

ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ И ГЕМОСОВМЕСТИМОСТЬ PLGA НАНОЧАСТИЦ, НАГРУЖЕННЫХ ДОКСОРУБИЦИНОМ

Ю.А. Малиновская^{1,3,4}, Е.И. Коваленко², Т.С. Ковшова^{1,3,4}, Н.С. Осипова^{1,4}, О.О. Максименко^{1,4},
В.Ю. Балабаньян³, В.А. Разживина¹, М.В. Гречихина², А.А. Бойко², С.Э. Гельперина^{1,4}

¹ООО «Технология лекарств»; Россия, 141400 Химки, ул. Рабочая, 2а;

²ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН»;
Россия, 117997 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова; Россия, 119991 Москва, Ленинские Горы, 1;

⁴Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева; Россия, 125047 Москва, Миусская площадь, 9

Контакты: Юлия Александровна Малиновская j.malinovskaya@gmail.com

Введение. Использование полимерных биodeградируемых наночастиц (НЧ) в качестве средств доставки лекарственных веществ является перспективным способом преодоления гистогематических барьеров. Так, НЧ из сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA), модифицированные полиоксамером 188, способны преодолевать гематоэнцефалический барьер и доставлять лекарственные вещества, в частности доксорубин, в интракраниальную опухоль при внутривенном введении. На этапе доклинических исследований было важно оценить возможное токсическое действие НЧ на компоненты крови.

Цель исследования — оценка цитотоксичности и гемосовместимости PLGA НЧ, нагруженных доксорубицином (Dox-PLGA НЧ), изучение кинетики захвата наночастиц клетками глиобластомы человека.

Материалы и методы. Для изучения влияния НЧ на свертывающую систему крови определяли протромбиновое время до и после инкубации плазмы с НЧ. Уровень активации тромбоцитов определяли на проточном цитофлуориметре по уровню экспрессии Р-селектина. Гемолитическую активность НЧ определяли спектрофотометрически по концентрации высвободившегося гемоглобина. Цитотоксичность НЧ оценивали с помощью MTS-теста. Захват НЧ клетками изучали с помощью проточного цитофлуориметра.

Результаты. Dox-PLGA НЧ не оказывали влияния на время коагуляции плазмы крови и активность тромбоцитов в диапазоне концентраций 0,1–100 мкг/мл: показатель протромбинового времени составил 12–15 с для всех тестируемых образцов и уровень экспрессии Р-селектина не превысил 15 %. НЧ не вызывали гемолиз после 3 ч инкубации с образцами крови. Цитотоксический эффект Dox-PLGA НЧ на клетки глиобластомы U87MG был сравним с действием субстанции доксорубина. Результаты проточной цитометрии показали, что НЧ активно захватываются клетками.

Заключение. Проведенное исследование подтвердило гемосовместимость Dox-PLGA НЧ: НЧ не оказывали влияния на свертывающую систему крови и не вызывали гемолиз в исследуемом диапазоне концентраций. НЧ активно захватывались клетками глиобластомы и оказывали выраженный цитотоксический эффект.

Ключевые слова: PLGA наночастицы, биосовместимость, гемосовместимость, цитотоксичность, интернализация

DOI: 10.17650/1726-9784-2019-19-1-71-80



CYTOTOXICITY AND HEMOCOMPATIBILITY OF DOXORUBICIN-LOADED PLGA NANOPARTICLES

Yu.A. Malinovskaya^{1,3,4}, E.I. Kovalenko², T.S. Kovshova^{1,3,4}, N.S. Osipova^{1,4}, O.O. Maksimenko^{1,4},
V.Yu. Balabanyan³, V.A. Razzhivina¹, M.V. Grechikhina², A.A. Boiko², S.E. Gelperina^{1,4}

¹Drug Technology LLC; 2a Rabochaya St., Khimki 141400, Russia;

²Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry; 16/10 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117997, Russia;

³M. V. Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia;

⁴D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia; 9 Miusskaya ploshchad', Moscow 125047, Russia

Introduction. The use of polymeric biodegradable nanoparticles (NP) as drug delivery systems is a promising approach to overcome histohematomatic barriers. Thus, poloxamer 188-coated poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) NP are able to overcome blood-brain barrier and to deliver therapeutic agents, in particular doxorubicin, into intracranial tumour upon intravenous administration. It is important to evaluate NP interaction with blood components in preclinical studies.

The objective of the study was to investigate cytotoxicity and hemocompatibility of doxorubicin-loaded PLGA NP (Dox-PLGA NP), to assess NP uptake by glioblastoma cells.

Materials and methods. The influence of NP on coagulation cascade was evaluated by prothrombin time measuring before and after plasma incubation with NP. To assess NP thrombogenicity the platelet activation level was determined by flow cytometry. The NP hemolytic activity (released hemoglobin concentration) was measured spectrophotometrically. NP cytotoxicity was determined by MTS assay. NP uptake by human glioblastoma cells was evaluated by flow cytometry.

Results. Dox-PLGA NP did not influence blood coagulation time and thrombocyte activity at concentrations up to 100 mcg/mL: PT values were 12–15 s for all tested samples, and P-selectin expression level did not exceed 15 %. All samples were not hemolytic after 3 h of incubation.

Cytotoxicity of doxorubicin released from PLGA NP on glioma U87MG cells was comparable to that of free doxorubicin. As shown by flow cytometry Dox-PLGA NP were efficiently internalized into the cells.

Conclusion. The study of hemocompatibility confirmed the safety of Dox-PLGA NP: NP did not influence blood coagulation system and did not induce hemolysis. NP were efficiently internalized into the human glioblastoma cells and produced considerable antitumor effect in vitro.

Key words: PLGA nanoparticles, biocompatibility, hemocompatibility, cytotoxicity, internalization

Введение

Важными задачами современной фармакологии являются разработка систем направленной доставки противоопухолевых лекарственных веществ (ЛВ) и снижение системной токсичности в терапии злокачественных новообразований. В настоящее время на рынке существует более 40 препаратов на основе коллоидных систем доставки, одобренных системой контроля качества пищевых продуктов и лекарственных средств США (FDA), и сотни нанотехнологических препаратов находятся на стадии разработки. В состав противоопухолевых наносомальных препаратов (наночастиц (НЧ), липосом) вводят как цитотоксические ЛВ, так и малые интерферирующие РНК (siРНК) и лизаты опухолевых клеток [1–4]. Одним из наиболее перспективных направлений в этой области является использование НЧ на основе сополимера молочной и гликолевой кислот (PLGA) [5–17]. Благодаря способности разлагаться в живом организме без образования токсичных продуктов полилактиды широко применяются в хирургии, ортопедии и стоматологии, а также в качестве полимеров-носителей для инъекционных лекарственных форм длительного действия (депо-форм), представляющих собой микросферы размером 50–150 мкм с включенным в них ЛВ [5–7].

