

Московский государственный университет им. М.В.
Ломоносова Биологический факультет
Кафедра иммунологии

**Адресные полимерные наноконплексы для
фотоиндуцируемой гибели HER2-
сверхэкспрессирующих клеток *in vitro* и *in
vivo***

Выпускная квалификационная
работа магистра
студентки II курса

КОМЕДЧИКОВОЙ Елены Николаевны

Научные руководители

д. б. н., проф., акад. РАН,
зав. лаб. молекулярной
иммунологии ИБХ РАН

Деев Сергей Михайлович

к. б. н., с.н.с. лаб. молекулярной
иммунологии ИБХ РАН

Шипунова Виктория Олеговна

Допускается к защите:

Москва 2021

Оглавление

Введение.....	3
Цели и задачи.....	5
Обзор литературы.....	6
Нанотехнологии.....	6
Разнообразие наночастиц.....	6
Наночастицы на основе неорганических материалов.....	7
Органические наночастицы.....	10
Распределение наночастиц в организме.....	13
Рецептор HER2.....	16
Фототермическая терапия.....	20
Применение наночастиц в фототермической терапии.....	21
Материалы и методы.....	26
Оборудование.....	26
Реактивы.....	26
Синтез наночастиц.....	27
Электронная микроскопия.....	27
Флуоресцентная спектроскопия.....	28
Исследование фототермических свойств наночастиц.....	28
Измерение гидродинамического и электрофоретического рассеяния света.....	28
Условия культивирования клеточных линий.....	28
Проточная цитометрия.....	29
МТТ тест.....	29
Исследование биораспределения наночастиц.....	30
Результаты.....	32
Синтез наночастиц.....	32
Спектральные характеристики наночастиц.....	34
Фототермические свойства наночастиц.....	36
Характеристика наночастиц.....	40
Изучение специфичности полученных наночастиц.....	41
Изучение цитотоксичности полученных наночастиц.....	43
Обсуждение.....	50
Выводы.....	52

Введение

Постепенное старение населения, распространения вредных привычек, а также прогресс в разработке методов лечения других заболеваний – все эти факторы ведут к увеличению доли онкологических заболеваний среди остальных болезней. Только за 2020 год по всему миру количество заболевших раком возросло на 19.1 миллион новых случаев и по некоторым оценкам может достигнуть 28.4 миллиона новых случаев к 2040 году. При этом раковые заболевания также являются второй по распространённости причиной смерти в мире после сердечно-сосудистых заболеваний (Sung et al. 2021).

Несмотря на значительный прогресс в разработке новых методов для лечения данного заболевания, химиотерапия остаётся одним из основных подходов для лечения рака, особенно при наличии метастазирования (Edward Chu 2004). Наибольшим недостатком химиотерапии является недостаточная селективность в доставке препарата к раковым клеткам и связанное с этим большое количество побочных эффектов. Поэтому в данный момент активно разрабатываются методы направленной доставки лекарств. Одним из широко используемых методов является заключение препарата в оболочку наночастиц, что позволяет улучшить фармакодинамику и фармакокинетику препарата, а также снизить систематическую токсичность для организма (Wang et al. 2012). Широкий спектр используемых методик также позволяет модифицировать поверхность частиц адресными молекулами различной природы за счёт чего можно достичь

ещё лучшего распределения препарата в организме. Ещё одним несомненным преимуществом применения наночастиц является возможность совмещать несколько функций в одном препарате – терапию и диагностику, а также различные виды терапий, например, химиотерапию и фототермическую терапию. Всё это позволяет комплексно воздействовать на раковые клетки и наиболее эффективно вызывать их гибель. Таким образом, применение нанотехнологий позволяет создавать многофункциональные препараты для визуализации и лечения опухолей.

Фототермическая терапия – это один из способов лечения раковых заболеваний, основанный на способности некоторых веществ нагреваться при облучении светом определённой длины волны. Это активно развивающееся направление получает всё большее распространение благодаря возможности локального воздействия на раковые клетки в совокупности с доступностью биосовместимых препаратов для фототермической терапии.

Онкологические заболевания различаются по встречаемости и степени злокачественности, а также набору возможных форм. Рак молочной железы входит в число самых распространённых видов рака и является одной из лидирующих причин смерти женщин по всему миру (Waks and Winer 2019). HER2-положительный рак молочной железы является одним из наиболее злокачественных и встречается более чем у 20% пациенток (Loibl and Gianni 2017). Сверхэкспрессия рецептора HER2 ассоциирована с усилением свойств, способствующих прогрессированию метастазирования, таких как ангиогенез, инвазия и повышенная выживаемость раковых клеток, к тому же эта форма рака зачастую связана с невосприимчивостью к

гормональной терапии и устойчивость к химиотерапии, что вынуждает докторов выписывать всё большие дозы препаратов и их комбинаций, что ведёт к усилению негативного влияния химиотерапии на здоровые клетки (Mendelsohn and Baselga 2000). Вследствие этого критически необходимо разрабатывать новые подходы к лечению данного заболевания.

Цели и задачи

Целью данной работы было создание биосовместимых полимерных наночастиц, сочетающих терапевтические и диагностические свойства, для фототермической терапии HER2-сверхэкспрессирующих раковых клеток.

Для реализации поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- 1) Разработать и оптимизировать метод синтеза адресных полимерных наноконструкций, обладающих выраженными фототермическими свойствами;
- 2) Исследовать фототермические свойства наночастиц и получить их спектральные характеристики;

- 3) Количественно исследовать связывание полученных конструкторов с клеточными линиями с различным уровнем экспрессии рецептора HER2;
- 4) Исследовать цитотоксичность полученных наночастиц;
- 5) Исследовать возможность применения наночастиц *in vivo* для диагностики раковых заболеваний.

Обзор литературы

Нанотехнологии

В настоящее время нанотехнологии – это активно развивающееся направление биомедицины, которое, как ожидается, может принести значительный прогресс в область терапии и диагностики различных заболеваний. Широкое распространение наночастицы получили благодаря их уникальным свойствам, а именно (Jong and Borm 2008):

- 1) большое отношение площади поверхности наночастиц к их массе. Это особое свойство появляется при переходе к

наноразмерам и позволяет модифицировать поверхность наночастиц различными молекулами в достаточном количестве;

- 2) большое разнообразие материалов и методов синтеза наночастиц открывает обширные возможности для конструирования наночастиц с заданными свойствами;
- 3) широкий спектр методов модификации поверхности наночастиц позволяет создавать адресные наночастицы, нацеленные на клетки с экспрессией определённых молекул на поверхности;
- 4) возможность инкапсулировать различные вещества (в том числе гидрофобные) в оболочку из наночастиц позволяет улучшить фармакодинамические и фармакокинетические свойства препаратов, а также их биодоступность, что позволяет улучшить эффективность применения;
- 5) наночастицы можно загрузить веществами с различными свойствами (цитотоксические, флуоресцентные, радиоактивные, магнитные), что позволяет создавать мультифункциональные препараты для тераностики (терапия + диагностика) или комплексного воздействия на клетки.

Разнообразие наночастиц

В настоящее время разработано большое количество методик для синтеза наночастиц из материалов различной природы. По происхождению можно выделить органические (белковые, липидные, полимерные) и неорганические материалы (оксиды металлов, благородные металлы, углеродные). Оба вида материалов обладают своими преимуществами и недостатками. Так, использование неорганических материалов позволяет

придать наночастицам уникальные свойства, включающие радиоактивность, магнитные свойства, различные оптические характеристики. Однако при этом зачастую наночастицы из неорганических материалов не обладают достаточной биосовместимостью и могут обладать токсичностью для организма при длительном применении. Органические материалы, напротив, в большинстве своём являются биосовместимыми и не токсичными для организма, но при этом не обладают сами по себе специфическими свойствами. Таким образом, использование определённого материала наночастиц зависит от конкретной задачи, сроков воздействия на организм и желаемого результата. Ниже приводится краткое описание основных видов наночастиц из неорганических и органических материалов с перечислением их основных преимуществ и недостатков.

Наночастицы на основе неорганических материалов

Как уже упоминалось ранее, использование неорганических материалов для синтеза наночастиц позволяет придать им большой спектр различных физических и химических свойств, а также размеров и форм благодаря широкому разнообразию доступных на данный момент материалов и методов получения наночастиц. К наиболее распространённым неорганическим наночастицам, используемым в биомедицине, относятся: квантовые точки; углеродные наночастицы; наночастицы на основе металлов; кремниевые частицы.

- ***Квантовые точки*** – это полупроводниковые нанокристаллы размером всего несколько (2-10) нанометров, обладающие уникальными оптическими характеристиками, включающими высокую интенсивность

флуоресценции, высокую устойчивость к выгоранию, большую разницу между максимумами возбуждения и эмиссии флуоресценции. Их основу составляют полупроводниковые металлы, покрытые оболочкой из органических веществ, улучшающих биосовместимость квантовых точек, а также позволяющих модифицировать их поверхность молекулами для направленной доставки к раковым клеткам. Благодаря своим уникальным оптическим свойствам квантовые точки могут быть использованы для визуализации опухолевых клеток (что уже было показано в ряде *in vitro* и *in vivo* работ), однако необходимо разрабатывать подходы для снижения негативного влияния наночастиц на организм в связи с токсичностью используемых металлов (таких как кадмий, свинец, мышьяк) (Fang et al. 2012).

- **Наночастицы на основе углерода** представляют собой целый спектр наночастиц различных форм и размеров, включающих углеродные нанотрубки, наноалмазы и графен. *Углеродные нанотрубки* представляют собой полые цилиндры, состоящие из свёрнутых листов графита. Благодаря хорошей электропроводности, гибкости и прочности, а также большому структурному разнообразию нанотрубки могут быть использованы в качестве биосенсоров (например, для определения содержания глюкозы или определённых белков в крови), а также для направленной доставки лекарственных препаратов к раковым клеткам и фототермической терапии. Однако основным недостатком углеродных нанотрубок является токсичность компонентов, используемых при их синтезе, потому встаёт необходимость разработки методов очистки

от токсичных примесей и повышения биосовместимости нанотрубок. *Наноалмазы* представляют собой наночастицы с кристаллической решёткой, характерной для алмазов. Благодаря низкой токсичности и высокой биосовместимости, способности к флуоресценции, а также возможному наличию функциональных групп на поверхности, наноалмазы могут быть использованы как визуализирующие агенты, а также как платформы для адресной доставки веществ. *Графен* представляет собой лист из углеродов, находящихся в sp^2 -гибридизации. По своим электрическим, термическим и оптическим свойствам наночастицы из графена близки к углеродным нанотрубкам, а потому также могут применяться в качестве биосенсоров и платформ для адресной доставки препаратов (Cha et al. 2013; Maiti et al. 2018; Patel et al. 2019).

- Среди **наночастиц на основе кремния** особо можно выделить мезопористые наночастицы, которые представляют собой однородные по размеру частицы с упорядоченной системой пор, покрытых силанольными группами, что открывает возможности функциональной модификации поверхности. Благодаря хорошо регулируемому размеру наночастиц, количеству пор, большой площади поверхности и высокой вместимости, а также высокой биосовместимости мезопористые кремниевые наночастицы могут выступать в качестве носителей лекарственных препаратов и визуализирующих агентов. Однако несмотря на все выше перечисленные свойства, на данный момент мезопористые наночастицы ещё не были одобрены для использования в медицинских

целях управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) из-за недостаточно исследованного биораспределения и путей выведения наночастиц (Manzano and Vallet - Regí 2020).

- Среди **наночастиц на основе металлов** можно особо выделить магнитные наночастицы и наночастицы из благородных металлов. *Магнитные частицы* представляют собой наночастицы, которыми можно манипулировать под воздействием внешнего магнитного поля. Это уникальное свойство магнитных наночастиц вместе с хорошей проникающей способностью магнитных волн внутрь тканей позволяет: воздействовать на наночастицы извне и приводить к концентрации частиц в определённой области организма, осуществляя тем самым направленную доставку наночастиц; использовать наночастицы в качестве контрастирующих агентов для МРТ; применять наночастицы в качестве гипертермических препаратов. Основным недостатком данных наночастиц является их низкая биосовместимость и биodeградируемость вкупе с токсичностью для организма (Shubayev et al. 2009). *Наночастицы из благородных металлов* (золотые, серебряные и платиновые) получили распространение благодаря своим уникальным опто-электрическим свойствам, зависящим от размера частиц и их формы, которые позволяют использовать частицы в различных областях медицины, включающих и диагностику, и терапию опухолей. Однако оставшиеся токсические вещества, используемые при синтезе некоторых частиц из благородных металлов, как и сами частицы могут обладать цитотоксичностью для

нормальных клеток организма, что может ограничивать их применение в клинике (Arvizo et al. 2012; Conde et al. 2012).

Таким образом, несмотря на большое разнообразие материалов и методов синтеза, а главное широкий спектр уникальных физических и химических свойств, основным сдерживающим фактором, ограничивающим широкое применение в клинике наночастиц из неорганических материалов, является их недостаточная биосовместимость и токсичность для организма при долгом применении. Одобрённые на данный момент неорганические наночастицы для диагностики созданы в основном для кратковременного применения в качестве контрастирующих агентов или же для восполнения недостатка железа при железодефицитной анемии (Anselmo and Mitragotri 2019). Однако в настоящий момент большое количество препаратов, основанных на неорганических частицах, находится на различных стадиях клинических испытаний, а также разрабатывается большой спектр методик для снижения токсичности и повышения биосовместимости наночастиц из неорганических материалов (Huang et al. 2020).

Органические наночастицы

Частицы из органических материалов получили широкое распространение в биомедицине благодаря высокой степени биосовместимости и биodeградируемости, широким возможностям модификации поверхности и содержимого частиц, что открывает большие возможности для создания частиц с заданными свойствами, зависящими от включённых в состав веществ. К основным типам наночастиц из органических

материалов относятся липосомы, мицеллы, белковые и полимерные частицы. Далее идёт краткая характеристика основных типов органических наночастиц.

- **Липосомы** представляют собой концентрически замкнутый липидный бислой (или несколько слоёв), заключающий в себе водный раствор. Содержание как водной, так и липидной фаз в липосомах позволяет инкапсулировать в них вещества различной природы (водорастворимые в водную фазу внутри липосомы, жирорастворимые – внутрь липидного бислоя). Благодаря своей природе липосомы являются полностью биосовместимыми и биodeградируемыми. К недостаткам липосом можно отнести низкую стабильность при хранении, невысокую эффективность инкапсулирования, а также возможность вызвать активацию белков комплемента. В настоящее время активно разрабатываются подходы для решения всех перечисленных проблем. Ряд препаратов для лечения некоторых видов рака на основе липосом был уже одобрен FDA (Bozzuto and Molinari 2015; Bobo et al. 2016).
- **Мицеллы**, как и липосомы, состоят из амфифильных веществ, имеющих полярную часть и гидрофобный хвост. Однако в отличие от последних не имеют внутри полость с водной средой, а потому подходят для доставки лишь гидрофобных веществ. Мицеллы могут состоять как из липидов, так и из полимеров (тогда их можно отнести к полимерным наночастицам). Основным недостатком мицелл является их низкая стабильность (особенно это касается мицелл на основе липидов). На данный момент одобрено FDA лишь небольшое количество препаратов на

основе мицелл, и оно включает Estrasorb, который является мицеллярной формуляцией эстрадиола, и Genexol-PM, являющийся мицеллярной формуляцией паклитаксела (Ahmad et al. 2014; Gravel and Doris 2018).

