральной среды, содержащей частицы различных концентраций в диапазоне 0.04–1 мкг/мл. Клетки инкубировали в течение 72 ч, после чего среду удаляли и вносили в каждую лунку по 100 мкл 10%-ного раствора реагента СТВ в базальной среде (1 : 10). Клетки инкубировали

в CO_2 -инкубаторе в течение 2 ч при 37°C и измеряли флуоресценцию раствора с помощью флуоресцентного ридера “Fluoroscan Ascent” (“Thermo Fisher Scientific Inc.”, США). Для коррекции фона из значений интенсивности флуоресценции растворов лунок, содержащих клетки, вычитали значения интенсивности флуоресценции растворов лунок, не содержащих клетки. Данные нормировали в процентах по отношению к контролю (интенсивности флуоресценции растворов лунок, содержащих клетки, инкубированных без тестируемых веществ). Значения концентрации, при которой выживает половина клеток (IC_{50}), рассчитывали путем построения дозозависимых кривых с использованием программы OriginPro 8.6.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез сополимеров на основе *L*-лизина и *L/D*, *L/D*-фенилаланина

В данной работе с целью изучения влияния оптического изомера гидрофобной аминокислоты на характеристики и свойства наночастиц, формируемых из амфифильного сополимера, был проведен синтез сополимеров Lys с LPhe, D,LPhе или DPhe, где содержание гидрофобной аминокислоты варьировали в пределах 10–50 мол. %. Соплимеры были получены методом полимеризации с раскрытием цикла *N*-карбоксиангидридов LLys(Z) и LPhe/D,LPhе/DPhe с использованием *n*-гексиламина в качестве инициатора:

Полученные в результате полимеризации продукты имели гидрофобную природу и растворялись в органических растворителях, что позволи-

ло проанализировать их методом эксклюзионной жидкостной хроматографии в ДМФА, содержащем 0.1 М LiBr. Среднемассовая молекулярная масса сополимеров закономерно возрастала с увеличением доли *N*-карбоксиангидрида Lys(Z) в полимеризационной смеси (молекулярная масса *N*-карбоксиангидрида Lys(Z) больше молекулярной массы *N*-карбоксиангидрида Phe) (рис. 1).

Дисперсность полученных полимеров лежала в пределах 1.10–1.37 и возрастала с увеличением содержания КА производного лизина в полиме-

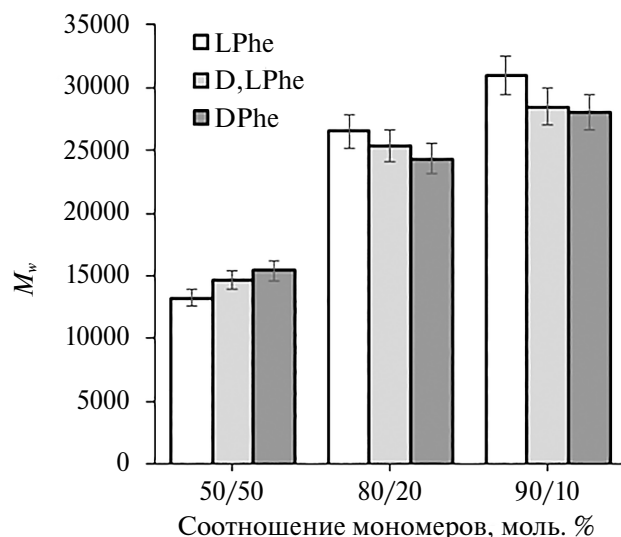
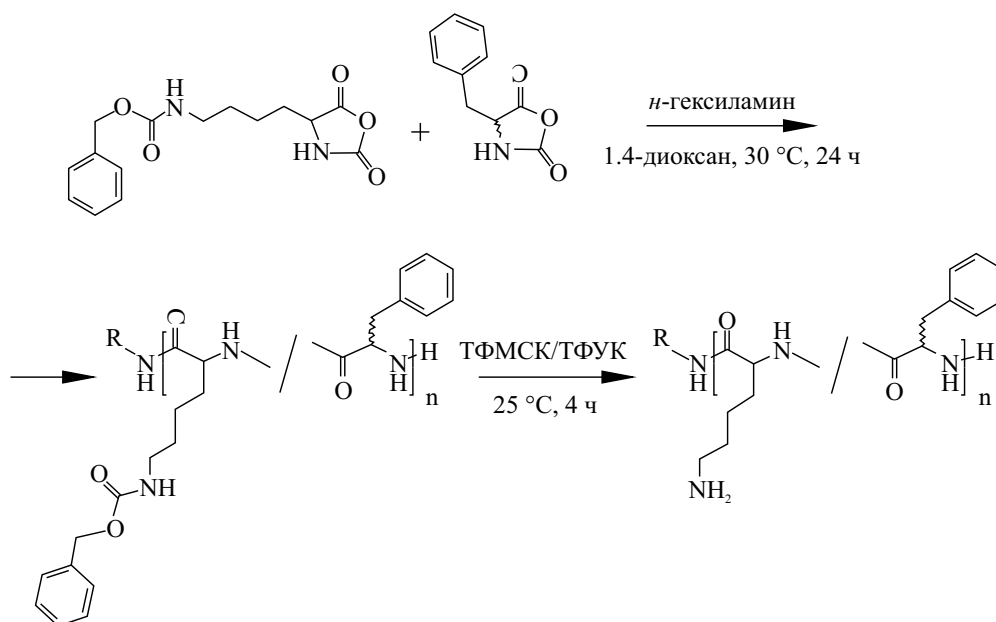


Рис. 1. Зависимость молекулярной массы сополимеров карбоксибензил-*L*-лизина с *L/D*, *L/D*-фенилаланином от состава смеси мономеров (ЭЖХ). Мольные соотношения 50 : 50, 80 : 20 и 90 : 10 соответствуют соотношению Lys(Z) КА : Phe КА в реакционной смеси.