Помимо биосовместимости, к полилактидам как к материалам, предназначенным для контакта с кровью, предъявляется еще и требование гемосовместимости, что подразумевает отсутствие отрицательного воздействия на кровь или ее компоненты. Гемосовместимый материал не должен провоцировать образование тромбов и тромбоэмболии, активировать свертывающую, фибринолитическую системы и систему комплемента, оказывать отрицательное действие на белковые и форменные элементы крови, нарушать электролитный баланс крови [18].

В то же время гемосовместимость наночастиц PLA/PLGA изучена недостаточно, данные часто противоречивы, что объясняется разнообразием свойств полилактидов и других ингредиентов, применяемых для получения НЧ [19, 20]. Так, в работах С. Fornaguera и соавт., S. Rahimian и соавт., N. Desai показано, что особенности взаимодействия НЧ с биологической

средой зависят от их физико-химических параметров, таких как гидрофобность, поверхностный заряд и размер [19, 21–23].

На этапе доклинических исследований важно оценить возможное токсическое действие НЧ на компоненты крови. Противоопухолевая активность НЧ, нагруженных цитостатическим ЛВ, зависит от способности НЧ захватываться клетками и высвобождать ЛВ в активной форме. Поэтому важно изучить цитотоксичность разрабатываемых НЧ в отношении опухолевых клеток и сравнить эффект со свободным ЛВ и плацебо-НЧ.

Необходимо отметить, что при переносе технологии получения наносомальной формы с лабораторного уровня на стадию клинических исследований часто лимитирующим фактором является отсутствие первичных систематических исследований по взаимодействию НЧ с биологическими компонентами, изучению биосовместимости и цитотоксичности НЧ.

Как показали проведенные ранее исследования, модификация поверхности НЧ PLGA полоксамером 188 позволяет им преодолевать гематоэнцефалический барьер и проникать в мозг.

Наноразмерная форма доксорубина на основе модифицированных НЧ (Dox-PLGA НЧ) проявила высокую противоопухолевую активность в отношении экспериментальной интракраниальной опухоли и весьма перспективна для клинического использования [24, 25]. В связи с этим помимо влияния на свертывающую систему крови, выявления возможных тромбогенных свойств и оценки гемолитической активности важно оценить цитотоксические свойства Dox-PLGA НЧ и их захват потенциальными клетками-мишенями (клетки глиомы человека U87MG).

Цель исследования — оценка цитотоксичности и гемосовместимости PLGA НЧ, Dox-PLGA НЧ, изучение кинетики захвата НЧ клетками глиобластомы человека.

Материалы и методы

Получение Dox-PLGA НЧ. Для получения НЧ использовали PLGA марки Resomer® 502H с соотношением мономеров молочной и гликолевой кислот 50 : 50 (ММ 7–17 кДа, Evonik Röhm GmbH, Германия).

НЧ получали методом двойных эмульсий (в/м/в). Доксорубин (25 мг, Teva, Sicor, Италия) растворяли в 0,001 н. соляной кислоте (4 мл) и смешивали с раствором PLGA (250 мг) в дихлорметане (6 мл). Смесь гомогенизировали с помощью диспергатора Ultra-Turrax T18 Basic (IKA, Германия) при 23 600 об/мин в течение 3 мин. Полученную первичную эмульсию (в/м) добавляли к 1 % раствору поливинилового спирта (9–10 кДа, Sigma, Германия) в фосфатном буфере (PBS, pH 7,4) и гомогенизировали сначала с помощью Ultra-Turrax T18, а затем с помощью гомогенизатора высокого давления (Panda Plus 2000, Италия) при 1000 бар. Органический растворитель удаляли под вакуумом; полученную суспензию лиофильно высушивали (Alpha 2–4 LSC, Martin Christ GmbH, Германия). В качестве криопротектора использовали маннит. Для получения PLGA-плацебо НЧ использовали аналогичную методику; при этом органическую фазу (раствор PLGA в дихлорметане) непосредственно добавляли к 1 % водному раствору поливинилового спирта. Для модификации поверхности НЧ поллоксамером 188 (P188, BASF, Германия) непосредственно перед экспериментами лиофилизированные НЧ ресуспендировали в 1 % растворе поллоксамера и инкубировали в течение 30 мин.

Получение флуоресцентно-меченных НЧ. Для визуализации *in vitro* использовали PLGA НЧ, меченные флуоресцентными красителями DiI и Cy5.5 (PLGA-Cy5.5 и PLGA-DiI НЧ соответственно). Для получения PLGA-Cy5.5 НЧ использовали конъюгат PLGA с цианиновым флуоресцентным красителем Cy5.5 (Cyamine5.5 amine, Lumiprobe, Германия). Соотношение краситель : полимер = 1 : 600 (в/в). Краситель конъюгировали с концевыми карбоксильными группами PLGA, активированными 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимидом (Sigma, США). Для получения PLGA-DiI НЧ липофильный флуоресцентный краситель DiI (Sigma Life Science, США) вводили в состав органической фазы на стадии получения первичной эмульсии. Соотношение краситель : полимер = 1 : 750 (в/в). Свободный DiI отделяли от НЧ с помощью геля фильтрационной хроматографии на колонке с Sephadex G-25.

Определение физико-химических параметров наночастиц

Размеры НЧ (средний гидродинамический радиус), индекс полидисперсности (PDI) и ζ -потенциалы определяли с помощью Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). Общее содержание доксорубина и флуоресцентных красителей Cy5.5 и DiI определяли спектрофотометрически после растворения НЧ в диметилсульфоксиде при длинах волн 480, 650 и 555 нм соответственно. Концентрацию свободного доксорубина и флуоресцентных красителей

в суспензии НЧ определяли спектрофотометрически в супернатантах, полученных после отделения НЧ ультрацентрифугированием (фильтры Microcon 30 kDa, Millipore, США; центрифуга Eppendorf Centrifuge 5415 R, Германия). Степень включения доксорубина в НЧ рассчитывали как отношение (%) свободного доксорубина к его общему содержанию в образце.

Исследование кинетики высвобождения доксорубина из наночастиц

Скорость высвобождения доксорубина из НЧ изучали в фосфатном буфере (PBS) при pH 7,4 и 4,5. НЧ ресуспендировали в PBS и помещали в шейкер-инкубатор (200 об/мин, 37 °C). Пробы отбирали через 0, 1, 2, 3, 4, 6 и 24 ч, НЧ отделяли центрифугированием (48300 g, 30 мин). Концентрацию доксорубина в супернатантах определяли спектрофотометрически ($\lambda_{\max} = 480$ нм). Для каждого образца проводили по 3 параллельных измерения.

