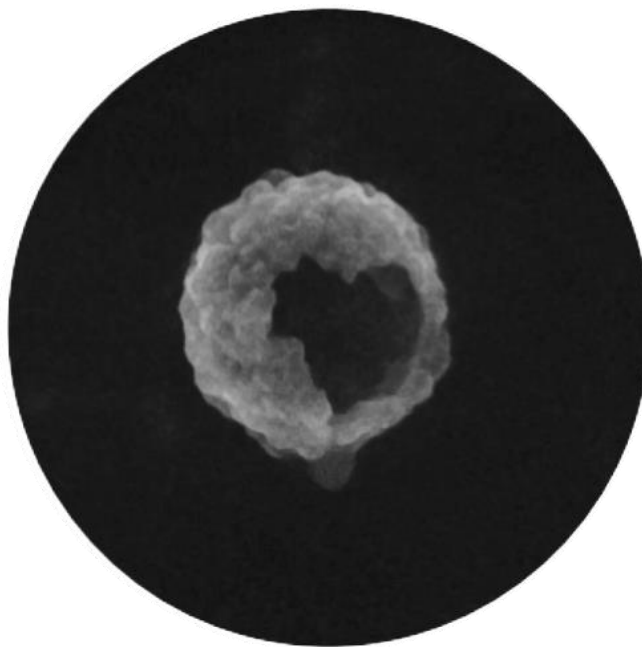


ІІТМО

**Д.В. Кладько, А.С. Фальчевская,
А.Ю. Прилепский**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
ДЛЯ СТАНДАРТИЗАЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ
В БИОНАНОТЕХНОЛОГИЯХ**



**Санкт-Петербург
2025**

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

**Д.В. Кладько, А.С. Фальчевская,
А.Ю. Прилепский**
**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
ДЛЯ СТАНДАРТИЗАЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ
В БИОНАНОТЕХНОЛОГИЯХ**

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ

РЕКОМЕНДОВАНО К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ В УНИВЕРСИТЕТЕ ИТМО
по направлению подготовки 19.04.01 Биотехнология
в качестве Учебно-методического пособия для реализации основных
профессиональных образовательных программ высшего образования
магистратуры

ИТМО

Санкт-Петербург
2025

Кладько Д.В., Фальчевская А.С., Прилепский А.Ю. Методические указания для стандартизации экспериментов в бионанотехнологиях – СПб: Университет ИТМО, 2025. – 76 с.

Рецензенты:

Уласевич Светлана Александровна, кандидат химических наук, доцент (квалификационная категория "ординарный доцент") научно-образовательного центра инфохимии Университета ИТМО.

В пособии изложены основные рекомендации по постановке экспериментов в бионанотехнологиях. Предназначено для студентов-магистрантов химико-биологического кластера Университета ИТМО, а также может быть рекомендовано студентам естественно-научного профиля при выполнении ими ряда работ в специализированных практикумах.

ИТМО

ИТМО (Санкт-Петербург) — национальный исследовательский университет, научно-образовательная корпорация. Альма-матер победителей международных соревнований по программированию. Приоритетные направления: IT и искусственный интеллект, фотоника, робототехника, квантовые коммуникации, трансляционная медицина, Life Sciences, Art&Science, Science Communication. Лидер федеральной программы «Приоритет-2030», в рамках которой реализуется программа «Университет открытого кода». С 2022 ИТМО работает в рамках новой модели развития — научно-образовательной корпорации. В ее основе академическая свобода, поддержка начинаний студентов и сотрудников, распределенная система управления, приверженность открытому коду, бизнес-подходы к организации работы. Образование в университете основано на выборе индивидуальной траектории для каждого студента.

ИТМО пять лет подряд — в сотне лучших в области Automation & Control (кибернетика) Шанхайского рейтинга. По версии SuperJob занимает первое место в Петербурге и второе в России по уровню зарплат выпускников в сфере IT. Университет в топе международных рейтингов среди российских вузов. Входит в топ-5 российских университетов по качеству приема на бюджетные места. Рекордсмен по поступлению олимпиадников в Петербурге. С 2019 года ИТМО самостоятельно присуждает ученые степени кандидата и доктора наук.

© Университет ИТМО, 2025

© Кладько Д.В., Фальчевская А.С., Прилепский А.Ю., 2025

Содержание

Содержание.....	3
Введение.....	6
1. Постановка гипотезы и дизайн эксперимента в бионанотехнологиях.....	8
1.1. Дизайн исследования	8
1.1.1. Определение желаемых свойств нанопрепаратов с использованием подхода, ориентированного на биологическую цель.....	10
1.1.2. Выбор наноматериалов с необходимыми характеристиками для клинического использования	11
1.1.3. Контроль качества препарата после получения наноформуляции	11
1.1.4. Инновации без ущерба для простоты, функциональности и технологичности	11
1.2. Постановка эксперимента	12
1.2.1. Комплексное исследование химического состава и физико-химических свойств	14
1.2.2. Исследование высвобождения лекарства для улучшения предсказуемости <i>in vivo</i> производительности	15
1.2.3. Установление взаимодействий наноматериалов с биологическими мишенями и характеристика биомолекулярной короны.....	15
1.2.4. Понимание ограничений доклинических моделей	16
1.2.5. Воспроизводимость.....	17
1.2.6. Определение и включение контрольных точек «да/нет».....	17
1.3. Экономические вопросы постановки бионанотехнологических исследований ...	17
1.3.1. Определение бизнес-плана	18
1.3.2. Оценка рыночного потенциала, конкуренции и свободы действий	18
Вопросы для самоконтроля	19
2. Синтезы наноматериалов и физико-химические методы исследования.....	21
2.1 Что такое наноматериалы, их виды, какие наноматериалы применяются для наномедицины, их основные свойства.....	21
2.1.1 Определение нанообъектов и применение в наномедицине	21

2.1.2	Виды наноматериалов, используемых в наномедицине	22
2.1.3	Требования к наноматериалам для биологических применений	23
2.2	Основные методы синтеза наноматериалов	24
2.2.1	Золь-гель метод	25
2.2.2	Метод химического восстановления.....	25
2.2.3	Метод соосаждения	25
2.2.4	Полиольный метод.....	25
2.2.5	Гидротермальный/сольвотермальный метод	25
2.3	Методические рекомендации к синтетическим методикам наночастиц, одобренных FDA	26
2.3.1	Синтез наночастиц фосфата кальция.....	26
2.3.2	Синтез оксида железа методом ко-преципитации.....	27
2.3.3	Синтез наночастиц серебра в водной среде цитрат опосредованным методом.....	27
2.3.4	Синтез наночастиц AlOON золь-гель методом.....	28
2.4	Планирование синтезов и способы варьирования параметров	30
2.5	Факторы, влияющие на взаимодействие наноматериалов с биологическими объектами.	32
2.5.1	Синтез и состав	32
2.5.2	Размер и форма	33
2.5.3	Распределение по размерам и агрегация наночастиц.	33
2.5.4	Дзета - потенциал (электрокинетический потенциал, ζ)	33
2.5.5	Плотность (в культуре).....	34
2.5.6	Загрузка и высвобождение лекарственного препарата	34
2.5.7	Детали анализа данных	34
2.5.8	Общие рекомендации	35
2.6	Исследование физико-химических свойств наноматериалов	36
2.6.1	Основные методы характеристики наноматериалов:.....	37
	Вопросы для самоконтроля	43
3.	Модификация наноматериалов для экспериментов в бионанотехнологиях	44
3.1.	Функционализация поверхности наночастиц:	44

3.1.1. Получение SiO ₂ оболочек	44
3.1.2. Получение полиэлектролитных оболочек.....	45
3.1.3. Перезарядка поверхности оксидных наночастиц.....	46
3.1.4. Загрузка и высвобождение лекарственного вещества	47
3.1.5. Направленная доставка лекарств	48
3.1.6. Метки для отслеживания механизмов реакции либо биологического поведения.....	49
Вопросы для самоконтроля	49
4. Стандартизация биологических экспериментов в бионанотехнологиях.....	50
4.1. Особенности культивирования и характеристики клеток.....	51
4.2. Использование адекватных контролей.....	53
4.3. Характеристика биологических жидкостей.....	54
4.3. Детали экспериментального протокола	56
4.4. Особенности культивирования клеток.....	57
4.5. Исследуемая доза наноматериалов	58
4.6. Детали визуализации	60
4.7. Обработка данных взаимодействий наноматериалов с биологическими мишенями	62
4.8. Проведение МТТ-теста с наночастицами	64
4.8.1. Общие рекомендации	64
4.8.2. Особенности подготовки клеток	66
4.8.3. Подготовка НЧ для МТТ-теста.....	67
4.8.4. Предварительная оценка клеток перед МТТ	68
4.8.5. Особенности проведения МТТ-теста	68
4.8.6. Пример протокола МТТ-теста.....	69
Вопросы для самоконтроля	73
Список литературы	74
Список рекомендуемой литературы.....	75

Введение

Бионанотехнология (нанобиотехнология или нанобиология) – область науки на стыке биологии и нанотехнологии, которая охватывает широкий круг технологических подходов, включая: применение нанотехнологических устройств и наноматериалов в биотехнологии; использование биологических молекул для нанотехнологических целей; создание биотехнологических продуктов, свойства которых определяются размерными характеристиками (для объектов, размер которых лежит в диапазоне 1–100 нм); использование биотехнологических подходов, в основе которых лежит принцип контролируемой самоорганизации наноструктур. Бионанотехнология направлена на решение новых социальных, экологических и медицинских проблем устойчивого, биосовместимого и регенеративного характера. Одним из наиболее популярным направлением в этой области, начиная с середины 90-х годов XX века, является наномедицина.

Термин «Наномедицина» впервые был упомянут К. Эриком Дрекслером и его коллегами в их книге «Unbounding the Future: The Nanotechnology Revolution» (Открывая будущее: нанотехнологическая революция), которая вышла в 1991 году. С тех пор термин «наномедицина» использовался в литературе более 10 миллионов раз, по данным поисковой системы Google по состоянию на октябрь 2024 года, для описания любого материала, предназначенного для терапевтических или диагностических целей, если хотя бы один из его размеров находится в диапазоне размеров 1–100 нм.

Исторически первым примером наноформуляции являются липосомы, работа по которым опубликована в 1962 [Bangham, Horne, 1962], которые представляют собой двухслойные нановезикулы фосфолипидов, окружающие гидрофильное ядро. Липосомальный доксорубин, Doxil®, стал первым нанопрепаратом, преодолевшим барьер перехода в практику, и был одобрен для клинического применения в 1995 году. Впоследствии появилось несколько одобренных FDA (англ. Food and Drug Administration, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) формул низкомолекулярных препаратов на основе липидных наноформуляций, включая Vuxeo® (цитарабин и даунорубин) и AmBisome® (амфотерицин В). Более того, было показано, что липосомы являются высокоэффективными невирусными векторами доставки генов, о чем свидетельствует одобрение FDA Onpattro®, первый пример генной терапии на основе интерферирующих РНК для лечения наследственного транстиретинозопосредованного амилоидоза (hATTR) в 2018 году. Во время пандемии COVID-19 в 2020 году FDA одобрило две эффективные вакцины – Pfizer-BioNTech и Moderna Therapeutics, которые доставляют мРНК, кодирующую спайковый белок вируса SARS-CoV-2, в иммунные клетки с помощью липосом.

К сожалению, количество одобренных наномедицинских препаратов за десятилетия исследований не превышает сотни. Согласно пессимистической заметке с красноречивым названием «*The beginning of the end of the nanomedicine*

hype» [Park, 2019], центр передового опыта в области нанотехнологий в области борьбы с раком (CCNE) за 15 лет своего существования привлек около 330 миллионов долларов на исследования наномедицинских препаратов для терапии рака, что оказалось недостаточным для революции в медицине с помощью нанотехнологий. К возможным проблемам, которые не позволили бионанотехнологиям изменить медицину, относят чрезвычайно комплексную природу взаимодействия наноматериалов с живыми системами, недостаток стандартизации и тесной работы фармацевтической индустрии, ученых и врачей. Таким образом, целью этого методического пособия является дать рекомендации для постановки, проведения и анализа бионанотехнологических экспериментов с учетом особенностей наносистем и живых систем.

Предназначено для студентов-магистрантов химико-биологического кластера Университета ИТМО, обучающихся по программе Молекулярная биология и биотехнология (дисциплины «Нанобиотехнология», «Магнитные композиты для биомедицины», «Принципы постановки научного эксперимента», «Синтез и характеристика наночастиц для биомедицины»), а также может быть рекомендовано студентам естественно-научного профиля при выполнении ими ряда работ в специализированных практикумах.

Приобретаемые обучающимися результаты обучения и компетенции представлены в таблице 1.

Таблица 1.
Результаты обучения и формируемые компетенции

№	Результат обучения (РО)	Компетенции
1	Обосновывает выбор экспериментальных протоколов с учетом требований стандартизации и воспроизводимости.	ПК-5: Способность выбирать и обосновывать методы проведения биотехнологических исследований
2	Проводит подготовку биологических и наноматериалов в соответствии с утвержденными стандартами.	ПК-3: Владение методами получения, анализа и очистки биотехнологических продуктов
3	Анализирует экспериментальные данные и выявляет ошибки, вызванные нарушением стандартных процедур.	ПК-4: Умение анализировать результаты биотехнологических процессов
4	Составляет документацию по стандартам ISO/GLP (протоколы, формы, журналы).	ПК-7: Способность разрабатывать и оформлять техническую и нормативную документацию
5	Применяет методы калибровки и валидации оборудования в бионанотехнологических экспериментах.	ПК-6: Умение эксплуатировать и калибровать лабораторное оборудование
6	Оценивает биосовместимость и токсичность материалов в соответствии с регламентами.	ПК-2: Владение методами оценки безопасности биотехнологических объектов
7	Эффективно взаимодействует в мультидисциплинарной среде при разработке стандартизированных процессов.	ОК-2: Способность работать в коллективе и коммуницировать с профессиональным сообществом

1. Постановка гипотезы и дизайн эксперимента в бионанотехнологиях

1.1. Дизайн исследования

Дизайн исследования требует от исследователей рационального выбора наноматериалов, которые улучшат терапевтический индекс их целевого препарата и/или продемонстрируют эффект на биосистеме, заключающийся в особенностях взаимодействия наночастиц с клетками или внешним излучением. Незначительные изменения в составе могут вызвать существенные модификации физико-химических свойств, стабильности и биологической функциональности. Таким образом, исследователи должны выбирать наноматериалы и этапы их изготовления на основе четкого понимания того, как каждый компонент влияет на функциональность. Таблица 1.1 демонстрирует основные риски и пути их обхода при дизайне эксперимента (адаптирована и дополнена из [Joose и др., 2024]).

Таблица 1.1.

Методы снижения риска в бионанотехнологиях.

Риск	Методы снижения риска		
	Существенный	Важный	Полезный
Плохо определенные гипотеза и цель	<ul style="list-style-type: none"> • Определите заболевание/функцию и основные недостатки существующих решений (желательно с консультаций людей из бизнеса и медицины) • Определите биологическую мишень, уровень организации мишени (белок, мембрана, клетка, орган) и основные пути доставки нанопрепарата к мишени • Определите наилучший препарат для наноформуляции • Определите желаемые свойства и функционализацию наноматериала • Определите возможные эффекты взаимодействия наноматериала с организмом (химия поверхности, белковая корона, 	<ul style="list-style-type: none"> • Проведите анализ литературы для получения нанофармацевтических клинических данных, коррелирующих с вашей гипотезой, которые могут помочь с дизайном исследования 	<ul style="list-style-type: none"> • Рассмотрите преимущества или ограничения комбинированной терапии для заболеваний, при которых обычно используются несколько лекарственных средств • Используйте подход «качество через проектирование» для определения цели, профиля целевого продукта и плана доклинических экспериментов

	заряд, возможное биораспределение)		
Токсичность наноматериала	<ul style="list-style-type: none"> Используйте биосовместимые и нетоксичные наноматериалы 	<ul style="list-style-type: none"> Используйте биоразлагаемые наноматериалы или те, которые могут выводиться через почки без накопления в органах По возможности используйте материалы, которые могут быть изготовлены в соответствии с требованиями GMP (англ. Good Medical Practice), отрегулированы и одобрены для клинического использования Понимайте потенциальные проблемы гиперчувствительности и иммуногенности, связанные с функционализацией поверхности нанопрепаратов (например, полиэтиленгликоль (ПЭГ)) Избегайте использования токсичных компонентов во время синтеза и обеспечьте оптимальные этапы очистки для снижения количества потенциальных остаточных компонентов, вызывающих токсичность Установите технические меры, которые уменьшают или устраняют бактериальное и эндотоксиновое загрязнение для 	<ul style="list-style-type: none"> Проведите скрининг токсичности <i>in silico</i> Охарактеризуйте исходные материалы сверх заявлений производителя, чтобы гарантировать качество продукта и ограничить потенциальные артефакты во время доклинической оценки

		ограничения артефактов в данных <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>	
Плохая совместимость между лекарством и наноматериалом	<ul style="list-style-type: none"> Охарактеризовать совместимость на ранних этапах разработки 	<ul style="list-style-type: none"> Теоретически оценить совместимость с помощью установленных баз данных и инструментов машинного обучения Отрегулировать выбор и/или дизайн препарата и/или наноматериала Проверить и выбрать химию линкера или другие фрагменты, подходящие для поверхностной конъюгации, которые совместимы как с выбранным препаратом, так и с типом используемого наноматериала 	-
Неконтролируемое высвобождение лекарств из наноматериала	<ul style="list-style-type: none"> Определить эффективность высвобождения препарата из наноформуляции в различных биологических средах Выбрать наноматериалы или химические вещества с воспроизводимыми характеристиками высвобождения 	-	-
Отсутствие внимания к окончательной формуле	<ul style="list-style-type: none"> Определите способ введения, желаемую лекарственную форму и частоту приема 	<ul style="list-style-type: none"> Определите необходимую концентрацию нанопрепаратов Определите количество и тип растворителя, необходимого для решения потенциальных проблем растворимости 	<ul style="list-style-type: none"> Рассмотрите вопросы совместимости с требуемыми производственными процессами и вспомогательными веществами, необходимыми для доставки конечной формулы

1.1.1. Определение желаемых свойств нанопрепаратов с использованием подхода, ориентированного на биологическую цель

Необходимо хорошо понимать проблемы лечения и биологические барьеры, связанные с целевой патологией, чтобы сформулировать гипотезу для лечения и разработать дизайн нанопрепарата, определяющий желаемые характеристики и функциональность. Применение стратегии разработки, ориентированной на

биологическую мишень, или подхода "сверху-вниз", обеспечивает рациональный дизайн и создание наномедицинских препаратов, способных преодолевать четко определенные клинические проблемы, систему доставки и целевую группу пациентов с конкретной биологической мишенью для оптимальной терапевтической активности. Этот подход гарантирует, что клиническая проблема находится в центре процесса проектирования и остается приоритетной на протяжении всего этапа разработки, включая рациональный выбор терапевтической мишени и агента, желаемых физико-химических свойств, пути введения, дозировки и соответствующих доклинических моделей.

1.1.2. Выбор наноматериалов с необходимыми характеристиками для клинического использования

Биосовместимость и токсичность выбранных наноматериалов являются наиболее важными характеристиками нанопрепаратов. Необходимые токсикологические исследования для наноматериалов, которые еще не регулируются и не одобрены для клинического применения, должны быть учтены. Характеристики всех материалов, включая инкапсулированные, комплексированные или конъюгированные лекарства, а также потенциальные продукты их разложения или примеси, должны быть тщательно охарактеризованы и задокументированы. Недостаточная детализированная характеристика материалов наноформуляции может привести к неожиданным профилям токсичности *in vivo* на поздних этапах разработки.

1.1.3. Контроль качества препарата после получения наноформуляции

Инкапсуляция, комплексирование или конъюгация лекарства с наноматериалами сопряжены с риском возникновения проблем физической и химической совместимости, которые могут привести к плохой функциональности и стабильности. Для новых составов наноформуляций необходимо всестороннее понимание химического состава и физико-химических свойств всех материалов в системе для теоретической оценки рисков совместимости. Рекомендуется проводить рациональное предсказание совместимости до начала разработки нанопрепаратов, что может быть реализовано с помощью моделирования, баз данных и инструментов машинного обучения. Например, механизм расщепления ковалентно связанных лекарств должен быть хорошо изучен, чтобы обеспечить активное высвобождение лекарства в целевой области. После инкапсуляции, комплексообразования или конъюгации важно, чтобы лекарственные средства высвобождались в активной форме с желаемой кинетикой в целевом месте.