- **Белковые наночастицы** представляют собой ещё один тип биосовместимых органических наночастиц. Благодаря амфифильности белков такие наночастицы можно нагружать жирорастворимыми веществами, повышая их биодоступность. При создании белковых наночастиц особое внимание уделяется повышению их стабильности (хорошо известно, что структура белков сильно зависит от pH и осмолярности раствора), понижению иммуногенности (с этой целью используют природные белки, такие как альбумин). К одобренным на данный момент наночастицам на основе белков относятся: Абрахане – препарат для лечения злокачественных новообразований, основанный на цитостатическом препарате паклитакселе, связанным с альбумином; Ontak, состоящий из цитотоксического дифтерийного токсина, связанного с интерлейкином-2 (Lohcharoenkal et al. 2014; Herrera Estrada and Champion 2015; Hong et al. 2020) .
- **Полимерные наночастицы** представляют собой широкий спектр наночастиц на основе полимеров различного происхождения (полисахариды, полиамиды, полиэфиры и другие). Среди полимерных наночастиц можно выделить нанокапсулы, которые содержат внутри полость с жидкой средой, и наносферы, не содержащие полости, в которые препарат включается в полимерную оболочку. Высокая степень биосовместимости и биodeградируемости, внушительное разнообразие

доступных материалов, методов синтеза и модификации поверхности, высокая стабильность и эффективность инкапсулирования препаратов привели к большой распространённости полимерных наночастиц. Поли-лактид-ко-гликолид (PLGA) относится к одним из наиболее многообещающих полимеров, при этом ряд препаратов на его основе уже одобрены FDA (Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов). PLGA состоит из молочной и гликолевых кислот, которые присутствуют в клетках, и является полностью биосовместимым и биоразлагаемым. На данный момент доступны различные модификации PLGA функциональными группами (такими как, карбоксильные и амино группы), что расширяет возможности модификации поверхности наночастиц. Целый ряд препаратов на основе полимерных наночастиц является одобренным для лечения раковых заболеваний, а также большое количество препаратов находится на различных стадиях клинических испытаний (Pillai and Panchagnula 2001; Makadia and Siegel 2011; Bobo et al. 2016; Lu et al. 2011; Sur et al. 2019).

Исходя из всего вышеперечисленного, создание частиц из органических материалов представляют собой активно развивающуюся область наномедицины. В отличие от неорганических наночастиц, для органических частиц проблема токсичности и биосовместимости стоит не так остро, а потому всё большее количество препаратов на их основе одобряется и находит применение в клинике. К тому же разработанные недавно компаниями Pfizer /BioNTech и Moderna вакцины от коронавируса также относятся к органическим

наночастицам и представляет собой липидные наночастицы (Mulligan et al. 2020; Meo et al. 2021).

Распределение наночастиц в организме

Однако несмотря на улучшенную эффективность доставки лекарственных препаратов и их повышенную биодоступность большинство доступных сейчас наночастиц для лечения опухолей являются неспецифичными и доставляются в опухоль за счёт эффекта повышенной проницаемости и задержки (англ. enhanced permeability and retention, EPR, effect), а именно: частицы попадают в опухоль за счёт увеличенной проницаемости кровеносных сосудов в ней, при этом частицы задерживаются в опухоли из-за недостаточной эффективности лимфатического оттока (Park et al. 2019). Раковые клетки активно делятся, а потому им необходимо хорошее кровоснабжение, при этом опухоль постоянно растёт, поэтому в ней активно происходит процесс ангиогенеза. Но кровеносные сосуды в опухоли имеют изменённую анатомию. Так, поры в эндотелии сосудов опухолей значительно крупнее, чем в нормальных тканях, и составляет порядка 200-600 нм (Hobbs et al. 1998). За счёт этого более крупные молекулы (включая наночастицы) способны проникать внутрь опухоли.

Для усиления эффективности доставки препаратов и уменьшения влияния на здоровые клетки было предложено использовать адресную доставку веществ. Как было уже упомянуто ранее, адресная доставка может быть осуществлена методами внешнего воздействия, включающими воздействие внешнего магнитного поля, а также может быть связана с разницей в pH или температуре между опухолью и нормальными тканями организма. Однако эти подходы имеют свои ограничения, связанные с недостаточной разницей pH и

температур между опухолью и остальными тканями, а также с особенностями скорости тока крови. Другим методом для реализации адресной доставки является модификация поверхности частиц адресными (таргетными) молекулами, способными селективно взаимодействовать с раковыми клетками. Так как опухолевые клетки являются изменёнными мутированными клетками, профиль экспрессии молекул на их поверхности также отличается от характерного профиля для тканей, из которых возникла опухоль, кроме того из-за мутаций возможно появление изменённых белков, которые ранее не встречались в организме (Scott et al. 2012). Помимо связывания с клетками, адресные молекулы могут опосредовать поглощение наночастиц клетками, например, за счёт рецептор-опосредованного эндоцитоза. Для данной цели могут использоваться вещества различной природы – как низкомолекулярные соединения (такие как фолат), так и высокомолекулярные соединения (например, моноклональные антитела) (Torchilin 2010).

Ниже приводится характеристика основных классов адресных молекул:

- 1) Одними из самых распространённых молекул, используемых для адресной доставки, являются **моноклональные антитела**. С момента появления гибридной технологии было получено большое количество антител к различным молекулам. К основным преимуществам использования антител относятся высокая специфичность взаимодействия с антигеном, широкий спектр доступных антител (в том числе к молекулам, экспрессируемым в большем количестве или только на раковых клетках). На данный момент конъюгаты антител с

другими молекулами нашли применение в диагностике (например, антитела с радиоактивной меткой применяются для выяснения локализации злокачественных образований) и терапии раковых заболеваний. Возможность создания биспецифичных антител (содержащих распознающие участки к двум различным эпитопам) позволяет нацеливать определённые клетки на опухоль (Scott et al. 2012).

- 2) **Фолиевая кислота, или фолат** – является низкомолекулярным соединением, играющим важную роль в метаболизме пуринов и пиримидинов, а потому активно делящиеся клетки (особенно раковые) активно потребляют фолат и содержат повышенное количество рецепторов к нему на своей поверхности. Потому фолат может быть использован в качестве адресной молекулы для доставки к раковым клеткам (Xia and Low 2010).
- 3) В последнее время всё большую популярность набирает использование **каркасных белков** (дарпины, аффибоди, нанободи, и другие). Это синтетические полипептиды, в основе которых лежат природные белки или их фрагменты. Такие молекулы имеют небольшой размер (6-15 кДа), высокую аффинность взаимодействия и высокую стабильность. К настоящему времени уже получен целый спектр каркасных белков к различным раковым биомаркерам и со временем их количество только продолжает расти (Rosenblum et al. 2018).
- 4) **Лектины** – белковые молекулы, способные связывать определённые сахара. В основном предполагается использование лектинов для доставки наночастиц в крови при пероральном введении, так как лектины устойчивы к

действию кислой среды и ферментативному расщеплению (Bies et al. 2004).

Основным процессом, конкурирующим с доставкой наночастиц в опухоль, является процесс захвата и выведения наночастиц ретикуло-эндотелиальной системой или мочевыделительной системой. Если размер наночастиц составляет меньше 5 нм (примерно 48 кДа) (что соответствует размеру пор в почечном фильтре), то они быстро выводятся почками из циркуляции. Наночастицы размером более 5 нм поглощаются макрофагами ретикуло-эндотелиальной системы, в частности печени (клетки Купфера) и селезёнки (Zhang et al. 2016; Yang et al. 2019). Одним из наиболее распространённых методов продления циркуляции наночастиц является покрытие их полиэтиленгликолем. Однако данный подход имеет ряд недостатков, включающих усиление иммунного ответа на наночастицы, препятствие для проникновения частиц в клетки, а также для выхода из эндосом, что в итоге приводит к снижению эффективности адресной доставки (Abu Lila et al. 2013; Hatakeyama et al. 2013; Zelepukin et al. 2020). Потому в настоящее время разрабатывается множество подходов для продления циркуляции наночастиц, включающих изменение поверхностного заряда (было показано, что сильно заряженные наночастицы сильнее адсорбируют на себе белки из сыворотки, что приводит к усилению их взаимодействия с макрофагами), присоединение дизопсонинов или собственных пептидов, а также «преднасыщение» ретикуло-эндотелиальной системы нетоксичными неадресными частицами (Hsu et al. 2003; Zhang et al. 2016; Mirkasymov et al. 2021).

Рецептор HER2

Выбор молекул для адресной доставки зависит от свойств опухоли, а потому использование наночастиц может рассматриваться как часть персонализированной медицины. Раковые опухоли отличаются не только по локализации, но и по спектру экспрессируемых генов, а значит и молекул, и по степени злокачественности. При этом некоторые молекулы являются маркёрами более злокачественных опухолей и более неблагоприятного прогноза. К одной из таких молекул относится рецептор HER2, который встречается в 1 из 5 случаев рака молочной железы, в некоторых типах рака эндометрия, пищевода, желудка и некоторых других типа рака, и является показателем неблагоприятного прогноза (Mimura et al. 2005; Morrison et al. 2006; Liu et al. 2010; Krishnamurti and Silverman 2014; Yan et al. 2015).

Рецептор HER2 (human epidermal growth factor receptor 2, HER2/neu, ERBB-2, прото-онкоген Neu, CD340) – 185 кДа трансмембранный гликопротеин, входящий в семейство рецепторных тирозинкиназ EGFR, в которое входит ещё 3 рецептора – HER1 (epidermal growth factor receptor, EGFR, ERBB-1), HER3 (ERBB-3) и HER4 (ERBB-4) (Akiyama et al. 1986; Krishnamurti and Silverman 2014). Рецепторы из этого семейства состоят из внеклеточного лиганд-связывающего домена (который находится в «закрытом» положении без лиганда), трансмембранного домена и внутриклеточного домена (Moasser 2007). Лигандами для этих рецепторов служат пептиды из семейства эпидермального фактора роста, и именно их экспрессией регулируется активность рецепторов HER. Связывание лиганда приводит к конформационным изменениям, переходу рецептора в «открытое» положение и освобождению участков димеризации, что ведёт к димеризации

рецептора и трансфософолированию внутриклеточных доменов (рис. 1). При димеризации могут образовываться как гомодимеры (например, HER1- HER1), так и гетеродимеры (например, HER1- HER2). В конечном итоге это приводит к передаче сигнала внутрь клетки по различным сигнальным путям, включающим MAPK-киназный и S6-киназный каскады, PI3K/Akt сигналинг, которые контролируют рост клеток, дифференцировку, миграцию, адгезию и апоптоз (Yarden and Sliwkowski 2001).

В отличие от всех остальных рецепторов из этого семейства для HER2 так и не был найден свой лиганд, кроме того, этот рецептор находится всегда в «открытом» положении. Рецептор HER2 образует пары с другими рецепторами из семейства HER, при чём было показано, что наиболее интенсивным сигналингом обладает пара HER2- HER3, хотя рецептор HER3 обладает не активным тирозинкиназным доменом. При этом есть данные, свидетельствующие о наибольшей киназной активности HER2 среди других рецепторов этого семейства (Ménard et al. 2003).

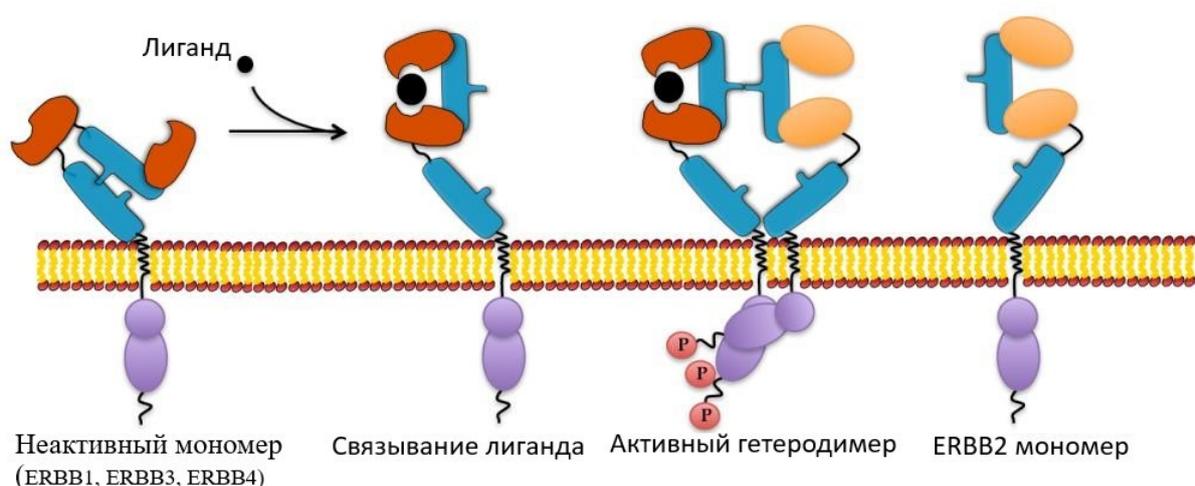


Рисунок 1. Схематическое представление активации рецепторов из семейства EGFR. До связывания с лигандом рецептор (HER1, HER3 или HER4) находится в «закрытой» конформации. Взаимодействие с лигандом

приводит к конформационным изменениям в структуре 1-го и 3-го доменов рецептора, которые ведут к образованию гомо- и гетеродимеров. Димеризация рецепторов ведёт к фосфолированию тирозинов на С-конце внутриклеточного домена рецептора, тем самым создавая площадку для посадки последующих адаптеров в передаче сигнала. Рецептор HER2 находится в постоянно «открытой» конформации и готов взаимодействовать с остальными рецепторами из этого семейства. Адаптировано из Marchini et al. 2013.

Рецепторы из семейства EGFR экспрессируются на различных клетках (не считая гематopoэтических) и на различных стадиях развития организма (Yarden 2001). В норме, как упоминалось выше, активность рецепторов HER определяется экспрессией их лигандов, в то время как сигналинг от HER2 также находится под строгим контролем, и его избыток ведёт к индукции апоптоза (Ménard et al. 2003). Однако амплификация, мутации, повышенный уровень экспрессии HER2 наряду с дефектами в других генах, играющих роль в контроле клеточного цикла и индукции апоптоза может приводить к злокачественному перерождению клеток (Ménard et al. 2003; Oh and Bang 2020). Была показана роль HER2 в запуске пролиферации, а также в индукции метастазирования, благодаря способности к запуску ферментов, ответственных за разрушение базальной мембраны и включающих матриксные металлопротеазы (Ménard et al. 2003). Также было показано, что HER2-положительный рак связан с невосприимчивостью к эндокринной терапии, что частично может быть объяснено отрицательной корреляцией между экспрессией HER2 и рецептора к эстрогену (Elledge et al. 1998; Konecný et al. 2003). Разница в экспрессии рецептора HER2 между нормальными клетками и HER2-положительными клетками опухоли, наряду с важной ролью этого рецептора в прогрессировании заболевания делают рецептор HER2 отличной мишенью для адресной терапии. На данный момент несколько

моноклональных антител, специфичных к рецептору HER2, уже разработаны и одобрены для лечения этих видов рака. Одно из таких антител – Трастузумаб показало многообещающие результаты в клинических испытаниях и одобрено для лечения различных видов HER2-положительного рака в качестве самостоятельного лечения или в комбинации с химиотерапией. Трастузумаб (в составе препарата Герцептин) – моноклональное антитело к рецептору HER2. Оно связывается с 4 внеклеточным доменом рецептора (рис. 2) и приводит к ингибированию димеризации, интернализации рецептора и/или его деградации, ингибированию PI3K-АКТ сигнального пути и антитело-зависимой цитотоксичности. Применение Трастузумаба является стандартным лечением на различных стадиях HER2-положительного рака груди, рака желудка (Klapper et al. 2000; Oh and Bang 2020).