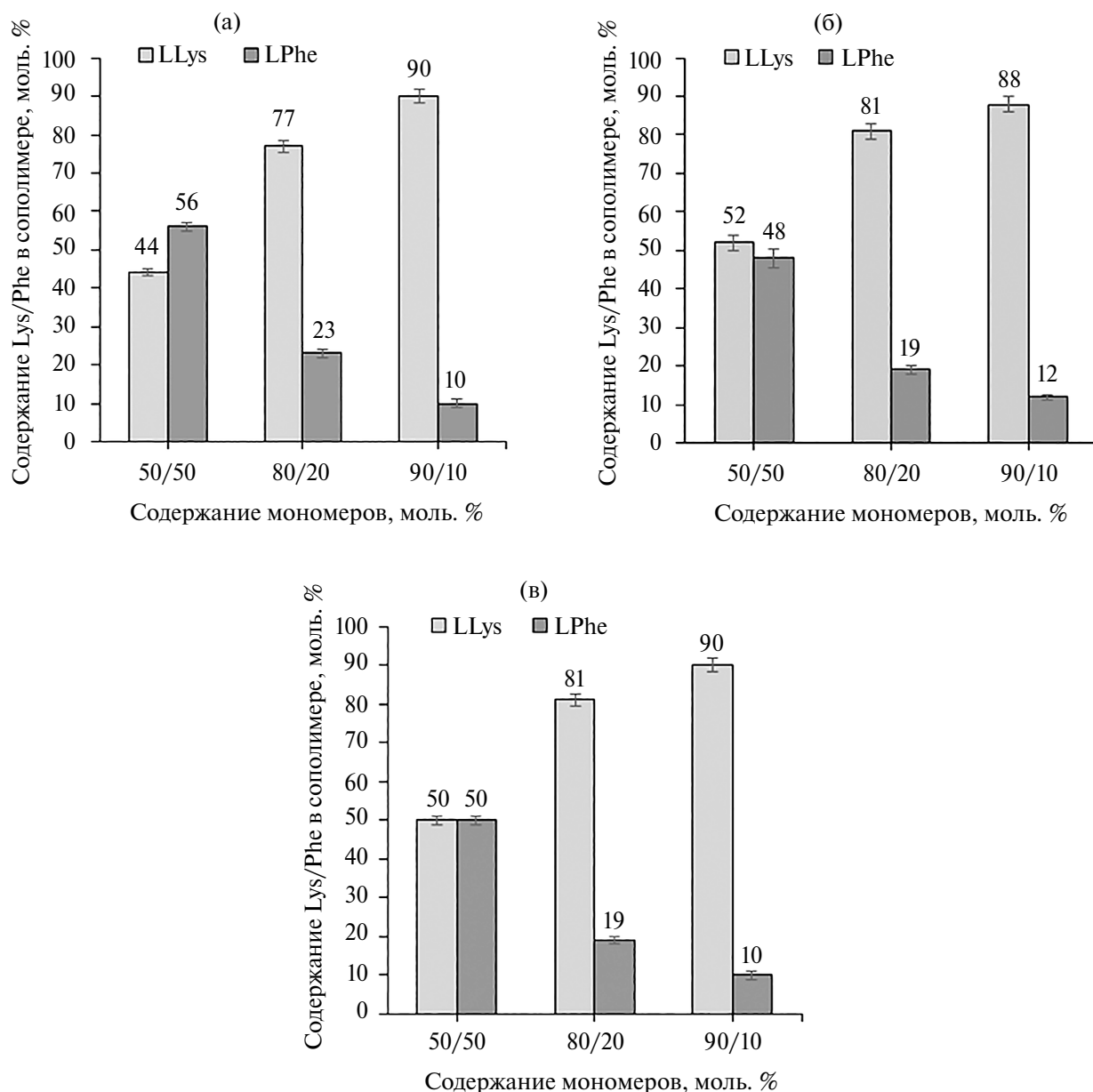


Рис. 2. Состав полученных сополимеров (ВЭЖХ-МС свободных аминокислот, полученных после полного кислотного гидролиза образцов сополимеров) P(LLys-co-LPhe) (а), P(LLys-co-DLPhe) (б) и P(LLys-co-DPhe) (в).

ризационной смеси. После удаления карбоксибензильной защитной группы лизина (см. приведенную выше схему) сополимеры становились амфифильными и приобретали способность к самоорганизации в водных средах.

Состав сополимеров определяли методом количественного ВЭЖХ-МС анализа свободных аминокислот, полученных после полного кислотного гидролиза образцов сополимеров. Полученные результаты представлены на рис. 2.

Состав всех сополимеров, содержащих D,L Phe или DPhe, был близок к теоретически заданному. В то же время состав сополимеров, содержащих LPhe, был немного обогащен этой аминокислотой при начальных соотношениях мономеров 50 : 50 и 80 : 20.

Для установления особенности распределения мономерных звеньев в цепи сополимера была исследована относительная активность *N*-карбоксиангидридов Lys(Z) и LPhe/DPhe в реакции

сополимеризации. В качестве примера на рис. 3 приведена зависимость состава сополимера P(LLys(Z)-co-LPhe) от состава исходной смеси *N*-карбоксиингидридов.

Установлено, что при сополимеризации КА оптически чистых изомеров LLys (M_1) и LPhe (M_2), константы сополимеризации составили $r_1 = 0.80$, $r_2 = 0.93$. В случае сополимеризации смеси КА оптических изомеров LLys (M_1) и DPhe (M_2), константы сополимеризации равны $r_1 = 1.17$, $r_2 = 1.22$. В обоих случаях константы сополимеризации мономеров были близки между собой, что свидетельствует о близкой относительной активности мономеров. Таким образом, синтезированные сополимеры имеют статистическое распределение звеньев в полимерной цепи.

Получение наночастиц и изучение их характеристик

Наночастицы получали методом градиентной инверсии фаз (диализ) с органического растворителя на дистиллированную воду. В таких условиях замена растворителя способствует прогрессирующей самоорганизации амфифильного полимера вследствие ухудшения растворимости гидрофобной составляющей в воде и усиления гидрофобных взаимодействий. По мере инверсии фаз макромолекулы амфифильного сополимера стремятся принять конформацию, минимизирующую термодинамически невыгодный контакт гидрофобных фрагментов с плохим растворителем (вода), вследствие чего возникает

микрофазная гетерогенность. При достижении определенных условий происходит самосборка макромолекул в надмолекулярные структуры (наночастицы), в результате чего гидрофобные фрагменты (звенья Phe) формируют агрегированную микрофазу, локализованную преимущественно внутри наночастицы. При этом хорошо сольбилизирующиеся гидрофильные фрагменты (звенья Lys) преимущественно экспонируются в раствор. В отличие от амфифильных блок-сополимеров полное разделение на гидрофобное ядро и оболочку, как в мицеллах, в случае обсуждаемых сополимеров невозможно. Учитывая относительно равномерное распределение звеньев в сополимере, часть гидрофильных звеньев неизбежно будет попадать внутрь частиц, при этом часть гидрофобных звеньев, вероятно, будет иметь приповерхностное расположение.