1.1.4. Инновации без ущерба для простоты, функциональности и технологичности

Не всегда инновационные подходы для создания нанопрепаратов находятся в рамках того, что реально возможно использовать для клинического применения.

Это может привести к тому, что исследователи оказываются в ловушке проектирования чрезмерно сложных систем и процессов для обеспечения новизны, патентоспособности и публикации в престижных журналах. Несмотря на то, что исследовательская деятельность имеет важное значение для развития области, важно находить баланс между инновациями, логистической и финансовой осуществимостью, чтобы обеспечить переход препаратов от лабораторий в клиническую практику.

1.2. Постановка эксперимента

Экспериментальные соображения касаются описанию характеристик и доклинической оценки наномедицинских подходов (Таблица 1.2) и направлены на обеспечение точных предсказаний терапевтических исходов. Слишком быстрый переход к клиническим исследованиям без тщательного понимания химического состава наноформуляций, их физико-химических свойств, фармакокинетики и терапевтической активности может привести к провалу испытаний, стоящий десятки миллионов долларов. При соблюдении набора рекомендаций риск провала можно будет существенно снизить на более ранних этапах разработки.

Таблица 1.2

Экспериментальные соображения, касающиеся характеристики нанопрепаратов и их доклинической оценки для снижения риска во время разработки.

Этапы разработки	Основные проблемы и подходы для минимизации риска
1) Производство пилотной партии и характеристика	Неполная характеристика материалов
<i>Основные моменты:</i>	- Разработать набор тестов, который позволит всесторонне охарактеризовать наноформуляцию.
	- Исследовать следующие свойства: химический состав (включая концентрации лекарственного вещества и вспомогательных веществ), размер частиц и их распределение, морфологию, форму, структуру, стабильность, диспергируемость, заряд и химию поверхности (включая концентрацию и пространственное распределение функциональных групп, лигандов для нацеливания), чистоту и стерильность.
	- Исследовать взаимодействие наночастиц с биологической системой, чтобы понять, как молекулярная корона изменяет физико-химические свойства и функциональность наноматериалов.

	- Исследовать высвобождение лекарства (например, загрузку, эффективность инкапсуляции и кинетику высвобождения) с использованием хорошо известных и воспроизводимых методов в тех биологических средах, которые хорошо мимикрируют микроокружение целевой области организма.
<i>Важные моменты:</i>	- Исследовать концентрацию наноматериалов и вспомогательных веществ в составе нанопрепаратов.
	- По возможности, характеризовать структурное расположение и конфигурацию каждого компонента формулы.
	Отсутствие воспроизводимости физико-химических свойств
<i>Важные моменты:</i>	- Создать стандартную операционную процедуру для производства и исследования свойств наноформуляций.
	- Тестировать различные формуляции (например, размер, форма, химия) для определения взаимосвязи структура-свойство.
	- Продемонстрировать воспроизводимость, используя современные статистические подходы
	- По возможности использовать несколько и ортогональных методов исследования для одних и тех же физико-химических свойств.
2) Доклиническая разработка	Нереалистичная или неполная оценка безопасности и эффективности
<i>Основные моменты:</i>	- Понять сильные и слабые стороны экспериментальных моделей для моделирования заболевания.
	- Определить клинические ориентиры (например, стандарт лечения, схема дозирования) и включить их в доклинические исследования.
	- Идентифицировать и использовать проверенные доклинические модели (<i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> , <i>in vivo</i> и <i>in silico</i>), которые имеют отношение к целевой патологии и группы пациентов с доказанной способностью предсказывать клинические результаты.
	- Установить наиболее подходящую модель заболевания, экспериментальные контроли и количественные измерения.
	- Идентифицировать биомаркеры, предсказывающие терапевтические эффекты.
	- Показать эффективность нанопрепарата против целевой патологии через четко определенную количественную оценку биомаркеров.
	- Установить фармакокинетику, фармакодинамику, биораспределение, токсичность и эффективность в нескольких моделях заболеваний <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> .
	- Оценить преимущества, которые приносит наномедицинских подход по сравнению со свободным препаратом и стандартом лечения в выбранной области.
	- Исследовать безопасность нанопрепаратов, токсичность на мишени и вне мишени для свободного лекарства и наноформуляции в различных органах для установления терапевтической эффективности.
<i>Важные моменты:</i>	- Использовать научные консультации от экспертных советов и регулирующих органов для обеспечения соответствие разработки запланированным доклиническим стандартам.
	- Повторить результаты с использованием нескольких доклинических моделей для установления эффективности и токсичности наноформуляции.
	- Обеспечить четкое определение связи структура-свойство для нанопрепаратов и установить пределы их функционирования.
	- Использовать фармакокинетические-фармакодинамические и другие предсказательные модели для прогнозирования поведения препаратов в человеке.
	- Оценить и/или рассмотреть токсичность отдельных вспомогательных веществ и наноматериалов.
	- Использовать количественные методы визуализации и/или вычислительные подходы для сравнений в исследованиях <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>
	Отсутствие воспроизводимости доклинических терапевтических исходов
<i>Важные моменты:</i>	- Обширно характеризовать физико-химические свойства в средах, которые биологически релевантны для целевой патологии.
	- Определить размеры выборки на основе статистических методов
	- Исследовать корреляции <i>in vitro</i> - <i>in vivo</i> для улучшения понимания уровня воздействия нанопрепаратов на целевые клетки или ткани.

	- Использовать моделирование, способное предсказать поведение в <i>in vivo</i> .
	Плохая воспроизводимость между различными лабораториями
<i>Важные моменты:</i>	- Следовать, проводить и сообщать об экспериментах в соответствии с минимальными требованиями и стандартами отчетности, включая «Минимальная информация для отчетности в бионанотехнологиях» (MIRIBEL) и «Отчетность о <i>in vivo</i> исследованиях» (ARRIVE).
	- Повышать прозрачность, видимость, доступность и полезность данных, связывая наборы данных и элементы исследований (например, новые методологии) с репозиториями данных.
	Предвзятый выбор экспериментальных моделей
<i>Важные моменты:</i>	- Выбирать положительные и отрицательные контроли, которые имеют отношение к нанопрепаратам и методам их характеристики.
<i>Полезные моменты:</i>	- Рандомизировать и анонимизировать группы лечения, чтобы минимизировать предвзятость.
	Чрезмерное использование ресурсов
<i>Важные моменты</i>	- Использовать передовые экспериментальные модели <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> и <i>in silico</i> для прогнозирования фармакокинетики, эффективности и безопасности, прежде чем переходить к ресурсозатратным исследованиям на животных.
	- Определить и включить «go/no-go» контрольные точки, которые служат ориентирами для обеспечения успешного доклинического исследования.
	- Оставаться объективными в отношении слабых сторон разработки и вероятности клинического успеха.
	- Провести детальный анализ затрат и выгод для определения экономически эффективных способов продвижения разработки.

1.2.1. Комплексное исследование химического состава и физико-химических свойств

Подробная характеристика нанопрепаратов позволяет определить зависимости «структура-активность» и выявить желаемые ключевые параметры качества (англ. Critical quality attribute, CQA), необходимых для достижения желаемого терапевтического эффекта. Часто упускается из виду химический состав нанопрепаратов, включая химию поверхности и структурную конфигурацию различных компонентов формулы. Многие исследования пытаются соотнести физико-химические свойства с биологическим поведением, однако существует тенденция игнорировать значительные различия между фактическим составом наноформуляции и ее гипотетической структурой. При этом большинство исследований предполагают, что все вспомогательные вещества полностью интегрированы в наноструктуру, что далеко не всегда подтверждено экспериментально. Таким образом, следует уделить особое внимание комплексной характеристике химического состава и функционализации поверхности нанопрепаратов, а также физико-химических свойств, указанных в Таблице 1.2, чтобы предоставить углубленное понимание CQA, фундаментальных для терапевтической активности.

1.2.2. Исследование высвобождения лекарства для улучшения предсказуемости *in vivo* производительности

Необходимо охарактеризовать загрузку лекарства, эффективность инкапсуляции и кинетику его высвобождения в биологически релевантных средах и условиях биомеханического/физиологического микроокружения для адекватного предсказания фармакокинетической активности. Примеры, такие как AZD2811 (AstraZeneca) и липосомальные формы доксорубицина (Doxil, Myocet), показывают, что даже при одинаковой эффективности токсичность может существенно различаться из-за различий в профилях высвобождения. Более того, отсутствие эффективности SPI-077 (липосомальный цисплатин) в фазах I/II клинических испытаний против опухолей мозга было связано с недостаточным уровнем высвобождением лекарства (менее 10%), не превышающим целевых концентраций лекарства, необходимых для индукции терапевтического ответа.

Данные, полученные из *in vitro* исследований высвобождения лекарства, остаются отраслевым стандартом для поиска корреляции *in vitro*–*in vivo* (IVIVC) и более точным предсказанием фармакинетических свойств препаратов *in vivo*, чем физико-химических свойств наночастиц. Например, компания BIND Therapeutics показала, что высвобождение лекарства *in vitro* на примере полимерных наночастиц было важным предсказательным фактором для *in vivo* фармакокинетики, в то время как такие поверхностные химические свойства, как плотность лигандов на поверхности наночастицы и дзета-потенциал, не продемонстрировали фармакокинетической корреляции. Проблемы остаются при разработке сильных IVIVC для нанопрепаратов из-за ограничений в моделировании взаимодействий наноматериалов с биологическими мишенями в *in vitro* тестах. В этом контексте требуется использование специализированных *in vitro* моделей, таких как трехмерные органы на чипах, органоиды, сфероиды и эксперименты с мембранами Transwell®, а также усовершенствованными *in silico* моделями, которые более точно моделируют биомеханическое/физиологическое микроокружение и предсказывают системное распределение препаратов *in vivo*, эффективность и токсичность лекарства, при этом снижая ресурсо- и трудозатратность исследований на животных.

1.2.3. Установление взаимодействий наноматериалов с биологическими мишенями и характеристика биомолекулярной короны

Биомолекулярная корона — это слой молекул (например, белков, липидов, углеводов), который самопроизвольно формируется на поверхности наночастицы или другого инородного объекта, когда он попадает в биологическую среду (например, кровь, лимфу или межклеточную жидкость).

Когда наночастица оказывается в живом организме, она сразу взаимодействует с тысячами различных молекул. Эти молекулы обволакивают её, образуя «корону»,

которая фактически определяет, как частица будет восприниматься клетками: как безопасная, опасная, подлежащая удалению или пригодная для захвата.

Размер и состав биомолекулярной короны влияют на распределение нанопрепаратов в организме, их захват клетками, стабильность и эффективность. Несмотря на это, в литературе в основном упускается из виду роль биомолекулярной короны при описании взаимодействий наноматериалов с биологическими мишенями, уделяя больше внимания их физико-химическим свойствам в водных средах. Таким образом, необходимо комплексно исследовать состав биомолекулярной короны и изменение физико-химических свойства нанопрепаратов после попадания в биологические среды. Кроме того, нанопрепараты следует инкубировать с биологическими средами до и/или во время *in vitro* исследований для более точного предсказания функциональности нанопрепаратов на уровне *in vivo*. Установление взаимодействий наноматериалов с биологическими мишенями на ранних этапах разработки снижает риск неожиданных фармакокинетических и цитотоксических эффектов во время доклинической/клинической оценки.

1.2.4. Понимание ограничений доклинических моделей

Процент успешных испытаний нанопрепаратов в клинических исследованиях фазы I составляет более 90%, что свидетельствует о том, что нанопрепараты в основном безопасны. Однако более 80% нанопрепаратов по-прежнему не проходят фазы II/III из-за низкой эффективности. Это подчеркивает неспособность нанопрепаратов продемонстрировать эквивалентную клиническую эффективность, наблюдаемую в доклинических исследованиях, что в значительной степени связано с недостатками доклинических моделей. В большинстве случаев доклинические модели и группы пациентов, испытанные на фазе I, не являются репрезентативными по сравнению с клиническими случаями в фазах II/III. Учитывая ограничения каждой доклинической модели, важно обеспечить возможность собрать убедительный набор данных. Идеально, чтобы исследователи продемонстрировали, что их нанопрепараты: (1) обеспечивают улучшенную (или эквивалентную) эффективность по сравнению с текущим стандартом лечения; (2) имеют хорошо описанные профили токсичности, возможные тканеспецифичные реакции и побочные эффекты; (3) демонстрируют достаточные фармакокинетические свойства и оптимальное биораспределение на целевых участках относительно контроля; и (4) эффективны в различных доклинических моделях, релевантных заболеванию. Для этого необходимо рационально выбирать доклинические модели с учетом их ограничений и преимуществ.

1.2.5. Воспроизводимость

Проблема низкой воспроизводимости нанопрепаратов широко обсуждается в научной литературе. Значительная вариабельность их свойств часто возникает на этапе производства, что требует проведения постоянного контроля на множестве независимых партиях. Для обеспечения надежности данных важно, чтобы исследования характеристик обладали достаточной статистической значимостью. Кроме того, по возможности рекомендуется применять несколько ортогональных методов для оценки одних и тех же химических, физических или биологических свойств.

В контексте заболеваний с гетерогенными клиническими проявлениями важно учитывать, что воспроизводимость должна оцениваться не только с научной, но и с клинической точки зрения — в аспектах эффективности и безопасности. Соответственно, доклинические исследования также должны обладать достаточным набором данных и включать воспроизведение экспериментов на различных моделях — *in vitro*, *ex vivo* и/или *in vivo*.

1.2.6. Определение и включение контрольных точек «да/нет»

Рекомендуется на каждом этапе разработки нанопрепарата предусматривать ключевые контрольные точки типа «да/нет», чтобы своевременно прекращать проекты с низким потенциалом успешной трансляции в клиническую практику и избегать чрезмерных затрат ресурсов. Примеры критериев для остановки разработки включают (но не ограничиваются): проблемы масштабируемости и стабильности, низкую воспроизводимость, нежелательное высвобождение препарата и недостаточное улучшение терапевтического индекса по сравнению с текущими стандартами лечения. Для получения объективной оценки технологии исследовательская команда должна регулярно консультироваться с экспертами в области разработки и коммерциализации нанопрепаратов.

1.3. Экономические вопросы постановки бионанотехнологических исследований

Бизнес-стратегия должна разрабатываться параллельно с проектированием, экспериментальными, производственными, клиническими и регуляторными аспектами, чтобы обеспечить реализуемость проекта на всех этапах его развития.

Для многих исследователей разработка и реализация бизнес-плана могут показаться сложной задачей. Однако важно отметить, что существуют национальные и международные программы поддержки и менторства, направленные на коммерциализацию технологий и предоставление рекомендаций по вопросам бизнеса и продуктового развития.

Путь бизнес-развития нанопрепаратов является сложным: не существует универсальной стратегии, гарантирующей успех или предотвращающей неудачу.

Ученым-предпринимателям рекомендуется следовать ключевым принципам, сформулированным лабораторией Лангера для успешной разработки и коммерциализации продуктов [Langer, 2013]:

- думать масштабно и действовать заранее,
- патентовать широко,
- публиковаться стратегически,
- тщательно формировать команду стартапа.

Эффективность такого предпринимательского подхода подтверждается более чем 40 успешными стартапами, вышедшими из лаборатории Лангера, включая компанию Moderna, которая сыграла ключевую роль в борьбе с пандемией COVID-19 благодаря разработке наночастичных вакцин против SARS-CoV-2.

1.3.1. Определение бизнес-плана

Четкий и продуманный бизнес-план рекомендуется разрабатывать на самых ранних этапах проекта. Это позволяет обеспечить финансирование разработки, подтвердить реализуемость проекта, оценить потенциальную прибыльность продукта и обосновать ожидаемую окупаемость инвестиций.

Коммерциализация нанопрепаратов обычно осуществляется через совместную разработку с промышленными партнерами, лицензирование технологий или создание стартапа. Независимо от выбранного пути, общим требованием является наличие значительных финансовых ресурсов для проведения клинических исследований.

Затраты на клиническую разработку нанопрепаратов, как правило, превышают аналогичные расходы для стандартных препаратов и малых молекул, что делает анализ прибыльности и возврата инвестиций важнейшей частью бизнес-плана. Выбор стратегии коммерциализации напрямую влияет на доступные источники финансирования, будь то промышленные партнеры, государственные гранты или венчурные инвестиции.

1.3.2. Оценка рыночного потенциала, конкуренции и свободы действий

Для коммерческого успеха необходимо понимать текущее состояние рынка нанопрепаратов, особенности целового заболевания и существующие методы лечения. В идеальном случае необходимы следующие условия:

- Должен существовать рынок с коммерчески жизнеспособной целевой аудиторией пациентов,
- Новые нанопрепараты должны обладать преимуществами перед существующими методами лечения,
- Исследователи должны иметь свободу действий и не сталкиваться с ограничениями из-за существующих патентов.

Чтобы убедиться, что новый продукт соответствует этим критериям, следует на ранних этапах привлекать патентных поверенных и экспертов по коммерциализации для оценки патентоспособности и защиты интеллектуальной собственности.

1.3.3. Защита интеллектуальной собственности

Права на интеллектуальную собственность (ИС) обеспечивают эксклюзивность технологии и защиту от конкурентов, значительно повышая коммерческую ценность нанопрепарата. Для максимизации коммерческого потенциала необходимо тщательно защищать все ключевые аспекты разработки. При этом следует учитывать три основных критерия патентоспособности:

1. Новизна — нанопрепарат считается новым, если о нем ранее не было публичных упоминаний в статьях, докладах, переговорах или иных формах раскрытия информации. Хотя в некоторых странах предусмотрены льготные периоды после публикации, во избежание рисков рекомендуется не разглашать детали разработки без подписания соглашения о неразглашении.
2. Уровень инновации — требует тщательного анализа существующей научной и патентной литературы. Важно помнить, что нанопрепараты часто включают несколько уровней инноваций, например: состав наночастиц, химию ионизируемых липидов, структуру мРНК и технологию производства в случае мРНК-вакцин.
3. Промышленная применимость — технология должна быть пригодной для практического применения в промышленности.

Защита ИС является важным элементом коммерциализации, в некоторых случаях успешный выход на рынок возможен и без патентов — в ситуациях срочной медицинской потребности (например, пандемии).

Вопросы для самоконтроля

1. Что включает в себя дизайн исследования в бионанотехнологиях?
2. Какие параметры важно учитывать при выборе наноматериалов для клинического применения?
3. В чем заключается подход, ориентированный на биологическую цель при разработке нанопрепаратов?
4. Почему важно сохранять простоту и технологичность при внедрении инноваций в наноформуляции?
5. Какие физико-химические характеристики следует учитывать при анализе наноматериалов?
6. Как проводится исследование высвобождения лекарственного вещества из нанопрепарата?

7. Что такое биомолекулярная корона и как она влияет на поведение наночастиц *in vivo*?
8. Каковы ограничения доклинических моделей и как их учитывать при интерпретации данных?
9. Какие контрольные точки "да/нет" используются для стандартизации эксперимента?
10. Какие ключевые аспекты включает экономическое обоснование бионанотехнологического проекта?

2. Синтезы наноматериалов и физико-химические методы исследования

2.1 Что такое наноматериалы, их виды, какие наноматериалы применяются для наномедицины, их основные свойства

2.1.1 Определение нанообъектов и применение в наномедицине

Наномедицина, которая объединяет нанотехнологии с медицинской наукой и работает в наномасштабе, предлагает широкий спектр применений. Она предназначена повысить биодоступность лекарств, минимизировать побочные эффекты и эффективно воздействовать на больные клетки и ткани, улучшая доставку лекарств, медицинскую визуализацию и диагностику заболеваний. Это должно привести к улучшенным клиническим результатам и лучшему качеству жизни в целом. Кроме того, наномедицина позволяет проводить и генную терапию, облегчая разработку, производство и доставку лекарств. Наноматериалы также служат каркасами для восстановления тканей, продвигая регенеративную медицину и тканевую инженерию. Эти инновации трансформируют здравоохранение, позволяя проводить персонализированное лечение, улучшать терапию и обеспечивать более глубокое понимание молекулярных механизмов человеческого организма. Наномедицина имеет огромные перспективы, революционизируя целевую терапию, доставку лекарств и восстановление тканей. Наноматериалы предлагают значительные преимущества в биомедицинских применениях, повышая стабильность и растворимость биологических молекул, таких как липиды и белки [Jouse и др., 2024]. Одним из наиболее важных применений в ответ на COVID-19 является разработка мРНК вакцин. Эти вакцины доставляются с помощью липидных наночастиц, каждая из которых содержит молекулы мРНК [Sofias, Lammers, 2023]. Было обнаружено, что металлические наночастицы демонстрируют антибактериальную активность как против грамположительных (+), так и против грамотрицательных (-) бактерий, в то время как органические лигандные покрытия, такие как цитрат или фолат, усиливают специфичность лекарств и целевую доставку в органы [Banerjee и др., 2023]. Кроме того, синтез наночастиц сыграл ключевую роль в продвижении методов визуализации опухолей и иммунотерапевтических подходов в наномедицине [Malik, Muhammad, Waheed, 2023].