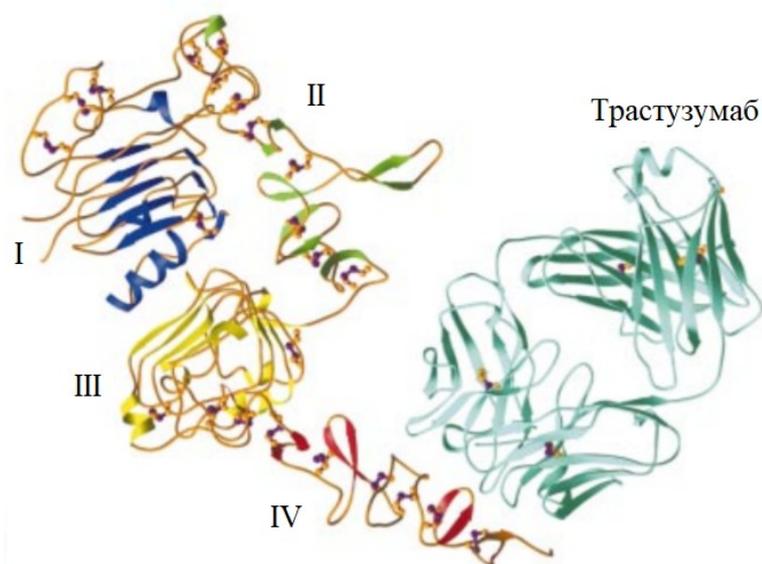


Рисунок 2. Структура комплекса растворимого внеклеточного домена рецептора HER2 (sHER2) и Fab-фрагмента антитела Трастузумаб. Синим помечен I домен рецептора, зелёным II домен, жёлтым III домен, а красным – IV домен. Трастузумаб взаимодействует с IV доменом рецептора. Адаптировано из Cho et al. 2003.

Фототермическая терапия

Фототермическая терапия – это метод теплового воздействия на раковые клетки. Он основан на способности некоторых веществ нагреваться при воздействии светом определённой длины волны (рис. 3).

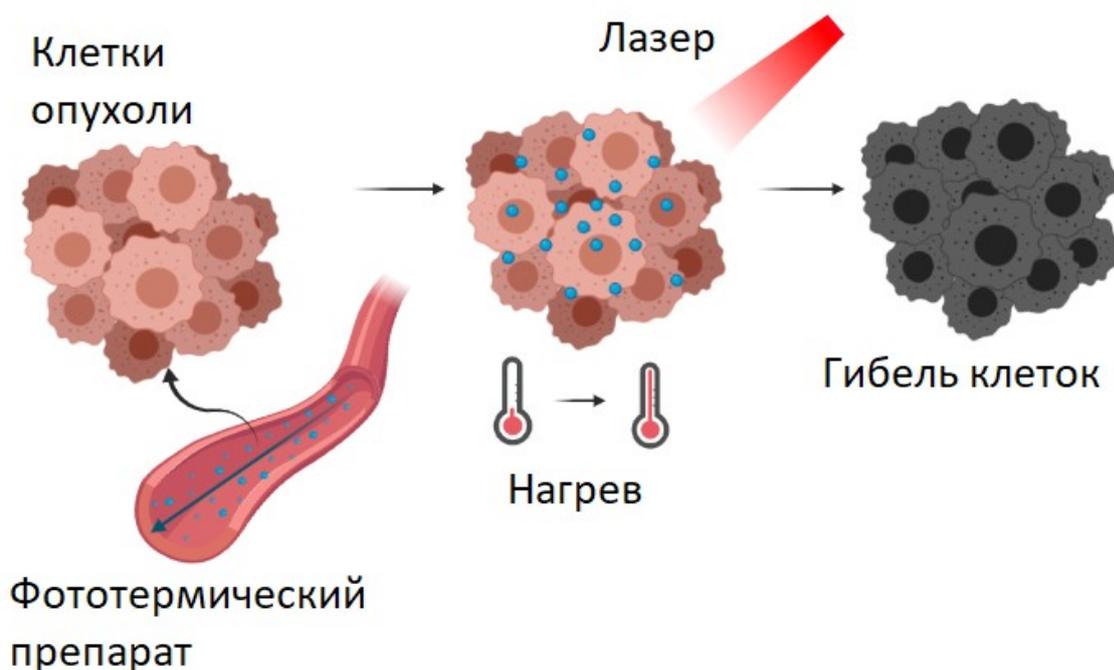


Рисунок 3. Принцип действия фототермической терапии. По кровеносным сосудам фототермический препарат доставляется к клеткам опухоли, которые впоследствии облучают лазером, что приводит к нагреванию фототермического препарата и гибели клеток.

Основными преимуществами фототермической терапии являются малая инвазивность, возможность локального и точного воздействия на раковые клетки, а значит минимальное повреждающее воздействие на здоровые клетки организма. Образующееся в результате облучения лазером фототермических препаратов тепло может привести к значительному повышению температуры внутри опухоли, что оказывает повреждающее воздействие на клетки и ведёт к регрессии опухоли. На степень изменения температуры сильно влияет концентрация частиц в опухоли, эффективность

конверсии энергии света в тепло, а также доза облучения. Для максимизации фототермии необходимо использовать вещества, поглощающие свет в окне прозрачности биотканей (Melamed et al. 2015). Окно прозрачности (англ. near-infrared, NIR) – это те длины волн, которые лучше всего и на большую глубину (больше 500 мкм) пропускаются биологическими тканями при минимальном поглощении (Park et al. 2017). Выделяется 2 окна прозрачности: первое (NIR-I) начинается с 650 нм и заканчивается 950 нм, а второе (NIR-II) входит в диапазон от 1000 до 1700 нм (Jiang et al. 2018).

Применение наночастиц в фототермической терапии

Для точечной доставки фототермических препаратов к раковым клеткам можно использовать средства доставки на основе наноструктур. Наночастицы, загруженные фототермическими препаратами, позволяют доставить большую дозу вещества к раковым клеткам в неизменном виде, чего достаточно трудно достичь при стандартном введении препарата. Благодаря большому разнообразию наночастиц и их методов синтеза, можно инкапсулировать в состав наночастиц соединения, придающие дополнительные свойства наночастицам, такие как визуализирующая способность и дополнительная цитотоксическая модальность за счёт добавления химиотерапевтического препарата. Способность сочетать фототермическую терапию с другими модальностями открывает большие возможности для разработки препаратов и в совокупности можно выделить несколько возможных путей воздействия на раковые клетки (Zou et al. 2016):

- 1) Благодаря большой проникающей способности лазеров с инфракрасным светом, возможно воздействовать на

опухоль и /или метастазы, залегающие на глубине нескольких сантиметров. Нагревание препарата под воздействием облучения будет приводить к гипертермии с последующей гибелью раковых клеток (абляция раковых клеток). Более того, помимо непосредственной гибели клеток в небольших дозах гипертермия способна приводить к подавлению экспрессии генов, связанных с метастазированием

2) Добавление в наночастицы второй модальности – химиотерапевтического препарата, будет приводить к усилению воздействия на раковые клетки и к более эффективной их гибели. К тому же это позволит вызвать гибель тех раковых клеток, на которые не попало облучение или которые залегают достаточно глубоко в опухоли или же в отдалённых сайтах метастазирования

3) Третья возможная модальность – визуализация. Добавление флуоресцентного красителя в наночастицы позволит уточнить расположение опухоли и точнее воздействовать на раковые клетки

На данный момент разрабатывается большое количество препаратов для фототермической терапии, основанных на наночастицах и реализующих все 3 перечисленных стратегии создания нанолекарств (табл. 1).

Таблица 1. Нанолекарства для фототермической терапии (Zou et al. 2016).

Реализуемые функции	Наночастицы
Только фототермическая	Золотые и платиновые наночастицы, аммоний-вольфрамовые нанокубы, ПЕГирированные

терапия	наночастицы из оксида железа, покрытые золотом
Фототермическая терапия + визуализация при помощи магнитно-резонансной томографии (МРТ)	Однослойные и многослойные углеродные нанотрубки, нагруженные оксидами металлов
Фототермическая терапия + визуализация при помощи компьютерной томографии или фотоакустической визуализации	Наностержни из сульфида висмута (Bi_2S_3), наночастицы из оксида вольфрама ($\text{W}_{18}\text{O}_{49}$)
Фототермическая терапия + химиотерапия	Доксорубин: обёрнутые ДНК наностержни, термо- и pH-чувствительные наностержни из золота с покрытием из диоксида кремния Паклитаксел: полимерные наночастицы из человеческого сывороточного альбумина с индоцианиновым зелёным
Фототермическая терапия + радиотерапия	Наночастицы из сульфида меди с изотопом ^{131}I или с изотопом ^{64}Cu

Как можно видеть из приведённой выше таблицы, большинство разрабатываемых препаратов для фототермической терапии основаны на неорганических наночастицах. Несмотря на их высокую способность конвертировать энергию поглощаемого света в нагрев, они также обладают рядом недостатком, включающих токсичность веществ при длительном применении и низкую биосовместимость, сложную или невыясненную химическую структуру (Zheng et al. 2021). Всё вместе это затрудняет их применение в терапии. Потому необходимо

разрабатывать препараты, основанные на биосовместимых и биodeградируемых материалах.

Большое разнообразие биосовместимых органических веществ, поглощающих свет в окне прозрачности биотканей и обладающих точно известной химической структурой было исследовано в качестве препаратов для фототермической терапии. К наиболее распространённым органическим веществам для фототермической терапии относятся цианины, порфирины, родамины, BODIPY и фталоцианины. Среди этих соединений можно выделить фталоцианины как обладающие наиболее выдающимися фотохимическими и спектральными свойствами

Фталоцианин или тетрабензопорфирин – флуоресцентный краситель, обладающий фототермическими свойствами.

Молекула фталоцианина представляет собой гетероцикл (рис. 4) и является высоко сопряжённой системой, за счёт чего обладает высоким уровнем поглощения в первом окне прозрачности биотканей (максимум поглощения в районе 650-700 нм). Так как в области этих длин волн ткани лучше пропускают свет, фталоцианин может быть использован для фототермической терапии на большей глубине залегания в тканях. В то же время у фталоцианина невысокая интенсивность поглощения света с длинами волн, находящимися в области 400-600 нм, что позволяет снизить риски кожной токсичности, индуцированной солнечным светом. Это свойство выгодно отличает фталоцианин от порфиринов, используемых в клинике, чьи максимумы поглощения в основном приходятся на область 400-600 нм, и от BODIPY, имеющих максимум поглощения в районе 500 нм, а потому они могут быть активированы солнечным светом (Cai et

al. 2018).. Кроме того фталоцианин обладает более высоким коэффициентом молярной экстинкции (который является показателем эффективности поглощения) по сравнению с порфиринами: $\epsilon_{\max} > 10^5 \text{ л*моль}^{-1}\text{*см}^{-1}$ у фталоцианина и $\epsilon_{\max} > 10^3 \text{ л*моль}^{-1}\text{*см}^{-1}$ у порфиринов. Молекула фталоцианина отличается высокой термической стабильностью, что позволяет использовать схему многократного облучения лазером (Wong et al. 2019). Существенным недостатком фталоцианина является его гидрофобность, однако применение нанотехнологий позволяет решить эту проблему, благодаря возможности инкапсулировать соединение внутрь наночастиц.

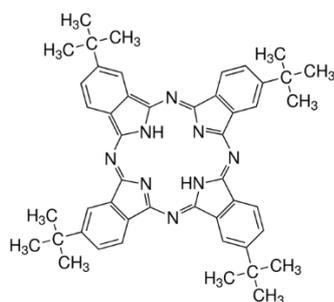


Рисунок 4. Структурная формула молекулы фталоцианина. Взято из <https://www.sigmaaldrich.com>.

Ещё одним важным параметром при реализации фототермической терапии является тип клеточной гибели, которая она индуцирует. В основном, в ходе фототермической терапии клетки гибнут некрозом или апоптозом. Некроз характеризуется потерей целостности плазматической мембраны и высвобождением наружу клеточного содержимого, включая сигналы опасности (DAMP), что в итоге приводит к развитию воспаления. Апоптоз является механизмом запрограммированной клеточной гибели, при котором не происходит нарушения целостности клеточной мембраны, а потому не происходит высвобождение сигналов опасности и воспаление не развивается. При этом на мембране

апоптотических клеток появляются сигналы для фагоцитоза (Martin et al. 2012). Исходя из всего вышесказанного, апоптоз является желательным механизмом клеточной гибели, так как не приводит к развитию нежелательных реакций. На запускаемый механизм клеточной гибели влияет ряд факторов, включающих:

- 1) Мощность используемого лазера. Так, было показано, что при облучении клеток, нагруженных золотыми наночастицами, лазером с длиной волны 1064 нм и мощностью 5 Вт/см² в течение 4 минут преимущественным механизмом гибели клеток был апоптоз, в то время как облучение лазером с той же длиной волны, но мощностью 30 Вт/см² вызывало мгновенную некротическую гибель клеток (Pelaz et al. 2012; Pérez-Hernández et al. 2015).
- 2) Изменение температуры. Так, при повышении температуры до 45 градусов гибель клеток происходит в случае длительного воздействия, в то время как при повышении температуры до 60 градусов и выше наступает быстрая гибель клеток в результате некроза (Chu and Diery 2014).

Таким образом, при подборе препарата для фототермической терапии следует учитывать его спектральные характеристики (входит ли в окно прозрачности биотканей, возможно ли возбуждение солнечным светом), возможную токсичность (насколько вещество биосовместимо и биodeградируемо), а также фототермические свойства (в частности, насколько сильно и быстро происходит нагрев, так как от этого зависит преимущественный тип гибели клеток).

Материалы и методы

Оборудование

Ультразвуковой дезинтегратор Vibra-Cell (Sonics) мощностью 130 Вт; электронный микроскоп MAIA3 (Tescan); микропланшетный анализатор Infinite M100 Pro (Tecan); анализатор Zetasizer Nano (Malvern Instruments); проточный цитометр Accuri C6 (Becton Dickinson); ламинарный шкаф II класса для работы с эукариотическими клетками (NuAire); CO₂-инкубатор MCO-175 (Sanyo); автоматический счётчик клеток Luna-II (Logos Biosystems); центрифуги 5415D, 5430R (Eppendorf); вортекс; лабораторные весы ARA520 и AR 0640 (Ohaus); система очистки воды MilliQ (Merck); система для визуализации IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer); смеситель ротационный RM-1L; ультразвуковая ванна Bandelin Sonorex RK31H; лазер KLM-H808-x-5 с длиной волны 808 нм мощностью 1.2 Вт/см²; термопара на основе Arduino.

Реактивы

Поли-лактид-ко-гликолид, PLGA (лактид:гликолид 50:50, карбокси- и гидроксигидрокси-терминированный, 25 кДа, Sigma); 2,9,16,23-тетра-tert-бутил-29H,31H-фталоцианин (Sigma-Aldrich); [9-(диэтиламино)бензо[а]феноксазин-5-илиден]азана сульфат (Nile blue, Sigma); Метотрексат-Эбеве (Эбеве Фарма Гес.м.б.Х.Нфг.КГ); Оксалиплатин медак (Онкотек Фарма Продакшн ГмбХ/ медак ГмбХ); Эндоксан (Baxter); Кампто® ЦС

(Pfizer); Гидреа® (Bristol-Myers Squibb); Герцептин® Трастузумаб (Ф.Хоффманн-Ля Рош Лтд, Швейцария); хлороформ; спирт поливиниловый (PVA, Mowiol® 4-88, Sigma); лактат олигосахарид хитозана (5 кДа, Sigma); среда для культивирования клеток DMEM medium (HyClone); бычий сывороточный альбумин; раствор Версена (ПанЭко, Россия); фетальная бычья сыворотка (HyClone); 3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолия бромид (МТТ, ПанЭко); L-глутамин (ПанЭко); раствор пенициллин-стрептомицина (ПанЭко,); флуоресцеин изотиоцианат (FITC); диметилсульфоксид; трипановый синий.