Для хранения в сухом виде и приготовления наночастиц в различных средах с заданной концентрацией дисперсию лиофильно высушивали. Перед исследованием физико-химических характеристик, стабильности и цитотоксичности наночастиц проводили редиспергирование соответствующей навески в нужной среде (воде/буферном растворе/водной среде с заданным pH) под кратковременным воздействием ультразвука (15–30 с).

Как видно из данных, представленных на рис. 4, гидродинамический диаметр частиц зависел от содержания гидрофобной аминокислоты и ее оптического изомера.

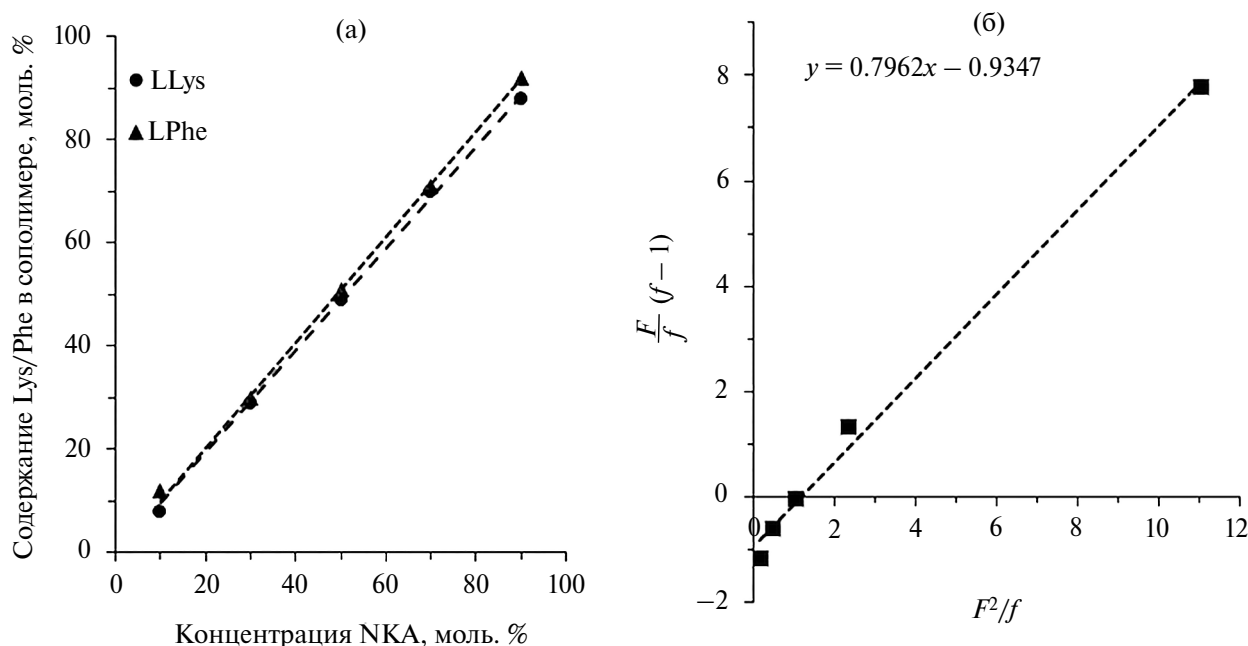


Рис. 3. Зависимость состава сополимера P(LLys-co-LPhe) от содержания мономеров в полимеризационной смеси (а) и определение констант сополимеризации по методу Файнемана–Росса (б).

Во всех случаях при повышении содержания гидрофобной аминокислоты наблюдалось формирование наиболее компактных наночастиц. Данный результат обусловлен уменьшением растворимости сополимера, усилением гидрофобных взаимодействий в водных средах при увеличении доли гидрофобного фрагмента, и, как следствие, формированием более плотной упаковки. В свою очередь повышение содержания лизина в сополимере способствует образованию более рыхлой структуры прежде всего за счет электростатического отталкивания одноименно заряженных полимерных фрагментов, что ожидаемо приводит к росту гидродинамического диаметра.

Кроме того, при прочих равных характеристиках (состав, молекулярная масса) гидродинамический диаметр наночастиц уменьшался в зависимости от хиральности фенилаланина в следующем ряду $L\text{Phe} > D,L\text{Phe} > D\text{Phe}$. Известно, что $L\text{Phe}$ относится к аминокислотам, ответственным за формирование β -складчатых фрагментов вторичной структуры полипептидов [30, 31]. В литературе на примере β -складчатых L - и D -стереоизомеров амилоидных пептидов показано, что образование амилоидных фибрилл являлось L -стереоспецифичным. При этом смешение энантиомерных пептидов изменяло морфологию и физические свойства самособирающихся пептидных систем [32, 33]. Также известно, что введение D -аминокислот в L -пептиды может деформировать или разрушить их первоначальную вторичную структуру [34]. Недавно, S. Kralj и соавторы исследовали влияние изменения хиральности аминокислот на самоорганизацию дифени-

лаланина. Установлено, что замена одного $L\text{Phe}$ на его D -энантиомер сохраняла способность дипептида к самосборке в нанотрубки, а гетерохиральность делала нанотрубки более однородными и стабильными [35]. O.S. Tiwari и соавт. показали, что при конъюгации дипептида Phe-Phe с нуклеозидом A как гомохиральные, так и гетерохиральные конъюгаты образовывали сферические частицы, однако только в последнем случае формировались полые частицы [36]. Кроме того, измерения контактного угла выявили, что гомохиральный D -пептид был более гидрофобным, чем гетерохиральные пептиды. Таким образом, на основании литературных данных о влиянии хиральности на морфологию и свойства самособирающихся пептидных систем можно предположить, что наблюдаемые в настоящей работе различия в гидродинамических диаметрах полипептидных наночастиц, вероятно, обусловлены изменением упорядоченной структуры полипептидов, содержащих оптически чистый $L\text{Phe}$, на неупорядоченные клубки в случае $L,D\text{Phe}$ -содержащих полипептидов, а также более высокой гидрофобностью D -содержащих полипептидов.