Классификация наноразмерных материалов зависит от все еще обсуждаемого определения данного термина. Одним из вариантов является рассмотрение материала как *наноматериала*, если он имеет по крайней мере одну размерность в масштабе от 1 до 100 нм. Однако FDA постановило, что это «материалы или конечные продукты могут также проявлять схожие свойства или явления, приписываемые измерению(ям) за пределами наномасштабного диапазона». Биологические взаимодействия, зависящие от размера, вряд ли будут строго соответствовать метрическим барьерам, и в данном контексте мы используем термины “наноинженерный”, “наноразмерный”, “наноматериал” и “наночастица”

взаимозаменяемо и в широком смысле для обозначения всего класса этих материалов. Другими словами, мы поддерживаем всеобъемлющее определение того, что представляет собой наноматериал, и предлагаем методические указания для бионанотехнологий с использованием материалов, которые подпадают под это широкое определение.

2.1.2 Виды наноматериалов, используемых в наномедицине

Наноматериалы можно классифицировать по разным группам на основе различных критериев. Обычно наноматериалы классифицируются по размерам, морфологии, внутренней архитектуре и химическому составу. Тем не менее, полезна также классификация по применению. Классификация, представленная на рисунке 2.1, не учитывает множество композитных наноматериалов (органические + неорганические материалы), а также структур по типу «ядро-оболочка» или «частицы Януса», где половина частицы состоит из одного материала, а вторая – из другого. Стоит также учитывать и способы интеграции лекарственного препарата в наночастицу (если такое предусмотрено исследованием). Так, например, лекарственное средство может прикрепляться (ковалентно, межмолекулярными силами) на поверхность наночастицы либо инкорпорироваться во внутренние полости или поры.



Рисунок 2.1. Классификация наноматериалов для биологических применений [Eker и др., 2024].

2.1.3 Требования к наноматериалам для биологических применений

а) Биосовместимость и безопасность

Наноматериалы должны быть биосовместимыми, то есть не вызывать токсических, иммуногенных, онкогенных или воспалительных реакций в организме. Исследования *in vivo* и *in vitro* необходимы для оценки токсичности и биораспределения наноматериалов, особенно для металлических и металлоксидных наночастиц (например, оксидов железа), которые могут накапливаться в тканях.

б) Стабильность

Наноматериалы должны сохранять стабильность в биологических средах (например, в крови или тканях) и не агрегировать. Это важно для их эффективного использования в качестве носителей лекарств или контрастных агентов. Контроль размеров (зачастую 1–100 нм) и поверхностных свойств (например, функционализация для улучшения растворимости или целевой доставки) является критическим фактором.

в) Специфичность и таргетность

Для биологических применений наноматериалы должны обладать способностью к специфическому взаимодействию с клетками или тканями (например, за счет антител или лигандов на поверхности). Это используется в терапии рака, генной инженерии и других областях. Примеры включают магнитные наночастицы для гипертермии или углеродные наноматериалы (например, нанотрубки) для доставки ДНК в клетки.

По состоянию на 2024 год FDA одобрило около 20–30 нанолекарств (включая липосомальные, полимерные, металлические и другие наноформы), а именно (по классам):

- Синтетические полимерные частицы в комбинации с лекарственными средствами или биолекарствами (белки, ферменты, аптамеры и др.);
- Липосомальные составы в сочетании с лекарственными средствами или биолекарствами (липосомальные формы доксорубина, винкристина, амфотерицина В и др.);
- Мицеллярные наночастицы в сочетании с лекарствами или биолекарствами (мицеллярный эстрадиол);
- Белковые наночастицы в сочетании с лекарствами или биолекарствами (Наночастицы паклитаксела, связанные с альбумином);
- Нанокристаллы (нанокристаллы кальция фосфата, гидроксиапатита, и др.);
- Неорганические, в том числе металлические наночастицы (оксид железа, суперпарамагнитные наночастицы оксида железа);

Некоторые известные примеры препаратов:

- Doxil (липосомальный доксорубин) – 1995 г.

- Abraxane (наночастицы альбумина с паклитакселом) – 2005 г.
- Onpattro (липидные наночастицы для доставки РНК) – 2018 г.
- Comirnaty (Pfizer-BioNTech - мРНК вакцина против COVID-19) – 2021 г.
- Spikevax (Moderna - вакцина против COVID-19) – 2022 г.

Более того, более 100 препаратов на данный момент проходят клинические испытания. Помимо лекарств, существуют одобренные FDA наночастицы для иных применений:

- ZnO – одобрено для применения в косметике.
- γ -AlOOH – одобрено для применения в качестве адъювантов при изготовлении вакцин.
- TiO₂ – одобрено для использования в пищевых продуктах.
- Ag – антимикробное средство.

2.2 Основные методы синтеза наноматериалов

Синтез наноматериалов может осуществляться *химическими, физическими и биологическими методами*, каждый из которых имеет свои преимущества и ограничения. Хотя выбранная методика не всегда напрямую определяет биологическую активность наноматериалов, она влияет на их *размер, форму, стабильность, поверхностные свойства и воспроизводимость*.

Ключевые факторы, влияющие на синтез:

1. Растворители

- Влияют на кинетику и механизм реакции.
- Примеры: вода, этанол, толуол, ДМСО.
- Биосовместимые растворители и буферные системы предпочтительны для медицинских применений.

2. Прекурсоры (исходные вещества)

- Определяют химический состав наночастиц.
- Примеры:
 - Для металлических наночастиц – хлориды (HAuCl₄, AgNO₃), оксиды (TiO₂, Fe₂O₃).
 - Для углеродных наноматериалов – графит, сажа, органические соединения.

3. Поверхностно-активные вещества (ПАВ) и стабилизаторы

- Контролируют агрегацию и обеспечивают коллоидную стабильность.
- Примеры:
 - Цитрат натрия (для золотых наночастиц),
 - Поливинилпирролидон (PVP), полиэтиленгликоль (PEG) – для биосовместимых покрытий.

2.2.1 Золь-гель метод

Принцип: Гидролиз и поликонденсация прекурсоров с образованием золя (коллоидного раствора), который затем переходит в гель.

Применение: Оксиды металлов (SiO_2 , TiO_2), гибридные материалы.

Плюсы:

- Высокая чистота и однородность.
- Контроль пористости.

Минусы:

- Длительный процесс, иногда требует высоких температур для финального прокаливания.

2.2.2. Метод химического восстановления

Принцип: Восстановление ионов металлов до нуль-валентного состояния с помощью восстановителей.

Применение: Металлические наночастицы (Au, Ag, Pt).

Плюсы:

- Быстрый синтез, контроль размера.

Минусы:

- Требуется стабилизаторов для предотвращения агрегации.

2.2.3 Метод соосаждения

Принцип: Одновременное осаждение нескольких компонентов из раствора.

Применение: Магнитные наночастицы (Fe_3O_4), композиты.

Плюсы:

- Простота, масштабируемость.

Минусы:

- Не всегда контролируется форма частиц.

2.2.4 Полиольный метод

Принцип: Использование многоатомных спиртов (этиленгликоль, глицерин) в качестве растворителя и восстановителя.

Применение: Металлы (Ag, Co), оксиды.

Плюсы:

- Высокая температура кипения полиолов позволяет получать кристаллические наночастицы.

Минусы:

- Требуется очистки от органических остатков.

2.2.5 Гидротермальный/сольвотермальный метод

Принцип: Синтез в автоклаве при высоких температурах и давлениях.

Применение: Оксиды (ZnO , TiO_2), квантовые точки.

Плюсы:

- Высокая кристалличность, контроль морфологии.

Минусы:

- Энергозатратный процесс.

2.2.6. Дополнительные методы:

а) Микроволновый синтез

- Быстрый нагрев, высокая степень однородности наночастиц.
- Применение: оксиды, металлы.

б) Биосинтез (зеленый синтез)

- Использование бактерий, грибов, растительных экстрактов.
- Пример: восстановление Ag^+ до Ag^0 с помощью экстракта листьев.

в) Лазерная абляция

- Испарение мишени лазером с образованием наночастиц в жидкости.
- Плюсы: отсутствие примесей, но низкая производительность.

2.3 Методические рекомендации к синтетическим методикам наночастиц, одобренных FDA

2.3.1 Синтез наночастиц фосфата кальция

Реагенты:

Дигидрат хлорида кальция ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \geq 99,0\%$ чистоты), тетрагидрат нитрата кальция ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}, \geq 99,0\%$ чистоты), безводный гидрофосфат калия ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \geq 98,0$ чистоты), карбонат натрия ($\text{Na}_2\text{CO}_3 \geq 99,0\%$ чистоты), нитрат калия (KNO_3), деионизированная вода (с проводимостью $< 0,06$ мкСм/см).

Посуда и оборудование:

- 2 Химических стакана
- Стеклянная бутылка с завинчивающейся крышкой
- Центрифуга

Подготовка:

Вся стеклянная посуда сначала очищается моющим средством, затем царской водкой и тщательно ополаскивается дистиллированной водой и ацетоном, чтобы гарантировать максимально чистую стеклянную поверхность. Царская водка окисляет и растворяет остаточные органические и неорганические примеси, которые могут помешать синтезу наночастиц. Раствор царской водки готовится путем смешивания 3 объемных частей соляной кислоты (HCl) с 1 объемной частью азотной кислоты (HNO_3) и должен использоваться свежим.

Методика:

Готовятся два водных раствора (1:1 об. /об., всего 100 мл): (1) 0,2 моль/л $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и (2) 0,1 моль/л $\text{Na}_2\text{CO}_3 + 0,12$ моль/л K_2HPO_4 . Оба раствора смешиваются при комнатной температуре. Смесь помещается в стеклянную бутылку, запечатанную завинчивающейся крышкой, и нагревается при 37°C в течение 24 часов. Частицы осаждаются центрифугированием (10 мин, 5000 об/мин), промываются водой, лиофилизируются и хранятся при комнатной температуре в запечатанных флаконах [Carmona и др., 2020].

2.3.2 Синтез оксида железа методом ко-преципитации

В этом методе прекурсоры железа восстанавливаются до оксидов железа слабыми восстановителями, такими как гидроксид натрия, аммиак, тетраметиламмония гидроксид и т. д. по следующей реакции:



Реагенты:

Тетрагидрат хлорида железа (II) ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), гексагидрат хлорида железа (III) ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) и водный раствор аммиака 27,5%, деионизированная вода.

Посуда и оборудование:

- Химические стакан или плоскодонная колба на 250 мл
- Круглодонная колба на 250 мл
- Ультразвуковая ванна
- Магнитная мешалка
- Верхнеприводная мешалка

Методика:

2,5 г $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и 5 г $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, взятых в молярном отношении $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+} = 0,7$, растворяются в 100 мл деионизированной воды при постоянном перемешивании на магнитной мешалке (500 оборотов/минуту (об/мин)). Затем к этому раствору по каплям добавляется 12 мл водного раствора аммиака при постоянном перемешивании (500 об/мин), при комнатной температуре в течение 5 мин. С помощью магнита раствор декантируют и промывают деионизированной водой до нейтрального pH. Промытый черный осадок смешивается со 100 мл деионизированной воды и подвергается ультразвуковой обработке (37 кГц, 110 Вт) при постоянном перемешивании (300 об/мин) верхнеприводной мешалкой в течение 120 минут. Полученный золь магнетита затем охлаждается до комнатной температуры [Drozdov и др., 2016].

2.3.3 Синтез наночастиц серебра в водной среде цитрат опосредованным методом

Существует множество подходов к растворному синтезу наночастиц серебра. Здесь мы опишем один из них, позволяющий получить частицы размером ≈ 15 нм.

Реагенты:

Нитрат серебра (AgNO_3), цитрат натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) и дубильная кислота ($\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$) фирмы Sigma-Aldrich. Дистиллированная вода ($\Omega = 18 \text{ МОм} \cdot \text{см}$).

Посуда и оборудование:

- Круглодонная трехгорлая колба объемом 250 мл.
- Обратный холодильник
- магнитная мешалка с функцией нагрева
- лабораторный термометр
- лабораторный колбогрей
- центрифуга

Подготовка:

Аналогичная п. 2.3.1

Методика

Описанная процедура использует дубильную кислоту (в основном ее фенольные гидроксильные группы), а также лимонную кислоту в качестве восстановителей. Использование небольшого количества дубильной кислоты контролирует размер во время процесса роста, что дает узкое распределение размеров. Она действует и как восстановитель, и как агент контроля размера.

Для синтеза наночастиц серебра с размером 15 нм, стабилизированных лимонной кислотой (Цит-Ag НЧ), 100 мл водного раствора цитрата натрия и дубильной кислоты помещают в трехгорлую круглодонную колбу таким образом, чтобы конечная концентрация цитрата натрия и дубильной кислоты составляла 5 ммоль/л и 0,1 ммоль/л соответственно. На этом этапе раствор должен быть бесцветным. Далее колба нагревается при перемешивании (с магнитной мешалкой), а обратный холодильник используется для предотвращения испарения растворителя. Когда раствор начинает кипеть, в него быстро добавляют 1 мл водного раствора 25 ммоль/л AgNO_3 . Цвет раствора резко становится ярко-желтым, что является косвенным подтверждением формирования наночастиц серебра.

После охлаждения раствора его отмывают с помощью центрифугирования при 5000 оцу (относительное центробежное ускорение) в течение 10 мин для осаждения наночастиц. Затем супернатант удаляют, а осадок наночастиц редиспергируется в 0,25 ммоль/л растворе цитрата натрия для получения очищенных Цит-Ag НЧ [Bastús и др., 2014].

Преимущество данного метода заключается в том, что, варьируя концентрацию дубильной кислоты, можно синтезировать широкий диапазон размеров монодисперсных Цит-Ag НЧ. Так, при увеличении концентрации дубильной кислоты с 0,025 ммоль/л до 0,1 ммоль/л, 0,25 ммоль/л, 1 ммоль/л и 5 ммоль/л размер наночастиц Ag увеличивался с $10,1 \pm 0,9$ нм до $14,8 \pm 1,4$ нм, $23,4 \pm 5,0$ нм, $36,9 \pm 6,2$ нм и $46,1 \pm 8,3$ нм соответственно.

2.3.4 Синтез наночастиц AlOOH золь-гель методом

Реагенты:

нитрат алюминия ($\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, Merck) лимонная кислота ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich) и деионизированная вода.

Оборудование и посуда:

- Круглодонная колба.
- Обратный холодильник
- магнитная мешалка с функцией нагрева
- лабораторный термометр
- лабораторный колбогрей
- печь

Подготовка:

Аналогичная п. 2.3.1

Методика:

Около 18,76 г нитрата алюминия растворяется с лимонной кислотой в деионизированной воде. Молярное соотношение цитрат/нитрат составило 0,5. Раствор непрерывно перемешивается в течение нескольких часов при 60°C до его превращения в желтоватый золь. Затем раствор нагревается до 80°C при постоянном помешивании, пока не образуется прозрачный гель. Гель высушивается при 90°C в печи в течение 12 часов. Высушенный гель измельчается и спекается при 1000°C [Mohamad и др., 2019].

2.3.5 Синтез наночастиц ZnO методом прямого осаждения

Реагенты:

дигидрат ацетата цинка ($Zn(CH_3CO_2)_2 \cdot 2H_2O$), гидроксид натрия (NaOH), деионизированная вода, ацетон.

Оборудование и посуда:

- Лабораторный стакан
- магнитная мешалка
- печь
- центрифуга

Подготовка:

Аналогичная п. 2.3.1

Методика:

Готовятся два водных раствора: дигидрата ацетата цинка (0,1 моль/л) и гидроксида натрия (0,2 моль/л). Оба раствора добавляются по каплям в стакан при комнатной температуре при непрерывном перемешивании со скоростью 600 об/мин в течение 2 ч. Полученный белый осадок отделяют центрифугированием в течение 15 мин при 10 000×g и затем трижды промывают деионизированной водой с последующей промывкой ацетоном. Осадок сушится в печи при 120 °C в течение 6 ч, а затем прокаливается при 300 °C в воздушной атмосфере для получения стабильных наночастиц ZnO [Акбар и др., 2021].

2.3.6 Синтез наночастиц TiO₂ гидротермальным методом

Реагенты:

Тетрабутоксититан ($C_{16}H_{36}O_4Ti$), деионизированная вода, изопропиловый спирт, тетраметиламмоний гидроксид.

Оборудование и посуда:

- лабораторный стакан
- центрифуга
- нагревательная плитка (или магнитная мешалка с нагревательным элементом)
- лабораторный термометр
- стальной автоклав
- тефлоновый вкладыш в автоклав

- печь

Методика:

Осадок TiO_2 получают путем добавления 0,5 моль/л изопропанольного раствора буюксида титана по каплям в деионизированную воду с помощью пипетки или шприца ($[H_2O]/[Ti]=150$). Осадок дважды промывают деионизированной водой с использованием центрифуги. Белый осадок далее пептизируется при $70^\circ C$ в течение 1 ч путем добавления *тетраметиламмоний гидроксида* в соотношении $[TANOH]/[Ti]=0,25$.

Полученный золь фильтруют и помещают в тефлоновый стакан, который в свою очередь помещается в тефлоновый автоклав ($[H_2O]/[Ti]=150$). Автоклавирование проводилось при температуре $240^\circ C$ в течение 2 ч со скоростью нагрева $3^\circ C/мин$. Полученные порошки промывают деионизированной водой и, наконец, абсолютным этанолом, чтобы уменьшить агломерацию частиц, а затем высушивают при температуре $60^\circ C$ [Yang, Mei, Ferreira, 2001].

2.4 Планирование синтезов и способы варьирования параметров

В некоторых синтетических методиках, описанных в п.2.3, было упомянуто, что варьирование концентрации прекурсора одного из реагентов приводит к изменению размера финальных наночастиц. В данном разделе будут даны рекомендации, полезные при исследовании синтезов, которые возможно применить для варьирования размеров и формы наночастиц. При синтезе наноматериалов ключевую роль играет контроль параметров, влияющих на их размер, морфологию, состав и свойства. Данные методические указания помогут систематизировать подход к оптимизации синтеза.

Таблица 2.1.
Химические параметры, влияющие на протекание синтеза и/или свойства наночастиц.

Параметр	Ожидаемое влияние	Примеры варьирования
Концентрация реагентов	Определяет скорость реакции и размер частиц.	0.01 моль/л → 0.1 моль/л → 1.0 моль/л (шаг 0.05 моль/л).
Соотношение реагентов	Влияет на стехиометрию и фазу продукта.	Изменение мольного соотношения (1:1 → 1:2 → 1:3).
Тип восстановителя/стабилизатора	Контролирует форму и агрегацию частиц.	$NaBH_4$ или цитрат натрия для Au наночастиц.
pH среды	Определяет заряд поверхности и кинетику роста.	pH 3 → 7 → 11 (с шаг 1).

Таблица 2.2.

Физические параметры, влияющие на протекание синтеза и/или свойства наночастиц.

Параметр	Влияние на синтез	Примеры варьирования
Температура	Увеличивает скорость реакции	25°C → 60°C → 100°C (интервал 10°C).
Время реакции	Влияет на размер и степень кристаллизации.	1 ч → 2 ч → 3 ч → 6 ч → 12 ч → 24 ч.
Скорость перемешивания	Контролирует однородность, диффузию реагентов и продуктов, а также агрегацию.	200 об/мин → 500 об/мин → 1000 об/мин.
Метод нагрева	Микроволновый, ультразвуковой, традиционный.	Сравнение УЗ-синтеза (20 кГц/40 кГц) и термостата.

Таблица 2.3.

Основные методы контроля результатов.