Клеточные линии

В исследовании использовали культуры клеток глиобластомы человека (U87MG), гепатокарциномы человека (HepG2) и иммортализованные клетки почечного эпителия свиньи (LLC-PK). Культуры клеток получены из Американского банка клеточных культур (ATCC, США). Клетки культивировали на ростовой среде (DMEM, Gibco) с добавлением смеси антибиотиков (100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, Gibco, США), GlutaMAX (2 мМ, Gibco, США) и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (Biowest, США) в стандартных условиях при температуре 37 °C во влажной атмосфере с 5 % CO₂.

Оценка цитотоксического действия наночастиц

Цитотоксическое действие Dox-PLGA НЧ оценивали на клеточных линиях U87MG, HepG2 и LLC-PK с помощью колориметрического MTS-теста. Для сравнения использовали ненагруженные НЧ (PLGA-плацебо НЧ) и свободный доксорубин. MTS-тест выполняли согласно стандартному протоколу с модификациями (Protocol TB245, Promega). В работе использовали CellTiter 96 AQ_{ueous} One Solution Reagent (PROMEGA, США). Клетки высаживали в 96-луночные культуральные планшеты (по 4 тыс. клеток в 100 мкл ростовой среды (DMEM с добавлением 10 % телячьей эмбриональной сыворотки)). В части лунок ростовую среду заменяли на питательную среду с образцами Dox-PLGA, PLGA-плацебо НЧ и доксорубина в диапазоне концентраций 1–500 мкг/мл НЧ, что соответствует 0,004–67 мкг/мл в пересчете на доксорубин. Через 24 ч культивирования определяли количество жизнеспособных клеток с помощью MTS-теста.

Определение гемосовместимости

Образцы крови получали минимум от 3 доноров, не принимавших в течение 2 нед лекарственных средств, способных повлиять на результаты эксперимента. Для исследования протромбинового времени (ПВ) и реакции активации тромбоцитов кровь отбирали в пробирки с цитратом натрия, для тестирования гемолитической активности — в пробирки с литий-гепарином.

Для определения ПВ использовали бедную тромбоцитами плазму крови, полученную центрифугированием крови при 3000 об/мин (1500 g). Исследуемую плазму инкубировали в течение 30 мин с НЧ (PLGA-плацебо и Dox-PLGA) в концентрациях 1, 10, 100 мкг/мл. Для того чтобы исключить влияние времени инкубации на величину ПВ, использовали 2 контроля: ПВ определяли для плазмы крови непосредственно после центрифугирования и через 30 мин (время инкубации плазмы крови с НЧ).

Для определения активации тромбоцитов использовали плазму, обогащенную тромбоцитами (Platelet-rich plasma, PRP). Кровь в пробирке с этилендиаминтетрауксусной кислотой центрифугировали (1000 об/мин, 10 мин), затем отбирали белый ободок на границе форменных элементов и плазмы. Плазму (PRP) разбавляли в 20 раз PBS и инкубировали в CO₂-инкубаторе в течение 1 ч с Dox-PLGA и PLGA-плацебо НЧ в концентрациях 0,1; 1,0; 10; 100 мкг/мл. В качестве положительного контроля плазму инкубировали с индуктором агрегации тромбоцитов аденозиндифосфатом (10 мкг/мл, 1 : 125); в качестве отрицательного контроля использовали PRP. Образцы фиксировали 1 % параформальдегидом и инкубировали с моноклональными антителами CD34, конъюгированными с FITC (Сорбент, Россия), и антителами к Р-селектину (CD62P), конъюгированными с PE (BioLegend, США), в течение 15 мин при комнатной температуре. Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре MoFlo XDP (Beckman Coulter, США). CD34 использовали для выделения популяции тромбоцитов, а CD62P (P-selectin) — для идентификации активированных тромбоцитов. Уровень активации тромбоцитов определяли как долю CD62P-положительных тромбоцитов (%).

Для оценки гемолитической активности НЧ использовали фотометрический тест, основанный на детекции окисленных форм гемоглобина. Цельную кровь разбавляли в 25 раз PBS и центрифугировали при 800 g (15 мин); супернатант отбирали и использовали для определения свободного гемоглобина плазмы. Образцы крови инкубировали с PLGA-плацебо и Dox-PLGA НЧ в концентрации 1, 10, 100 мкг/мл в течение 3 ч при 37 °С. Для определения общего гемоглобина (tHb) в отдельный образец крови добавляли 1 % Triton X-100, вызывающий гемолиз (поло-

жительный контроль). После инкубации неповрежденные эритроциты отделяли центрифугированием. Супернатанты переносили в 96-луночные планшеты. Для индукции образования гемихромов в экспериментальные образцы добавляли додецилсульфат натрия. Количество гемоглобина в образце определяли, оценивая оптическую плотность раствора при 540 нм. Процент гемолиза рассчитывали как отношение оптической плотности образца к оптической плотности контроля.

Изучение интернализации наночастиц методом проточной цитометрии

Клетки U87MG высаживали в 48-луночные культуральные планшеты. Dox-PLGA НЧ, меченные DiI или Cy5.5, ресуспендировали в 1 % растворе полоксамера, инкубировали в течение 30 мин, затем переносили в культуральную среду (DMEM), содержащую 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, и вносили в лунки культурального планшета в концентрации 40 мкг/мл. Клетки инкубировали с НЧ в течение 5, 15, 30, 60, 120, 240 и 300 мин. После инкубации среду удаляли. Клетки промывали PBS для удаления НЧ, связанных с мембраной клетки, затем снимали с подложки с помощью раствора трипсина и этилендиаминтетрауксусной кислоты 0,25 %, центрифугировали (1000 об/мин, 5 мин) и ресуспендировали в питательной среде до конечной концентрации 5×10^5 клеток/мл. Флуоресценцию клеток анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии на клеточном сортере MoFlo XDP (Beckman Coulter, США). Обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Summit V5.2.0.7477. Эффективность интернализации оценивали как процент клеток, интернализовавших НЧ. Для возбуждения флуоресценции DiI применяли лазер с длиной волны 561 нм; эмиссионные светофильтры: 580/23 нм (FL12-Dil) и 625/26 нм (FL13-Dil). Для возбуждения флуоресценции Cy5.5 использовали лазер 488 нм, эмиссионные светофильтры: 670/30 нм (FL4-PE-Cy5) и 725/40 нм (FL5-PE-Cy5).