Значения индекса полидисперсности наночастиц на основе сополимеров лизина с фенилаланином лежали в диапазоне 0.20–0.34 в случае сополимеров с $L\text{Phe}$ и 0.19–0.33 в случае сополимеров с $D,L\text{Phe}$. В обоих случаях значения индекса полидисперсности уменьшались с увеличением содержания гидрофобной аминокислоты. Для всех полученных наночастиц на основе сополимеров $L\text{Lys}$ с $D\text{Phe}$ индекс полидисперсности имел меньшие значения и составлял 0.20–0.22. Согласно существующим представлениям, значения индекса полидисперсности до 0.1 свидетельствуют о наличии монодисперсных наночастиц, индекс полидисперсности в диапазоне 0.1–0.3 указывают на относительно однородную популяцию наночастиц (умеренной полидисперсности), тогда как наночастицы с индексом полидисперсности более 0.4 рассматриваются как неоднородная популяция (широкая полидисперсность) [37–39]. Для применения в качестве систем доставки лекарств допустимым считается значение индекса полидисперсности до 0.3 [38]. В данной работе за исключением образцов, содержащих минимальное количество $L\text{Phe}$ (10 мол. %) и $D,L\text{Phe}$ (12 мол. %), все полученные наночастицы имели значения индекса полидисперсности менее 0.3.

Как ожидалось, все наночастицы характеризовались положительными значениями ζ -потенциала поверхности, что определяется локализацией на поверхности ионизуемых звеньев лизина. При этом значения дзета-потенциала напрямую зависели от содержания лизина в сополимере и возрастали от 30 до 39 мВ (дистиллированная вода, содержащая 0.001 М NaCl) с увеличением доли лизина в сополимере от 50 до 90 мол. %.

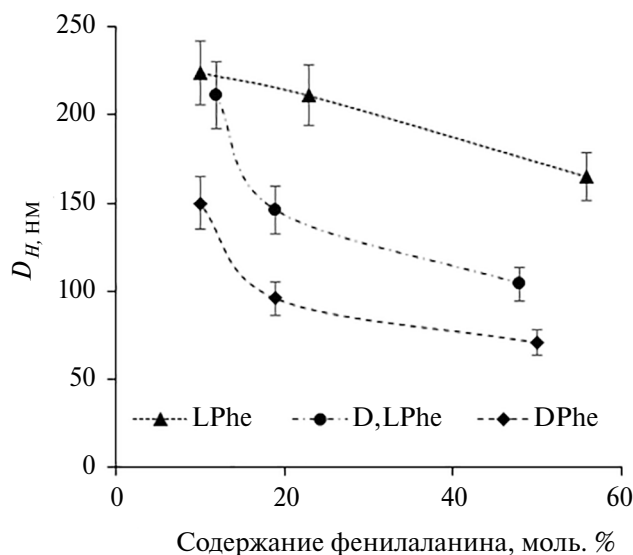


Рис. 4. Зависимость гидродинамического диаметра наночастиц от состава сополимера (0.01 М фосфатный буферный раствор, 25°C).

Для сравнения самоорганизации сополимеров лизина с фенилаланином различной хиральности были определены значения критических концентраций агрегации для сополимеров с промежуточным составом: LLys : LPhе = 77 : 23 мол. %; LLys : D,LPhе и LLys : DPhе = 81 : 19 мол. %. Значения критических концентраций агрегации (вода, 25°C) для данных сополимеров составили 9.4 ± 0.2 , 6.7 ± 0.3 и 7.2 ± 0.3 мкг/мл соответственно. Значения критических концентраций агрегации, рассчитанные в единицах молярной концентрации для тех же сополимеров в той же последовательности, составили 0.6, 0.5 и 0.5 мкМ соответственно. Найденные значения согласуются с литературными данными для самоорганизации других амфифильных полипептидов [5, 40–43].

Изучение гидродинамического диаметра наночастиц в зависимости от pH среды показало незначительное влияние pH среды на характеристики наночастиц (рис. 5).

Резкое увеличение D_H наблюдалось только при значениях pH выше 10, что связано с депротонированием боковых аминогрупп лизина, потерей заряда и коллоидной стабильности наночастиц и, как следствие, их агрегацией. Полученные результаты согласуются с известными свойствами лизина: pK_a ε -аминогруппы лизина составляет 10.5. В области pH ниже 10 аминогруппа в боковой цепи сополимеров лизина протонирована, что обеспечивает поверхности наночастиц положительный заряд, и, следовательно, коллоидную стабильность дисперсии в широком диапазоне.

Морфологию полученных наночастиц оценивали методом ПЭМ при использовании в качестве контрастного агента уранил ацетата. Согласно микрофотографиям ПЭМ, все синтезированные сополимеры в водных средах формировали сферические частицы (рис. 6).

Средний диаметр частиц в сухом состоянии был вдвое меньше значений гидродинамического диаметра (табл. 1), что объясняется потерей воды при высыхании наночастиц и, как следствие, схлопыванием полимерных цепей. Данная особенность поведения является характерной для так называемых “мягких наночастиц” (soft nanoparticles), к которым относятся полимерные мицеллы, полимерсомы и наногели. В отличие от первых двух типов наночастиц, формирующихся только из амфифильных блок-сополимеров, наногели могут собираться из других типов амфифильных сополимеров. Учитывая примерно двукратное изменение размера полученных наночастиц в водной среде по отношению к сухому состоянию (набухание), формируемые за счет самосборки наночастицы можно отнести к физически стабилизированным (гидрофобными и π - π -взаимодействиями) наногелям.