Синтез наночастиц

Наночастицы были синтезированы методом двойной эмульсии «вода-масло-вода» с последующим испарением растворителя, как описано нами ранее со следующими изменениями (Shipunova et al. 2020). Первая эмульсия была приготовлена добавлением к 400 мкл раствора, содержащего 300 мкл 20 г/л PLGA, 50 мкл фталоцианина в концентрациях 20 г/л или 7 г/л и 50 мкл нильского голубого в концентрациях 1.5, 1 или 0.5 г/л в хлороформе, 150 мкл водного раствора химиотерапевтического препарата (Кампто ЦС, Гидреа, Метатрексат, Эндоксан, Оксалиплатин). После этого смесь обрабатывали ультразвуком 1 минуту при амплитуде 40% и 1 минуту при амплитуде 60% на ультразвуковом дезинтеграторе мощностью 130 Вт (Sonics) при +4 °С. Вторая эмульсия была приготовлена добавлением первой эмульсии к 8 мл раствора, содержащего 3 мл 3% поливинилового спирта в натрий-фосфатном буфере (PBS), 5 мл 1% бычьего сывороточного альбумина в PBS, 90 мкл олигосахарид хитозан лактата в концентрации 10 г/л, 200 мкл

Трастузумаба в концентрации 1 г/л в PBS с последующей обработкой ультразвуком в течение 1 минуты при амплитуде 40% и в течение 1 минуты при амплитуде 60% на ультразвуковом при +4 °С. После чего полученную смесь встряхивали в течение ночи при комнатной температуре для испарения хлороформа. Полученный раствор трижды центрифугировали для выделения наночастиц, и осадок растворяли в 900 мкл PBS. Конечную концентрацию наночастиц определяли высушиванием при +60 °С с последующим взвешиванием осадка.

Электронная микроскопия

Электронные фотографии наночастиц были получены с помощью сканирующего электронного микроскопа MAIA3 (Tescan) при ускоряющем напряжении 5 кВ. Образцы наночастиц были нанесены на кремниевую подложку с последующим высушиванием на воздухе. Готовые изображения были обработаны с использованием программного обеспечения ImageJ для вычисления размера наночастиц.

Флуоресцентная спектроскопия

Спектры возбуждения и эмиссии наночастиц были получены с использованием микропланшетного анализатора Infinite M100 Pro (Tecan). Раствор наночастиц в концентрации 10 мг/л помещали в 96-луночные планшеты с плоским дном. Спектры возбуждения наночастиц были получены в диапазоне 350–675 нм при длине волны эмиссии 700 нм и с коэффициентом усиления 170. Спектры эмиссии получали в диапазоне 575–850

нм при длине волны возбуждения 550 нм и с коэффициентом усиления 200.

Исследование фототермических свойств наночастиц

Изучение фототермических свойств наночастиц происходило при непрерывном измерении температуры 900 мкл раствора, содержащего частицы в концентрации 10 г/л в PBS в течение 10 минут. Облучение наночастиц происходило с использованием лазера с длиной волны 808 нм и мощностью 1.2 Вт/см². Заносили показания температуры за 0, 15, 30, 60 секунд после включения лазера, а затем за каждые последующие 30 секунд.

Измерение гидродинамического и электрофоретического рассеяния света

Гидродинамический размер наночастиц был определён с использованием анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd) в PBS буфере при 25 °С.

Дзета-потенциал наночастиц был измерен с помощью Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd) в 10 мМ KNO₃ при 25 °С.

Все измерения были выполнены трижды.

Условия культивирования клеточных линий

Клеточные линии культивировали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, пенициллина-стрептомицина и 2 мМ L-глутамин (ПанЭко) во влажной атмосфере с 5% CO₂ при 37 °С. Клетки пересеивали при достижении 80-90% монослоя. Для снятия клеток с поверхности культурального пластика использовали раствор Версена, представляющий собой раствор PBS с добавлением 2 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), без трипсина, чтобы избежать повреждения клеточных рецепторов.

Клеточные линии поддерживали в культуре не более 2 месяцев, после чего заменяли на свежие клеточные линии из криохранилища.

Длительное хранение клеток осуществлялось с использованием диметилсульфоксида (ДМСО) в качестве криоконсерванта (в составе 70% DMEM, 20% FBS, 10% ДМСО) в криопробирках при -150 °С.

Подсчёт клеток производили при помощи автоматического счётчика клеток Luna-II (Logos Biosystems). Для этого к 20 мкл клеточной суспензии добавляли 20 мкл 0,4% трипанового синего, который окрашивает только мёртвые клетки. Раствор пипетировали и добавляли на слайды для автоматического счётчика клеток.

Проточная цитометрия

Для определения специфичности полученных частиц суспензию клеток промывали в PBS, ресуспендировали в 300 мкл PBS 20% FBS в концентрации 10^6 клеток на мл. К клеткам добавляли 50 мкл частиц в PBS 20% FBS в различных концентрациях с последующей отмывкой от не связавшихся частиц центрифугированием и анализировали на проточном цитометре BD Accuri C6 (BD) в канале FL4 (лазер возбуждения – 644 нм, эмиссионный фильтр – 675/25 нм).

MTT тест

Для оценки цитотоксичности химиотерапевтических препаратов использовали MTT тест. Для этого в лунки 96-луночного планшета высевали клетки в концентрации 2500 клеток на лунку в 100 мкл среды DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, пенициллина-стрептомицина и 2 mM L-глутамин (далее – DMEM full) и

инкубировали ночь во влажной атмосфере с 5% CO₂ при 37 °С. На следующий день к клеткам добавляли химиотерапевтический препараты в различных концентрациях в 100 мкл среды DMEM full. После этого клетки инкубировали в течение 48 часов. После этого среду из планшетов удаляли, а к клеткам добавляли 100 мкл 0.5 г/л раствора МТТ, инкубировали 2 часа в инкубаторе при 37 °С. Затем раствор удаляли и в лунки добавляли 100 мкл ДМСО с последующим аккуратным встряхиванием планшета для полного растворения кристаллов формазана. Оптическая плотность полученной жидкости анализировалась на планшетном анализаторе Infinite M1000 Pro (Tecan) при длине волны 570 нм.

Для оценки цитотоксичности полученных наночастиц к клеткам в концентрации 10⁶ клеток на мл в 200 мкл PBS 20% FBS добавляли 50 мкл частиц в различных концентрациях. Затем клетки инкубировали в течение 15 минут и отмывали от не связавшихся частиц центрифугированием. Клетки ресуспендировали в 100 мкл PBS и инкубировали в течение 1 часа во влажной атмосфере с 5% CO₂ при 37 °С в инкубаторе. Облучение клеток происходило в пробирках на 1500 мкл в термостате при 33 °С. Для облучения клеток использовали лазер с длиной волны 808 нм и мощностью 1.2 Вт/см². После облучения клетки переносили в среду DMEM full для достижения концентрации 12500 кл/мл. В 96-луночный планшет добавляли по 200 мкл суспензии, таким образом в лунку попадало 2500 клеток. Клетки инкубировали в течение 48 часов. Через 48 часов жизнеспособность клеток оценивали МТТ тестом, как было описано выше.

Исследование биораспределения наночастиц

Самки бестимусных мышей BALB/c Nude были получены из вивария в Пущино и содержались в виварии Института биоорганической химии (ИБХ РАН). Все процедуры были одобрены Институтом по уходу и использованию животных ИБХ РАН. Самке подкожно вводили 10^7 раковых клеток BT-474 NanoLuc со сверхэкспрессией рецептора HER2. Когда объем опухоли BT-474 достиг 900 мм³, мыши внутрибрюшинно вводили 200 мкг наночастиц в 200 мкл PBS. Распределение наночастиц анализировали при помощи системы визуализации IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer, США) с использованием следующих фильтров возбуждения: 570, 590, 610, 630, 650, 670, 690, 710 нм и фильтров эмиссии: 640, 660, 680, 700, 720, 740. Животных анестезировали с использованием газовой анестезии – 1.5% изофлурана в смеси с кислородом. Для визуализации локализации опухолевых клеток мыши вводили 7 мкг фуримазина в 100 мкл PBS путем внутрибрюшинной инъекции, и через 20 мин биолюминесценцию опухоли мышей визуализировали с помощью IVIS Spectrum CT.

Результаты

Синтез наночастиц

Как было отмечено в обзоре литературы, полимерные наночастицы обладают рядом преимуществ, включающих высокую биосовместимость и биodeградируемость, большую эффективность инкапсулирования веществ, что важно для последующего применения *in vivo*. В качестве материала для синтеза наночастиц был выбран поли-лактид-ко-гликолид – полностью биосовместимый полимер, разлагающийся до молочной и гликолевых кислот, которые присутствуют в нормальных клетках, а потому полностью утилизируются организмом.

Наночастицы были загружены фталоцианином (Pht) – веществом с фототермическими свойствами, поглощающем в первом окне прозрачности биотканей в районе 650-750 нм.

Для усиления цитотоксических свойств наночастиц в их состав был добавлен химиотерапевтический препарат иринотекан (Кампто® ЦС), являющийся ингибитором топоизомеразы I и вызывающий гибель клеток по механизму апоптоза.

Для придания наночастицам специфичности и для реализации адресной доставки в состав частиц было добавлено моноклональное антитело Трастузумаб к рецептору HER2, сверхэкспрессия которого встречается при различных типах рака и ассоциирована с неблагоприятным прогнозом.

Для придания наночастицам визуализирующих свойств был использован флуоресцентный краситель нильский голубой. Нильский голубой ([9- (диэтиламино) бензо [a] феноксазин-5-илиден] азана сульфат, Nile blue, Nile blue A, NB) – краситель из семейства бензофеноксазинов, обладающий высокой интенсивностью флуоресценции, высоким квантовым выходом и фотостабильностью. Максимум возбуждения красителя в ДМСО составляет 636 нм, а эмиссии – 669 нм (Martinez and Henary 2016). Таким образом, по своим оптическим свойствам нильский голубой является перспективным для диагностического использования, так как максимум эмиссии красителя входит в окно прозрачности биотканей.

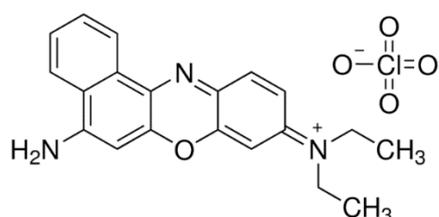


Рисунок 5. Структурная формула молекулы нильского голубого перхлората. Взято из <https://www.sigmaaldrich.com>.

Ввиду своего липофильного строения, нильский голубой нашёл применение в гистологии для окрашивания лизосом и липидов

in vitro. Некоторые исследования продемонстрировали способность красителя накапливаться в опухолевых клетках (Lin et al. 1991) и даже вызывать замедление роста опухоли (LEWIS et al. 1946; LEWIS et al. 1949). Исследования предыдущих лет показали небольшую токсичность красителя для клеток, причём как самого по себе, так и при облучении клеток с красителем лазером с длиной волны 630 нм. Однако имеющиеся на данный момент данные неполные и ограничиваются лишь несколькими небольшими исследованиями (Fowler et al. 1990; Cincotta et al. 1987). Наночастицы получали методом двойной эмульсии «вода-масло-вода» (рис. 6): водорастворимый иринотекан включали в водную фазу, в то время как водонерастворимые PLGA, Pht и NB включали в масляную фазу.

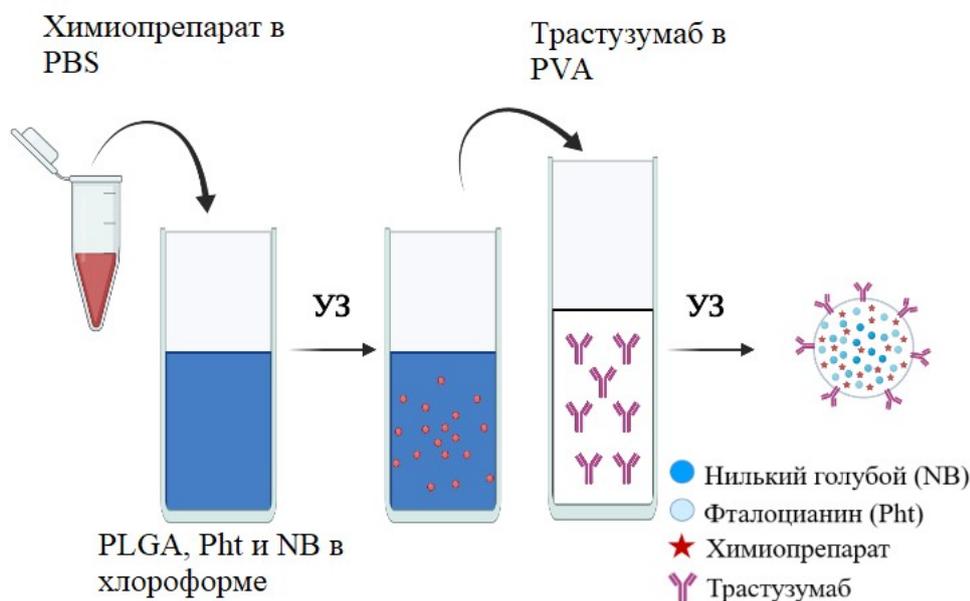


Рисунок 6. Схема синтеза наночастиц и схематическое изображение полученных наночастиц

Было получено 6 наночастиц с различными концентрациями Pht и NB при синтезе (табл. 2).

Таблица 2. Концентрации фталоцианина и нильского голубого, используемые при синтезе наночастиц.

Название частицы	Концентрация Pht, г/л	Концентрация NB, г/л
1	20	1.5
2	20	1
3	20	0.5
4	7	1.5
5	7	1
6	7	0.5

Спектральные характеристики наночастиц

Спектральные характеристики полученных наночастиц исследовали на микропланшетном анализаторе Infinite M100 Pro. Были получены спектры возбуждения наночастиц в диапазоне от 350 до 675 нм при длине волны эмиссии 700 нм (рис. 7). Форма спектра возбуждения у различных наночастиц была сходной, но различалась интенсивностью флуоресценции. При заданных параметрах наиболее интенсивной флуоресценцией обладали 1 (концентрация фталоцианина и нильского голубого при синтезе 20 г/л и 1.5 г/л соответственно), 4 и 5 (концентрация фталоцианина 7 г/л и нильского голубого при синтезе 1.5 и 1 г/л соответственно) частицы, при этом максимальная флуоресценция наблюдалась при длине волны возбуждения около 650 нм. Как и обсуждалось в обзоре литературы, эта длина волны входит в окно прозрачности биотканей, что позволяет облучать наночастицы, расположенные на большей глубине. К тому же при длинах волн 400-600 нм наблюдается меньшее возбуждение, что важно для минимизации индуцированной светом кожной токсичности.

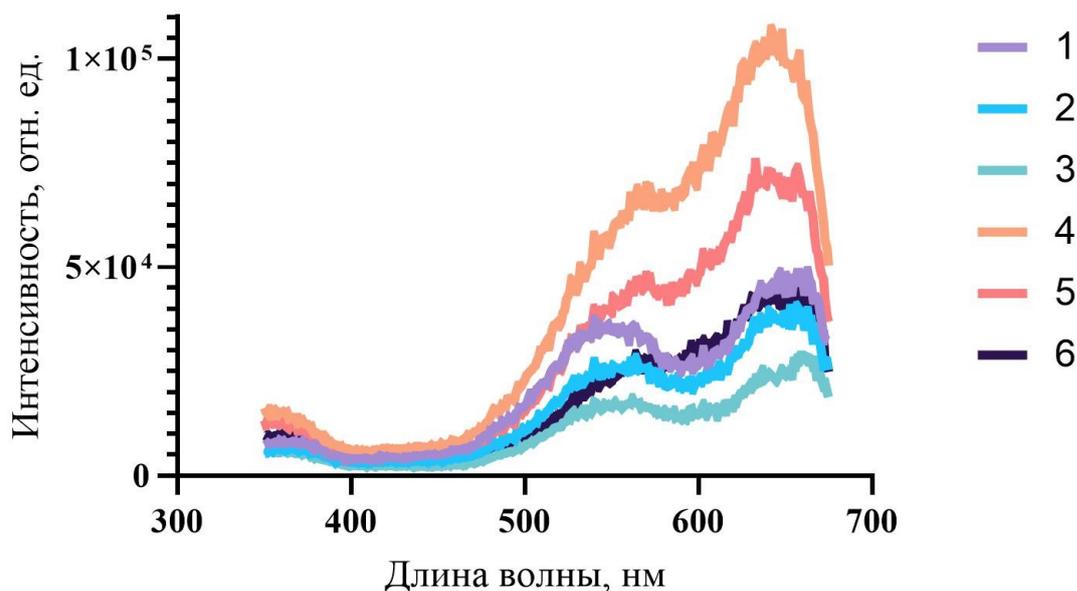


Рисунок 7. Спектры возбуждения наночастиц, полученные с использованием микропланшетного анализатора Infinite M100 Pro. По оси x отложены длины волн возбуждения, по оси y – интенсивность флуоресценции в относительных единицах.