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов проводили с использованием t-критерия Стьюдента (Microsoft Excel 2010) и программы GraphPad Prism 6. Используемый статистический уровень значимости — $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Все полученные НЧ имели диаметр < 200 нм, узкое распределение по размерам (PDI $< 0,2$) и отрицательный ξ -потенциал поверхности (табл. 1). Для визуализации НЧ в экспериментах *in vitro* PLGA предварительно конъюгировали с индоцианиновым флуоресцентным красителем Cy5.5. Образование

Таблица 1. Физико-химические характеристики наночастиц (среднее значение \pm SD; $n = 3$)Tabl. 1. Physicochemical parameters of nanoparticles (mean value \pm SD; $n = 3$)

Образец наночастиц Nanoparticles sample	Концентрация активного вещества/ флуоресцентного красителя, мкг/мл Concentration of active substance/fluorescent dye, $\mu\text{g/ml}$	Средний размер, нм Mean size, nm	Индекс полидисперсности Polydispersity index	ξ -потенциал, мВ ξ -potential, mV
Dox-PLGA	Dox: 70,5	120 ± 1	$0,104 \pm 0,011$	$-11,6 \pm 0,8$
Dox-PLGA-Cy5.5	Dox: 67 Cy5: ~1,5	114 ± 1	$0,196 \pm 0,008$	$-14,9 \pm 0,2$
PLGA-DiI	DiI: 1,56	143 ± 2	$0,138 \pm 0,011$	$-30,8 \pm 1,3$

конъюгата подтверждали методом гелепроникающей хроматографии. Максимумы поглощения и флуоресценции Cy5.5 лежат в дальней красной области, поэтому введение этой флуоресцентной метки позволило дифференцировать меченые НЧ (Cy5.5 $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 690/712$ нм) и доксорубицин ($\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 480/570$ нм).

Исследование кинетики высвобождения доксорубицина из наночастиц

Влияние pH среды на скорость высвобождения доксорубицина из НЧ изучали в фосфатном буфере при 2 значениях pH: 4,5 и 7,4. Данные значения pH были выбраны для моделирования профиля высвобождения доксорубицина из НЧ в экстрацеллюлярном матриксе со значением pH, близким к 7,4, и органеллах клетки, внутри которых поддерживается кислая реакция среды (поздние эндосомы и лизосомы, pH 4,0–5,5) [26–28]. На рис. 1 видно, что кинетика высвобождения доксорубицина из НЧ имеет двухфазный профиль. Высокая скорость высвобождения доксорубицина в I фазе эксперимента (так называемый burst release) характерна для полимерных наносомальных форм и обусловлена диффузией ЛВ с поверхности НЧ [5]. В течение первых 2 ч высвобождается примерно 30 % доксорубицина. В дальнейшем наблюдается медленное контролируемое высвобождение: так, в течение 24 ч высвобождается 60–70 % доксорубицина. В кислой среде скорость его высвобождения выше: при pH 7,4 за 6 ч высвобождается около 40 % доксорубицина, в то время как при pH 4,5 высвобождается 70 % доксорубицина. Высокая скорость высвобождения доксорубицина при кислых значениях pH коррелирует с данными, полученными другими авторами [29].

Оценка цитотоксического действия наночастиц

Цитотоксический эффект PLGA-плацебо НЧ оценивали на клеточных линиях HepG2, LLC-PK и U87MG. Культуры клеток LLC-PK и HepG2 часто используют как *in vitro* модели для оценки нефротоксического и гепатотоксического действия лекар-

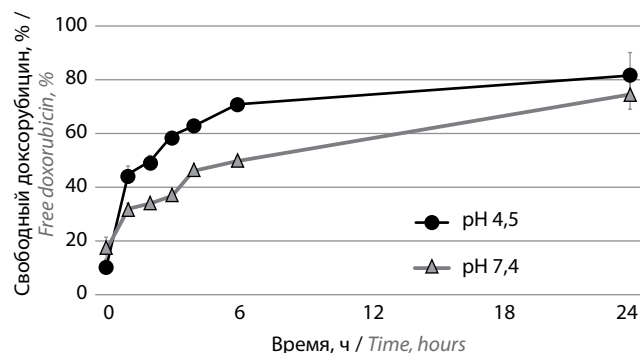


Рис. 1. Кинетика высвобождения доксорубицина из PLGA наночастиц, нагруженных доксорубицином, в PBS при pH 4,5 и 7,4 (25-кратное разведение; среднее значение \pm SD; $n = 3$; $p = 0,95$)

Fig. 1. Kinetics of doxorubicin release from Dox-PLGA nanoparticles (release medium PBS pH 4.5 and 7.4; 25-fold dilution; mean value \pm SD; $n = 3$; $p = 0.95$)

ственных средств [30, 31]. Цитотоксический эффект Dox-PLGA НЧ в отношении опухолевых клеток оценивали на культурах клеток U87MG и HepG2. U87MG — хорошо изученная и часто используемая клеточная линия глиобластомы человека IV степени злокачественности. Показано, что данные клетки характеризуются средней чувствительностью к доксорубину по сравнению с другими клеточными линиями глиобластомы [32, 33]. Результаты MTS-теста после 24 ч инкубации подтвердили отсутствие цитотоксического действия PLGA-плацебо НЧ в исследуемом диапазоне концентраций (рис. 2). При инкубации клеток U87MG и HepG2 как с субстанцией, так и с наносомальной формой доксорубицина наблюдалось достоверное снижение жизнеспособности клеток во всем диапазоне концентраций (рис. 3, 4). При этом цитотоксический эффект доксорубицина, высвободившегося из НЧ, был сравним с действием субстанции доксорубицина.

Определение гемосовместимости

Оценка влияния НЧ на свертывающую систему крови. Характер и особенность взаимодействия НЧ

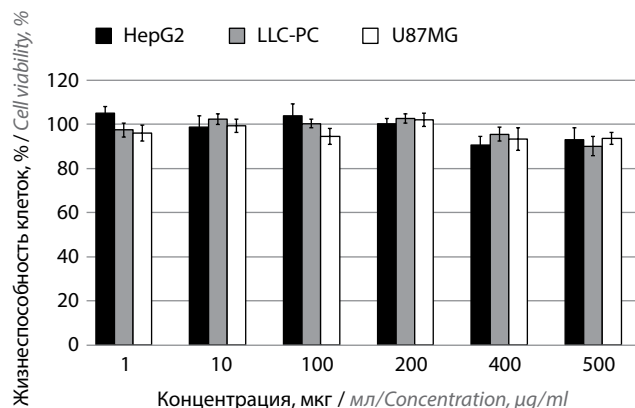


Рис. 2. Анализ жизнеспособности клеток U87MG, HepG2 и LLC-PC после 24 ч инкубации с PLGA-плацебо наночастиц (MTS-тест; среднее значение \pm SD; $n = 3$)