Исследование стабильности наночастиц *in vitro*

Исследование стабильности наночастиц на основе синтезированных сополимеров было проведено в двух модельных средах: 0.01 М фосфатный буферный раствор, pH 7.4, и 0.01 М фосфатный буферный раствор, pH 7.4, с добавлением папаина. Выбранный фермент относится к классу

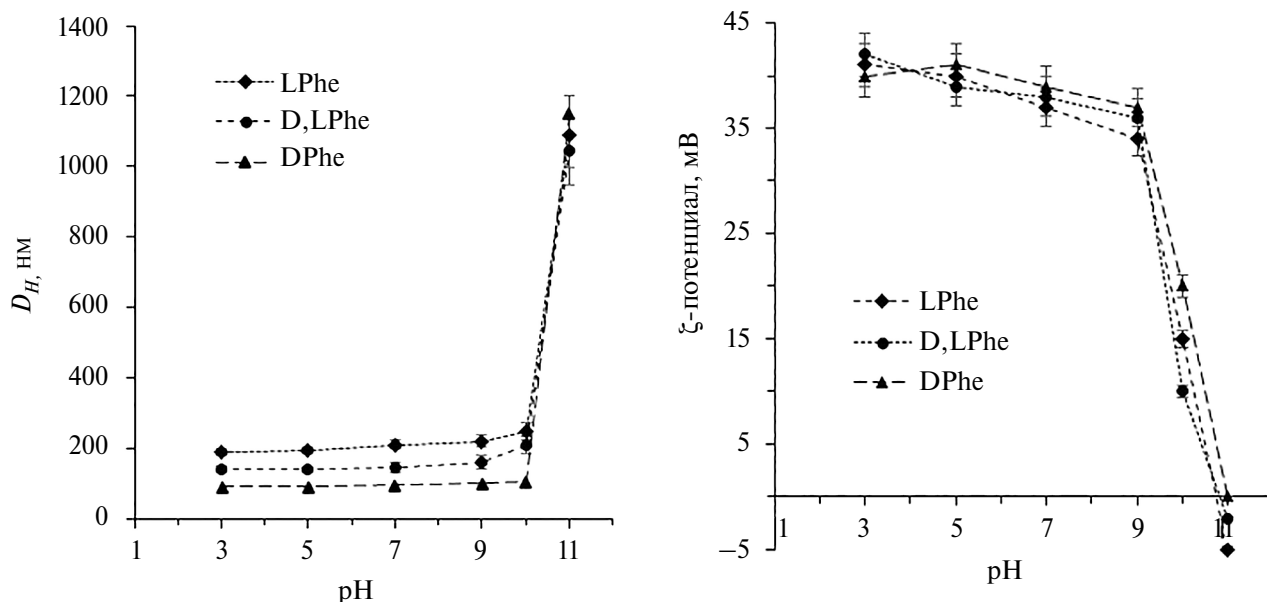


Рис. 5. Зависимость гидродинамического диаметра (а) и дзета-потенциала (б) наночастиц на основе сополимеров L-лизина и L/D,L/D-фенилаланина от pH дисперсионной среды (вода, содержащая 0.001 моль/л NaCl; pH среды задан добавлением 0.1 М раствора HCl/NaOH). Измерения проводили, редиспергируя навеску сухих частиц в среде с заданным pH.

протеаз с широкой субстратной специфичностью и активен в диапазоне рН от 5.0 до 7.5. Стабильность оценивали, инкубируя дисперсию наноча-

стиц при температуре 37°С в течение 30 дней, и измеряя гидродинамический диаметр частиц через определенные промежутки времени (рис. 7).

Таблица 1. Сравнительные размеры наночастиц на основе сополимеров лизина с фенилаланином в водной дисперсии (вода) и сухом состоянии

Сополимер	Lys : Phe, мол. %	ДРС		ПЭМ
		D_n , нм	индекс полидисперсности	$\bar{D}$, нм
P(LLys-co-LPhe)	77/23	211	0.27	100 ± 37
P(LLys-co-D,LPhe)	81/19	146	0.20	73 ± 29
P(LLys-co-DPhe)	81/19	96	0.22	51 ± 15