Метод	Что анализирует	Критерии оценки
Динамическое светорассеяние	Размер частиц и распределение размеру, индекс полидисперсности.	Индекс полидисперсности <0.05 → монодисперсность.
ПЭМ/СЭМ	Морфология и размер.	Сферичность, наличие агрегатов.
РФА	Фаза и кристалличность.	Соответствие PDF-карте (например, JCPDS).
ИК	Функциональные группы и состав поверхности.	Наличие целевых пиков (C=O, M-O).

В пунктах и таблицах выше представлены примеры варьирования, однако, к сожалению, привести полнейшую унификацию правил варьирования нельзя, все зависит от типа наноматериала, метода синтеза, реагентов.

Когда исследователь делает достаточно новый синтез и ищет “диапазон” варьирования, возникает множество вопросов, в каких предельных значениях это делать. Вот некоторые рекомендации:

1) Проведите анализ литературы и патентный поиск. Определите наименьшие и наивысшие значения параметра, которые использовались в литературе. Нелишним

будет пойти чуть дальше и использовать параметры (например, концентрацию) в размере 50% и 150% от описываемых в литературе значений.

2) Если система абсолютно новая, то используйте правило 10х.

Начните с крайне низкой и крайне высокой концентрации (например, 0,1 ммоль/л и 10 моль/л). Проведите несколько экспериментов на краях диапазона.

3) Начните с грубого скрининга. Например, варьируйте температуру от 20°C до 100°C с шагом 20°C. После обнаружения оптимального диапазона выберите границы уже и варьируйте температуру уже с меньшим шагом, например, в 5 °C.

4) Не стоит забывать и про базовые ограничения, которые дает вам ваш синтез. Так, например, температуры кипения/замерзания растворителей не дадут вам менять температуру сверх них. Для воды диапазон значения будет лежать в пределах 5–90 °C.

2.5 Факторы, влияющие на взаимодействие наноматериалов с биологическими объектами.

Ниже описаны факторы, влияние которых неоднократно исследовано. Это раздел стоит воспринимать не только как полезное знание, но и как тот минимум, который нужно учесть при планировании исследования, передачи материалов для биологических экспериментов и подготовки исследования к публикации.

2.5.1 Синтез и состав

Химический состав наноматериала играет ключевую роль в определении его биологических взаимодействий, поэтому детальное описание состава является обязательным. Однако глубина характеристики материала во многом зависит от его природы. Требование конкретных деталей состава может оказаться слишком ограничительным для некоторых наноматериалов и недостаточно строгим для более хорошо изученных веществ. Один из способов обеспечить достаточную полноту описания состава недавно опубликованного наноматериала — предоставить высококачественные, воспроизводимые этапы его синтеза. Особое внимание следует уделить этапам синтеза, которые в ходе исследования проявили чувствительность к внешним условиям или к квалификации исполнителя. Также необходимо указать все использованные методы очистки, поскольку остатки прекурсоров в смеси наночастиц могут существенно повлиять на результаты биологических экспериментов и привести к ошибочным выводам. Для проверки полноты и воспроизводимости вашей методики рекомендуется попросить коллег-химиков воспроизвести синтез наноматериала, опираясь исключительно на ваше описание. Их обратная связь поможет определить, насколько подробно и точно изложены этапы синтеза, легко ли их повторить и удаётся ли получить сопоставимые результаты.

2.5.2 Размер и форма

Клеточные механизмы, обеспечивающие усвоение наноматериалов, а также эффективность этих процессов, зависят от размера и формы наночастиц. Кроме того, размер влияет на адсорбцию биомолекул на поверхности материала и на их конформацию. При исследованиях *in vivo* размер и форма определяют распределение наноматериалов в органах. В организме действуют как физические барьеры, так и клетки, способные селективно захватывать материалы определённого размера. Для сферических частиц достаточно указать их диаметр. Для частиц иной формы (например, наностержней) следует предоставить данные о длине, ширине, толщине и соотношении сторон. Необходимо также учитывать, как размер наноматериала может изменяться при взаимодействии с биологической системой, например, вследствие динамической адсорбции биомолекул на его поверхности. Кроме того, в отличие от неорганических металлических наночастиц, которые, как правило, сохраняют размер во "влажном" и "сухом" состоянии, органические наноматериалы могут демонстрировать значительные изменения размеров при переходе от сухого к гидратированному состоянию (например, при сравнении данных электронной микроскопии и измерений методом динамического светорассеяния). Обязательно следует указать протокол, использованный для измерения размеров наноматериала, а также уточнить тип измеренного размера (например, геометрический или гидродинамический).

2.5.3 Распределение по размерам и агрегация наночастиц.

Уменьшение распределения частиц по размерам (сужение дисперсности) - нетривиальная и комплексная задача. Простое указание среднего размера не является достаточно информативным для биологических применений. Рассмотрим разницу между частицами с распределением по размерам от 10 до 990 нм и теми, которые находятся в диапазоне от 495 до 505 нм. Обе системы имеют средний размер 500 нм, но, вероятно, будут участвовать в биологических взаимодействиях весьма по-разному. Именно поэтому информацию о размерном распределении необходимо вкладывать в описание полученных частиц. Подробности того, как оценивалась дисперсность, включая концентрацию исследуемого материала, используемый протокол и любые подготовительные шаги (например, фильтрация), должны быть включены. Жидкость, используемая для оценки дисперсности, также должна быть подробно описана, поскольку биологически среды могут вызывать агрегацию наноматериалов и смещать распределение по размеру.

2.5.4 Дзета - потенциал (электрокинетический потенциал, ζ)

Поверхностный заряд наночастиц существенно влияет на их взаимодействие с клетками, биораспределение в организме, адсорбцию биомолекул на поверхности, а также на коллоидную стабильность (устойчивость к агрегации и седиментации). Определение поверхностного заряда наночастиц представляет собой сложную

экспериментальную задачу, однако его знак и величину можно косвенно оценить через измерение поверхностного потенциала. На практике вместо истинного поверхностного потенциала обычно определяется потенциал на определённом расстоянии от поверхности наночастицы, связанный с длиной электростатического экранирования. Этот параметр известен как дзета-потенциал (электрокинетический потенциал коллоидной суспензии) и должен быть представлен для всех исследуемых материалов. Поскольку значение дзета-потенциала зависит от характеристик окружающей среды, необходимо указать условия измерений: используемую жидкость (или жидкости), их pH и концентрацию электролитов.

2.5.5 Плотность (в культуре).

Плотность наноматериала (масса/объем) влияет на поведение коллоидной системы и может иметь большое влияние на эффективное распределение наночастиц во время экспериментов с клеточными культурами. Биологические эффекты зачастую зависят от дозы, что делает плотность важным параметром для описания при экспериментах с клеточной культурой.

2.5.6 Загрузка и высвобождение лекарственного препарата

Множество современных наноформуляций созданы с целью доставки лекарств. В таком случае количество загружаемого лекарства должно быть количественно описано. Это может быть указано либо в процентах по массе, либо в виде количества препарата «на частицу». Если вы заявляете о высвобождении препарата, данный феномен должен быть количественно оценен. Высвобождение препарата из наноматериалов — как контролируемое, так и непреднамеренное — заслуживает тщательного рассмотрения.

2.5.7 Детали анализа данных

Все подробности статистического анализа данных должны быть предоставлены, поскольку данные без оценки неопределенности имеют сомнительную ценность и зачастую не вызывают доверия. Следует предоставить количество независимых экспериментов и подробности того, как выражается неопределенность (например, стандартное отклонение, стандартная ошибка или доверительные интервалы). Кроме того, следует предоставить подробности удаления выбросов и проверки значимости, если таковые имеются, включая любую параметризацию этих методов. Для данных, где используются относительно сложные методы нелинейной регрессии (например, подгонка данных рассеяния к структуре), метод должен быть полностью описан, а код, используемый для анализа, должен быть доступен, например, с помощью инструментов открытого доступа.

2.5.8 Общие рекомендации

Во-первых, взаимодействия наноматериалов с биологическими мишенями обычно оцениваются в жидкой среде. В связи с этим физико-химические исследования наноматериалов, по возможности, должны выполняться в среде, соответствующей жидкости, используемой в последующем эксперименте. Например, частицы, которые являются моодисперсными в воде, могут сильно агрегировать при взаимодействии со средой и, следовательно, могут демонстрировать существенные различия в поведении. В некоторых случаях жидкие среды могут быть одинаковыми (например, питательные среды). В других случаях может потребоваться подготовка среды, имитирующей биологическую жидкость (например, путем регулирования pH или концентрации соли). В описательную часть экспериментов следует включить подробности того, как эта жидкость была приготовлена, и соответствующие параметры для характеристики. Во-вторых, необходимо подробно описать, как оценивался тот или иной параметр (то есть какая методика, оборудование и протокол использовались). В-третьих, почти все параметры материала встречаются в виде распределения, и, таким образом, включение распределения измеренного свойства более информативно, чем предоставление одного среднего значения. В идеале также следует предоставить необработанные данные измерений (raw data). В-четвертых, исследование тех или иных свойств с использованием двух (или более) независимых методов имеет значительно бóльшую ценность. Наконец, учитывая опасения по поводу изменчивости значений от эксперимента к эксперименту, важно подробно указать, была ли дисперсия определена посредством нескольких независимых измерений на одной и той же “партии” материала (имеется в виду, использовались ли несколько образцов из одного синтеза) или было подготовлено несколько партий (проведено несколько последовательных идентичных синтезов и была оценена воспроизводимость значения той или иной характеристики в рамках погрешности).

Таблица 2.4.

Минимальная характеристика наноматериалов.

Характеристика материала	Величины измерения
Условия синтеза и состав	-
Размеры, форма, соотношение размеров (для несферических частиц)	нанометры (нм)
Индекс полидисперсности	безразмерный
Дзета-потенциал	мВ
Плотность	кг/м ³
Загрузка лекарств и высвобождение	% от массы
Таргетные молекулы	Количество лигандов на частицу
Метки	относительные единицы на частицу

2.6 Исследование физико-химических свойств наноматериалов

Из-за большого разнообразия наноматериалов не существует единого универсального метода достоверной характеристики. Часто для измерения определенных свойств существует несколько похожих методов, которые дают схожую или коррелирующую информацию. Что касается структурных свойств наноматериалов, то стандартными методами являются просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ), сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), сканирующая туннельная микроскопия (СТМ), атомно-силовая микроскопия (АСМ), электронная дифракция, рентгеновская дифракция (РФА), ИК-Фурье спектроскопия, термогравиметрический анализ (ТГА), масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой (ИСП-МС), элементный анализ и т. д. Для наноматериалов, диспергированных в растворителе, следует также исследовать коллоидные свойства в конкретном растворителе, в котором будут применяться наноматериалы. Типичные методы характеристики включают динамическое рассеяние света, флуоресцентную корреляционную спектроскопию (ФКС), абсорбционную спектроскопию. Для флуоресцентных наноматериалов следует выполнить оптическую характеристику, такую как ультрафиолетовые/видимые спектры поглощения, спектры флуоресценции, определение квантового выхода и т. д. Характер соответствующего исследования во многом определит, какие из методов характеристики являются наилучшими для применения.

2.6.1 Основные методы характеристики наноматериалов:

1) Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Сканирующая электронная микроскопия — мощный инструмент для анализа наноматериалов, но требует тщательной подготовки образцов и корректной интерпретации данных [Swain и др., 2023].

Для точного определения размеров необходимо использовать статистические методы, возможные артефакты и использовать специализированное ПО.

С помощью сканирующей электронной микроскопии можно определить три важных характеристики наноматериалов:

- форму (сферическая, игольчатая, пластинчатая и тд);
- морфологию и особенности поверхности (отростки на частицах, пористость образцов, неровности, шероховатости);
- размеры частиц и распределение по размерам, а также соотношение сторон для несимметричных форм.

Для того чтобы предоставить достоверные данные по размерам наночастиц, следует:

а) выбрать область анализа или фотографию СЭМ (минимум 300 частиц для статистики).

б) измерить диаметры (вручную или с помощью ПО, например, ImageJ, Fiji)

в) построить гистограмму распределения (определение среднего размера и дисперсии).

г) определить средний размер и индекс полидисперсности. Представить их как в графическом, так и числовом виде.

Для получения точных данных, вызывающих доверие других исследователей, стоит совмещать СЭМ с другими методами физико-химического анализа (ПЭМ, АСМ, РФА). Более того, анализ рекомендуется проводить после каждой процедуры синтеза для того, чтобы удостовериться в воспроизводимости методики и исключить ошибку в конкретной проведенной процедуре синтеза.

2) Энергодисперсионный анализ для определения элементного состава вещества (ЭДС) (англ. Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy, EDS) – метод элементного анализа, основанный на регистрации характеристического рентгеновского излучения, возникающего при взаимодействии электронного пучка с образцом. Он позволяет определять качественный и количественный состав вещества с точностью до ~ 0.1–1 ат.%. Обычно данный анализ совмещен в одном приборе вместе со сканирующим электронным микроскопом.

Для того, чтобы получить достоверные данные с помощью данного анализа, стоит учесть следующие факторы при пробоподготовке:

- *Чистота поверхности* – загрязнения (органические пленки, адсорбированные газы) искажают спектр.
- *Проводящее покрытие* – углерод или золото могут маскировать легкие элементы (С, О, N).

- *Плоская поверхность* – неровности приводят к погрешностям в количественном анализе.
- *Толщина образца* – слишком тонкие образцы дают слабый сигнал, толстые – перепоглощение.

Для верной интерпретации результатов следует:

- *Сделать минимум 3–5 измерений* в разных точках для оценки однородности распределения элементного состава.
- *Провести измерение с большим временем накопления сигнала (>100 с)* для улучшения статистики.
- *Проверить на воспроизводимость* – сравнение данных с разных участков, а также в нескольких разных синтезах.

3) Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)

Просвечивающая электронная микроскопия (*англ. Transmission Electron Microscopy, TEM*) - метод визуализации и анализа наноматериалов с атомарным разрешением (до 0.05 нм в современных приборах). Позволяет изучать морфологию, кристаллическую структуру, дефекты и элементный состав.

При пробоподготовке стоит обратить внимание на:

Толщину образца – должна быть <100 нм (*лучше <50 нм*) для лучшего контраста.

Чистоту поверхности – загрязнения (углерод, органические остатки) могут искажать изображение.

Стабильность образца – некоторые материалы разрушаются под пучком (полимеры, биологические образцы).

Данный анализ позволяет не только посмотреть частицы “на просвет”, что актуально для полых частиц, структур по типу “ядро - оболочка” или частиц по типу Януса, но и провести анализ их структурных характеристик (кристаллическая решетка, включения, дислокации, границы зерен, вакансии). Для этого необходимо использовать ПЭМ высокого разрешения, фазы и границы раздела – контраст в STEM-HAADF. Для анализа биологических образцов стоит использовать крио-ПЭМ.

При анализе результатов те же рекомендации, что и для СЭМ анализа:

- При анализе размеров наночастиц взять выборку не менее 100 штук, использовать соответствующее ПО (как и при анализе СЭМ изображений).
- всегда проводить множественный анализ для статистики и анализа воспроизводимости.

4) Рентгенофазовый анализ (РФА)

Рентгенофазовый анализ (*англ. X-ray Diffraction (XRD)*) – это неразрушающий метод исследования кристаллической структуры, фазового состава, размера кристаллитов и микронапряжений в материалах. Применяется для анализа порошков, тонких пленок, наночастиц и поликристаллических образцов.

Факторами, влияющими на качество полученных дифрактограмм и их интерпретации являются:

- *Подготовка образца (порошки должны быть однородно измельчены (без агломератов) и равномерно нанесены на подложку).*
- *контроль артефактов (вычитание пиков от подложки, $K\alpha_2$ - излучения)*
- *Несколько измерений – для проверки однородности.*
- *Длительное сканирование – для слабых пиков (например, малых количеств фазы).*
- *Фазовая идентификация проводится путем сравнения с базами данных (ICDD PDF-2, COD).*

5) Динамическое светорассеяние

Динамическое рассеяние света (англ. Dynamic Light Scattering, DLS) — это метод определения размеров наночастиц, белков, полимеров и других объектов в растворе путем анализа флуктуаций рассеянного света.

Ключевыми факторами, влияющие на достоверность данных, являются:

1. *Чистота раствора - пыль, пузырьки и агрегаты искажают результаты.*
2. *Концентрация частиц – должна быть оптимальной (обычно 0,1–1 мг/мл).*
 - а) *Слишком высокая → множественное рассеяние.*
 - б) *Слишком низкая → слабый сигнал.*
3. *Фильтрация – использование фильтров 0,1–0,45 мкм для удаления загрязнений.*
4. *Растворитель – должен быть чистым и не содержать флуоресцирующих примесей.*
5. *Индекс полидисперсности (англ. Polydispersity index, PDI) – должен быть <0.1 для монодисперсных систем.*
6. *Корреляционная функция должна быть гладкой, без артефактов.*
7. *Интенсивность рассеяния: резкие изменения указывают на агрегацию.*
8. *Минимум 3–5 измерений для каждого образца.*

Рекомендации:

- Для полидисперсных систем использовать комбинацию метода динамического светорассеяния и ПЭМ.
- Для белков и биомолекул учитывать вязкость и ионную силу буфера.
- Всегда проверять корреляционную функцию на артефакты.

ВАЖНО! Гидродинамический радиус \neq истинный размер частиц. Для определения последнего нужно использовать методы СЭМ и/или ПЭМ. Гидродинамический радиус зачастую флуктуирует, а также меняется в зависимости от выбранного растворителя и условий съемки (температуры).

Зачастую совместно с гидродинамическим радиусом определяют также дзета-потенциал наночастиц, который является важным с точки зрения взаимодействия частиц в растворе (в том числе с биологическими объектами).

Дзета-потенциал — ключевой параметр, характеризующий электростатические свойства поверхности частиц в жидкости и предсказывающий стабильность коллоидных систем. Измеряется методом электрофоретического рассеяния света (ELS) или электрофоретической подвижности с последующим расчетом по модели Генри.

Детали пробоподготовки:

- Ионная сила раствора:
 - Оптимальная концентрация электролита: 1–10 ммоль/л
 - Высокая ионная сила (>100 ммоль/л) сжимает двойной слой → снижает ζ -потенциал
- pH среды:
 - Измерять в физиологически релевантном диапазоне (например, 5.0–8.0 для биосистем)
 - Определять изоэлектрическую точку (pI) — pH, где $\zeta=0$
- Концентрация частиц: 0,01–0,1 масс. % (слишком высокая приведет к множественному рассеянию)
- Очистка от примесей: диализ/фильтрация (0,22 мкм) для удаления агрегатов и посторонних включений.

При анализе данных:

- Критерии стабильности:

ζ -потенциал (мВ)	Стабильность системы
0–±5	Быстрая агрегация
±10–±20	Умеренная стабильность
>±30	Высокая стабильность

- Зависимость от pH: построение кривой $\zeta=f(\text{pH})$ для определения pI
- Влияние ионной силы: анализ в разных буферах (фосфатный, Tris-HCl и др.)

Ограничения метода:

- Не работает для нейтральных частиц (ПЭК-лизированные наночастицы), концентрированных систем (>1 масс. %), органических растворителей с низкой диэлектрической проницаемостью.

б) Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия

Рентгеновская фотоэлектронная спектроскопия (англ. X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) — это мощный метод исследования химического состава и

электронного состояния поверхности материалов (глубина анализа ~5–10 нм). Применяется для изучения тонких плёнок, наноматериалов, катализаторов, полимеров и модифицированных поверхностей. Позволяет оценить поверхностный химический состав.

Достоверность результатов зависит, как и в любом анализе, от пробоподготовки, условий проведения анализа, и их интерпретации.

7) Инфракрасная спектроскопия

Инфракрасная спектроскопия (ИК) (англ. Fourier-transform infrared spectroscopy, FTIR) — ключевой метод для изучения химического состава, функциональных групп и молекулярных взаимодействий в наноматериалах. Важно отметить, что не все материалы можно исследовать данным методом. Так, наиболее часто встречающиеся примеры - исследование полимерных наночастиц, наночастиц с функциональными группами на поверхности (-C=O, -OH, -OOH, NH₂ и др.), наночастицы оксидов металлов (SiO₂, TiO₂, Fe₃O₄ и др.). Тем временем бессмысленно исследовать наночастицы чистых металлов (Au, Ag, Pt, Pd и др.).

Представленные в этом разделе методы далеко не единственные, множество в данном разделе не описано, таких как атомно-силовая спектроскопия, ядерный магнитный резонанс, анализы рамановских спектров и др. Данные типы анализов исследователям предлагается изучить самостоятельно.