Fig. 2. Viability of U87MG, u LLC-PC cells after 24 h of incubation with PLGA-Placebo NPs (MTS assay; mean \pm SD; $n = 3$)

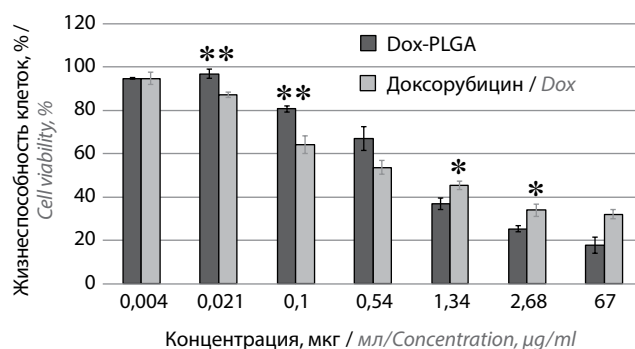


Рис. 3. Анализ жизнеспособности клеток U87MG после 24 ч инкубации с PLGA наночастиц, нагруженных доксорубицином, и свободным доксорубицином. Концентрация в пересчете на доксорубин (среднее значение \pm SD; $n = 4$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Fig. 3. Cell viability assay (MTS-assay) for U87MG cells after 24 h of incubation with different concentrations of Dox-PLGA NPs and doxorubicin in solution (mean \pm SD; $n = 4$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Concentrations are indicated corresponding to free doxorubicin

с компонентами крови определяется их составом и физико-химическими параметрами (размером, зарядом, формой, поверхностной модификацией) [26, 34–37]. В настоящем исследовании тромбогенные свойства НЧ оценивали по их влиянию на уровень активации тромбоцитов и время свертывания крови после ее инкубации с НЧ.

Определение ПВ. Для оценки возможного влияния наносомальной формы доксорубина на время коагуляции плазмы крови человека использовали стандартный тест определения ПВ.

Как видно из табл. 2, НЧ в исследуемом диапазоне концентраций не оказывают влияния на время коагуляции плазмы. Показатель ПВ находится в пределах стандартных значений и статистически не отличается от значения для контрольных образцов. В норме показатель ПВ составляет 11–15 с (100 % активность всех факторов протромбинового комплек-

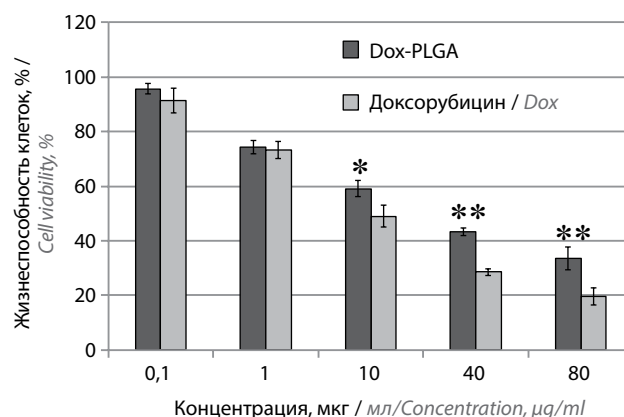


Рис. 4. Анализ жизнеспособности клеток HepG2 после 24 ч инкубации с PLGA наночастиц, нагруженных доксорубицином, и свободным доксорубицином (среднее значение \pm SD; $n = 3$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Концентрация в пересчете на доксорубин

Fig. 4. Cell viability assay (MTS-assay) for HepG2 cells after 24 h of incubation with Dox-PLGA NPs and doxorubicin in solution (mean \pm SD; $n = 3$); * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Concentrations are indicated corresponding to free doxorubicin

са), при этом физиологически значимый показатель имеет увеличение ПВ в 2 раза по сравнению с контрольной плазмой [26]. Полученные данные совпадают с большинством исследований, подтверждающих безопасность PLGA НЧ [6, 19, 35, 38].

Таблица 2. Время коагуляции плазмы крови (протромбиновое время) после инкубации с наночастицами. Контроли 1 и 2 – время коагуляции плазмы крови сразу и через 30 мин после забора (среднее значение \pm SD; $n = 3$)

Table 2. Prothrombin time after plasma incubation with nanoparticles. Controls 1 and 2 – PT of blood samples immediately and 30 min after withdrawal, respectively (mean value \pm SD; $n = 3$)

Образец Sample	Концентрация наночастиц, мкг/мл Nanoparticles concentration, µg/ml	Протромбиновое время, с Protrombin time, sec
Контроль 1 Control 1	—	14,85
Контроль 2 Control 2	—	14,95
PLGA-пла- цебо PLGA-Placebo	1	14,15
	10	14,55
	100	14,90
PLGA-доксо- рубин PLGA-Dox	1	14,65
	10	14,20
	100	15,20

Определение активации тромбоцитов. Определение активации тромбоцитов после контакта плазмы крови с НЧ является еще одним параметром оценки

гемосовместимости НЧ [35]. Тромбоциты представляют собой клеточные компоненты коагуляционной системы, их активация является важнейшим фактором в запуске и регуляции гемостаза [39, 40].

В табл. 3 показана доля (%) активированных тромбоцитов для PLGA-плацебо НЧ и Dox-PLGA НЧ. Добавление индуктора активации тромбоцитов (аденозиндифосфат) значительно увеличило экспрессию Р-селектина — основного компонента, обеспечивающего агрегацию [41, 42], и, соответственно, активацию тромбоцитов (положительный контроль). Количество клеток, экспрессирующих Р-селектин в отсутствие активации, составило не более 10 %, в то время как в положительном контроле данный показатель составлял 65–70 %, что подтверждает избирательную экспрессию Р-селектина только активированными тромбоцитами. Dox-PLGA НЧ в диапазоне концентраций 1–10 мкг/мл не оказывали значитель-

ного влияния на уровень экспрессии Р-селектина относительно отрицательного контроля (PRP). При концентрации НЧ 100 мкг/мл наблюдалась незначительная активация тромбоцитов (~7 % относительно контроля). Интересно, что такая же тенденция отмечалась и для пустых PLGA-плацебо НЧ. Полученные результаты коррелируют с данными других авторов, изучавших биосовместимость полилактидных наночастиц [19, 39, 41].

Оценка гемолиза. Тест определения гемолиза — это один из наиболее часто применяемых тестов для определения биосовместимости внутривенно введенных материалов с компонентами крови, характеризующийся наибольшей корреляцией с результатами экспериментов *in vivo* [40]. Параметром, определяющим гемолитическую активность НЧ, является их способность взаимодействовать с мембраной эритроцитов, изменять ее проницаемость и вызывать гемолиз. Повреждение мембраны эритроцитов может спровоцировать тяжелые физиологические последствия, такие как гемолитическая анемия, кроме того, высвободившийся гемоглобин является токсическим соединением для крови [43].