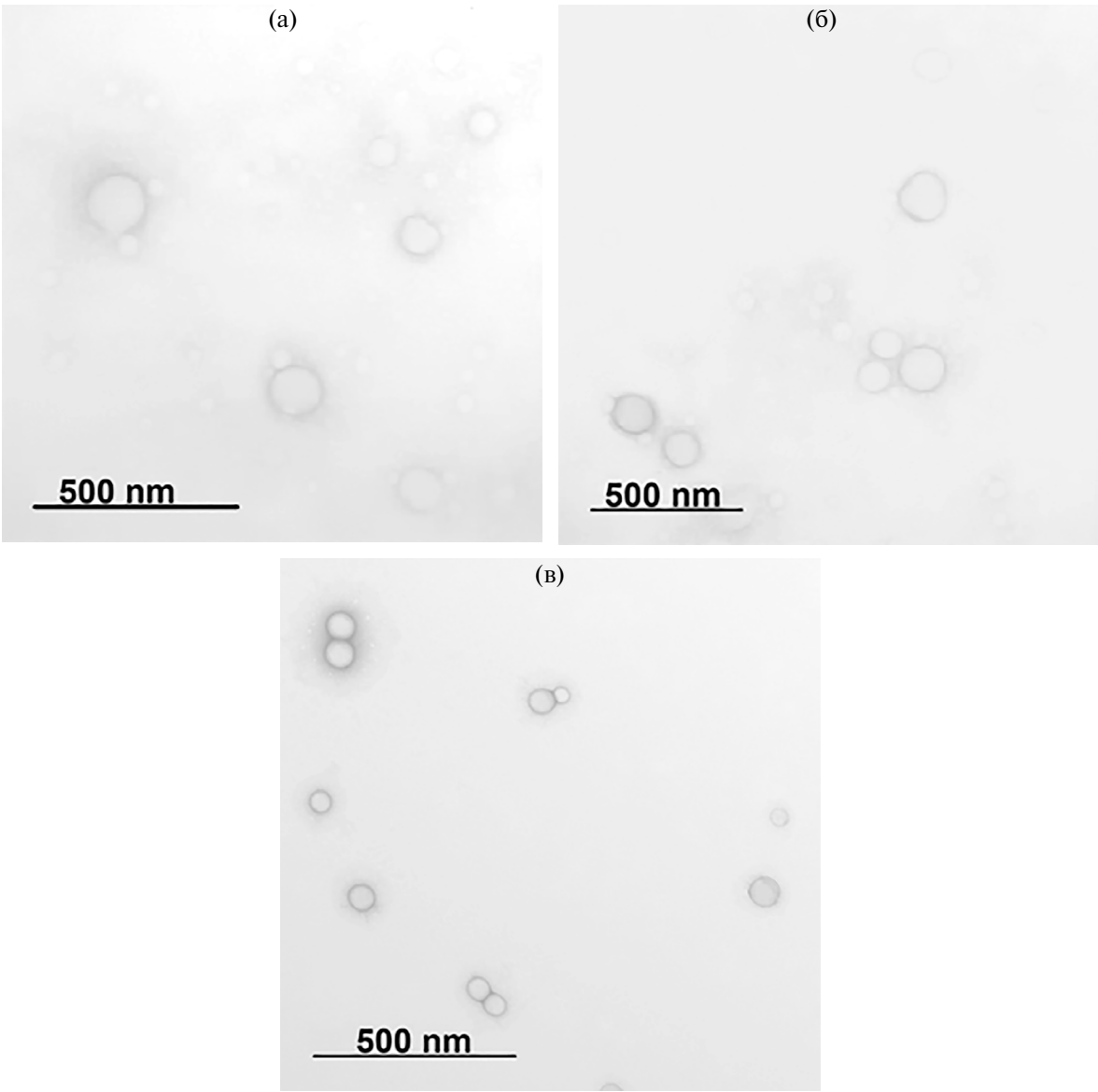


Рис. 6. Микрофотографии наночастиц (ПЭМ) на основе сополимеров лизина с фенилаланином P(LLys-co-LPhe) (77 : 23 мол. %) (а), P(LLys-co-D,LPhe) (81 : 19 мол. %) (б) и P(LLys-co-DPhe) (81 : 19 мол. %) (в).

В буферной среде наночастицы на основе сополимера, содержащего в своем составе только L-аминокислоты, были стабильны в течение двух недель, после чего наблюдалась постепенная агрегация частиц, связанная, по-видимому, с частичной деградацией гидрофильного фрагмента. В то же время наночастицы на основе сополимеров, содержащих в своем составе D,LPhе или DPhе, были стабильны в течение всего периода наблюдения.

Инкубирование наночастиц на основе сополимера, содержащего L-аминокислоты, в среде с ферментом выявило выраженную деградацию полипептида. Нарушения в стабилизирующей оболочке, вызванные отщеплением гидрофильной аминокислоты, приводят к экспонированию в водный раствор гидрофобных фрагментов, что в свою очередь влияет на стабильность наночастиц. В результате протекания данных процессов уже в первые сутки начиналась агрегация наночастиц, которая достигла своего максимума спустя 10 дней. Однако уже через 20 дней наблюдалась практически полная деградация полимерных частиц.

Как и ожидалось, частичная или полная замена LPhе на DPhе способствовала получению более ферментативно-устойчивых наночастиц, что, несомненно, важно с точки зрения создания систем доставки лекарств пролонгированного действия. В частности, наночастицы, содержащие рацемическую смесь гидрофобной аминокислоты в сополимере, были стабильны в течение 20 дней, тогда как сополимеры, содержащие только DPhе, были стабильны в течение всего периода наблюдения (30 дней).

Полученные результаты согласуются с литературными данными. Так, например, замена L-аминокислот на их D-стереоизомеры в пептиде KKVVFVKVFKK влияла на вторичную структуру, стабильность и биологическую активность пептида. Замена L-аминокислот на D-стереоизомеры в концевых фрагментах пептида мало влияла на антимикробную активность пептида, тогда как замены в середине аминокислотной последовательности приводили к полной потере активности. При этом стабильность пептида в сыворотке крови значительно повышалась при замене L-аминокислот на D-стереоизомеры [44].

Исследование цитотоксичности наночастиц

Одной из основных проблем при использовании неcodируемых D-аминокислот является их потенциальная токсичность. Так, известно, что при стереоселективном деаминировании D-аминокислот под действием оксидазы D-аминокислот образуется перекись водорода, вызывающая апоптоз-опосредованную цитотоксичность [45]. В частности, при сравнении пептидов, содержащих D-аминокислоты с таковыми, содержащими только L-стереоизомеры, действительно, D-пептиды демонстрировали более высокую цитотоксичность против неопластических клеток, чем L-пептиды [46]. В связи с этим (поли)пептиды, содержащие D-аминокислоты, на сегодняшний день перспективны в области терапии рака для усиления апоптоза раковых клеток.

В рамках данной работы цитотоксичность полученных наночастиц исследовали на двух линиях нормальных клеток, а именно на эмбриональных

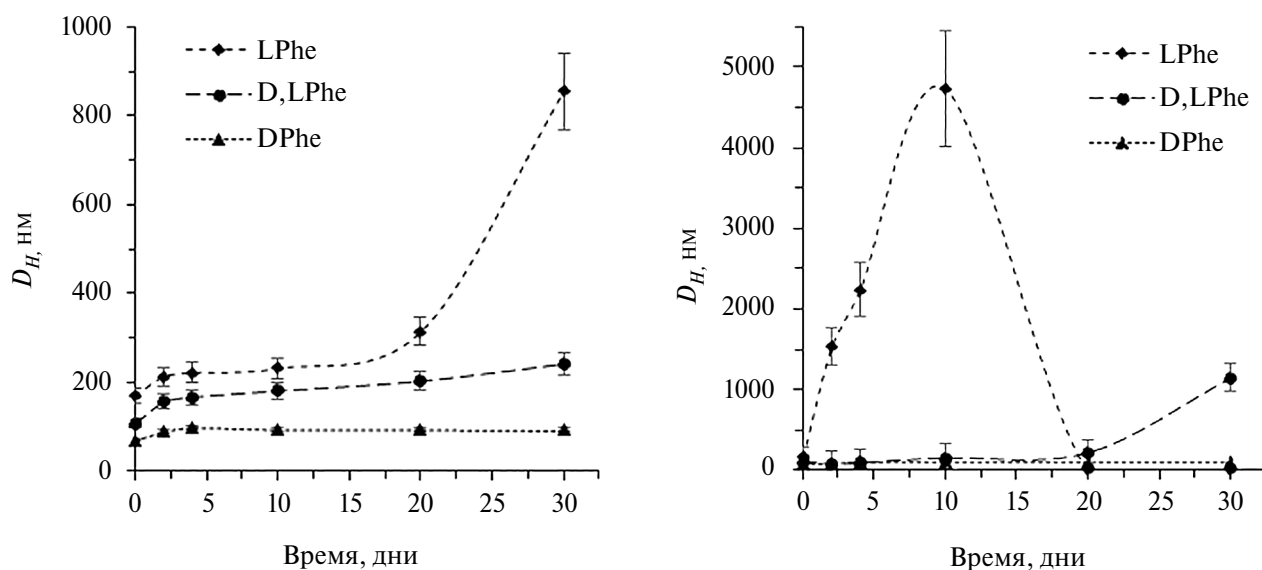


Рис. 7. Зависимость гидродинамического диаметра наночастиц на основе сополимеров L-лизина с фенилаланином различной хиральности (50 : 50 мол. %) от времени инкубирования при температуре 37°C в 0.01 М фосфатном буферном растворе, pH 7.4 (а) и 0.01 М фосфатном буферном растворе, pH 7.4, содержащем папаин (б).