Для улучшения воспроизводимости опубликованных данных по наноматериалам, предназначенных для использования в биомедицинских приложениях, Фария и его коллеги недавно предложили использовать чек-лист по минимальному описанию синтетических и биологических экспериментов, который предполагается использовать, в качестве ориентира при подготовке публикации. Ознакомиться с ним можно в таблице 2.5 [Faria и др., 2018].

Таблица 2.5.

Чек-лист по характеристике материалов для биологических экспериментов.

Пункт чек-листа	
Имеются ли подробные и понятные инструкции, описывающие все этапы синтеза и конечный состав наноматериала?	<input type="checkbox"/>
Сообщается ли размер (или размеры, если он несферический) и форма наноматериала?	<input type="checkbox"/>
Сообщается ли о дисперсности или агрегации размеров наноматериала?	<input type="checkbox"/>
Сообщается ли о дзета-потенциале наноматериала?	<input type="checkbox"/>
Сообщается ли плотность (масса/объем) наноматериала?	<input type="checkbox"/>
Сообщается ли о количестве загруженного в наноматериал препарата? Под «препаратом» здесь в широком смысле подразумеваются функциональные грузы (например, белки, малые молекулы, нуклеиновые кислоты).	<input type="checkbox"/>
Сообщается ли о целевых характеристиках наноматериала, включая количество лиганда, связанного с наноматериалом, если материал был функционализирован путем добавления лигандов для целевой доставки?	<input type="checkbox"/>
Сообщается ли сигнал метки на наноматериал/частицу? Например, сигнал флуоресценции на частицу для наноматериалов с флуоресцентными метками?	<input type="checkbox"/>
Если свойство материала, не указанное здесь, изменяется, было ли оно количественно определено?	<input type="checkbox"/>
Проводились ли исследования в жидкости, имитирующей биологические условия?	<input type="checkbox"/>
Предоставляются ли подробные сведения о том, как эти параметры были измерены/оценены?	<input type="checkbox"/>

Стоит отметить, что хотя цель данного методического пособия состоит в описании необходимых и достаточных данных о наночастицах для биологических применений, практически все описанное в Главе 2, в том числе и чек-лист, будет справедливо и для характеристики наночастиц для любых других применений.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие виды наноматериалов применяются в наномедицине?
2. Назовите основные требования к наноматериалам для биологических применений.
3. В чем суть золь-гель метода синтеза наночастиц?
4. Какие наночастицы синтезируются методом ко-преципитации и почему этот метод важен?
5. Какие параметры можно варьировать при планировании синтеза наноматериалов?
6. Как размер и форма наночастиц влияют на их биологические свойства?
7. Что такое дзета-потенциал и как он влияет на стабильность наночастиц?
8. Как определяется загрузка и высвобождение лекарственного препарата из наночастиц?
9. Какие физико-химические методы применяются для характеристики наноматериалов?
10. Какие факторы учитываются при выборе метода анализа взаимодействия наночастиц с биологической средой?

3. Модификация наноматериалов для экспериментов в бионанотехнологиях

Следующим логичным шагом после синтеза и получения физико-химических характеристик наночастиц является их подготовка для экспериментов с биологическими системами. Эта подготовка может включать несколько этапов, в зависимости от задач: функционализация другими оболочками, покрытие поверхности полимерами, в том числе и биополимерами; добавление маркеров и меток; загрузка лекарственных веществ.

3.1. Функционализация поверхности наночастиц:

Стратегия покрытий обычно используется для решения нескольких задач: а) снижение токсичности [Курдюков и др., 2021]; б) повышение стабильности в биологических средах и циркулируемости наночастиц в организме; в) повышение эффективности взаимодействия наночастиц с клетками; г) добавление визуализирующих агентов [Липенгольц и др., 2024]; д) обеспечение управляемого высвобождения лекарственного препарата из наноформуляции [Михеев и др., 2022].

3.1.1. Получение SiO_2 оболочек

Одним из наиболее частых примеров функционализации наночастиц является покрытие кремнеземом (SiO_2), необходимое для снижения токсичности и добавления пористой матрицы для загрузки лекарств. Классическим методом получения такой оболочки является метод Штобера, заключающийся в золь-гель процессе, в котором алкоксид кремния (чаще всего тетраэтоксисилан, TEOS) гидролизуется и конденсируется в присутствии воды, аммиака и этилового спирта. Рассмотрим пример получения оболочки из SiO_2 на примере синтеза золотых наночастиц (обозначение оболочки для систем типа ядро-оболочка записывают как @, $\text{Au}@(\text{SiO}_2)$) [Wong и др., 2011]

1. Получение наночастиц Au с размером 40 нм

На первом этапе получают затравки золотых наночастиц (нескольких очень маленьких частиц (~ 10–15 нм) для последующего роста более крупных частиц). Такие затравки получают следующим образом:

HAuCl_4 восстанавливается цитратом натрия, который также действует как стабилизирующий агент. Синтез затравок наночастиц Au размером ~ 40 нм выполняется путем добавления 99 мл деионизированной воды в стакан объемом 150 мл с мешалкой. Затем к деионизированной воде добавляется 1,0 мл исходного раствора HAuCl_4 (0,025 моль/л). Как только перемешиваемый раствор начинает кипеть, в стакан добавляется 1,0 мл исходного раствора цитрата натрия (0,039 моль/л). Сначала раствор окрасится в темно-фиолетовый цвет, а затем в винно-красный. Когда раствор станет винно-красного цвета, его все еще необходимо нагревать и перемешивать в течение дополнительных 20 минут. Через 20 минут раствор можно снять с плиты и дать ему остыть до комнатной температуры. Этот раствор затем будет использоваться в качестве затравочного раствора для выращивания частиц до более крупных размеров.

40 нм НЧ Au сначала синтезировали в виде затравочного раствора. На каждом этапе роста: кипящая вода (50 мл), NaOH (100 мкл, 0,165 ммоль/л), цитрат натрия (500 мкл, 34,0 ммоль/л) и HAuCl₄ (500 мкл, 29,4 ммоль/л) последовательно добавляли к синтезированному затравочному раствору (50 мл); полученную смесь затем кипятили в течение 30 мин. Этот этап роста повторяли еще 11 раз, получая наночастицы с однородным размером ~ 60 нм НЧ Au (общий объем около 650 мл).

2. Получение Au@SiO₂ наночастиц

3 мл синтезированных 60 нм НЧ Au концентрировали до 20 мкл центрифугированием при 4500 об/мин (1600 g) в течение 15 мин. Концентрированные НЧ Au повторно диспергировали в 480 мкл воды и добавляли в пробирку, содержащую 2,5 мл 2-пропанол и 20 мкл 2 ммоль/л 11-меркаптоуксуную кислоту в этаноле. Раствор интенсивно перемешивали в течение 10 мин, затем добавляли 600 мкл TEOS (тетраэтоксисилан) (11,2 ммоль/л в воде) и 90 мкл NH₃·H₂O. Смесь (общий объем = 3,71 мл, V_{2-пропанол}/V_{вода} = 2,1/1) интенсивно перемешивали в течение 14 ч. После этого продукт выделяли центрифугированием при 5000 об/мин (2000 g) в течение 15 мин, повторно диспергировали в чистом этаноле и затем хранили при комнатной температуре (23 °C). Хранение в этаноле – критически важный этап, так как в водных растворах оболочка нестабильна. При этом существует так называемый метод отверждения кремнезема, заключающийся в выдержке финального раствора (2) до процедуры отмывки в печи при 60 °C в течение 10 часов. Это позволяет повысить устойчивость оболочки не только к водным растворам, но и к кислотам.

3.1.2. Получение полиэлектролитных оболочек

Полиэлектролитные оболочки широко используются для стабилизации наночастиц, придания им функциональных свойств (например, повышения биосовместимости, pH-чувствительности, пришивки каталитических или оптических наноматериалов) и контроля их взаимодействия с окружающей средой. Рассмотрим пример получения полиэлектролитной оболочки для функционализации микрочастиц β-FeOOH@SiO₂ наночастицами платины.

1) Синтез наностержней β-FeOOH

Сначала 810 мг FeCl₃·6H₂O растворяли в 30 мл деионизированной воды. После полного растворения хлорида железа, раствор помещали в печь, разогретую до 100°C, и выдерживали в течение 6 часов. Затем раствор охлаждали до комнатной температуры естественным образом. Полученные частицы трижды промывали деионизированной водой методом центрифугирования при 6000 об/мин в течение 20 минут.

2) Синтез частиц β-FeOOH@SiO₂

Смешивали 125 мг СТАВ (цетилтриметиламмония бромид), 50 мл деионизированной воды, 20 мл этанола (EtOH) и 500 мкл NH₄OH, после чего проводили ультразвуковую обработку в течение 15 минут. Затем к смеси добавляли 1,85 мл суспензии β-FeOOH (2,7 мг/мл) и дополнительно обрабатывали

ультразвуком 5 минут. После этого при магнитном перемешивании (800 об/мин) по каплям добавляли заранее приготовленную смесь TEOS/EtOH (содержание TEOS в спирте 5 масс. %). Смесь оставляли на ночь, а затем трижды промывали деионизированной водой (центрифугирование при 6000 об/мин, 20 минут). Для предотвращения растворения кремнезёма проводили процесс отверждения. Для этого раствор, содержащий компоненты для роста кремнезёма (125 мг СТАВ, 50 мл dH₂O, 20 мл EtOH, 500 мкл NH₄OH и TEOS/EtOH), выдерживание в сушильном шкафу при 60°C в течение 10 часов.

3) Синтез частиц β -FeOOH@SiO₂@PAH@Pt

0,05 г PAH (полиаллиламин гидрохлорид) растворяли в 50 мл раствора NaCl (0,5 моль/л) и обрабатывали ультразвуком 20 минут. Затем добавляли 5 мг частиц FeOOH@SiO₂ (в 20 мл раствора) и перемешивали при магнитном перемешивании (500 об/мин) в течение 60 минут. После этого раствор центрифугировали (6000 об/мин) в течение 20 минут и трижды промывали дистиллированной водой.

Наночастицы Pt синтезировали следующим образом: смешивали 43 мл H₂O, 2,5 мл H₂PtCl₆ (0,05 моль/л) и 2,5 мл цитрата натрия (0,1 моль/л) в химическом стакане при магнитном перемешивании (900 об/мин). Затем по каплям добавляли 2,45 мл боргидрида натрия (0,015 моль/л). Раствор становился коричневым, и перемешивание продолжали ещё 15 минут. 10 мл полученного раствора наночастиц Pt добавляли к 5 мг частиц FeOOH@PAH и доводили объём до 50 мл дистиллированной водой. Конечный раствор перемешивали на ротаторе (35 об/мин) в течение ночи.

3.1.3. Перезарядка поверхности оксидных наночастиц

Достаточно частой задачей для биомедицинских тематик является перезарядка поверхности оксидных наночастиц, что позволяет снизить проникновение и взаимодействия наночастиц с клетками. Кроме того, такой подход позволяет повысить устойчивость наночастиц к агрегации в физиологических растворах. Одним из примеров перезарядки наночастиц является их покрытие лимонной кислотой.

Пример покрытие наночастиц Fe₃O₄ лимонной кислотой

1. Приготовление магнетита (Fe₃O₄)

2,5 г FeCl₂·4H₂O (Sigma-Aldrich, >99,0%) и 5 г FeCl₃·6H₂O (Sigma-Aldrich, 97,0–102,0%) растворяли в 100 мл деионизированной воды при постоянном перемешивании. К полученному раствору добавляли 12 мл водного аммиака (25%) и перемешивали в течение 10 минут при комнатной температуре (23 °C). Осаждённый магнетит отделяли с помощью магнита и многократно промывали деионизированной водой до достижения нейтрального pH. Чёрный осадок ресуспендировали в 100 мл деионизированной воды и подвергали ультразвуковой обработке (ультразвуковая ванна, 35 кГц, 150 Вт). Оптимальное время обработки (120 минут) определяли по зависимости среднего гидродинамического диаметра и ζ-потенциала от времени.

2. Модификация лимонной кислотой (Цит-Fe₃O₄)

После промывки магнетита и магнитного разделения к осадку добавляли 25 мл раствора лимонной кислоты (40 г/л). Смесь интенсивно перемешивали в течение 5 минут, после чего осадок снова отделяли магнитным способом. Процедуру повторяли 4 раза. Затем магнетит промывали деионизированной водой для удаления избытка лимонной кислоты. Окончательно осадок ресуспендировали в 100 мл деионизированной воды и подвергали ультразвуковой обработке. Оптимальное время обработки (120 минут) определяли, как описано выше.

3.1.4. Загрузка и высвобождение лекарственного вещества

Многие современные наноматериалы разрабатываются как системы доставки лекарств. Если частица является носителем, необходимо количественно оценить, какое количество препарата может быть или уже загружено. В случаях, когда лекарственное вещество не "загружается", а является неотъемлемым компонентом, следует указывать его содержание. Это можно выразить в процентах по массе или в количестве препарата на одну частицу. Если заявляется о контролируемом высвобождении или стабильности препарата в составе наноформуляции, эти утверждения должны быть подтверждены количественными данными. Особого внимания заслуживает как запланированное, так и спонтанное высвобождение лекарств из наноматериалов.

Пример загрузки доксорубина (Doxil) на магнитные наночастицы Fe₃O₄, модифицированные полиэлектролитами

1. Синтез и модификация магнитных наночастиц

Получение Fe₃O₄ (соосаждением):

- Растворяют 2,5 г FeCl₂·4H₂O и 5 г FeCl₃·6H₂O в 100 мл деионизированной воды.
- Добавляют 12 мл NH₄OH (25%) при перемешивании.
- Осаждённые частицы промывают водой до нейтрального pH и диспергируют ультразвуком (150 Вт, 30 минут).

Модификация полиэлектролитами (для повышения загрузки Doxil):

- Добавляют 10 мг полиаллиламина (ПАА) к 10 мл суспензии Fe₃O₄ (1 мг/мл) в 0,5 моль/л NaCl.
- Перемешивают 1 час, затем центрифугируют (10 000 об/мин, 15 мин) и промывают.

2. Загрузка доксорубина

Стандартный протокол:

- Смешивают 5 мл суспензии Fe₃O₄@ПАА (1 мг/мл) с 5 мл Doxil (0.5 мг/мл в фосфатно-солевой буфере (англ. Phosphate buffered saline, PBS), pH 7,4).
- Инкубируют 24 часа при 37°C в темноте (для предотвращения деградации Doxil).
- Центрифугируют (14 000 об/мин, 20 мин) и собирают супернатант.

3. Анализ эффективности загрузки

Метод: УФ-видимая спектроскопия ($\lambda = 480$ нм для Doxil).

Расчёты:

- Измеряют оптическую плотность супернатанта (свободный Doxil).
- Сравнивают с калибровочной кривой (0–100 мкг/мл Doxil в PBS).

Формула:

$$\text{ЭФ (\%)} = \left(1 - \frac{C_{\text{свободный}}}{C_{\text{исходный}}} \right) \times 100\%$$

Пример результата: 80% загрузки (4 мг Doxil на 5 мг Fe_3O_4 @PAH).

3.1.5. Направленная доставка лекарств

Значительный исследовательский интерес представляет создание так называемых "таргетных" (адресно доставляемых или направленно доставляемых) материалов, способных избирательно связываться с определенными тканями или клетками. Один из подходов предполагает присоединение направляющих лигандов к поверхности частицы, эффективность чего зависит как от количества лиганда, так и от способа его закрепления. Другие стратегии таргетинга основаны на физико-химических свойствах самого материала.

Если система разрабатывается для направленной доставки с использованием лигандов, необходимо указывать количество связанных с носителем молекул-мишеней. Этот вопрос особенно актуален в свете дискуссий о существующих проблемах доставки нанопрепаратов, целесообразности таргетинга как основной стратегии и сравнении эффективности таргетных наноматериалов с клинически применяемыми аналогами.

Оптимизация таргетинга — сложный процесс, и многие его аспекты пока недостаточно изучены. Например, исследования показывают, что лишь 3,5% поверхностных белков на частицах имеют правильную ориентацию для связывания с рецепторами, а увеличение концентрации антител на поверхности может даже снижать эффективность нацеливания. Это свидетельствует о том, что низкая эффективность таргетных систем, наблюдаемая в период 2005–2015 гг., могла быть связана скорее с методологическими, чем с принципиальными ограничениями.

Перспективные разработки последних лет позволяют анализировать взаимодействие наночастиц с рецепторами на молекулярном уровне. По мере совершенствования этих методов станет возможным более точно описывать функциональные характеристики наноматериалов, включая количество и плотность биологически активных лигандов на поверхности частиц. Пока же при описании таргетных систем следует включать хотя бы полуколичественную оценку их сродства и специфичности к мишени.

3.1.6. Метки для отслеживания механизмов реакции либо биологического поведения

Наноматериалы часто покрывают функциональными метками для изучения их биологического поведения. В качестве меток обычно используют:

- Флуоресцентные зонды
- Радиоактивные метки
- Контрастные агенты для МРТ

В некоторых случаях сам наноматериал может служить меткой. Независимо от выбранного метода, необходимо указывать интенсивность маркировки на одну частицу. Важно включать контрольные эксперименты для оценки возможных изменений сигнала в ходе исследования, которые могут быть вызваны как отделением метки от носителя, так и влиянием окружающей среды (например, рН-зависимая флуоресценция).

Кроме того, следует учитывать, может ли метка сама по себе влиять на биологическую активность наноматериала. Интенсивность маркировки допустимо указывать в условных единицах, если используются одинаковые приборы для измерений или применяются стандарты для калибровки. В противном случае рекомендуется использовать абсолютные единицы измерения (например, количество молекул флуорохрома или атомов метки).

Измерения интенсивности на частицу следует проводить в условиях, максимально приближенных к экспериментальным. Например, при использовании проточной цитометрии показатели "голых" частиц в растворе и частиц, инкубированных с клетками, следует определять в одной серии экспериментов. При невозможности такого подхода необходимо указывать оценку возможных колебаний сигнала.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие цели преследует функционализация поверхности наночастиц?
2. Как получают SiO₂ оболочки на поверхности наночастиц?
3. Что представляют собой полиэлектролитные оболочки и как их наносят?
4. Что означает перезарядка поверхности оксидных наночастиц и для чего она нужна?
5. Какие подходы используются для загрузки лекарств в наночастицы?
6. Как реализуется направленная доставка лекарственного вещества?
7. Зачем используют метки в составе наночастиц и какие типы меток применяются?
8. Какие параметры необходимо контролировать при высвобождении вещества из наночастиц?
9. В чем преимущество многоступенчатой модификации наночастиц?
10. Как оценить эффективность модификации наночастиц в биологических системах?

4. Стандартизация биологических экспериментов в бионанотехнологиях

Использование наноматериалов в биотехнологиях подразумевает баланс двух аспектов: токсичности и биосовместимости. Обе эти характеристики могут быть проверены в *in vitro* системах перед исследованиями на животных. Однако, ввиду сильной неоднородности и вариативности *in vitro* систем, полученные данные могут быть неэкстраполируемы на другие тест-системы и биологические модели. Поэтому используемые в исследования модели должны быть определенным образом охарактеризованы (иными словами, описаны), чтобы исследователи, которые будут основываться на ваших данных, могли продолжить вашу работу, развивать её или использовать, не было пустых или непонятных моментов, связанных с воспроизведением протоколов.

Очевидно, что различные характеристики биосистем, которые могут влиять на результаты эксперимента, можно плодить как сущности до бесконечности, что повлечет значительный рост затрат как времени, так и ресурсов. Поэтому основной задачей на этапе планирования эксперимента является соотношение возможной пользы и важности проводимого исследования, учитывающее имеющиеся ресурсы и навыки у экспериментатора. При этом проводимые исследования должны дать минимальный базис для того, чтобы результаты могли быть использованы в дальнейшей работе, в том числе и в других лабораториях.

Обычно первым этапом проверки являются исследования на клеточных культурах. Они позволяют получить как общие сведения о новых материалах (например, о их цитотоксичности), так и более детализированные данные, такие как взаимодействие наноматериалов с определенными органеллами или молекулами. Однако необходимо учитывать ряд особенностей, связанных с вариативностью биологических систем. Исследователи должны доказать, что представленные наблюдения обусловлены взаимодействием наноматериалов с биологическими мишенями, продиктованным ключевыми свойствами исследуемого материала, а не разницей в используемых клеточных линиях, пассажах или составе культуральных сред. Второй особенностью является несоответствие между вводимой дозой (количеством материала, добавленным в систему) и дозой, непосредственно действующей на клетки. Это несоответствие явно учитывается в исследованиях *in vivo* (например, при измерении распределения на уровне органов), однако в экспериментах *in vitro* оно часто игнорируется. Из-за широкого спектра физико-химических свойств наноматериалов разница между введенной и клеточной дозой может различаться на несколько порядков. Эта проблема характерна только для нано- и микроразмерных материалов: малые молекулы достаточно диффундируют, чтобы оставаться хорошо перемешанными в растворе, в то время как объемные материалы либо неподвижны, либо быстро оседают. Важно предоставить достаточно информации, чтобы отличить вводимую дозу от клеточной. Без этого крайне сложно сравнивать и обобщать результаты различных исследований.