Из данных, представленных в табл. 4, видно, что пустые PLGA-плацебо НЧ не оказывали гемолитического воздействия после инкубации с образцами крови в течение 3 ч во всем диапазоне концентраций. Незначительное цитотоксическое воздействие Dox-PLGA НЧ на эритроциты было отмечено лишь для максимальной исследованной концентрации 100 мкг/мл, превышающей прогнозируемые концентрации при клиническом применении препарата. Полученные данные подтверждают результаты С. Fornaguera и соавт., показавших гемосовместимость PLGA НЧ различного состава [19].

Таблица 4. Процент гемолиза после инкубации крови с PLGA наночастиц, обогащенных доксорубицином, и PLGA-плацебо наночастиц в различных концентрациях

Table 4. Percentage of hemolysis after incubation of blood samples with Dox-PLGA NP and PLGA-placebo NP in different concentration

Образец Sample	Концентрация НЧ, мкг/мл Nanoparticles concentration, µg/ml	Гемолиз, % Hemolysis, %
PLGA-плацебо PLGA-Placebo	1	0,17
	10	0,41
	100	0,98
Доксорубицин-PLGA Dox-PLGA	1	0,55
	10	1,25
	100	6,98

Таблица 3. Уровень активации тромбоцитов (уровень экспрессии Р-селектина) после инкубации плазмы крови, обогащенной тромбоцитами (PRP) с PLGA наночастиц, обогащенных доксорубицином, и PLGA-плацебо наночастиц. В качестве отрицательного контроля использовали PRP; в качестве положительного контроля использовали PRP + аденозиндифосфат (среднее значение \pm SD; n = 3)

Table 3. Level of platelet activation (P-selectin expression) after platelet-rich plasma incubation with Dox-PLGA and PLGA-Placebo nanoparticles. Platelet-rich plasma was used as negative control; Platelet-rich plasma + ADP was used as positive control (mean value \pm SD; n = 3)

Образец Sample	Концентрация наночастиц, мкг/мл Nanoparticles concentration, µg/ml	Уровень экспрессии Р-селектина, % Level of P-selectine expression, %
Отрицательный контроль (PRP) Negative control (PRP)	—	8,90
Положительный контроль (PRP + ADP) Positive control (PRP + ADP)	—	65,83
PLGA-плацебо PLGA-Placebo	0,1	11,32
	1	4,23
	10	8,24
	100	12,75
Доксорубицин-PLGA Dox-PLGA	0,1	8,80
	1	5,60
	10	11,91
	100	14,81

Примечание. PRP — плазма, обогащенная тромбоцитами.
Note. PRP — platelet-rich plasma.

Изучение интернализации наночастиц

Было выявлено, что Dox-PLGA-Cy5.5 и PLGA-DiI НЧ активно захватываются клетками глиобластомы U87MG, при этом PLGA-Cy5.5 НЧ, нагруженные доксорубицином (Dox-PLGA-Cy5.5), более эффективно интернализируются клетками по сравнению с PLGA НЧ, меченными DiI. Так, через 1 ч инкубации было обнаружено 50 % PLGA-DiI-положительных клеток, тогда как при инкубации клеток с Dox-PLGA-Cy5.5 НЧ в той же концентрации количество Cy5.5-положительных клеток достигало 90 %. То есть PLGA-DiI НЧ с большим отрицательным зарядом ($-30,8$ мВ) менее эффективно захватываются клетками, чем более нейтральные Dox-PLGA-Cy5.5 НЧ ($-14,9$ мВ), в которых доксорубин частично компенсирует отрицательный заряд полимера. Действительно, согласно данным литературы положительно заряженные частицы более эффективно связываются с отрицательно заряженной клеточной мембраной [27, 44, 45]. В свою очередь, интенсивность флуоресценции и концентрация Cy5.5/DiI-положительных клеток увеличивалась со временем (рис. 5).

Заключение

В настоящей работе продемонстрировано отсутствие цитотоксического действия PLGA-плацебо НЧ на клеточные линии LLC-PK и HEPG2. При инкубации клеток глиобластомы человека U87MG и гепатоцеллюлярной карциномы HEPG2 как с субстанцией, так и с наносомальной формой доксорубина, наблюдалось достоверное снижение жизнеспособности клеток; при этом цитотоксический эффект

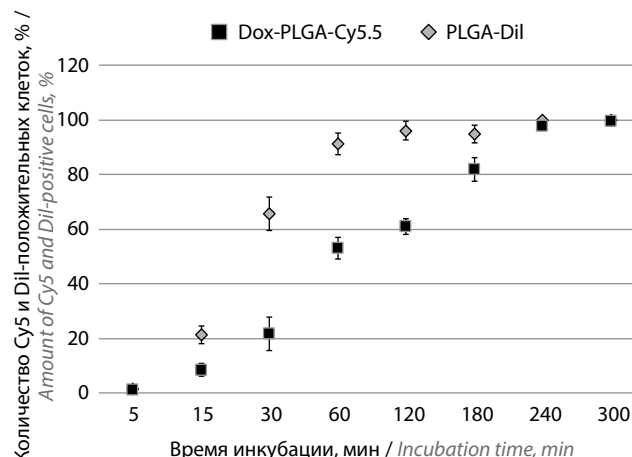


Рис. 5. Относительное содержание Cy5.5 и DiI-положительных клеток U87MG (%) в зависимости от времени их инкубации с наночастицами; концентрация наночастиц — 40 мкг/мл (среднее значение \pm SD; $n = 3$)

Fig. 5. Percentage of Cy5.5 and DiI-positive U87MG (%) cells depending on cell incubation time with NP; NP concentration 40 mcg/ml (mean \pm SD; $n = 3$)

доксорубина, высвободившегося из НЧ, был сравним с действием субстанции доксорубина. Результаты проточной цитометрии показали, что наносомальная форма доксорубина активно захватывается клетками глиобластомы человека.