клетках почек человека (НЕК 293) и эпителиальных клетках легких человека (BEAS-2B). Во обоих случаях время инкубирования наночастиц с клетками составляло 72 ч. Для наблюдения наиболее выраженного биологического эффекта для тестирования были выбраны сополимеры, содержащие максимальное количество фенилаланина (~50 мол. %). Рассчитанные значения концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) для исследованных образцов представлены в табл. 2.

Как можно было ожидать, все протестированные образцы катионных наночастиц демонстрировали заметную цитотоксичность. В целом полученные значения согласуются с литературными данными для положительно заряженных полипептидных наночастиц, обогащенных Lys и/или Arg. Значения IC_{50} , определенные с использованием нормальных и раковых клеток, в зависимости от размера и состава катионных полипептидных наночастиц лежат в пределах 15–80 мкг/мл [47–50]. Несмотря на некоторую цитотоксичность катионных систем, положительный заряд является ключевым для обеспечения эффективной внутриклеточной доставки генетических конструкций и некоторых лекарств.

Частичная замена LPhe на DPhe не оказала существенного влияния на выживаемость клеток обоих типов. Однако полная замена LPhe на DPhe приводила почти к двукратному снижению значений IC_{50} . Таким образом, сополимеры, содержащие в своем составе до 50 мол. % D-аминокислоты демонстрировали большую цитотоксичность, чем сополимеры, содержащие рацемическую смесь фенилаланина или только L-стереоизомер в том же количестве.

а распределение звеньев вдоль цепи носило статистический характер. Все полученные сополимеры в водных средах формировали сферические наночастицы (критическая концентрация агрегации ~ 6.7–9.4 мкг/мл (0.5–0.6 мкМ)), гидродинамический диаметр которых практически не изменялся в диапазоне pH от 3 до 9. Увеличение содержания гидрофобной аминокислоты, а также частичная или полная замена L-фенилаланина на D-стереоизомер в составе сополимера приводила к формированию наночастиц с меньшим гидродинамическим диаметром. Изучение процесса биodeградации полимерных наночастиц в модельных средах выявило, что деградация наночастиц на основе сополимеров, содержащих в своем составе L-аминокислоты, протекала значительно более интенсивно, чем для систем, содержащих D-аминокислоту. При этом сополимеры, содержащие значительную долю D-фенилаланина, демонстрировали большую цитотоксичность, чем их рацемические или только L-энантиомер-содержащие аналоги.

Таким образом, по совокупности характеристик и свойств сополимеры LLys с D,LPhe являются наиболее перспективными в качестве систем внутриклеточной доставки лекарств и генетических конструкций. С одной стороны, они демонстрируют достаточно компактный размер, а с другой, биологические свойства, схожие с сополимерами, содержащими LPhe, но при этом более высокую стабильность в биологических средах.

Работа выполнена при использовании оборудования ресурсных центров “Методы анализа состава вещества”, “Магнитно-резонансные методы исследования” и “Развитие молекулярных и клеточных технологий” Научного парка СПбГУ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Синтезирована серия амфифильных статистических сополимеров на основе L-лизина и L/D,L/D-фенилаланина с различным содержанием гидрофильного и гидрофобного фрагментов. Для всех синтезированных сополимеров их состав был близок с теоретически заданному,

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Perin F., Motta A., Maniglio D.* // Mater. Sci. Eng. C 2021. V. 123. P. 111952.
2. *Kuperkar K., Patel D., Atanase L.I., Bahadur P.* // Polymers (Basel). 2022. V. 14. P. 4702.
3. *Afzal O., Altamimi A.S.A., Nadeem M.S., Alzarea S.I., Almalki W.H., Tariq A., Mubeen B., Murtaza B.N.,*

Таблица 2. Значения IC_{50} , полученные при инкубировании наночастиц на основе сополимеров L-лизина с фенилаланином различной хиральности, с нормальными клетками (72 ч)

Сополимер	Lys : Phe, мол. %	Клеточная линия	IC_{50} , мкг/мл
P(LLys-co-LPhe)	44 : 56	HEK 293	61 ± 4
		BEAS-2B	47 ± 2
P(LLys-co-D,LPhe)	52 : 48	HEK 293	52 ± 6
		BEAS-2B	45 ± 5
P(LLys-co-DPhe)	50 : 50	HEK 293	32 ± 3
		BEAS-2B	17 ± 2