Общей рекомендацией к проведению экспериментов на клетках является унификация всех проводимых манипуляций. С самого первого эксперимента этого сложно добиться, и скорее всего придется воспроизводить эксперименты спустя некоторое время после того, как вы поймете, как правильно выполнять те или иные операции. Например, научитесь правильно диспергировать клетки при посеве на планшет, что снизит разброс данных при проведении МТТ-теста (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид), про специфику которого будет рассказано позже. Установите стандарт ультразвуковой обработки наночастиц перед добавлением в клетки, к примеру, будете обязательно обработать их 3 минуты ультразвуком перед добавлением. Обычно все эти процедуры направлены на снижение случайной ошибки и уменьшение разбросов в экспериментальных данных, что и является повышением их воспроизводимости, т. е. стандартизацией.

4.1. Особенности культивирования и характеристики клеток

Количество клеток, присутствующих в ходе эксперимента в культуре, является важным параметром для определения как дозы вводимых наночастиц, так и времени начала эксперимента. Следует указывать количество посеянных клеток, время между посевом и началом эксперимента, процентную конфлюэнтность (площадь культуральной посуды, занятую клетками) в начале эксперимента. Конфлюэнтность является критически важным параметром, который необходимо определять в начале эксперимента.

- Некоторые клетки при достижении монослоя (конфлюэнтность 100%) могут начать гибнуть и открепляться от подложки, что может быть ложно воспринято как токсичность исследуемого материала.
- Считается нормой начинать эксперимент тогда, когда конфлюэнтность составляет примерно 50-70%. Это обеспечивает достаточное количество клеток для получения изображений или сигнала в колориметрических тестах.
- Необходимо учесть, что за время эксперимента количество клеток будет увеличиваться в тех лунках/чашках, где материал проявляет низкую токсичность. В таких лунках количество клеток за время эксперимента может достичь 100%, или может наблюдаться критическое снижение количества питательных веществ в среде. Это может повлечь ложноположительные или ложноотрицательные результаты.
- В тех лунках, где токсикант проявляет высокую токсичность, при низкой исходной конфлюэнтности, количество клеток может стать слишком мало, чтобы быть зафиксированным колориметрическими методами, а при съемке изображений в поле зрения будет всего несколько клеток, что приведет к значительной вариации результатов.

Для экспериментов с несколькими типами клеток (например, совместное культивирование, опухолюиды из нескольких типов клеток, органоиды) следует указывать количество нецелевых (например, здоровых) клеток и количество

целевых (например, опухолевых) клеток. В идеале должно быть указано количество для каждого типа клеток.

Необходимо указывать условия инкубирования, включая температуру, влажность и процентное содержание CO₂ внутри инкубатора, а также тип используемой посуды. Если эксперимент проводился с использованием каких-либо разработанных камер для инкубирования или иных типов нестандартной посуды внутри инкубатора, необходимо детально описывать их метод сборки и параметры.

Так как клеточная линия является моделью некоего процесса или организма, необходимо убедиться, что используемая клеточная линия достаточно убедительно представляет интересующий процесс или организм. Выбор животной или клеточной модели является ключевым фактором в биологических экспериментах, часто отражающего тонкий баланс между релевантностью, стоимостью, доступностью и опытом лаборатории. Исследователи должны помнить, что модель должна быть выбрана для четкого представления биологического сценария в решении поставленного исследовательского вопроса, а не для получения наиболее интересных данных. Учитывая это, выбор модели должен быть обоснован. Если вы собираетесь исследовать доставку чего-либо в раковые клетки печени, очевидно, что наиболее релевантным будут клетки, например, HepG2 (клеточная линия гепатоцеллюлярной карциномы человека), а не нормальные фибробласты кожи. Помимо этого, ключевыми вопросами являются:

- Соответствие клеточной культуры заявленному названию. Если эксперимент проводится со «стандартной» клеточной линией (например, той, для которой существуют рекомендации Американской коллекции типовых культур, ATCC), следует указать название и ссылку на клеточную линию. Если культура получена из доверенного источника, например куплена в крупном биобанке, то необходимо получить и изучить паспорт на культуру. Если линия получена из локального криохранилища, от ваших коллег или других источников, то существует вероятность, что она может быть контаминирована или содержать мутации, что значительно повлияет на дальнейшие эксперименты. Если существует возможность провести генотипирование линии — это следует сделать. В серьезных лабораториях проверка подлинности клеточной линии жизненно важна и должна проводиться регулярно либо надежным поставщиком, либо отдельной лабораторией. Кроме того, необходимо провести ПЦР-скрининг на наличие микоплазмы, поскольку эту инфекцию сложно заметить на начальных этапах.
- Важным параметром является пассаж клеточной линии. Он должен быть всегда указан на культуральной посуде. Все эксперименты должны проводиться в определенном диапазоне пассажей, рекомендованном для данной клеточной линии. Обычным является значение 5–20 пассажей, но для некоторых клеточных линий оно может достигать 50 или больше. При

увеличении числа пассажей резко возрастает вероятность случайной мутации, которая может неконтролируемым образом повлиять на взаимодействие клеток с наноматериалами, что в дальнейшем приведет к невоспроизводимости экспериментов между повторами.

- Еще одним важным параметром является фаза клеточного цикла. Её необходимо учитывать отдельно, но такие параметры, как конfluence и пассаж, в том числе, могут на неё влиять. Например, при высокой конfluence клетки могут синхронно перейти в фазу G₀, в которой поглощение наночастиц может резко снизиться.
- Для первичных клеток следует указать известные данные о донорах, включая количество доноров, вид, возраст и пол.

Следует указать, проводились ли повторные опыты параллельно или как независимые эксперименты. Следует различать техническую повторность (повторное измерение одного и того же раствора, дублированные лунки в планшете с одинаковой концентрацией токсиканта и т.д.), биологическую повторность (когда эффект наблюдается на другой клеточной линии, или с использованием другого метода), и повторение эксперимента (когда все этапы эксперимента повторяются “с нуля”, т. е. готовятся новые растворы, среды, выводятся из заморозки клетки с нулевым пассажем и т. д. Когда говорят о том, что эксперимент был повторен три раза (n=3), имеют в виду именно повторение эксперимента, а не техническую повторность.

4.2. Использование адекватных контролей

Можно выделить четыре типа контролей, два из которых обязательны в эксперименте и два используются опционально. Без описания использованных контролей нельзя говорить об эффекте вообще, тем более нельзя сравнивать между собой эксперименты, проводимые с использованием разных контролей. Если мы говорим об исследовании токсичности чего-либо, описание контролей может быть следующим.

1. Негативный контроль – использование такого вещества в качестве токсиканта, которое не должно оказывать на них токсического воздействия.
 2. Положительный контроль – известный токсикант с известным дозозависимым действием.
 3. Супернегативный контроль – отсутствие токсиканта, интактная культура.
 4. Суперположительный контроль – вещество, убивающее 100% клеток, такое как Тритон X-100, перекись водорода или азид натрия.
- При исследовании наноматериалов необходимо убедиться, что сигнал, полученный тем или иным методом измерения, является именно сигналом от взаимодействия наночастиц с клетками и не является собственной особенностью клеточной линии. Фоновый сигнал в отсутствие наночастиц при использовании любого способа обнаружения наночастиц должен быть количественно оценен и представлен в работе. Это важный, часто

игнорируемый контроль, который необходим для количественного анализа в различных методах (например, проточной цитометрии, микроскопии или магнитно-резонансной томографии).

- Многие наноматериалы разрабатываются как носители для биологически активных молекул, лекарств или диагностических агентов. Необходимо подтвердить, что сам материал-носитель не оказывает существенного влияния на жизнеспособность клеток интересующей линии клеток.
- Важно предоставить подтверждение того, что используемый протокол (например, облучение светом, используемые красители) не является источником наблюдаемых изменений жизнеспособности.
- Учет токсичности растворителя. Наночастицы и загруженные в них вещества часто не растворяются в воде или биосовместимых буферах, и для их разведения могут использоваться такие растворители, как ДМСО. Такие растворители в эквивалентных дозах должны использоваться в качестве контроля, чтобы исключить их влияние на результат.
- Учёт краевых эффектов
 - При использовании многолуночных планшетов наблюдается эффект ускоренного испарения культуральной среды из периферийных лунок. Для минимизации данного явления некоторые исследователи заполняют периферийные лунки планшета буферным раствором или вовсе исключают их из эксперимента. Также применяется случайное (рандомизированное) распределение образцов, при котором токсикант титруется не по рядам или столбцам, а по произвольным лункам. Однако такой подход, как правило, используется при наличии автоматической системы дозирования, поскольку в противном случае возрастает риск ошибок, связанных с человеческим фактором.
 - При использовании чашек Петри или флаконов по краям обычно растет больше клеток, чем в центре. Это необходимо учитывать при определении конфлюэнтности и съемке изображений.

4.3. Характеристика биологических жидкостей

Под биологическими жидкостями применительно к теме данного пособия мы будем понимать любые жидкости биологического происхождения (в т. ч. плазма, сыворотка, культуральная среда, кровь и т. д.), а также буферные растворы, имитирующие некоторые свойства нативных биологических жидкостей (буферные растворы, растворы белков, модельные растворы полимеров и т. д.). Свойства этих жидкостей, а вернее их взаимодействие с наночастицами, кардинальным образом меняют поведение и химию последних. Биомолекулы, которые прилипают к наноматериалу при контакте с биологической жидкостью, существенно изменяют основные свойства частиц. В первую очередь это касается изменения дзета-потенциала и размера частиц. При инкубировании наночастиц в растворах, содержащих белок, эффект получил своё собственное имя белковой или

протеиновой короны (англ. protein corona). Изменение дзета-потенциала обычно негативным образом сказывается на стабильность (седиментационную и агрегационную) наночастиц и приводит к их выпадению в осадок. На степень агрегации влияет концентрация ионов в растворе (т. н. ионная сила раствора), или концентрация адсорбирующихся молекул, например, белков. За счет формирования протеиновой короны, а также за счет сопутствующей агрегации увеличивается размер частиц. Протеиновая корона может увеличить размер наночастицы в 2–3 раза.

В связи с вышеперечисленным, очень важно давать правильную характеристику тех сред, в которых происходит изучение наночастиц, поскольку это влияет на то, в каком состоянии изучались частицы. Если частицы были растворены просто в воде и электростатически стабилизированы, то после добавления в культуральную среду они практически гарантированно подвергаются агрегации и выпадают в осадок, что повлияет на эффективную дозу, которая будет взаимодействовать с клетками, что, в свою очередь, должно быть учтено при дальнейших экспериментах.

- Для культуральных сред следует указать тип и процентное содержание добавленной сыворотки, если таковая имеется. Несмотря на то, что типичное содержание сыворотки составляет 10%, бывают бессывороточные среды, среды с инактивированными сыворотками и пр. В особых случаях информация о средах и сыворотке должна включать данные о заказе и партии, месте происхождения, а также сведения о добавках (например, антибиотиках) или стабилизирующих агентах.
- Старайтесь проводить все эксперименты в рамках хотя бы одного повтора с жидкостями из одного стока (под стоком в данном случае понимается образцы жидкости, взятые из одной и той же партии или исходного источника). Это исключит разночтения в трактовке результатов, если возникнет сомнение, с чем связаны разбросы в эксперименте.
- При исследовании взаимодействия биологических жидкостей с наночастицами необходимо подвергать жидкость той же степени характеристики, что и наноматериал. Если не провести характеристику биологических жидкостей, трудно (если не невозможно) определить, обусловлены ли различия в реакции свойствами наночастиц или биологическими вариациями (разной концентрацией белка в сыворотке, или иной концентрацией ионов солей в среде). Например, если наночастица инкубируется с сывороткой крови и сообщается об относительных концентрациях белка, адсорбированного на частице, необходимо также сообщить об относительных концентрациях белков в остальной сыворотке. В качестве альтернативы, если для жидкости установлены стандартные значения состава белков, присутствия клеток и т. д., можно указать эти стандарты, однако необходимо убедиться, что жидкость хранилась

правильно, и прописанные стандарты соответствуют действительности. Тем не менее, лучше иметь внутренний лабораторный стандарт, по которому необходимо калибровать используемые материалы.

Таблица 4.1.

Чек-лист по характеристике биологических объектов

Указаны ли подробности посева клеток, включая количество засеянных клеток, плотность покрытия в начале эксперимента и время между посевом и экспериментом?	<input type="checkbox"/>
Если используется стандартизированная клеточная линия, указаны ли её обозначение и источник?	<input type="checkbox"/>
Известно ли и указано ли общее количество пассажей (сколько раз культура клеток была пересеяна)?	<input type="checkbox"/>
Указан ли последний случай верификации клеточной линии? Если верификация не проводилась, указано ли время и количество пассажей прошедшее с момента получения из надёжного источника (например, ATCC или ECACC)?	<input type="checkbox"/>
Представлены ли результаты тестирования клеточных культур на микоплазму?	<input type="checkbox"/>
Указан ли фоновый сигнал клеток/ткани? (Например, сигнал флуоресценции клеток без частиц в случае эксперимента с проточной цитометрией)	<input type="checkbox"/>
Представлены ли исследования токсичности, демонстрирующие ожидаемую токсичность материала и отсутствие токсичности в контроле?	<input type="checkbox"/>
Указаны ли детали приготовления среды (тип среды, сыворотка, добавленные антибиотики)?	<input type="checkbox"/>
Представлено ли обоснование использования биологической модели?	<input type="checkbox"/>
Представлена ли характеристика биологической жидкости (<i>ex vivo/in vitro</i>)? Например, при исследовании адсорбции белков на наночастицах, диспергированных в сыворотке крови, следует охарактеризовать соответствующие аспекты сыворотки крови (например, концентрации белков и различия между донорами, использованными в исследовании).	<input type="checkbox"/>
Для экспериментов на животных соблюдаются ли рекомендации ARRIVE?	<input type="checkbox"/>

4.3. Детали экспериментального протокола

Как и в случае с материалом и биологическими характеристиками, необходимо предоставить точную и достоверную информацию о том, как проводился эксперимент. Это очень важно для воспроизводимости результатов (как вами в будущем, так и вашими коллегами), поскольку экспериментальные детали, которые кажутся тривиальными, могут, тем не менее, существенно

изменить результаты. Конкретные советы, приведенные в этом разделе, также могут быть жизненно важны для последующего сравнения с новыми результатами и для разработки *in silico* моделей.

Общая рекомендация: когда вы описываете свой протокол, пишите его так подробно, как если бы вы сами пытались его воспроизвести с нуля. Попробуйте пройти по всем шагам в мысленном эксперименте. Например, вы берете стакан, чтобы развести раствор. Задайте себе вопрос: вы берете любой стакан или какой-то особый? Вы кладете в стакан мешалку, обычную или какого-то определенного размера? Если на какой-то из этих вопросов необходимо ответить так, чтобы обосновать свой выбор, значит эту информацию стоит включить и в экспериментальный протокол.

4.4. Особенности культивирования клеток

- Тип используемой клеточной культуры является определяющим фактором определения эффективной клеточной дозы. При использовании стандартных двумерных культуральных планшетов, чашек Петри или флаконов достаточно указать тип планшета (например, 24-луночный планшет) и объем добавленной среды. В некоторых случаях можно указать тип пластика или его обработку, если таковая имеется.
- Для более сложных систем (например, трехмерных сфероидов) необходимо указать полные размеры (например, форму, высоту, ширину, глубину). Если используется нестандартная ориентация (например, клетки растут вверх ногами на перевернутом стекле) или условия потока, необходимо предоставить полную информацию о том, как достигаются эти условия. Желательно предоставлять фотографии, в том числе фотографии процесса сборки.
- Важно воспроизводить все условия от эксперимента к эксперименту. К примеру, вы делали все эксперименты по определению цитотоксичности в течение 24 часов. Однако потом вы решили посмотреть, что произойдет через 72 часа, и обнаружили интересный эффект. Теперь, чтобы сравнить эти данные с ранее полученными, вам придется воспроизвести все предыдущие эксперименты с увеличенным временем инкубирования. А представьте, что они были сделаны пару лет назад. Вам придется поднять старые записи, возможно, уже нет нужных реактивов. Аналогично, если вы вдруг решили сократить время инкубирования с 72 до 24 часов, потому что “наночастицы всё равно не токсичны”, и за 24 часа вдруг выявилась сильная токсичность, вам придется переделать эксперимент. А если и нет, то ранее полученные данные окажутся ненужными, а это потраченные деньги и время. Таким образом, надо изначально определиться с тем, как вы будете проводить эксперименты, и далее придерживаться этого протокола.

4.5. Исследуемая доза наноматериалов

- Количество материала, добавленного в ходе эксперимента, является очевидным компонентом протокола, который должен быть точно указан. Однако выбор единиц измерения для этого параметра менее очевиден. Для экспериментов с клеточными культурами масса, объем, количество частиц и площадь поверхности являются общепринятыми единицами измерения «нанодозы». Мы рекомендуем предоставлять достаточную информацию о характеристиках наночастиц, чтобы заинтересованные исследователи могли рассчитать все четыре метрики дозировки.
 - *Масса.* В случае с малыми концентрациями наночастиц и малым добавляемым объемом, метод прямого взвешивания, даже с учетом использования аналитических весов, может быть затруднителен. Высушивание больших объёмов наночастиц исключительно с целью их взвешивания не всегда является целесообразным из-за низкого выхода продукта. Существует несколько альтернатив, однако они дают массу частиц с определенной погрешностью.
 - Если частицы обладают характерным спектром поглощения или рассеяния, можно заранее сделать калибровочную кривую, по которой затем определять концентрацию частиц. Необходимо помнить, что очень концентрированные растворы наночастиц не подчиняются линейному закону Бугера, поэтому необходимо готовить соответствующие разведения и проводить пересчет с их учетом.
 - Если известна исходная масса вещества, из которого получают частицы (например, используется некая соль серебра, а на выходе получают полностью серебряные частицы), можно рассчитать массу частиц по концентрации остаточного исходного вещества в растворе.
 - Можно воспользоваться количественными методами определения массы, такими как атомно-адсорбционной спектроскопии или масс-спектрометрия.
 - *Объем.* В эксперименте на клетках токсиканты обычно добавляются в первую лунку и затем разбавляются методом, например, двойных разведений. В таком случае необходимо тщательно проводить пипетирование в каждой лунке, чтобы получить максимально гомогенную взвесь. Также стоит избегать добавления токсиканта в объемах на пределе точности дозатора, например 0,5 или 1 мкл. Если позволяет исходная концентрация наночастиц – добавляйте 10–20 мкл. Однако стоит помнить, что если частицы разведены в потенциально токсичном растворителе, необходимо аналогичный объем растворителя использовать в качестве контроля.