Затем были получены спектры эмиссии наночастиц в диапазоне от 575 до 850 нм при длине волны возбуждения 550 нм (рис. 8). Форма спектра эмиссии у наночастиц была сходной, но различалась интенсивностью флуоресценции. При заданных параметрах наиболее интенсивной флуоресценцией обладали 1 (концентрация фталоцианина и нильского голубого при синтезе 20 г/л и 1.5 г/л соответственно), 4 и 5 (концентрация фталоцианина 7 г/л и нильского голубого при синтезе 1.5 и 1 г/л соответственно) частицы, при этом максимальная интенсивность флуоресценции наблюдалась при длине волны эмиссии около 680 нм. Так как данная длина волны входит в окно прозрачности биотканей, это открывает большие возможности для применения полученных наночастиц могут для визуализации опухолевых клеток.

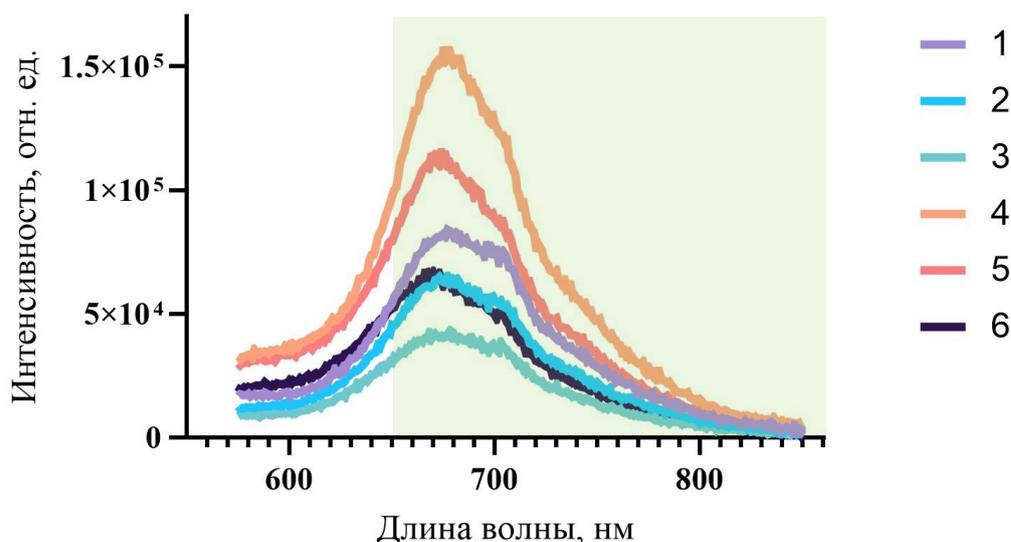


Рисунок 8. Спектры эмиссии наночастиц, полученные с использованием микропланшетного анализатора Infinite M100 Pro. По оси x отложены длины волн эмиссии, по оси y - интенсивность флуоресценции в относительных единицах. Зелёным обозначена зона окна прозрачности биотканей.

Фототермические свойства наночастиц

Фототермические свойства наночастиц исследовали при облучении раствора наночастиц в PBS лазером с длиной волны 808 нм в течение 10 минут (рис. 9).

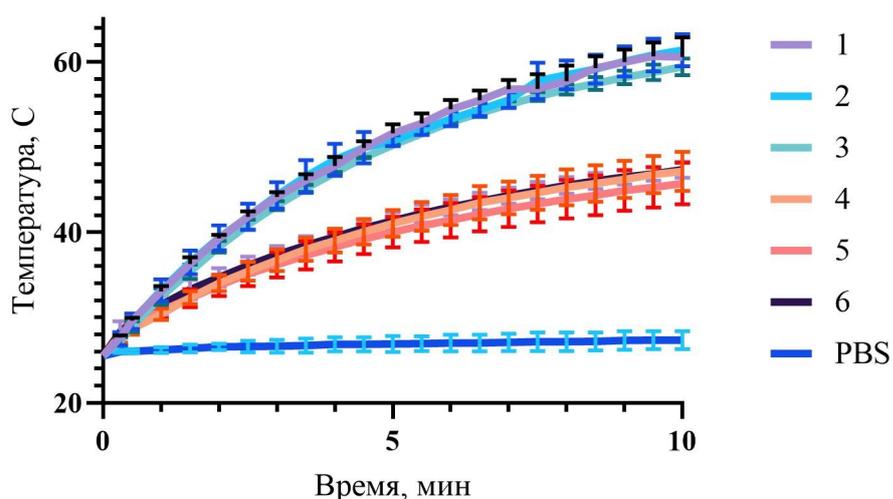


Рисунок 9. Динамика изменения температуры раствора, содержащего наночастицы при облучении лазером с длиной волны 808 нм, показано среднее при $n=3$.

Как видно из графика, по фототермическим свойствам выделялось 2 группы наночастиц – сильнее всего грелись (на 35 градусов за 10 минут, в среднем 3.5 градуса в минуту) 1, 2 и 3 наночастицы, содержащие наибольшее количество фталоцианина (20 г/л при синтезе), но разные концентрации нильского голубого, во вторую группу с меньшим нагревом (22 градуса за 10 минут, в среднем 2.2 градуса в минуту) входили наночастицы 4, 5 и 6, содержащие меньшее количество фталоцианина (7 г/л при синтезе), при этом концентрация нильского голубого практически не влияла на фототермические свойства частиц. При этом основной нагрев наночастиц происходил в первые 5 минут, после чего происходило замедление нагрева частиц с постепенным выходом на плато. При облучении PBS в течение 10 минут его температура изменялась в среднем на 2 градуса, таким образом, регистрируемое изменение температуры раствора вызвано наличием в нём наночастиц.

Для дальнейших экспериментов мы выбрали 1 наночастицы (концентрация фталоцианина и нильского голубого при синтезе 20 г/л и 1.5 г/л соответственно), так как они обладали наиболее интенсивными фототермическими свойствами и наиболее подходящими спектральными характеристиками.

Затем мы сравнивали фототермические свойства наночастиц, содержащих 1) и фталоцианин, и нильский голубой; 2) только фталоцианин; 3) только нильский голубой; 4) и не содержащих флуоресцентные красители (рис.10) при облучении лазером в течение 10 мин.

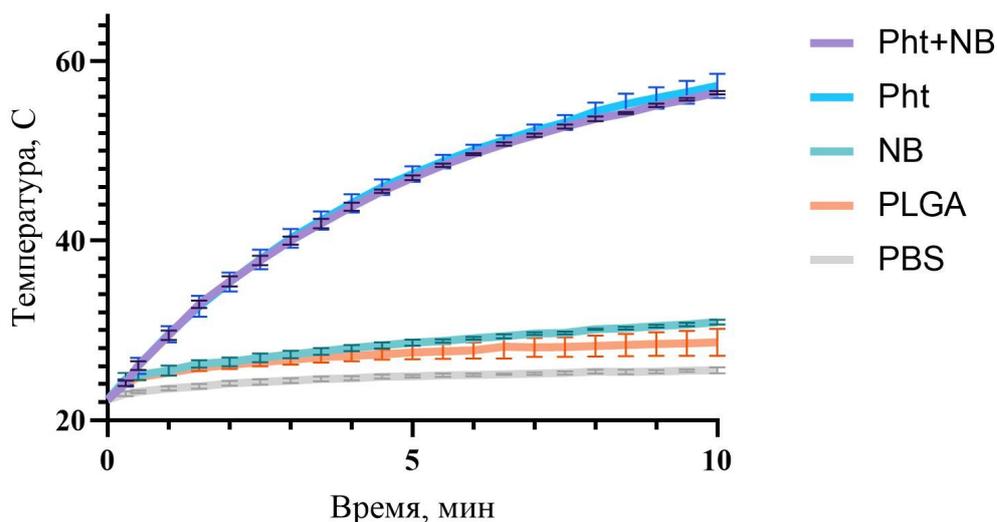


Рисунок 10. Динамика изменения температуры раствора, содержащего наночастицы при облучении лазером с длиной волны 808 нм, показано среднее и стандартные отклонения при $n=3$.

Частицы, содержащие только фталоцианин (Pht) или фталоцианин в комбинации с нильским голубым (Pht+NB) грелись сильнее всего и с одинаковой интенсивностью, что можно объяснить наличием выраженных фототермических свойств только у фталоцианина. В предыдущем эксперименте уже было продемонстрировано, что концентрация нильского голубого оказывает минимальное влияние на нагрев наночастиц. Это подтвердилось и в этом эксперименте, так как наночастицы, содержащие фталоцианин, с нильским голубым и без него грелись в одинаковой степени (35 градусов за 10 минут, рис. 10). Наночастицы, содержащие только нильский голубой (NB) и не содержащие красителей (PLGA), практически не грелись под воздействием лазера (8.6 и 6.4 градуса за 10 минут) и были ближе к изменению температуры PBS (3.2 градуса за 10 минут), чем наночастиц с фталоцианином (35 градусов), так как ни нильский голубой, ни поли-лактид-ко-гликоlid не обладают выраженными фототермическими свойствами.

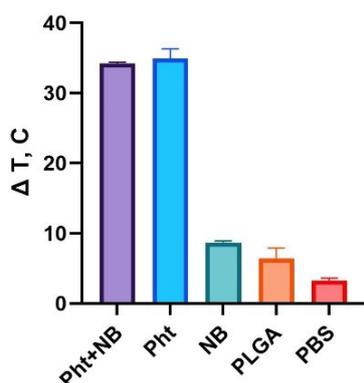


Рисунок 11. Изменение температуры раствора, содержащего наночастицы при облучении лазером с длиной волны 808 нм, показано среднее и стандартные отклонения при n=3.

Также мы исследовали влияние количества облучений на фототермические свойства наночастиц. Для этого одни и те же частицы мы облучали трижды при остывании до комнатной температуры после предыдущего облучения. При трёхкратном облучении наночастицы сохраняли свои фототермические свойства.

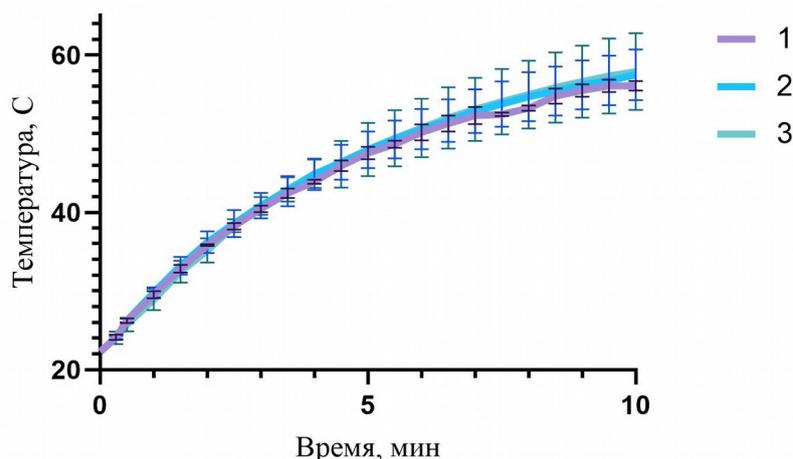


Рисунок 11. Изменение температуры раствора, содержащего наночастицы при последовательном облучении лазером с длиной волны 808 нм, показано среднее и стандартные отклонения при n=3. Разными цветами показаны последовательные облучения.

Таким образом, мы подобрали наиболее оптимальные концентрации красителей при синтезе наночастиц, при

которых наночастицы обладали наиболее выраженными фототермическими свойствами и наиболее подходящими параметрами флуоресценции, а также продемонстрировали стабильность фототермических свойств наночастиц при независимых синтезах и многократном нагревании.

Характеристика наночастиц

Методом динамического рассеяния света было получено распределение наночастиц по размерам (рис. 12), средний размер наночастиц составлял 296 ± 100 нм, что входит в допустимое окно размера наночастиц, способных проходить через поры в сосудах опухоли.

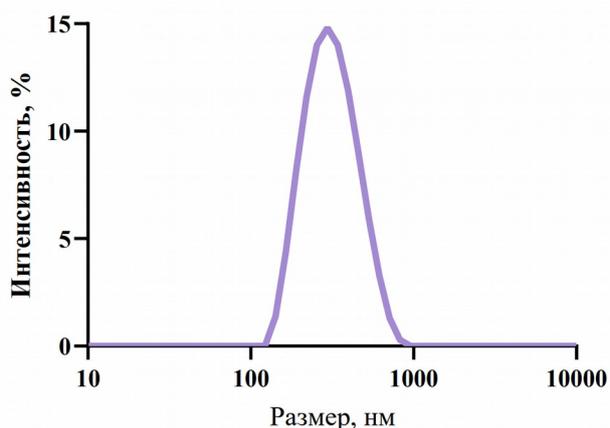


Рисунок 12. $n=3$ Распределение наночастиц по размеру, полученное методом динамического рассеяния света.

Методом электрофоретического рассеяния света был получен дзета-потенциал частиц, являющийся характеристикой поверхностного заряда. Для наночастиц, в синтезе которых не использовался Трастузумаб, дзета-потенциал составлял -1.79 мВ. Отрицательный заряд поверхности наночастиц можно объяснить наличием отрицательно заряженного бычьего сывороточного альбумина на поверхности. При добавлении в синтез положительно заряженного Трастузумаба размер дзета-

потенциала становился менее отрицательным и составлял -1.1 мВ.

Морфологию полученных наночастиц изучали методом сканирующей электронной микроскопии (МАІА3, Tescan) при ускоряющем напряжении 15 кВ с помощью встроенного детектора вторичных электронов. Наночастицы представляли собой моодисперсные структуры с формой, близкой к сферической (рис. 13). Полученные изображения обрабатывали в программе Image J для вычисления среднего размера наночастиц. Для наночастиц, в синтезе которых не использовался Трастузумаб, средний размер наночастиц составлял 233 ± 40 нм. Средний размер наночастиц с Трастузумабом (PLGA*Trast) составлял 233 ± 60 нм, что несколько меньше, чем размер наночастиц, полученный методом динамического светорассеивания.

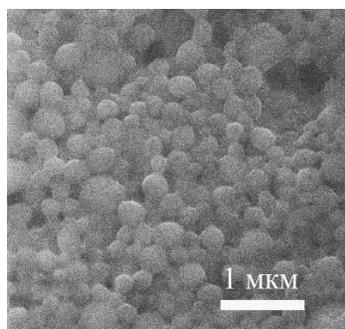


Рис 13. Микрофотография наночастиц с Тратузумабом, полученная методом сканирующей электронной микроскопии.

Изучение специфичности полученных наночастиц

Чтобы оценить специфичность полученных наночастиц, мы исследовали их взаимодействие с клеточными линиями с различным уровнем экспрессии рецептора HER2:

- Клеточные линии со сверхэкспрессией рецептора HER2 (около 10^5 - 10^6 рецепторов на клетку): SK-BR-3 клетки аденокарциномы молочной железы человека; SKOV3-1ip

клетки аденокарциномы яичника человека; BT-474 клетки протоковой карциномы молочной железы;

- Клеточные линии с нормальным уровнем экспрессии HER2 (около 10^4 рецепторов на клетку): A549 клетки аденокарциномы лёгкого человека; MDA-MB-231 клетки, полученные из метастазов аденокарциномы молочной железы;
- Клеточная линия, не экспрессирующая рецептор HER2: CHO – клетки яичника китайского хомяка.

Экспрессия рецептора HER2 на всех клеточных линиях была подтверждена методом проточной цитометрии путём мечения клеток полноразмерным антителом Трастузумаб, меченным флуоресцентной молекулой FITC. Был рассчитан индекс окрашивания для клеточных линий с различным уровнем экспрессии рецептора HER2 и он составлял: 14.4 для BT-474, 28.2 для SK-BR-3, 56.8 для SK-OV-1ip (клеточные линии со сверхэкспрессией рецептора HER2), 0.1 для MDA-MB-231, 1.6 для A549 (клеточные линии с нормальным уровнем экспрессии рецептора) и 0 для CHO (клетки не экспрессирующие рецептор HER2).