Исследования гемосовместимости подтвердили безопасность применения Dox-PLGA НЧ: НЧ не оказывали влияния на свертывающую систему крови (не изменяли время свертывания плазмы крови, не индуцировали активацию тромбоцитов) и не оказывали цитотоксического воздействия на эритроциты.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Афанасьева Д.А., Барышникова М.А., Щербаков А.И. и др. Разработка модели противоопухолевой липосомальной вакцины. Иммунология 2014;35(6):317–21. [Afanasyeva D.A., Baryshnikova M.A., Shcherbakov A.I. et al. The development of anticancer liposomal vaccine model. Immunologiya = Immunology 2014;35(6):317–21 (In Russ.)].
- Weissig V., Pettinger T.K., Murdock N. Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. Int J Nanomedicine 2014;9:4357–73. DOI: 10.2147/IJN.S46900.
- Pathak Y., Thassu D. Drug delivery nanoparticles formulation and characterization. Boca Raton, USA, CRC Press, 2009, 416 p.
- Wang A.Z., Langer R., Farokhzad O.C. Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs. Annu Rev Med 2012;63(1):185–98. DOI: 10.1146/annurev-med-040210-162544.
- Makadia H.K., Siegel S.J. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. Polymers (Basel) 2011;3(3):1377–97. DOI: 10.3390/polym3031377.
- Lü J.M., Wang X., Marin-Muller C. et al. Current advances in research and clinical applications of PLGA-based nanotechnology. Expert Rev Mol Diagn 2009;9(4):325–41. DOI: 10.1586/erm.09.15.
- Mundargi R.C., Babu V.R., Rangaswamy V. et al. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D, L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. J Control Release 2008;125(3):193–209. DOI: 10.1016/j.jconrel.2007.09.013.
- Shive M.S., Anderson J.M. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. Adv Drug Deliv Rev 1997;28(1):5–24. DOI: 10.1016/S0169-409X(97)00048-3.
- Szymonowicz M., Rybak Z., Witkiewicz W. et al. In vitro hemocompatibility studies of poly-(L-lactide) and poly(L-lactide-co-glycolide) as materials for bioresorbable stents manufacture. Acta Bioeng Biomech 2014;16(4):131–9. DOI: 10.5277/ABB-00055-2014-03.
- Landes C.A., Ballon A., Roth C. Maxillary and mandibular osteosyntheses with PLGA and P(L/DL)LA implants: a 5-year inpatient biocompatibility and degradation experience. Plast Reconstr Surg 2006;117(7):2347–60. DOI: 10.1097/01.prs.0000218787.49887.73.

11. Mau L.P., Cheng C.W., Hsieh P.Y., Jones A.A. Biological complication in guided bone regeneration with a polylactic acid membrane: a case report. *Implant Dent* 2012;21(3):171–4. DOI: 10.1097/ID.0b013e31824eece1.
12. Майбородин И.В., Кузнецова И.В., Береговой Е.А. и др. Отсутствие полной резорбции полилактидного материала в организме. *Новости хирургии* 2014;22(1):26–32. [Maiborodin I.V., Kuznetsova I.V., Beregovoy E.A. et al. Absence of complete resorption of polylactide material in the organism. *Novosti khirurgii* = *Surgery News* 2014;22(1):26–32. (In Russ.)].
13. Gentile P., Chiono V., Carmagnola I., Hatton P.V. An overview of poly(lactic-co-glycolic)acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. *Int J Mol Sci* 2014;15(3):3640–59. DOI: 10.3390/ijms15033640.
14. Pérez-Herrero E., Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm* 2015;93:52–79. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.03.018.
15. Tariq M., Alam M.A., Singh A.T. et al. Biodegradable polymeric nanoparticles for oral delivery of epirubicin: *in vitro*, *ex vivo*, and *in vivo* investigations. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2015;128:448–56. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.02.043.
16. Derakhshandeh K., Soheili M., Dadashzadeh S., Saghir R. Preparation and *in vitro* characterization of 9-nitrocamptothecin-loaded long circulating nanoparticles for delivery in cancer patients. *Int J Nanomedicine* 2010;5:463–71. DOI: 10.2147/IJN.S11586.
17. Derakhshandeh K., Hosseinalizadeh A., Nikmohammadi M. The effects of PLGA microparticles on intestinal absorption of p-glycoprotein substrate using the everted rat intestinal sac model. *Arch Pharm Res* 2011;34(11):1989–97. DOI: 10.1007/s12272-011-1120-1.
18. Sobot D., Mura S., Couvreur P. Nanoparticles: Blood Components interaction. *Encyclopedia of polymeric nanomaterials*, 2015, 1352 p. DOI: 10.1007/978-3-642-29648-2_227.
19. Fornaguera C., Caldero G., Mitjans M. et al. Interactions of PLGA nanoparticles with blood components: protein adsorption, coagulation, activation of the complement system and hemolysis studies. *Nanoscale* 2015;7(14):6045–58. DOI: 10.1039/c5nr00733j.
20. Kim D., El-Shall H., Dennis D., Morey T. Interaction of PLGA nanoparticles with human blood constituents. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2005;40(2):83–91. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2004.05.007.
21. Fornaguera C., Solans C. Methods for the *in vitro* characterization of nanomedicines – biological component interaction. *J Pers Med* 2017;7(1):2. DOI: 10.3390/jpm7010002.
22. Rahimian S., Fransen M.F., Kleino-vink J.W. et al. Particulate systems based on poly(lactic-co-glycolic)acid (PLGA) for immunotherapy of cancer. *Curr Pharm Des* 2015;21(29):4201–16. DOI: 10.2174/1381612821666150901100247.
23. Desai N. Challenges in development of nanoparticle-based therapeutics. *AAPS J* 2012;14(2):282–95. DOI: 10.1208/s12248-012-9339-4.
24. Gelperina S., Maksimenko O., Khalan-sky A. et al. Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: influence of the formulation parameters. *Eur J Pharm Biopharm* 2010;74(2):157–63. DOI: 10.1016/j.ejpb.2009.09.003.
25. Wohlfart S., Khalansky A.S., Gelperina S. et al. Efficient chemotherapy of rat glioblastoma using doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles with different stabilizers. *PloS one* 2011;6(5):e19121. DOI: 10.1371/journal.pone.0019121.
26. Rejman J., Oberle V., Zuhorn I.S., Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J* 2004;377(1):159–69. DOI: 10.1042/BJ20031253.
27. Hillaireau H., Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci* 2009;66(17):2873–96. DOI: 10.1007/s00018-009-0053-z.
28. Fehrenbacher N., Jäättelä M. Lysosomes as targets for cancer therapy. *Cancer Res* 2005;65(8):2993–5. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0476.
29. Ilinskaya A.N., Dobrovolskaia M.A. Nanoparticles and the blood coagulation system. Part II: safety concerns. *Nanomedicine* 2013;8(6):969–81. DOI: 10.2217/nmm.13.49.
30. Gunness P., Aleksa K., Kosuge K. et al. Comparison of the novel HK-2 human renal proximal tubular cell line with the standard LLC-PK1 cell line in studying drug-induced nephrotoxicity. *Can J Physiol Pharmacol* 2010;88(4):448–55. DOI: 10.1139/y10-023.
31. Ramirez T., Strigun A., Verlohrner A. et al. Prediction of liver toxicity and mode of action using metabolomics *in vitro* in HepG2 cells. *Arch Toxicol* 2018;92(2):893–906. DOI: 10.1007/s00204-017-2079-6.
32. Wolff J.E., Trilling T., Mölenkamp G. et al. Chemosensitivity of glioma cells *in vitro*: a meta analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125(8–9):481–6. DOI: 10.1007/s004320050305.
33. Clark M.J., Homer N., O'Connor B.D. et al. U87MG decoded: the genomic sequence of a cytogenetically aberrant human cancer cell line. *PLoS Genet* 2010;6(1):e1000832. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000832.
34. Chittasupho C., Xie S.X., Baoum A. et al. ICAM-1 targeting of doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles to lung epithelial cells. *Eur J Pharm* 2009;37(2):141–50. DOI: 10.1016/j.ejps.2009.02.008.
35. Lundqvist M., Stigler J., Elia G. et al. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(38):14265–70. DOI: 10.1073/pnas.0805135105.
36. Aggarwal P., Hall J.B., McLeland C.B. et al. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy. *Adv Drug Deliv Rev* 2009;61(6):428–37. DOI: 10.1016/j.addr.2009.03.009.
37. Oslakovic C., Cedervall T., Linse S., Dahlbäck B. Polystyrene nanoparticles affecting blood coagulation. *Nanomedicine* 2012;8(6):981–6. DOI: 10.1016/j.nano.2011.12.001.
38. Neun B.W., Dobrovolskaia M.A. Method for *in vitro* analysis of nanoparticle thrombogenic properties. *Methods Mol Biol* 2011;697:225–35. DOI: 10.1007/978-1-60327-198-1_24.
39. Li X., Radomski A., Corrigan O.I. et al. Platelet compatibility of PLGA, chitosan and PLGA-chitosan nanoparticles. *Nanomedicine (Lond)* 2009;4(7):735–46. DOI: 10.2217/nmm.09.65.
40. Jackson S.P. The growing complexity of platelet aggregation. *Blood* 2007;109(12):5087–95. DOI: 10.1182/blood-2006-12-027698.
41. Cenni E., Granchi D., Avnet S. et al. Biocompatibility of poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles conjugated with alendronate. *Biomaterials* 2008;29(10):1400–11. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.12.022.
42. Merten M., Thiagarajan P. P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation* 2000;102(16):1931–6. DOI: 10.1161/01.CIR.102.16.1931.
43. Bosi S., Feruglio L., da Ros T. et al. Hemolytic effects of water-soluble fullerene derivatives. *J Med Chem* 2004;47(27):6711–5. DOI: 10.1021/jm0497489.