- *Количество частиц.* Расчет количества частиц может быть важен, если требуется точно знать число частиц, приходящихся на одну клетку или единицу площади поверхности. В случае сферических частиц или иных простых геометрических форм их количество может быть подсчитано легко, зная общую массу частиц и геометрические параметры одной частицы. В случае частиц сложной формы к расчету следует подходить путем упрощения формы, разбиения её на составные части, или же с использованием специальных приборов, способных считать наночастицы.
- *Площадь поверхности.* Зная количество частиц, полученное на предыдущем этапе, расчет площади поверхности в случае простых геометрических форм не представляет сложности. Сложносоставные частицы, такие как нанозвезды, наноклетки, наноежи с частично случайной структурой поверхности, возможно усреднить и представить в виде модели. Можно также использовать приборные методы, например расчет площади поверхности по сорбции-десорбции газов. Однако стоит помнить, что многие наночастицы не устойчивы при сушке и склонны к агрегации, что может дать заниженные данные при исследовании сорбции. Об этом же следует помнить и при добавлении наночастиц в биологические жидкости. Реальная площадь поверхности агрегатов частиц в среде будет сильно меньше диспергированных наночастиц. В этом случае следует указывать площадь для обоих состояний.
- Доступная для клеток или в организме доза наночастиц может сильно зависеть от способа введения. Наночастицы можно добавлять в сухом виде, разводя их в культуральной среде или предварительно разводя в ином растворителе. При использовании порошка наночастиц следует помнить, что при сушке наночастицы часто агрегируют, даже если использованы стабилизаторы, и при добавлении культуральной среды их необходимо диспергировать. Классическим считается использование ультразвука, например ультразвуковой бани. Время облучения выбирают эмпирически, и оно зависит от многих факторов. Следует не повредить частицы ультразвуком, если они покрыты чувствительными молекулами, например антителами, и не допустить распада наночастиц, например липосом. Подбор времени облучения следует контролировать, проводя исследование наночастиц после облучения такими же методами, какими они изучались после синтеза. Следует разводить наночастицы в небольшом объеме среды и уже потом переносить их в общий объем среды, который требуется для эксперимента.
- В случае эксперимента *in vivo* данные о введении должны включать средство введения, место инъекции/введения, общий объем и концентрацию

вводимого препарата, а также сведения о многократных инфузиях (то есть временные точки или скорость введения). Кроме того, следует указать методы, использованные для нормировки дозы (например, по массе тела), а также концентрацию до и после нормализации. Количество материала, которое достигает интересующего участка или органа, является важной информацией. Как и в *in vitro* системах, существует множество вариантов используемой метрики дозы, включая процент от введенной дозы (%) и процент от введенной дозы на грамм органа (%/г). Учитывая разнообразие исследований, мы рекомендуем предоставлять достаточную информацию для расчета наиболее распространенных показателей дозы *in vivo*. В частности, мы рекомендуем указывать дозу в процентах от введенной дозы на грамм ткани (%/г). Такая нормировка позволяет более точно сравнивать данные, полученные на разных органах и животных. К примеру, селезенка обычно фильтрует наночастицы более “качественно”, чем печень, поэтому концентрация частиц на грамм ткани там выше. При этом печень – более массивный орган, и общая масса частиц в % от введенной дозы в печени будет выше, чем в селезенке. Кроме того, следует включить данные о весе измеренных органов или тканей (и использовать их при нормализации), а также информацию о массе введенного материала, чтобы другие исследователи могли рассчитать альтернативные метрики (например, %, мг/кг). Если возможно, в случае наноносителя желательно разграничить доставку носителя и доставку лекарства. Наконец, важной частью количественной оценки эффективности потенциальных нанопрепаратов является учет фармакокинетики исследуемого материала.

4.6. Детали визуализации

Визуализация взаимодействий наночастиц с клетками обычно подразумевает оптическую, флуоресцентную, конфокальную и электронную микроскопию. Все эти методы требуют многоступенчатой подготовки образцов, и поэтому должны быть детально описаны. Так как итогом является получение изображения, то общей рекомендацией является то, что должна быть объяснена любая обработка изображения. Конечно, в идеальном случае никакой обработки, кроме кадрирования или выделения интересующих объектов, например стрелками, применяться не должно. Однако если применяемая обработка не влияет качественно на отображаемый результат, например незначительно повышена четкость или контрастность изображения, то такое изменение можно внести. Во всех остальных случаях следует воздержаться от любых правок изображений. На всех без исключения изображениях должна быть масштабная линейка (scale bar), она должна иметь четкие границы и хорошо видна на фоне изображения.

- Оптическая микроскопия обычно позволяет увидеть наночастицы в виде агрегатов во внеклеточном пространстве или внутри клеток в эндосомах, однако достоверно установить внутриклеточную локализацию она не

позволяет. При использовании оптической микроскопии важно указывать увеличение, при котором было снято изображение, и режим съемки (светлое поле, фазовый контраст и т.д.).

- Флуоресцентная микроскопия подразумевает использование флуоресцентных красителей, которые окрашивают клеточные компоненты или конъюгированы с наночастицами для улучшения их визуализации. При использовании этой техники следует давать полную информацию по протоколу окрашивания, включая время инкубирования клеток с наночастицами, тип используемой фиксации, время фиксирования, среда для заключения и просветления, тип предметных и покровных стекол, если они не стандартны, концентрацию красителя, в чем он растворен, время окрашивания, условия окрашивания (в темноте, в инкубаторе и т.п.), промывки, их число и способ промывания. При визуализации такие параметры съемки, как экспозиция или Gain, обычно не указывают в протоколе, потому что подразумевается, что выбираются наиболее оптимальные параметры. Однако следует помнить, что при высоких параметрах выдержки возможно получение ложного окрашивания за счет усиления слабого сигнала от несвязанного и плохо отмытого красителя или автофлуоресцирующих структур в клетке. Как и при использовании обычной микроскопии, следует указывать параметры съемки, сопроводив их информацией о том, на каких длинах волн возбуждения и испускания осуществлялась съемка. Если предполагается количественная оценка изображений, то все режимы окрашивания и съемки между экспериментами должны совпадать.
- Конфокальная микроскопия отличается от обычной флуоресцентной тем, что возможно делать оптические срезы с точностью до десятков нанометров и определять внутриклеточную локализацию наночастиц, а также проводить 3D реконструкцию клеток. Именно поэтому конфокальная микроскопия является золотым стандартом визуализации взаимодействий наночастиц с биологическими мишенями. В дополнение к вышеперечисленным параметрам для флуоресцентной микроскопии, сюда следует добавить шаг съемки z-стеков и детали выбора длин волн лазера, а также любую программную обработку изображений в зависимости от типа вашего микроскопа.
- Электронная микроскопия (СЭМ и ПЭМ). С помощью данного типа микроскопии можно получить детали накопления частиц во внутриклеточных органеллах или их распределение в цитоплазме. Основную сложность при получении электронно-микроскопических изображений представляет собой правильная пробоподготовка образцов. Она заключается в многоступенчатой сушке и проводке образцов через ряд спиртов, а затем специальных заливочных сред или смол, с последующей

подготовкой срезов на микротоме. При описании процесса пробоподготовки необходимо давать точные данные о времени выполнения каждого этапа, концентрациях растворителей, способах отмывки, а также физических манипуляциях с образцом. При изучении образца на микроскопе необходимо указывать все параметры съемки, которые могут повлиять на итоговое изображения, включая ускоряющее напряжение, увеличение и настройки контрастности.

В случае *in vivo* визуализации необходимо предоставить подробную информацию о подготовке животного к съемке, включая тип анестезии, способ фиксации животного, время с момента введения препарата, время с момента введения анестезии. Все параметры съемки, таких как время накопления, усиления сигнала и пр. должны быть указаны. Если использовалось экранирование (например, использование алюминиевой фольги, чтобы скрыть место инъекции) или другие особенности, об этом должно быть сообщено. Кроме того, если использовалось контрастное вещество, необходимо предоставить подробную информацию о его введении (например, концентрация, метод введения).

4.7. Обработка данных взаимодействий наноматериалов с биологическими мишенями

Основная ценность исследования заключается не в полученных красивых картинках, а в тех численных значениях, которые можно из них извлечь. В этой связи полученные изображения должны быть надлежащим образом обработаны.

- К исходному изображению по возможности не должны быть применены никакие фильтры, или это должно быть сделано для всех изображений в равной мере.
- Следует предпочесть автоматические алгоритмы подсчета над ручными, поскольку это позволит исключить человеческую ошибку. Алгоритм подсчета следует сначала валидировать вручную, убедившись, что все ключевые объекты попадают в подсчет, области выделены корректно и т.д. Валидацию может проводить несколько человек, чтобы исключить предвзятость. Метод подсчета должен быть детально описан, а если использовался написанный самостоятельно код, его следует выложить на репозиторий и привести ссылку.
- Следует знать, что многие флуоресцентные красители способны взаимодействовать с наночастицами, и зачастую это взаимодействие носит непредсказуемый характер. К примеру, некоторые красители могут адсорбироваться на поверхности наночастиц, что приводит к тушению флуоресценции. Это может быть использовано для детекции наночастиц, однако может приводить и к появлению непрокрашенных участков на изображениях. Во всех случаях совместного использования наночастиц и флуоресцентных красителей необходимо детально изучать любые “странные” результаты взаимодействия, такие как изменение цвета

- окрашивания, излишне яркое или темное окрашивание по сравнению с контролем и т.п. О таких особенностях следует также сообщать в протоколе.
- Когда используется проточная цитометрия, следует тщательно настраивать сигнал от лазеров и учитывать возможные сигналы от наночастиц и их агрегатов. Также необходимо различать внутриклеточную интернализацию наночастиц и связывания с поверхностью клеток. В общем случае такое разделение методами проточной цитометрии возможно только с использованием специальных мембранотропных красителей или двойных меток. Также, когда сигнал от одной частицы меньше, чем автофлуоресценция клетки, или частицы обладают разными уровнями флуоресценции, необходимо более детально обрабатывать данные и представлять их не в виде среднего значения, а в виде гистограммы распределения экспериментальных данных.
 - Необходимо предоставить подробную информацию о проведенном статистическом анализе и анализе данных. Без надлежаще проведенной статистической обработки экспериментальные данные не имеют научной ценности. Следует указать количество независимых экспериментов (n) и детали того, как выражена неопределенность (например, стандартное отклонение, стандартная ошибка или доверительный интервал). Также следует предоставить подробную информацию об удаленных выбросах, тестах на нормальность данных и тестах на статистическую значимость, если таковые имеются, включая параметризацию этих методов. Для данных, в которых используются относительно сложные методы нелинейной регрессии, метод должен быть полностью описан, а код, использованный для анализа, должен быть доступен, например, загружен в соответствующий репозиторий.
 - По возможности мы рекомендуем предоставлять исходные данные для опубликованных статей либо как часть дополнительных данных (Supporting data), либо в доверенном репозитории данных. Если исходные данные не могут быть предоставлены, распределения измеренных параметров имеют гораздо большую ценность, чем среднее значение.

Таблица 4.2.

Чек-лист для описания экспериментальных деталей

Для экспериментов с клеточными культурами: указаны ли тип культуры клеток, включая тип лунки, объём добавленной среды? Указаны ли типы клеток (например, адгезивные или суспензионные) и ориентация (если нестандартная)?	<input type="checkbox"/>
Указана ли доза введённого материала? Указана ли масса наноматериала, объём, количество или площадь поверхности. Представлено ли достаточно информации, чтобы можно было рассчитать другие дозиметрические показатели (например, используя размеры наночастиц и массу материала)?	<input type="checkbox"/>
Для каждого типа проведённой визуализации предоставлены ли подробности о том, как выполнялась визуализация, включая увеличение, длины волн, неравномерную обработку изображений?	<input type="checkbox"/>
Предоставлены ли подробности о том, как вводилась доза, включая метод введения, место инъекции, скорость введения и детали множественных инъекций?	<input type="checkbox"/>
Представлена ли методология, используемая для выравнивания дозы?	<input type="checkbox"/>
Указана ли доставленная доза в ткани и/или органы (<i>in vivo</i>) в процентах от введённой дозы на грамм ткани (%/г)?	<input type="checkbox"/>
Измерена ли масса каждого органа/ткани и указана ли масса материала?	<input type="checkbox"/>
Указаны ли сигналы клеток/тканей с наноматериалами? Например, для флуоресцентно меченных наночастиц общее количество частиц на клетку или интенсивность флуоресценции частиц + клеток в каждый оценённый момент времени.	<input type="checkbox"/>
Предоставлены ли детали анализа данных, включая код, использованный для анализа?	<input type="checkbox"/>
Представлены ли исходные данные или распределение значений, лежащих в основе результатов?	<input type="checkbox"/>

4.8. Проведение МТТ-теста с наночастицами

В данном разделе будут даны общие рекомендации по проведению стандартного МТТ-теста для определения токсичности наночастиц.

4.8.1. Общие рекомендации

- Сначала необходимо определиться с тем, какая будет длительность экспозиции с токсикантом. Стандартным временем проведения МТТ-теста считаются 24, 48 и 72 часа. В некоторых случаях длительность может быть

увеличена до 120 часов (5 дней). Стоит понимать, что адекватное время экспонирования подобрать с первого раза будет довольно сложно, также как и определить все токсикометрические параметры наночастиц. Мы советуем начать с 24 часов, потому что если частицы сильно токсичны, они успеют проявить свою токсичность. В случае проведения теста на 24 часа старайтесь добавлять токсикант и снимать результаты именно через 24 часа, а не 18 или 27 часов.

- Затем следует определить, сколько повторностей и какие разведения мы будем делать, а также какая будет стартовая и конечная концентрация наночастиц. Концентрацию следует подбирать, полагаясь на следующие аспекты:
 - концентрация не должна мешать оптическому наблюдению и снятию спектров. Обычно концентрация наночастиц не превышает 1 мг/мл, зачастую 200-400 мкг/мл достаточно для выявления токсических эффектов.
 - концентрация должна соответствовать тому, что может наблюдаться в организме. Если НЧ планируется применять дальше для целей диагностики или лечения, и есть какая-то гипотетическая концентрация в органе или ткани, то следует использовать похожую концентрацию в эксперименте *in vitro*.
 - стока наночастиц должно быть достаточно для минимум трёх технических повторностей. Обычно готовится сильно больше наночастиц, но иногда выхода бывает мало, и приходится работать с тем, что есть, однако таких ситуаций следует избегать.
 - концентрация должна опираться на существующие литературные данные. Если в литературе описано, что похожие по составу НЧ токсичны в концентрации 1 мкг/мл, смысла исследовать концентрацию в 100 мкг/мл нет.

Разведения НЧ для первых экспериментов можно делать десятикратные, если нет никаких данных о возможной токсичности, или двукратные. Если вы исследуете за раз только один тип частиц, мы предлагаем использовать двукратные разведения. В таком случае при использовании 96-луночного планшета и его горизонтальной ориентации можно сделать 11 разведений, оставив последний столбец на отрицательный контроль. К примеру, при стартовой концентрации НЧ 400 мкг/мл, ряд разведений будет выглядеть следующим образом: 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125, 1,56, 0,78, 0,39 мкг/мл. Таким образом, разброс концентраций составит 1000 раз или три порядка, что будет более, чем достаточно, чтобы покрыть все основные токсикометрические характеристики. При этом каждый ряд планшета будет технической повторностью, что позволит сделать 8 повторов и снизить среднюю ошибку.

- Для МТТ-теста лучше использовать многоканальную пипетку или степпер, поскольку это позволит снизить случайную ошибку при раскапывании клеток, среды и НЧ. Однако следует уделить дополнительное внимание однородности распределения клеток и НЧ в ванне для многоканальных пипеток, а также стерильности ванночки.

4.8.2. Особенности подготовки клеток

- О том, как клетки выбираются для эксперимента, было описано в предыдущем разделе. В общем, клетки должны соответствовать той ткани или органу, где они будут накапливаться и оказывать действие в организме. К примеру, если НЧ планируется применять на коже, то следует выбрать клетки кожи, например фибробласты. В случае внутривенного введения можно выбрать клетки эндотелия или печени, поскольку они будут взаимодействовать с НЧ в первую очередь. Очевидно, что если НЧ предназначены для лечения определенного типа опухоли, следует взять опухолевые клетки из аналогичной ткани.
- Клетки для МТТ-теста следует брать на начальных пассажах с тем расчетом, чтобы вам хватило на весь цикл исследований без необходимости разморозки новых клеток. В неделю можно поставить в среднем два МТТ-теста на 24 часа или один на 72 часа. Таким образом, если вы хотите сделать три МТТ-теста на 72 часа, это займет у вас три недели и примерно 6-8 пассажей клеток. Эксперимент на 24 часа обычно начинают в понедельник, таким образом в среду у вас уже будут первые данные, и вы сможете поставить еще один МТТ-тест и получить результаты в пятницу.
- При проведении МТТ-теста в стандартных 96-луночных планшетах посевная доза клеток должна быть таковой, чтобы на следующий день конфлюэнтность составляла 50-60% при эксперименте на 24 часа и 20-30% при эксперименте на 72 часа. Таким образом клетки в контрольных лунках за 72 часа не успеют потратить все питательные вещества и погибнуть, дав ложные результаты. Однако если у вас возникает подозрение, что причина гибели клеток не в токсиканте, следует уменьшить посевную дозу. Обычно она составляет 2000-7000 клеток на лунку.
- Клетки для МТТ-теста открепляются от флакона таким образом, чтобы избежать присутствия агрегатов, поскольку они могут внести значительные разбросы в данные. Качество открепления клеток следует проверять с помощью оптического микроскопа. В случае присутствия агрегатов необходимо пипетировать клетки с использованием типса на 100 или 200 мкл. Во время посева клеток на планшет флакон с исходной суспензией следует постоянно встряхивать или пипетировать, чтобы избежать агрегации клеток друг к другу.
- После посева клеток на планшет следует визуально оценить несколько лунок на предмет равномерности распределения клеток. Если во время работы вам

показалось, что вы забыли добавить клетки в какую-то лунку или добавили дважды, эту лунку следует пометить и при анализе данных уделить ей внимание. *Равномерный посев клеток - ключ к качественному МТТ-тесту.*

- Обычно клетки инкубируют 24 часа перед добавлением токсиканта. Перед добавлением токсиканта следует оценить состояние монослоя, определить конфлюэнтность, убедиться в отсутствии контаминации, проверить “подозрительные лунки” из предыдущего пункта.

4.8.3. Подготовка НЧ для МТТ-теста

- НЧ могут быть использованы в разных формах. Перед проведением МТТ-теста необходимо убедиться в том, что тот способ растворения НЧ, который вы хотите использовать, подходит для конкретно этих НЧ. Будет не очень хорошо, если прямо перед проведением теста вы увидите, что НЧ не растворяются в культуральной среде.
- Необходимо помнить, что сам растворитель может быть токсичным в больших концентрациях, а при добавлении в среду водорастворимых веществ их объем не должен превышать 1/10 объема среды во избежание изменения осмотичности и кислотности среды.
- Идеальным вариантом будет, если НЧ будут растворены в культуральной среде. Если вы используете порошок НЧ, к нему следует добавить небольшой объем среды (~ 1 мл) и отправить пробирку в УЗ ванну. Время и дозу облучения необходимо выбирать эмпирически, обычно она составляет 1-5 мин. Хорошим результатом является получение такой взвеси НЧ, которая не оседает “на глазах”.
- Бывает, что НЧ сильно агрегируют в среде, или они изначально были большими (300-500 нм), и из-за этого они могут быстро оседать в среде. В этом случае следует интенсивно пипетировать взвесь НЧ в пробирке непосредственно перед добавлением в каждую лунку. Также старайтесь брать взвесь НЧ пипеткой из одного места в пробирке, например с уровня 1 мл или со дна.
- В случае, если вы заметили, что в какую-то лунку попал крупный агрегат НЧ, необходимо сделать об этом пометку и уделить внимание этой лунке при анализе данных. Может оказаться, что агрегат или сильно токсичен, или нетоксичен вовсе.
- При проведении двойных разведений особенно важно равномерно распределять НЧ по объему лунку. Мы рекомендуем пипетировать объем лунки не менее 3-4 раз перед переносом в следующую лунку.
- После добавления НЧ во все лунки следует визуально оценить качество раскапывания. Если НЧ обладают цветом, должен наблюдаться равномерный градиент цвета от максимальной к минимальной концентрации. Также можно посмотреть на лунки в микроскоп и качественно оценить равномерность распределения НЧ, а также наличие

агрегатов. Если агрегатов много, в следующий раз можно увеличить время обработки УЗ, или изменить синтез.

4.8.4. Предварительная оценка клеток перед МТТ

Через 24 часа после добавления токсиканта и перед началом МТТ-теста следует оценить состояние клеток. Данные морфологии клеток могут говорить о токсичности исследуемых наночастиц. Можно качественно оценить количество адгезированных клеток, общее состояние монослоя, наличие дебриса, присутствие эндосом с НЧ внутри клеток. Наблюдаемые особенности следует занести в журнал, чтобы в дальнейшем сравнить их с результатами МТТ-теста. При исследовании НЧ часто бывает, что данные морфологического наблюдения расходятся с данными МТТ-теста, поскольку цитотоксичность НЧ проявляется по-разному. К примеру, морфологически клетки могут выглядеть погибшими, они могут открепляться от поверхности, иметь апоптотические пузырьки по периметру и другие признаки гибели, но по результатам МТТ-теста токсичность может быть низкой. Это может быть связано с особенностями метаболизма НЧ клетками. Например, протеиновые частицы активно поглощаются и экскретируются клетками, что приводит к большому количеству экзосом в среде, что может быть принято за апоптотические тельца. В некоторых случаях, наоборот, митохондрии перестают работать раньше, чем токсические повреждения сказываются на общей морфологии клеток. В любом случае несоответствие морфологической картины и данных МТТ-теста говорит об определенных особенностях токсичности НЧ, которые необходимо проанализировать.