Затем клетки метили наночастицами с Трастузумабом в различной концентрации и оценивали эффективность мечения с помощью проточной цитометрии (рис. 14).

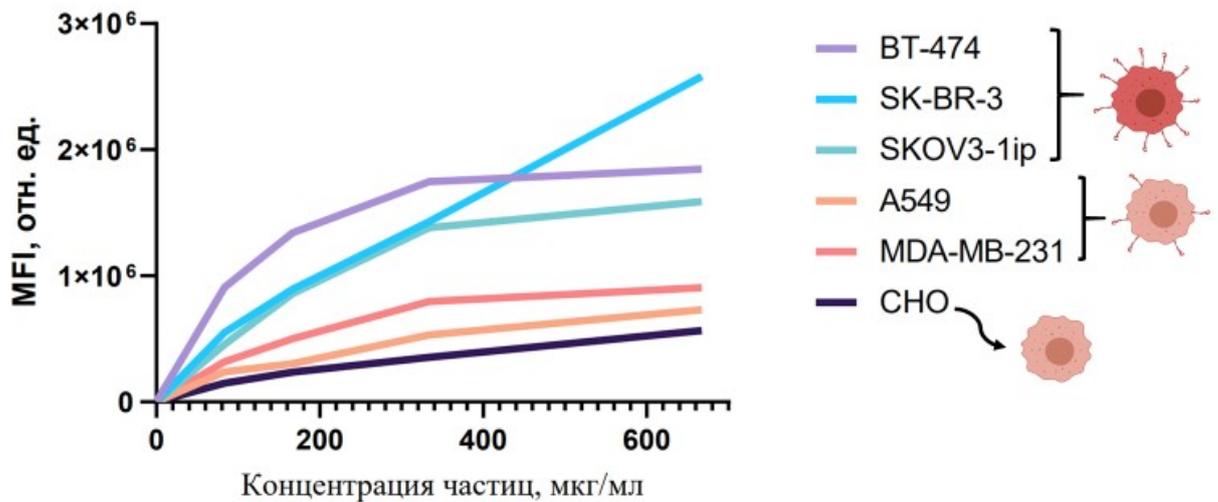


Рисунок 14. Результаты проточной цитометрии, показывающие эффективность меченя клеточных линий с различным уровнем экспрессии рецептора HER2 PLGA наночастицами с Трастузумабом, n=2.

Как видно из рисунка, эффективнее всего наночастицы связывались с клеточными линиями со сверхэкспрессией рецептора HER2 (SK-BR-3, SKOV3-1ip, BT-474). С увеличением концентрации частиц сначала шёл рост числа связавшихся наночастиц, но постепенно он замедлялся и выходил на плато (кроме линии SK-BR-3, для которой продолжался рост). Взаимодействие наночастиц с клетками с нормальным уровнем экспрессии рецептора (MDA-MB-231, A549) или без экспрессии рецептора (CHO) было менее выраженным. Мечение BT-474, сверхэкспрессирующей рецептор HER2, наночастицами было в 32 раза более эффективным, чем CHO клеток не экспрессирующих данный рецептор, и в 4 раза более эффективным, чем MDA-MB-231 клеток с нормальным уровнем экспрессии рецептора.

Таким образом, были получены наночастицы, содержащие на поверхности антитело к рецептору HER2, эффективно

связывающиеся с клеточными линиями со сверхэкспрессией данного рецептора.

Изучение цитотоксичности полученных наночастиц

Первым шагом был осуществлён подбор наиболее оптимального химиотерапевтического препарата, обладающей наибольшей цитотоксичностью для клеточных линий, используемых в эксперименте. Для этого мы провели эксперимент на BT-474 клетках со сверхэкспрессией рецептора HER2 (рис. 15). Для тестирования были выбраны водорастворимые химиотерапевтические препараты с различными механизмами действия на клетки:

- Метотрексат – цитотоксический препарат, являющийся ингибитором дигидрофолатредуктазы, играющей важную роль в метаболизме фолиевой кислоты (Cronstein 1997);
- Гидроксикарбамид (Гидреа, гидроксимочевина) – цитотоксический препарат, ингибирующий рибонуклеотидредуктазу и подавляющий синтез ДНК (Gwilt and Tracewell 1998);
- Иринотекан (Кампто ЦС) – цитотоксический препарат, являющийся ингибитором топоизомеразы I и вызывающий гибель клеток посредством апоптоза (Bailly 2019);
- Циклофосфамид (Эндоксан) – цитотоксический препарат, алкилирующий агент, вызывающий образование внутрицепочных и межцепочных сшивок в ДНК (Emadi et al. 2009);
- Оксалиплатин – цитотоксический препарат, алкилирующий агент, вызывающий образование внутрицепочных и межцепочных сшивок в ДНК и приводящий к индукции апоптоза (Graham et al. 2004).

Анализ цитотоксичности проводился методом МТТ теста. Он основан на оценке жизнеспособности клеток по их способности восстанавливать МТТ тетразолиевый краситель (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид) до нерастворимого формазана при помощи НАДФ-Н-зависимых клеточных оксидоредуктаз.

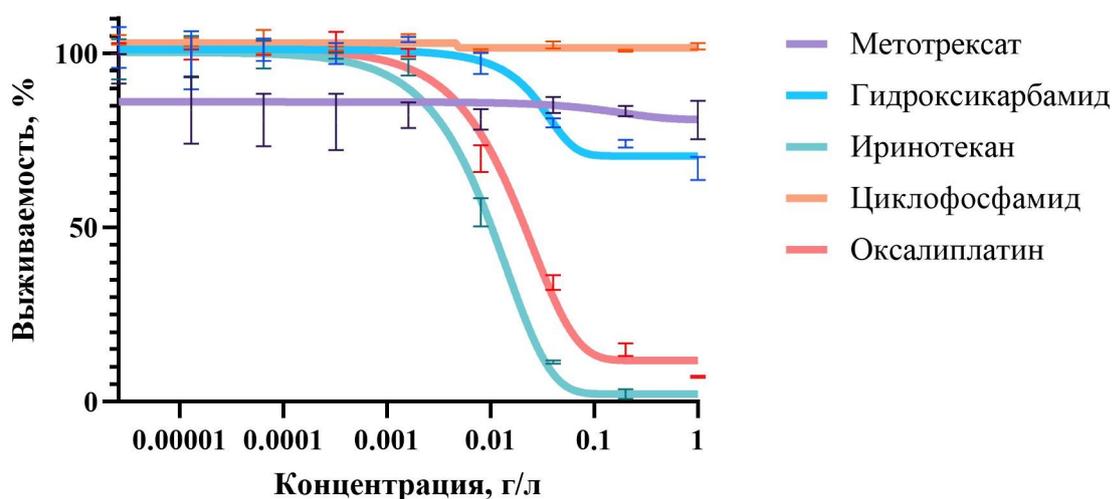


Рисунок 15. Цитотоксичность химиотерапевтических препаратов для клеточной линии ВТ-474, измеренная МТТ тестом, n=3

Цитотоксичность выбранных химиотерапевтических препаратов для клеточной линии ВТ-474 различалась, и была наибольшей в случае с иринотеканом и оксалиплатином. В то время как ВТ-474 были не чувствительны к циклофосфамиду и мало чувствительны к гидроксикарбамиду и метотрексату. Следующим шагом мы измерили цитотоксичность для клеточной линии ВТ-474 тех же химиотерапевтических препаратов, но инкапсулированных в состав PLGA наночастиц

(рис. 16). Наночастицы были синтезированы методом двойной эмульсии, но не содержали Трастузумаба, то есть были не адресными.

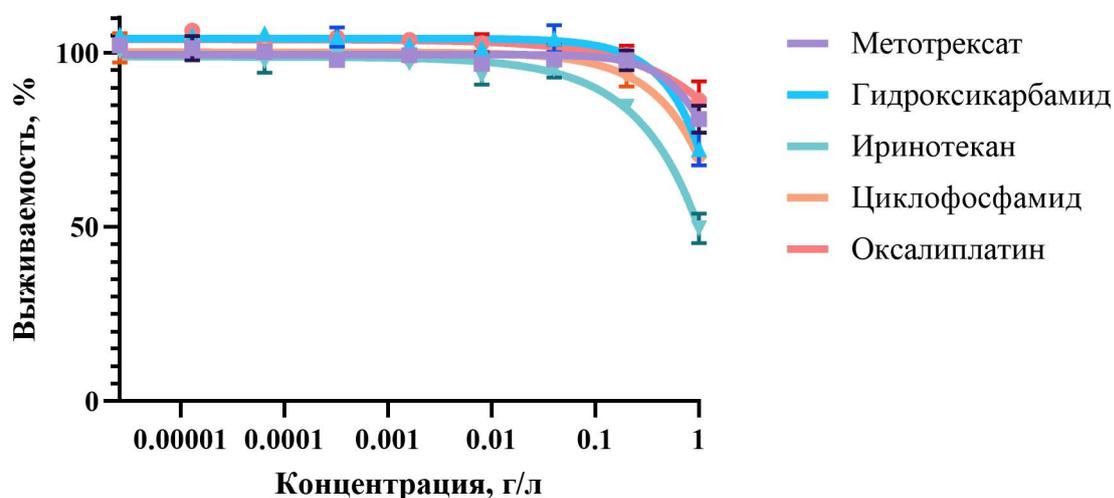


Рисунок 16. Цитотоксичность химиотерапевтических препаратов, инкапсулированных в состав наночастиц, для клеточной линии BT-474, измеренная МТТ тестом, n=3

Наибольшей цитотоксичностью для клеток обладали наночастицы, нагруженные иринотеканом, в то время как наночастицы с оксалиплатином были менее цитотоксичными и обладал примерно одинаковой цитотоксичностью с циклофосфамидом, гидроксикарбамидом и метотрексатом. Одним из объяснений может быть различная степень эффективности инкапсулирования иринотекана и оксалиплатина. Вероятно, оксалиплатин хуже входил в состав наночастиц, а потому его концентрация была недостаточной для проявления цитотоксических свойств.

По совокупности этих двух экспериментов для дальнейшей работы мы выбрали иринотекан, который обладал наибольшей цитотоксичностью, как сам по себе, так и в составе наночастиц. Затем мы проверили цитотоксичность иринотекана для клеточных линий с различным уровнем экспрессии рецептора HER2 (рис. 17).

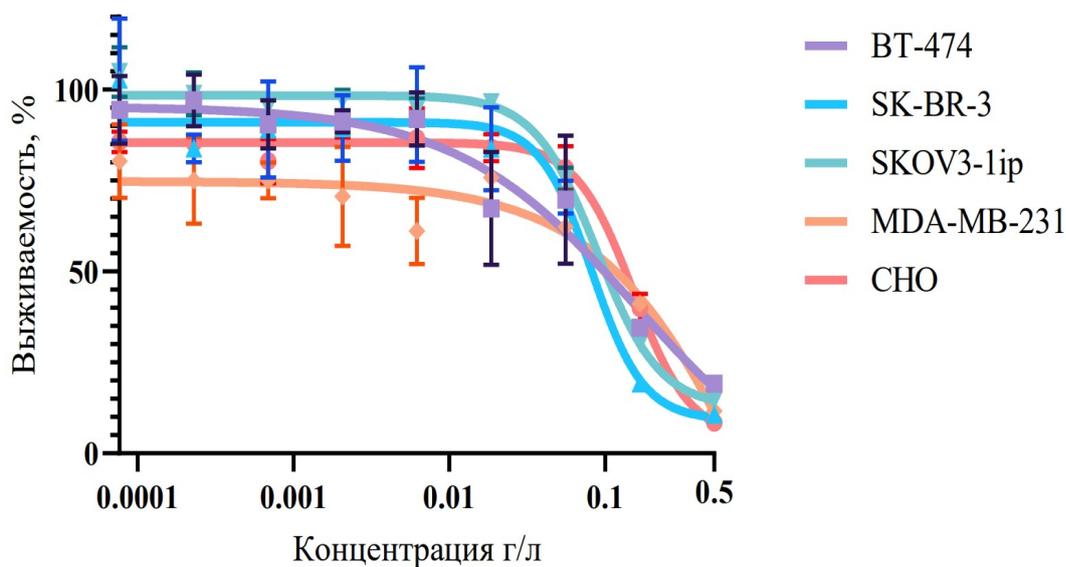


Рисунок 17. Цитотоксичность иринотекана для клеточных линий с различным уровнем экспрессии рецептора HER2, измеренная МТТ тестом, n=3.

По результатам эксперимента все клеточные линии обладали сходной чувствительностью к иринотекану (IC50 для всех клеточных линий находился в районе 100-150 мкг/мл), а значит их дальнейшее сравнение между собой правомерно.

Затем мы проверили цитотоксичность адресных наночастиц при для клеточных линий с различным уровнем экспрессии рецептора HER2 (рис. 18).

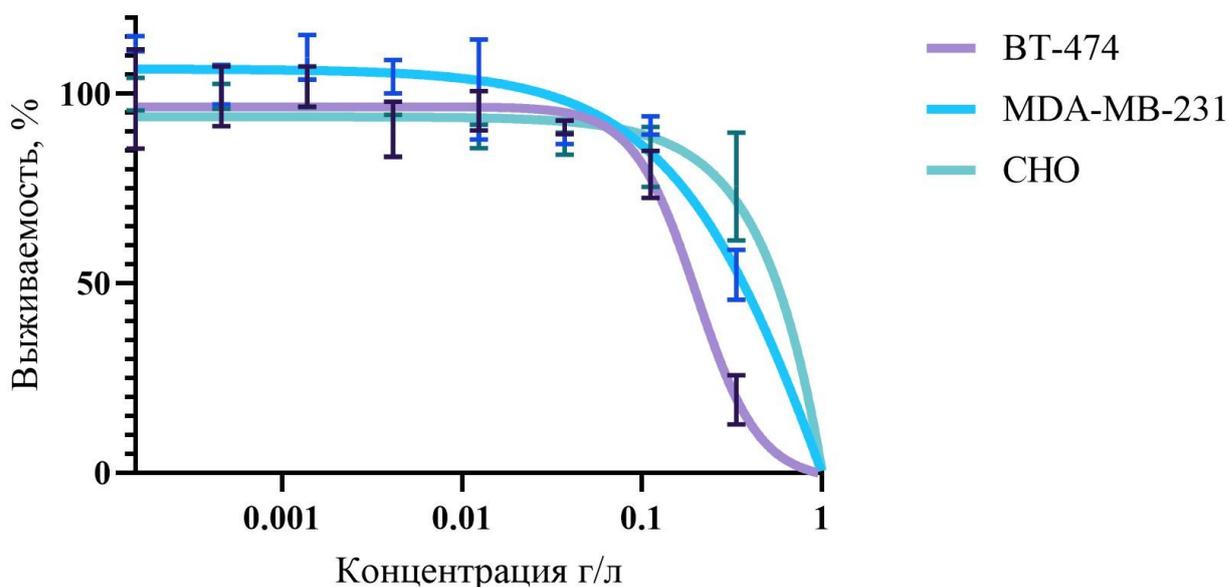


Рисунок 18. Анализ цитотоксичности наночастиц для клеточных линий с различным уровнем экспрессии рецептора HER2 с помощью МТТ теста, n = 8.

Как видно из графика, цитотоксичность наночастиц для клеток зависела от уровня экспрессии на них рецептора HER2: в наибольшей степени наночастицы вызывали гибель клеток со сверхэкспрессией рецептора (BT-474) и в меньшей степени клеток с нормальным уровнем экспрессии рецептора (MDA-MB-231) или не экспрессирующих его (CHO). IC50 для BT-474 составлял 200 мкг/мл.