44. Bannunah A.M., Vlasaliu D., Lord J., Stolnik S. Mechanisms of nanoparticle internalization and transport across an intestinal epithelial cell model: effect of size and surface charge. *Mol Pharm* 2014;11(12):4363–73. DOI: 10.1021/mp500439c.
45. Kumar R., Kulkarni A., Nabulsi J. et al. Facile synthesis of PEGylated PLGA nanoparticles encapsulating doxorubicin and its *in vitro* evaluation as potent drug delivery vehicle. *Drug Deliv Transl Res* 2013; 3(4):299–308. DOI: 10.1007/s13346-012-0124-9.

Вклад авторов

Ю.А. Малиновская: получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
 Е.И. Коваленко: разработка дизайна исследования по изучению гемосовместимости, анализ полученных данных;
 Т.С. Ковшова: физико-химический анализ наночастиц, изучение профиля высвобождения лекарственного вещества;
 Н.С. Осипова: получение наночастиц с доксорубицином, разработка синтеза флуоресцентно-меченных наночастиц;
 О.О. Максименко: разработка метода получения наночастиц-плацебо и наночастиц, нагруженных доксорубицином, оптимизация параметров наночастиц;
 В.Ю. Балабаньян: анализ полученных данных;
 В.А. Разживина: руководство доклиническими исследованиями наносомального доксорубицина, разработка и утверждение дизайна исследования;
 М.В. Гречихина: разработка методики определения цитотоксичности наночастиц;
 А.А. Бойко: разработка методики оценки влияния наночастиц на свертывающую систему крови, активацию тромбоцитов и оценку токсического действия наночастиц на эритроциты;
 С.Э. Гельперина: общее руководство проектом, анализ полученных данных.

Authors' contributions
 Yu.A. Malinovskaya: data collection and analysis, writing the manuscript;
 E.I. Kovalenko: designing the study of hemocompatibility, data analysis;
 T.S. Kovshova: physicochemical analysis of nanoparticles, studying a profile of drug release;
 N.S. Osipova: obtaining nanoparticles with doxorubicin, developing synthesis of fluorescently-labeled nanoparticles;
 O.O. Maksimenko: developing a method to obtain placebo nanoparticles and doxorubicin loaded nanoparticles, optimizing nanoparticle parameters
 V.Yu. Balabanyan: data analysis;
 V.A. Razzhivina: head of preclinical studies of nanosomal form of doxorubicin, developing and approving the study design;
 M.V. Grechikhina: developing a method to determine nanoparticles cytotoxicity;
 A.A. Boyko: developing a method to assess nanoparticles effect on blood coagulation system, platelet activation, and assessment of nanoparticles toxic effect on red blood cells;
 S.E. Gelperina: head of the project, data analysis.

ORCID авторов/ORCID of authors

Ю.А. Малиновская/Yu.A. Malinovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9771-3992>
 Е.И. Коваленко/E.I. Kovalenko: <https://orcid.org/0000-0001-8119-8247>
 Т.С. Ковшова/T.S. Kovshova: <https://orcid.org/0000-0002-0398-4645>
 Н.С. Осипова/N.S. Osipova: <https://orcid.org/0000-0002-2814-9064>
 О.О. Максименко/O.O. Maksimenko: <https://orcid.org/0000-0002-1230-4680>
 В.Ю. Балабаньян/V.Yu. Balabanyan: <https://orcid.org/0000-0002-5744-7060>
 С.Э. Гельперина/S.E. Gelperina: <https://orcid.org/0000-0003-1113-6715>
 А.А. Бойко/A.A. Boiko: <https://orcid.org/0000-0002-8996-2905>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено при поддержке Федеральной целевой программы «Фарма 2020» (Госконтракт № 13411.1008799.13.144).

Financing. This study was supported by the Federal target program “Pharma 2020” (Contract No 13411.1008799.13.144).

Статья поступила: 17.08.2019. Принята к публикации: 19.12.2019.

Article submitted: 17.08.2019. Accepted for publication: 19.12.2019.