4.8.5. Особенности проведения МТТ-теста

МТТ-тест является колориметрическим тестом, результаты получают с помощью планшетного спектрофотометра. Использование этого метода накладывает ограничения на раствор в лунке: он должен быть истинным, а НЧ не должны давать значительный вклад на длине волны поглощения МТТ реагента. Большинство спектрофотометров работают в линейном диапазоне от 0 до 1, не стоит превышать его для получения надежных результатов.

- Чтобы добиться максимальной воспроизводимости, следует отмывать клетки от НЧ перед добавлением МТТ реагента. Обычно это делают путем трехкратной отмывки PBS. Основная опасность тут заключается в вероятности смыть “полумертвые” клетки и таким образом снизить данные по дыхательной активности.
- Можно не отмывать НЧ, но в этом случае необходимо убедиться, что НЧ не дают значимого вклада в МТТ-тест. При использовании концентрации НЧ порядка 100 мкг/мл и выше вклад будет ощутимый.

- Основной принцип - отмывайте все лунки в одинаковой мере, а не выборочно, в том числе и контрольные лунки.
- Если отмыть клетки от НЧ невозможно в силу любых причин, а их вклад велик, можно попробовать сделать референсные лунки без клеток, но с НЧ в среде, а затем вычестить сигнал от этих лунок из сигнала МТТ тесте. Однако этот метод не очень надежен.
- МТТ реагент может восстанавливаться некоторыми типами НЧ. Если по данным морфологического наблюдения клетки выглядят мертвыми, а по данным МТТ теста дыхательная активность высокая, есть вероятность, что НЧ вносят вклад в оптическую плотность или взаимодействуют с МТТ.
- Если спектрофотометр имеет функцию усреднения по лунке, необходимо её использовать, чтобы исключить влияние крупных агрегатов НЧ на оптическую плотность. Также следует измерять оптическую плотность на длине волны 690 нм для учета вклада клеток и НЧ в рассеяние.

4.8.6. Пример протокола МТТ-теста

МТТ-тест остается одним из наиболее часто используемых методов изучения токсичности наночастиц. В данном подразделе приводится пример протокола МТТ-теста, проводимого в рамках лабораторных работ по дисциплинам, связанных с получением наночастиц для биомедицинских задач (дисциплины в «Нанобиотехнология» и «Синтез и характеристика наночастиц для биомедицины» в магистерской программе «Молекулярная биология и биотехнология» Университета ИТМО). Кроме того, подобный протокол может быть полезен для практикумов и лабораторных работ по смежным направлениям подготовки для студентов естественно-научного профиля.

Для проведения МТТ-теста с одним типом НЧ в 96-луночной планшете потребуется:

- 25 мл полной среды
 - 96-луночный культуральный планшет
 - Автоматические пипетки объемом 1 мл, 200 мкл, 10 мкл, степпер с наконечниками 10 мл и 2.5 мл
 - 10 мг МТТ-реактива
 - 50 мл фосфатно-солевого буфера
 - 20 мл ДМСО
 - 5 мл раствора трипсина-Версена
1. Снять клетки с флакона стандартным образом с помощью раствора трипсина-Версена. Добавить во флакон 2-3 мл раствора и оставить в инкубаторе на 2-5 минут. Проконтролировать открепление клеток на микроскопе. Пипетированием добиться однородности распределения клеток.

2. Смешать клетки в трипсин-Версене с культуральной средой, чтобы общий объем составил 21 мл. С помощью степпера добавить в каждую лунку планшета 200 мкл среды с клетками. Флакон с клеточной суспензией необходимо периодически встряхивать, чтобы клетки были распределены равномерно и не агрегировали. Остаток среды с клетками во флаконе можно оставить для дальнейшего роста и контроля.
3. Планшет поставить в инкубатор на сутки. Некоторые клеточные культуры могут расти медленно, тогда срок инкубирования можно увеличить.
4. На следующий день нужно приготовить раствор наночастиц необходимой концентрации. Для примера приводим определение токсичности коллоидного серебра со средним диаметром наночастиц 20 нм (КС-20). Для коллоидного серебра концентрация по серебру свежеприготовленного раствора составляет 30 мкг [Ag]/мл. Максимальная концентрация в первой лунке составляет 400 мкг [Ag]/мл. Стартовая концентрация выбрана из имеющихся в литературе данных о токсичности коллоидного серебра. При восьми заполненных рядах нам необходимо $8 \times 400 \text{ мкл} = 3.2 \text{ мл}$ среды с концентрацией КС-20 400 мкг/мл. Растворы следует брать с запасом 10%, потому что среда пенится. Таким образом, нам необходимо $3.2 * 1,1 * 400 = 1408 \text{ мкг}$ НЧ, которые содержатся в $1408 / 30 = 46,92 \text{ мл}$ исходного раствора. КС-20 центрифугировать при ускорении 10000 g 15 минут, осадок перерастворить в 3,52 мл среды. Обработать раствор УЗ в течение 1 мин.
5. Забрать среду из первых лунок первого столбца планшета с помощью аспиратора или пипетки. Стараться не касаться дна планшета наконечником.
6. В первые лунки каждого ряда добавить 200 мкл раствора НЧ в среде. Удобно делать это многоканальной пипеткой. Во вторые лунки каждого ряда также добавить по 200 мкл среды с НЧ. Следует делать это аккуратно, поскольку это немного превышает максимальный объем лунки. Пропипетировать второй ряд 3 раза. Пипетировать среду в лунках необходимо аккуратно, стараясь не смыть клетки со дна. Забрать 200 мкл из вторых лунок и перенести в третьи, пипетировать 3 раза и перенести 200 мкл смеси в следующую. Повторить процедуру для всех лунок, кроме последней, которая останется для контроля. Остаток в наконечниках из предпоследней лунки вылить в специальную посуду для слива.
7. Визуально проконтролировать однородность распределения НЧ. Поместить планшет в инкубатор на 24 часа.
8. На следующий день приготовить раствор МТТ 1 мг/мл в фосфатно-солевом буфере комнатной температуры. Общий объем раствора следует готовить из расчета 100 мкл на каждую лунку. Альтернативно, если МТТ не взаимодействует с НЧ, можно приготовить раствор МТТ с концентрацией 5 мг/мл и добавлять по 20 мкл этого раствора к 200 мкл среды в лунке.

9. Отобрать среду со всего планшета. Каждую лунку промыть не менее трех раз фосфатно-солевым буфером комнатной температуры, затем добавить 100 мкл раствора МТТ и поставить в инкубатор с температурой 37°C на один час. В общем случае время инкубирования с МТТ-раствором подбирается эмпирически для каждой клеточной культуры и заполненности монослоя из принципа, что оптическая плотность контроля на длине волны 540 нм не превышает максимальную величину, которую может измерить спектрофотометр, через 24 часа инкубирования. В нашем случае это значение составляет 1,2–1,3.
10. Через 1 час МТТ-раствор отобрать из лунок. В каждой живой клетке образовались кристаллы формазана, которые необходимо растворить. Для этого в каждую лунку необходимо добавить 200 мкл ДМСО. С ДМСО работать в перчатках, стараться не вдыхать, при попадании на кожу смыть водой. Инкубировать с ДМСО 15 минут в инкубаторе. При раскапывании ДМСО стараться не опускать кончик пипетки в лунку, чтобы не захватить часть раствора формазана и не перенести его в стоковый раствор.
11. Измерить оптическая плотность на планшетном спектрофотометре при длинах волн 540 и 690 нм. Планшет предварительно необходимо встряхнуть на шейкере в течение 30 секунд для равномерного растворения формазана.
12. Полученные данные обработать программе Microsoft Excel или аналогичной. Из значений оптической плотности на длине волны 540 нм нужно вычесть значения на длине волны 690 нм. Затем необходимо найти среднее по каждой концентрации (столбцу). После нахождения среднего мы получим 12 значений, 11 из которых – это экспериментальные значения, и 12-е – отрицательный контроль. Затем необходимо пересчитать оптическую плотность в проценты, приняв оптическую плотность контроля за 100% дыхательной активности. Остается только построить график из полученных значений.

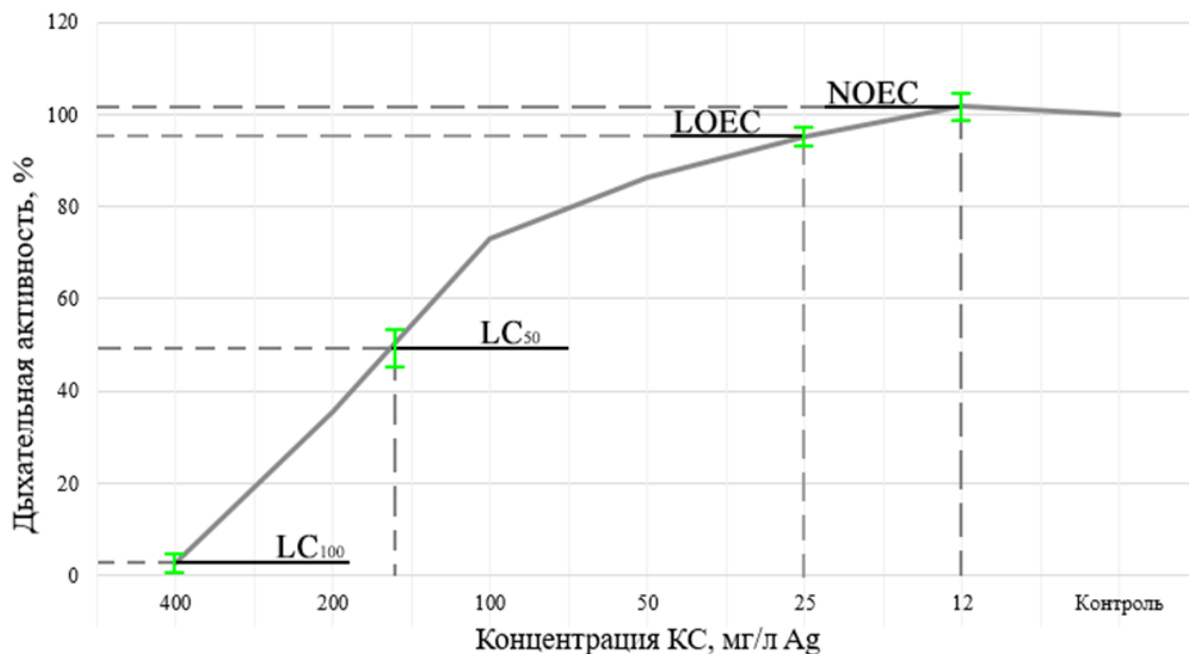


Рисунок 4.1. Дыхательная активность клеток после инкубации с КС-20. На графике отмечены основные токсикометрические характеристики. Зеленым цветом указано стандартное отклонение

То, что определяется в МТТ-тесте, называется по-разному: дыхательной активностью, митохондриальной активностью, активностью клеточных ферментов и т. д. То, что мы называем это жизнеспособностью клеток - лишь наша трактовка полученных данных как исследователя. Фактически это просто оптическая плотность некоего раствора, которую мы ассоциируем с жизнеспособностью клеток. В связи с этим рассчитываются ключевые параметры, среди которых основное значение имеют точки пересечения кривой дозозависимого отклика с уровнями 0% и 50% оптической плотности. Значение 0% соответствует полной цитотоксичности (100% гибели клеток), тогда как 50% оптической плотности указывает на половинное ингибирование клеточной жизнеспособности. Терминологически эту концентрацию можно назвать как LC₁₀₀ (absolute lethal concentration, абсолютная летальная концентрация) или IC₁₀₀ (Full Maximal Inhibitory Concentration, абсолютная ингибирующая концентрация). На практике такой результат встречается крайне редко, поскольку какая-то часть МТТ-реагента восстанавливается внеклеточными ферментами, поэтому дыхательную активность менее 5% можно условно принять за LC₁₀₀. LC₅₀ или IC₅₀ (half maximal lethal concentration или half maximal inhibitory concentration, полуметальная концентрация, концентрация полумаксимального ингибирования) определяется как концентрация, при которой график дыхательной активности пересекает отметку в 50% активности. Это одна из основных токсикометрических характеристик. Стоит, однако, понимать, что при проведении МТТ-теста мы не знаем, что на самом деле произошло с клетками, ведь LC₅₀ может быть достигнута как при гибели 50% клеток, так и при снижении активности всех клеток на 50%.

LOEC (lowest observed effect concentration, наименьшая наблюдаемая эффективная концентрация) – это концентрация, при которой наблюдается минимальное достоверное отклонение дыхательной активности от уровня 100%. NOEC (no observed effect concentration, неэффективная наблюдаемая концентрация) – первое значение, когда значение дыхательной активности становится статистически неотличимым от контроля, обычно следует сразу за LOEC. Небольшое превышение контрольных значений при малых концентрациях токсиканта – типичное явление и называется эффектом гормезиса.

Стоит сделать несколько замечаний по поводу контрольных лунок при исследовании веществ, растворенных в этаноле, ДМСО или других токсичных для клеток веществах. В этом случае в качестве контроля следует сделать разведения растворителя без токсиканта, аналогично разведениям с токсикантом. К примеру, если вещество было растворено в 150 мкл ДМСО, а затем перерастворено в 15 мл полной среды, следует взять 15 мл среды и добавить в неё 150 мкл ДМСО без токсиканта, а затем титровать аналогичным образом. При расчете процентного снижения дыхательной активности за 100% дыхательную активность (контроль) брать соответствующее разведение растворителя.

Вопросы для самоконтроля

1. Какие параметры клеточной культуры наиболее критичны для воспроизводимости?
2. Что считается адекватными контролями в экспериментах с наноматериалами?
3. Какие особенности имеют биологические жидкости при взаимодействии с наночастицами?
4. Как правильно оформлять экспериментальный протокол?
5. Какие дозировки наноматериалов считаются обоснованными для *in vitro* экспериментов?
6. Какие методы визуализации применяются для изучения наноматериалов в клетках?
7. Как обрабатываются данные по взаимодействию наночастиц с клетками?
8. В чем особенности проведения МТТ-теста с наночастицами?
9. Как правильно подготовить клетки и наночастицы к проведению МТТ-теста?
10. Что включает в себя примерный протокол проведения МТТ-теста и его ключевые этапы?

Список литературы

1. Akbar N. и др. Zinc oxide nanoparticles conjugated with clinically-approved medicines as potential antibacterial molecules // *AMB Express*. 2021. Т. 11. № 1.
2. Banerjee A. и др. Development of Nanomedicine from Copper Mine Tailing Waste: A Pavement towards Circular Economy with Advanced Redox Nanotechnology // *Catalysts*. 2023. Т. 13. № 2.
3. Bangham A. D., Horne R. W. Action of saponin on biological cell membranes // *Nature*. 1962. Т. 196. № 4858. С. 952–953.
4. Bastús N. G. и др. Synthesis of highly monodisperse citrate-stabilized silver nanoparticles of up to 200 nm: Kinetic control and catalytic properties // *Chem. Mater.* 2014. Т. 26. № 9. С. 2836–2846.
5. Carmona F. J. и др. The role of nanoparticle structure and morphology in the dissolution kinetics and nutrient release of nitrate-doped calcium phosphate nanofertilizers // *Sci. Rep.* 2020. Т. 10. № 1.
6. Drozdov A. S. и др. A universal magnetic ferrofluid: Nanomagnetite stable hydrosol with no added dispersants and at neutral pH // *J. Colloid Interface Sci.* 2016. Т. 468. С. 307–312.
7. Eker F. и др. A Comprehensive Review of Nanoparticles: From Classification to Application and Toxicity // *Molecules*. 2024. Т. 29. № 15.
8. Faria M. и др. Minimum information reporting in bio–nano experimental literature // *Nat. Nanotechnol.* 2018. Т. 13. № 9. С. 777–785.
9. Joyce P. и др. A translational framework to DELIVER nanomedicines to the clinic // *Nat. Nanotechnol.* 2024.
10. Langer R. A personal account of translating discoveries in an academic lab // *Nat. Biotechnol.* 2013. Т. 31. № 6. С. 487–489.
11. Malik S., Muhammad K., Waheed Y. Nanotechnology: A Revolution in Modern Industry // *Molecules*. 2023. Т. 28. № 2.
12. Mohamad S. N. S. и др. Synthesis of alumina nanoparticles by sol-gel method and their applications in the removal of copper ions (Cu²⁺) from the solution // *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.* 2019. Т. 701. № 1.
13. Park K. The beginning of the end of the nanomedicine hype // *J. Control. Release*. 2019. Т. 305. С. 221–222.
14. Sofias A. M., Lammers T. Multidrug nanomedicine // *Nat. Nanotechnol.* 2023. Т. 18. № 2. С. 104–106.
15. Swain J. и др. Fundamentals and Analytical Techniques for Biological Applications of Nanomaterials // *Biol. Appl. Nanoparticles*. 2023. С. 1–22.
16. Wong Y. J. и др. Revisiting the Stöber method: Inhomogeneity in silica shells // *J. Am. Chem. Soc.* 2011. Т. 133. № 30. С. 11422–11425.
17. Yang J., Mei S., Ferreira J. M. F. Hydrothermal synthesis of TiO₂ nanoparticles from tetraalkylammonium hydroxide peptized sols // *Mater. Sci. Eng. C*. 2001. Т. 15. № 1–2. С. 183–185.

18. Д. А. Курдюков, Д. А. Еуров, А. В. Медведев, Д. А. Кириленко, М. В. Томкович, С. В. Шмаков, В. Г. Голубев, “Мультипористые наночастицы кремнезема с углеродными наноточками: синтез, оптоэлектронные и биомедицинские применения”, *Физика твердого тела*, 63:10 (2021), 1680–1686; *Phys. Solid State*, 63:11 (2021), 1704–1710

19. Высвобождение ТРИТЦ-декстрана из композитных микрокапсул под воздействием низкочастотного переменного магнитного поля / А. В. Михеев, И. А. Бурмистров, В. Б. Зайцев [и др.] // *Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования*. – 2022. – № 1. – С. 10-17.

20. Липенгольц А.А., Скрибицкий В.А., Финогенова Ю.А., Шуляк А.Т., Абакумов М.А., Быков А.Ю., Григорьева Е.Ю., Смирнова А.В., Шпакова К.Е., Жижин К.Ю. Комплексы гафния как дозоповышающие агенты для фотонозахватной терапии и контрастные агенты для радиологии // *Биофизика*. - 2024. - Т. 69. - №1. - С. 173-182.

Список рекомендуемой литературы

1. Будкевич, Е. В. Биомедицинские нанотехнологии : Учебное пособие для вузов / Е. В. Будкевич, Р. О. Будкевич. — 3-е изд., стер. — Санкт-Петербург : Лань, 2022. — 176 с.
2. Гусев А. И. Наноматериалы, наноструктуры и нанотехнологии. — 6-е изд., испр. и доп. — М.: Физматлит, 2020. — 704 с.
3. Elsaesser A., Howard C. V. Toxicology of nanoparticles // *Advanced Drug Delivery Reviews*. — 2012. — Vol. 64, no. 2. — P. 129–137.
4. Varenholz Y. Doxil® — the first FDA-approved nano-drug: lessons learned // *Journal of Controlled Release*. — 2012. — Vol. 160, no. 2. — P. 117–134.
5. ГОСТ ISO 10993-1-2019. Изделия медицинские. Оценка биологического воздействия. Часть 1. Оценивание и испытания в рамках процесса управления риском. — Введ. 2021-03-01. — М.: Стандартиформ, 2019. — 32 с.
6. ISO/TR 13014:2012. Nanotechnologies — Guidance on physicochemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment. — Geneva: ISO, 2012. — 50 p.

Кладько Даниил Валериевич
Фальчевская Александра Сергеевна
Прилепский Артур Юрьевич

**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ДЛЯ
СТАНДАРТИЗАЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТОВ В
БИОНАНОТЕХНОЛОГИЯХ**

Учебно-методическое пособие

В авторской редакции

Редакционно-издательский отдел Университета ИТМО

Зав. РИО

Н.Ф. Гусарова

Подписано к печати

Заказ №

Тираж

Отпечатано на ризографе

Редакционно-издательский отдел
Университета ИТМО
197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49, литер А