Затем мы исследовали влияние облучения клеток с наночастицами на цитотоксичность (рис. 19). Для этого BT-474 клетки со сверхэкспрессией рецептора HER2 инкубировали с наночастицами в 2 различных концентрациях, отмывали от частиц центрифугированием и облучали на термостате при 33 °С.

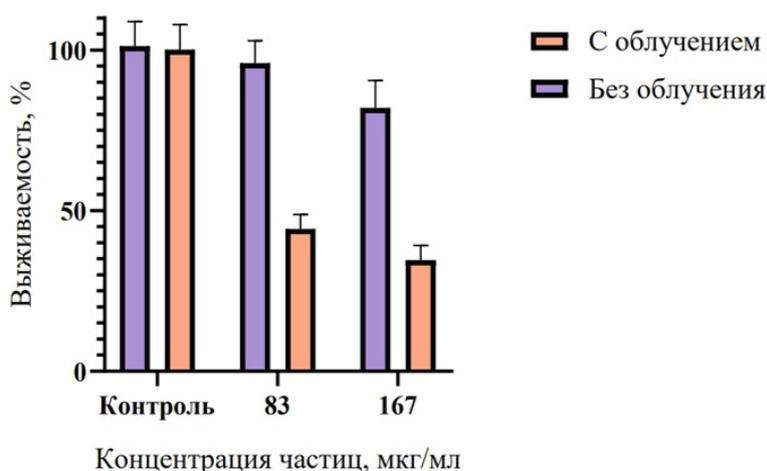


Рисунок 19. Влияние облучения на цитотоксичность наночастиц для BT-474 клеток. Жизнеспособность клеток измерена МТТ тестом, n=8.

Добавление облучения клеток лазером в схему эксперимента приводило к усилению цитотоксических свойств наночастиц в 2.4 раза (выживаемость клеток при концентрации наночастиц 167 мкг/мл составляла 82% без облучения и 34% после

облучения лазером). При этом выживаемость клеток, к которым не добавляли наночастицы, практически не уменьшалась при облучении клеток лазером, что является свидетельством решающей роли наночастиц в светоиндуцированной гибели клеток.

Визуализация опухоли

Для демонстрации возможности применения наночастиц *in vivo* для визуализации опухолей со сверхэкспрессией рецептора HER2 была использована самка бестимусной мыши BALB/c Nude, которой подкожно была привиты опухолевые клетки со сверхэкспрессией рецептора HER2 BT NanoLuc. Это клеточная линия BT-474, которая также экспрессирует люциферазу NanoLuc. При добавлении к таким клеткам специфического субстрата для люциферазы фуримазина происходит его окисление до фуримамида с продукцией люминесценции. Это свойство позволяет визуализировать локализацию опухолевых клеток в организме мыши. На рисунке 20 слева вверху показана люминесценция опухолевых клеток: справа видна первичная опухоль, а слева расположены метастазы.

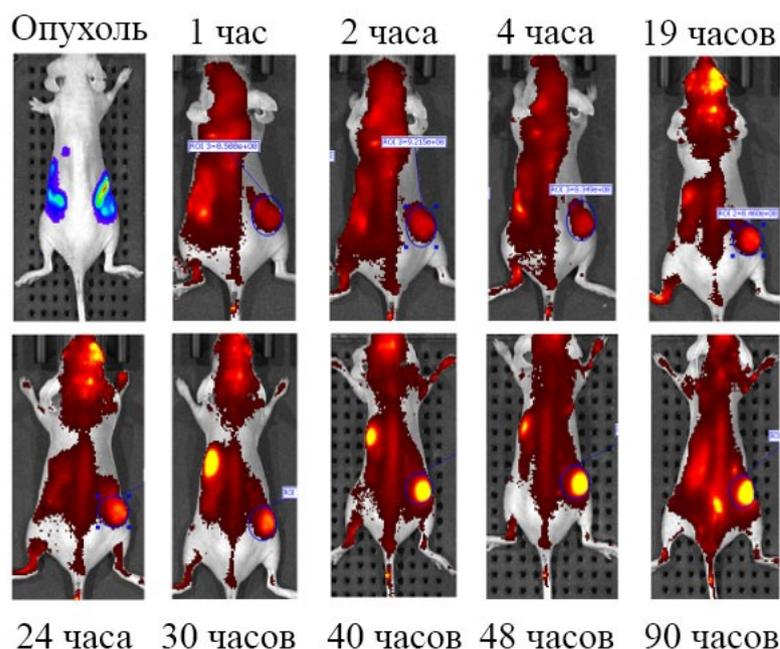


Рисунок 20. Визуализирующие возможности наночастиц. Показана люминесценция опухолевых клеток (слева вверху) и изменение распределения наночастиц по организму мыши с течением времени.

Наночастицы вкалывали внутривенно и следили за динамикой распределения наночастиц в организме мыши по изменению флуоресценции с помощью системы для визуализации IVIS Spectrum CT. На рисунке 20 видно, что уже через час часть частиц достигла опухоли и метастаз. С течением времени интенсивность флуоресценции частиц в опухоли увеличивалась, что говорит о постепенном накоплении наночастиц в опухоли. При этом сначала частицы накапливались преимущественно в одном сайте метастазирования (слева внизу), но потом начинали накапливаться и в другом сайте метастазирования (слева наверху).

Таким образом, была продемонстрирована возможность визуализации опухолей со сверхэкспрессией рецептора HER2 при помощи полученных адресных наночастиц.

Обсуждение

В работах предыдущих лет были получены полимерные наночастицы для фототермической терапии на основе цинкового производного фталоцианина. Были продемонстрированы цитотоксические свойства наночастиц

при облучение лазером, который соответствовал инфракрасному лазеру, применяемому в данной работе (Jin et al. 2019). Однако полученные наночастицы, хоть и обладали достаточно выраженными цитотоксическими свойствами, не были адресными. Как было сказано в обзоре литературы, неадресные наночастицы накапливаются в опухоли за счёт эффекта повышенной проницаемости и задержки, однако было показано, что данный эффект работает не во всех опухолях и не на всех пациентах, поэтому важно разрабатывать системы для активной доставки препаратов (Riley et al. 2019).

Для используемого в данной работе химиотерапевтического препарата иринотекана существует липосомальная формуляция Onivyde, одобренная для лечения метастазирующего рака поджелудочной железы, устойчивого к гемцитабиновой химиотерапии (Passero et al. 2016). Однако данные наночастицы также не являются таргетными и обладают одной модальностью.

В данной работе мы впервые синтезировали адресные полимерные наночастицы на основе фталоцианина для адресной комбинированной фототермической терапии и диагностики HER2 сверхэкспрессирующих раковых клеток. Было показано эффективное мечение BT-474 клеток со сверхэкспрессией рецептора HER2 (усиление эффективности мечения в 32 раза по сравнению с клетками не экспрессирующими рецептор). Было продемонстрировано усиление в 2.4 раза цитотоксических свойств наночастиц при облучении инфракрасным лазером клеток BT-474 со сверхэкспрессией рецептора HER2 *in vitro*. Была продемонстрирована способность наночастиц визуализировать

раковые клетки со сверхэкспрессией HER2 рецептора *in vivo* на бестимусной мыши BALB/c Nude.

Таким образом, разработанные в данной работе адресные наночастицы являются важным шагом на пути развития комбинированных персонализированных препаратов для диагностики и терапии злокачественных образований.

Выводы

1. Были получены адресные наночастицы на основе поли-лактид-ко-гликолида (PLGA), моноклонального антитела Трастузумаб и флуоресцентных красителей фталоцианина, обладающего фототермическими свойствами, и нильского голубого, сочетающие в себе диагностические и терапевтические свойства.
2. Были подобраны концентрации красителей при синтезе наночастиц, приводящие к наиболее выраженным фототермическим свойствам частиц (нагрев на 35 °С за 10 минут), а также наиболее эффективной флуоресценции частиц (а именно – 20 г/л для фталоцианина, 1.5 г/л для нильского голубого).
3. Были исследованы спектральные характеристики частиц. Максимум возбуждения составил 643 нм. Максимум эмиссии флуоресценции наночастиц входил в первое окно прозрачности биотканей и составлял 680 нм.
4. Было количественно исследовано взаимодействие наночастиц с клеточными линиями с различной экспрессией рецептора HER2 и показана специфичность исследуемых наночастиц к клеткам со сверхэкспрессией рецептора HER2 (разница в эффективности мечения в 32 раза с клетками без экспрессии рецептора и в 4 раза с клетками с нормальным уровнем экспрессии рецептора).
5. Была определено, что используемые клеточные линии имеют примерно одинаковую чувствительность к

химиотерапевтическому препарату – иринотекану. Была продемонстрирована цитотоксичность полученных наночастиц для клеточных линий со сверхэкспрессией рецептора HER2, а также увеличение в 2.4 раза цитотоксических свойств наночастиц при облучении клеток инфракрасным лазером.

6. Была продемонстрирована *in vivo* возможность использования полученных адресных наночастиц для диагностики и визуализации опухолей со сверхэкспрессией рецептора HER2 и отдалённых сайтов метастазирования.

Список литературы

1. Abu Lila, Amr S.; Kiwada, Hiroshi; Ishida, Tatsuhiro (2013): The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: clinical challenge and approaches to manage. In *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 172 (1), pp. 38–47. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.07.026.
2. Ahmad, Zaheer; Shah, Afzal; Siddiq, Muhammad; Kraatz, Heinz-Bernhard (2014): Polymeric micelles as drug delivery vehicles. In *RSC Adv* 4 (33), pp. 17028–17038. DOI: 10.1039/C3RA47370H.
3. Akiyama, T.; Sudo, C.; Ogawara, H.; Toyoshima, K.; Yamamoto, T. (1986): The product of the human c-erbB-2 gene: a 185-kilodalton glycoprotein with tyrosine kinase activity. In *Science (New York, N.Y.)* 232 (4758), pp. 1644–1646. DOI: 10.1126/science.3012781.
4. Anselmo, Aaron C.; Mitragotri, Samir (2019): Nanoparticles in the clinic: An update. In *Bioengineering & translational medicine* 4 (3), e10143. DOI: 10.1002/btm2.10143.
5. Arvizo, Rochelle R.; Bhattacharyya, Sanjib; Kudgus, Rachel A.; Giri, Karuna; Bhattacharya, Resham; Mukherjee, Priyabrata (2012): Intrinsic therapeutic applications of noble metal nanoparticles: past, present and future. In *Chemical Society reviews* 41 (7), pp. 2943–2970. DOI: 10.1039/C2CS15355F.
6. Bailly, Christian (2019): Irinotecan: 25 years of cancer treatment. In *Pharmacological Research* 148, p. 104398. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.104398.
7. Bies, Christiane; Lehr, Claus-Michael; Woodley, John F. (2004): Lectin-mediated drug targeting: history and applications. In *Advanced drug delivery reviews* 56 (4), pp. 425–435. DOI: 10.1016/j.addr.2003.10.030.
8. Bobo, Daniel; Robinson, Kye J.; Islam, Jiaul; Thurecht, Kristofer J.; Corrie, Simon R. (2016): Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date. In *Pharmaceutical research* 33 (10), pp. 2373–2387. DOI: 10.1007/s11095-016-1958-5.
9. Bozzuto, Giuseppina; Molinari, Agnese (2015): Liposomes as nanomedical devices. In *International journal of nanomedicine* 10, pp. 975–999. DOI: 10.2147/IJN.S68861.
10. Cai, Yu; Si, Weili; Huang, Wei; Chen, Peng; Shao, Jinjun; Dong, Xiaochen (2018): Organic Dye Based Nanoparticles for Cancer

- Phototheranostics. In *Small* (Weinheim an der Bergstrasse, Germany) 14 (25), e1704247. DOI: 10.1002/sml.201704247.
11. Cha, Chaenyung; Shin, Su Ryon; Annabi, Nasim; Dokmeci, Mehmet R.; Khademhosseini, Ali (2013): Carbon-based nanomaterials: multifunctional materials for biomedical engineering. In *ACS nano* 7 (4), pp. 2891–2897. DOI: 10.1021/nn401196a.
 12. Cho, Hyun-Soo; Mason, Karen; Ramyar, Kasra X.; Stanley, Ann Marie; Gabelli, Sandra B.; Denney, Dan W.; Leahy, Daniel J. (2003): Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. In *Nature* 421 (6924), pp. 756–760. DOI: 10.1038/nature01392.
 13. Chu, Katrina F.; Dupuy, Damian E. (2014): Thermal ablation of tumours: biological mechanisms and advances in therapy. In *Nature reviews. Cancer* 14 (3), pp. 199–208. DOI: 10.1038/nrc3672.
 14. Cincotta, L.; Foley, J. W.; Cincotta, A. H. (1987): Novel red absorbing benzoaphenoxazinium and benzoaphenothiazinium photosensitizers: in vitro evaluation. In *Photochemistry and photobiology* 46 (5), pp. 751–758. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1987.tb04843.x.
 15. Conde, João; Doria, Gonçalo; Baptista, Pedro (2012): Noble metal nanoparticles applications in cancer. In *Journal of drug delivery* 2012, p. 751075. DOI: 10.1155/2012/751075.
 16. Cronstein, Bruce N. (1997): THE MECHANISM OF ACTION OF METHOTREXATE. In *Rheumatic Disease Clinics of North America* 23 (4), pp. 739–755. DOI: 10.1016/S0889-857X(05)70358-6.
 17. Edward Chu (2004): *Cancer chemotherapy*. 14th ed. New York: McGraw-Hill Education.
 18. Elledge, R. M.; Green, S.; Ciocca, D.; Pugh, R.; Allred, D. C.; Clark, G. M. et al. (1998): HER-2 expression and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. In *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 4 (1), pp. 7–12.
 19. Emadi, Ashkan; Jones, Richard J.; Brodsky, Robert A. (2009): Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary. In *Nature reviews. Clinical oncology* 6 (11), pp. 638–647. DOI: 10.1038/nrclinonc.2009.146.
 20. Fang, Min; Peng, Chun-Wei; Pang, Dai-Wen; Li, Yan (2012): Quantum dots for cancer research: current status, remaining issues, and future perspectives. In *Cancer biology & medicine* 9 (3), pp. 151–163. DOI: 10.7497/j.issn.2095-3941.2012.03.001.
 21. Fowler, G. J.; Rees, R. C.; Devonshire, R. (1990): The photokilling of bladder carcinoma cells in vitro by phenothiazine dyes. In *Photochemistry and photobiology* 52 (3), pp. 489–494. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1990.tb01790.x.
 22. Graham, Joanne; Mushin, Mohamed; Kirkpatrick, Peter (2004): Oxaliplatin. In *Nature reviews. Drug discovery* 3 (1), pp. 11–12. DOI: 10.1038/nrd1287.
 23. Gravel, Edmond; Doris, Eric (2018): Where do nanometric micelles stand for biomedical applications? In *Future medicinal chemistry* 10 (10), pp. 1137–1139. DOI: 10.4155/fmc-2018-0040.
 24. Gwilt, P. R.; Tracewell, W. G. (1998): Pharmacokinetics and pharmacodynamics of hydroxyurea. In *Clinical pharmacokinetics* 34 (5), pp. 347–358. DOI: 10.2165/00003088-199834050-00002.