- Iftikhar S., Riaz N., Kazmi I.* // *Nanomaterials*. 2022. V. 12. P. 4494.
4. *Yao Y., Zhou Y., Liu L., Xu Y., Chen Q., Wang Y., Wu S., Deng Y., Zhang J., Shao A.* // *Front. Mol. Biosci.* 2020. V. 7. P. 193.
5. *Stepanova M., Nikiforov A., Tennikova T., Korzhikova-Vlakh E.* // *Pharmaceutics*. 2023. V. 15. P. 2641.
6. *Feng H., Fabrizi J., Li J., Mayer C.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. P. 5042.
7. *Sakhabeev R.G., Polyakov D.S., Sinitsyna E.S., Korzhikova-Vlakh E.G., Korzhikov-Vlakh V.A., Shavlovsky M.M.* // *J. Evol. Biochem. Physiol.* 2023. V. 59. P. 504.
8. *Bonduelle C.* // *Polym. Chem.* 2018. V. 9. P. 1517.
9. *Kricheldorf H.R.* // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2006. V. 45. P. 5752.
10. *Cheng J., Deming T.J.* // *Pept. Mater. Top. Curr. Chem.* / Ed. T. Deming. Springer, Berlin, Heidelberg. 2012. P. 1–26.
11. *Deng C., Wu J., Cheng R., Meng F., Klok H.A., Zhong Z.* // *Prog. Polym. Sci.* 2014. V. 39. P. 330.
12. *Clerici F., Erba E., Gelmi M.L., Pellegrino S.* // *Tetrahedron Lett.* 2016. V. 57. P. 5540.
13. *Perumal S., Atchudan R., Lee W.* // *Polymers (Basel)*. 2022. V. 14. P. 2510.
14. *Tarasenko I., Zashikhina N., Guryanov I., Volokitina M., Biondi B., Fiorucci S., Formaggio F., Tennikova T., Korzhikova-Vlakh E.* // *RSC Adv.* 2018. V. 8. P. 34603.
15. *Blanazs A., Armes S.P., Ryan A.J.* // *Macromol. Rapid Commun.* 2009. V. 30. P. 267.
16. *Korzhikov-Vlakh V., Tennikova T.* // *Tunable Hydrogels. Adv. Biochem. Eng.* / Eds. A. Lavrentieva, I. Pepelanova, D. Seliktar. Springer, Cham. 2021. P. 99–146.
17. *Wong C.K., Lai R.Y., Thordarson P.* // *Supramol. Nanotechnol. Adv. Des. Self-Assembled Funct. Mater.* / Eds. O. Azzaroni and M. Conda-Sheridan. Wiley. 2023. P. 1027–1054.
18. *Sudareva N.N., Suvorova O.M., Korzhikova-Vlakh E.G., Tarasenko I.I., Kolbe K.A., Smirnova N.V., Saprykina N.N., Suslov D.N.* // *Tech. Phys.* 2022. V. 67. P. 277.
19. *Sudareva N.N., Korzhikova-Vlakh E.G., Tarasova I.I., Suslov D.N., Yukina G.Y., Sukhorukova E.G., Galibin O.V., Vilisov A.D.* // *Cell. Ther. Transplant.* 2023. V. 12. P. 44.
20. *Georgilis E., Abdelghani M., Pille J., Aydinlioglu E., van Hest J.C.M., Lecommandoux S., Garanger E.* // *Int. J. Pharm.* 2020. V. 586. P. 119537.
21. *Zashikhina N., Gandaliyov E., Dzhuzha A., Korzhikov-Vlakh V., Korzhikova-Vlakh E.* // *J. Microencapsul.* 2023. V. 1.
22. *Zashikhina N.N., Yudin D.V., Tarasenko I.I., Osipova O.M., Korzhikova-Vlakh E.G.* // *Polym. Sci. Ser. A.* 2020. V. 62. P. 43.
23. *Korovkina O., Polyakov D., Korzhikov-Vlakh V., Korzhikova-Vlakh E.* // *Molecules*. 2022. V. 27. P. 8495.
24. *Stefanovic S., McCormick K., Fattah S., Brannigan R., Cryan S.-A., Heise A.* // *Polym. Chem.* 2023. V. 14. P. 3151.
25. *Zheng Y., Mao K., Chen S., Zhu H.* // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021. V. 9. P. 703004.
26. *Bastings J.J.A.J., van Eijk H.M., Olde Damink S.W., Rensen S.S.* // *Nutrients*. 2019. V. 11. P. 2205.
27. *Abdulbagi M., Wang L., Siddig O., Di B., Li B.* // *Biomolecules*. 2022. V. 11. P. 1716.
28. *Wilder R., Mobashery S.* // *J. Org. Chem.* 1992. V. 57. P. 2755.
29. *Tsugita A., Scheffler J.J.* // *Proc. Japan Acad.* 1982. V. 58. P. 1.
30. *Nowick J.S., Insaf S.* // *J. Am. Chem. Soc.* 1997. V. 119. P. 10903.
31. *Fujiwara K., Toda H., Ikeguchi M.* // *BMC Struct. Biol.* 2012. V. 12. P. 18.
32. *Wadai H., Yamaguchi K., Takahashi S., Kanno T., Kawai T., Naiki H., Goto Y.* // *Biochemistry*. 2005. V. 44. P. 157.
33. *Gupta D., Sasmal R., Singh A., Joseph J.P., Miglani C., Agasti S.S., Pal A.* // *Nanoscale*. 2020. V. 12. P. 18692.
35. *Luo Z., Wang S., Zhang S.* // *Biomaterials*. 2011. V. 32. P. 2013.
36. *Kralj S., Bellotto O., Parisi E., Garcia A.M., Iglesias D., Semeraro S., Deganutti C., D'Andrea P., Vargiu A.V., Geremia S., De Zorzi R., Marchesan S.* // *ACS Nano*. 2020. V. 14. P. 16951.
37. *Tiwari O.S., Ganesh K.N., Gazit E.* // *Macromol. Chem. Phys.* 2022. V. 223. P. 11.
38. *Zhang S., Wang C.* // *Nano-Structures & Nano-Objects*. 2023. V. 35. P. 100994.
39. *Danaei M., Dehghankhold M., Ataei S., Hasanzadeh Davarani F., Javanmard R., Dokhani A., Khorasani S., Mozafari M.* // *Pharmaceutics*. 2018. V. 10. P. 57.
40. *Cho E.J., Holback H., Liu K.C., Abouelmagd S.A., Park J., Yeo Y.* // *Mol. Pharm.* 2013. V. 10. P. 2093.
41. *Ren T.-B., Xia W.-J., Dong H.-Q., Li Y.-Y.* // *Polymer (Guildf)*. 2011. V. 52. P. 3580.
42. *Arimura H., Ohya Y., Ouchi T.* // *Biomacromolecules*. 2005. V. 6. P. 720.
43. *Quadir M. A., Morton S.W., Deng Z.J., Shopsowitz K.E., Murphy R.P., Epps T.H., Hammond P.T.* // *Mol. Pharm.* 2014. V. 11. P. 2420.
44. *Osipova O., Zakharova N., Pyankov I., Egorova A., Kislova A., Lavrentieva A., Kiselev A., Tennikova T., Korzhikova-Vlakh E., Drug Deliv J.* // *J. Sci. Technol.* 2022. V. 69. P. 103135.
45. *Yao C., Liu J., Wu X., Tai Z., Gao Y., Zhu Q., Li J., Zhang L., Hu C., Gu F., Gao J., Gao S., Control J.* // *Release*. 2016. V. 232. P. 203.
46. *Zheng C., Zheng M., Gong P., Deng J., Yi H., Zhang P., Zhang Y., Liu P., Ma Y., Cai L.* // *Biomaterials*. 2013. V. 34. P. 3431.
47. *Qu J., Peng S., Wang R., Yang S., Zhou Q., Lin J.* // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2019. V. 181. P. 315.