25. Hatakeyama, Hiroto; Akita, Hidetaka; Harashima, Hideyoshi (2013): The polyethyleneglycol dilemma: advantage and disadvantage of PEGylation of liposomes for systemic genes and nucleic acids delivery to tumors. In *Biological & pharmaceutical bulletin* 36 (6), pp. 892-899. DOI: 10.1248/bpb.b13-00059.
26. Herrera Estrada, L. P.; Champion, J. A. (2015): Protein nanoparticles for therapeutic protein delivery. In *Biomaterials science* 3 (6), pp. 787-799. DOI: 10.1039/C5BM00052A.
27. Hobbs, S. K.; Monsky, W. L.; Yuan, F.; Roberts, W. G.; Griffith, L.; Torchilin, V. P.; Jain, R. K. (1998): Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. In *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (8), pp. 4607-4612. DOI: 10.1073/pnas.95.8.4607.
28. Hong, Seyoung; Choi, Dong Wook; Kim, Hong Nam; Park, Chun Gwon; Lee, Wonhwa; Park, Hee Ho (2020): Protein-Based Nanoparticles as Drug Delivery Systems. In *Pharmaceutics* 12 (7). DOI: 10.3390/pharmaceutics12070604.
29. Hsu, Yu-Chih; Acuña, Marcela; Tahara, Stanley M.; Peng, Ching-An (2003): Reduced phagocytosis of colloidal carriers using soluble CD47. In *Pharmaceutical research* 20 (10), pp. 1539-1542. DOI: 10.1023/A:1026114713035.
30. Huang, Hui; Feng, Wei; Chen, Yu; Shi, Jianlin (2020): Inorganic nanoparticles in clinical trials and translations. In *Nano Today* 35, p. 100972. DOI: 10.1016/j.nantod.2020.100972.
31. Jiang, Yuyan; Li, Jingchao; Zhen, Xu; Xie, Chen; Pu, Kanyi (2018): Dual-Peak Absorbing Semiconducting Copolymer Nanoparticles for First and Second Near-Infrared Window Photothermal Therapy: A Comparative Study. In *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)* 30 (14), e1705980. DOI: 10.1002/adma.201705980.
32. Jin, Hong-Guang; Zhong, Weibang; Yin, Shulu; Zhang, Xingxing; Zhao, Yun-Hui; Wang, Youjuan et al. (2019): Lesson from Nature: Biomimetic Self-Assembling Phthalocyanines for High-Efficient Photothermal Therapy within the Biological Transparent Window. In *ACS applied materials & interfaces* 11 (4), pp. 3800-3808. DOI: 10.1021/acsami.8b21299.
33. Jong, Wim H. de; Borm, Paul J. A. (2008): Drug delivery and nanoparticles: applications and hazards. In *International journal of nanomedicine* 3 (2), pp. 133-149. DOI: 10.2147/ijn.s596.
34. Klapper, L. N.; Waterman, H.; Sela, M.; Yarden, Y. (2000): Tumor-inhibitory antibodies to HER-2/ErbB-2 may act by recruiting c-Cbl and enhancing ubiquitination of HER-2. In *Cancer research* 60 (13), pp. 3384-3388.
35. Konecny, Gottfried; Pauletti, Giovanni; Pegram, Mark; Untch, Michael; Dandekar, Sugandha; Aguilar, Zuleima et al. (2003): Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. In *Journal of the National Cancer Institute* 95 (2), pp. 142-153. DOI: 10.1093/jnci/95.2.142.
36. Krishnamurti, Uma; Silverman, Jan F. (2014): HER2 in breast cancer: a review and update. In *Advances in anatomic pathology* 21 (2), pp. 100-107. DOI: 10.1097/PAP.0000000000000015.
37. Lewis, M. R.; Goland, P. P.; Slovirer, H. A. (1949): The action of oxazine dyes on tumors in mice. In *Cancer research* 9 (12), pp. 736-740.

38. Lewis, M. R.; Sloviter, H. A.; Goland, P. P. (1946): In vivo staining and retardation of growth of sarcomata in mice. In *The Anatomical record* 95, pp. 89-96. DOI: 10.1002/ar.1090950203.
39. Lin, C. W.; Shulok, J. R.; Kirley, S. D.; Cincotta, L.; Foley, J. W. (1991): Lysosomal localization and mechanism of uptake of Nile blue photosensitizers in tumor cells. In *Cancer research* 51 (10), pp. 2710-2719.
40. Liu, Feng; Frick, Amber; Yuan, Xing; Huang, Leaf (2010): Dysopsonin activity of serum DNA-binding proteins favorable for gene delivery. In *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 332 (2), pp. 500-504. DOI: 10.1124/jpet.109.159541.
41. Lohcharoenkal, Warangkana; Wang, Liying; Chen, Yi Charlie; Rojanasakul, Yon (2014): Protein nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy. In *BioMed research international* 2014, p. 180549. DOI: 10.1155/2014/180549.
42. Loibl, Sibylle; Gianni, Luca (2017): HER2-positive breast cancer. In *The Lancet* 389 (10087), pp. 2415-2429. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)32417-5.
43. Lu, Xiao-Yun; Wu, Dao-Cheng; Li, Zheng-Jun; Chen, Guo-Qiang (2011): Polymer nanoparticles. In *Progress in molecular biology and translational science* 104, pp. 299-323. DOI: 10.1016/B978-0-12-416020-0.00007-3.
44. Maiti, Debabrata; Tong, Xiangmin; Mou, Xiaozhou; Yang, Kai (2018): Carbon-Based Nanomaterials for Biomedical Applications: A Recent Study. In *Frontiers in pharmacology* 9, p. 1401. DOI: 10.3389/fphar.2018.01401.
45. Makadia, Hirenkumar K.; Siegel, Steven J. (2011): Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. In *Polymers* 3 (3), pp. 1377-1397. DOI: 10.3390/polym3031377.
46. Manzano, Miguel; Vallet-Regí, María (2020): Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery. In *Adv. Funct. Mater.* 30 (2), p. 1902634. DOI: 10.1002/adfm.201902634.
47. Marchini, Cristina; Pietrella, Lucia; Kalogris, Cristina; Garulli, Chiara; Gabrielli, Federico; Quaglino, Elena et al. (2013): HER2-Driven Carcinogenesis: New Mouse Models for Novel Immunotherapies. In Yahwardiah Siregar (Ed.): *Oncogene and Cancer - From Bench to Clinic: InTech*.
48. Martin, Seamus J.; Henry, Conor M.; Cullen, Sean P. (2012): A perspective on mammalian caspases as positive and negative regulators of inflammation. In *Molecular cell* 46 (4), pp. 387-397. DOI: 10.1016/j.molcel.2012.04.026.
49. Martinez, Vincent; Henary, Maged (2016): Nile Red and Nile Blue: Applications and Syntheses of Structural Analogues. In *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 22 (39), pp. 13764-13782. DOI: 10.1002/chem.201601570.
50. Melamed, Jilian R.; Edelstein, Rachel S.; Day, Emily S. (2015): Elucidating the fundamental mechanisms of cell death triggered by photothermal therapy. In *ACS nano* 9 (1), pp. 6-11. DOI: 10.1021/acsnano.5b00021.
51. Ménard, Sylvie; Pupa, Serenella Marja; Campiglio, Manuela; Tagliabue, Elda (2003): Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer. In *Oncogene* 22 (42), pp. 6570-6578. DOI: 10.1038/sj.onc.1206779.

52. Mendelsohn, J.; Baselga, J. (2000): The EGF receptor family as targets for cancer therapy. In *Oncogene* 19 (56), pp. 6550–6565. DOI: 10.1038/sj.onc.1204082.
53. Meo, S. A.; Bukhari, I. A.; Akram, J.; Meo, A. S.; Klonoff, D. C. (2021): COVID-19 vaccines: comparison of biological, pharmacological characteristics and adverse effects of Pfizer/BioNTech and Moderna Vaccines. In *European review for medical and pharmacological sciences* 25 (3), pp. 1663–1669. DOI: 10.26355/eurrev_202102_24877.
54. Mimura, K.; Kono, K.; Hanawa, M.; Mitsui, F.; Sugai, H.; Miyagawa, N. et al. (2005): Frequencies of HER-2/neu expression and gene amplification in patients with oesophageal squamous cell carcinoma. In *British journal of cancer* 92 (7), pp. 1253–1260. DOI: 10.1038/sj.bjc.6602499.
55. Mirkasymov, Aziz B.; Zelepukin, Ivan V.; Nikitin, Petr I.; Nikitin, Maxim P.; Deyev, Sergey M. (2021): In vivo blockade of mononuclear phagocyte system with solid nanoparticles: Efficiency and affecting factors. In *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 330, pp. 111–118. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.12.004.
56. Moasser, M. M. (2007): The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. In *Oncogene* 26 (45), pp. 6469–6487. DOI: 10.1038/sj.onc.1210477.
57. Morrison, Carl; Zanagnolo, Vanna; Ramirez, Nilsa; Cohn, David E.; Kelbick, Nicole; Copeland, Larry et al. (2006): HER-2 is an independent prognostic factor in endometrial cancer: association with outcome in a large cohort of surgically staged patients. In *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 24 (15), pp. 2376–2385. DOI: 10.1200/JCO.2005.03.4827.
58. Mulligan, Mark J.; Lyke, Kirsten E.; Kitchin, Nicholas; Absalon, Judith; Gurtman, Alejandra; Lockhart, Stephen et al. (2020): Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults. In *Nature* 586 (7830), pp. 589–593. DOI: 10.1038/s41586-020-2639-4.
59. Oh, Do-Youn; Bang, Yung-Jue (2020): HER2-targeted therapies - a role beyond breast cancer. In *Nature reviews. Clinical oncology* 17 (1), pp. 33–48. DOI: 10.1038/s41571-019-0268-3.
60. Park, Jooho; Choi, Yongwhan; Chang, Hyeyoun; Um, Wooram; Ryu, Ju Hee; Kwon, Ick Chan (2019): Alliance with EPR Effect: Combined Strategies to Improve the EPR Effect in the Tumor Microenvironment. In *Theranostics* 9 (26), pp. 8073–8090. DOI: 10.7150/thno.37198.
61. Park, Seung-Min; Aalipour, Amin; Vermesh, Ophir; Yu, Jung Ho; Gambhir, Sanjiv S. (2017): Towards clinically translatable in vivo nanodiagnosics. In *Nature reviews. Materials* 2 (5). DOI: 10.1038/natrevmats.2017.14.
62. Passero, Frank C.; Grapsa, Dimitra; Syrigos, Kostas N.; Saif, Muhammad Wasif (2016): The safety and efficacy of Onivyde (irinotecan liposome injection) for the treatment of metastatic pancreatic cancer following gemcitabine-based therapy. In *Expert review of anticancer therapy* 16 (7), pp. 697–703. DOI: 10.1080/14737140.2016.1192471.
63. Patel, Kapil D.; Singh, Rajendra K.; Kim, Hae-Won (2019): Carbon-based nanomaterials as an emerging platform for theranostics. In *Mater. Horiz.* 6 (3), pp. 434–469. DOI: 10.1039/C8MH00966J.
64. Pelaz, Beatriz; Grazu, Valeria; Ibarra, Alfonso; Magen, Cesar; Del Pino, Pablo; La Fuente, Jesus M. de (2012): Tailoring the synthesis and

- heating ability of gold nanoprisms for bioapplications. In *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids* 28 (24), pp. 8965–8970. DOI: 10.1021/la204712u.
65. Pérez-Hernández, Marta; Del Pino, Pablo; Mitchell, Scott G.; Moros, María; Stepien, Grazyna; Pelaz, Beatriz et al. (2015): Dissecting the molecular mechanism of apoptosis during photothermal therapy using gold nanoprisms. In *ACS nano* 9 (1), pp. 52–61. DOI: 10.1021/nn505468v.
 66. Pillai, Omathanu; Panchagnula, Ramesh (2001): Polymers in drug delivery. In *Current Opinion in Chemical Biology* 5 (4), pp. 447–451. DOI: 10.1016/s1367-5931(00)00227-1.
 67. Riley, Rachel S.; June, Carl H.; Langer, Robert; Mitchell, Michael J. (2019): Delivery technologies for cancer immunotherapy. In *Nature reviews. Drug discovery* 18 (3), pp. 175–196. DOI: 10.1038/s41573-018-0006-z.
 68. Rosenblum, Daniel; Joshi, Nitin; Tao, Wei; Karp, Jeffrey M.; Peer, Dan (2018): Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics. In *Nature communications* 9 (1), p. 1410. DOI: 10.1038/s41467-018-03705-y.
 69. Scott, Andrew M.; Wolchok, Jedd D.; Old, Lloyd J. (2012): Antibody therapy of cancer. In *Nature reviews. Cancer* 12 (4), pp. 278–287. DOI: 10.1038/nrc3236.
 70. Shipunova, Victoria O.; Komedchikova, Elena N.; Kotelnikova, Polina A.; Zelepukin, Ivan V.; Schulga, Alexey A.; Proshkina, Galina M. et al. (2020): Dual Regioselective Targeting the Same Receptor in Nanoparticle-Mediated Combination Immuno/Chemotherapy for Enhanced Image-Guided Cancer Treatment. In *ACS nano* 14 (10), pp. 12781–12795. DOI: 10.1021/acsnano.0c03421.
 71. Shubayev, Veronica I.; Pisanic, Thomas R.; Jin, Sungho (2009): Magnetic nanoparticles for theragnostics. In *Advanced drug delivery reviews* 61 (6), pp. 467–477. DOI: 10.1016/j.addr.2009.03.007.
 72. Sung, Hyuna; Ferlay, Jacques; Siegel, Rebecca L.; Laversanne, Mathieu; Soerjomataram, Isabelle; Jemal, Ahmedin; Bray, Freddie (2021): Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. In *CA: a cancer journal for clinicians*. DOI: 10.3322/caac.21660.
 73. Sur, Srijia; Rathore, Aishwarya; Dave, Vivek; Reddy, Kakarla Raghava; Chouhan, Raghuraj Singh; Sadhu, Veera (2019): Recent developments in functionalized polymer nanoparticles for efficient drug delivery system. In *Nano-Structures & Nano-Objects* 20, p. 100397. DOI: 10.1016/j.nanoso.2019.100397.
 74. Torchilin, Vladimir P. (2010): Passive and active drug targeting: drug delivery to tumors as an example. In *Handbook of experimental pharmacology* (197), pp. 3–53. DOI: 10.1007/978-3-642-00477-3_1.
 75. Waks, Adrienne G.; Winer, Eric P. (2019): Breast Cancer Treatment: A Review. In *JAMA* 321 (3), pp. 288–300. DOI: 10.1001/jama.2018.19323.
 76. Wang, Andrew Z.; Langer, Robert; Farokhzad, Omid C. (2012): Nanoparticle delivery of cancer drugs. In *Annual review of medicine* 63, pp. 185–198. DOI: 10.1146/annurev-med-040210-162544.
 77. Wong, Roy C.H.; Lo, Pui-Chi; Ng, Dennis K.P. (2019): Stimuli responsive phthalocyanine-based fluorescent probes and

- photosensitizers. In *Coordination Chemistry Reviews* 379, pp. 30–46. DOI: 10.1016/j.ccr.2017.10.006.
78. Xia, Wei; Low, Philip S. (2010): Folate-targeted therapies for cancer. In *Journal of medicinal chemistry* 53 (19), pp. 6811–6824. DOI: 10.1021/jm100509v.
79. Yan, Min; Schwaederle, Maria; Arguello, David; Millis, Sherri Z.; Gatalica, Zoran; Kurzrock, Razelle (2015): HER2 expression status in diverse cancers: review of results from 37,992 patients. In *Cancer metastasis reviews* 34 (1), pp. 157–164. DOI: 10.1007/s10555-015-9552-6.
80. Yang, Guangbao; Phua, Soo Zeng Fiona; Bindra, Anivind Kaur; Zhao, Yanli (2019): Degradability and Clearance of Inorganic Nanoparticles for Biomedical Applications. In *Advanced materials* (Deerfield Beach, Fla.) 31 (10), e1805730. DOI: 10.1002/adma.201805730.
81. Yarden, Y.; Sliwkowski, M. X. (2001): Untangling the ErbB signalling network. In *Nature reviews. Molecular cell biology* 2 (2), pp. 127–137. DOI: 10.1038/35052073.
82. Yarden, Yosef (2001): Biology of HER2 and Its Importance in Breast Cancer. In *Oncology* 61 (2), pp. 1–13. DOI: 10.1159/000055396.
83. Zelepukin, Ivan V.; Yaremenko, Alexey V.; Yuryev, Mikhail V.; Mirkasymov, Aziz B.; Sokolov, Ilya L.; Deyev, Sergey M. et al. (2020): Fast processes of nanoparticle blood clearance: Comprehensive study. In *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 326, pp. 181–191. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.07.014.
84. Zhang, Yi-Nan; Poon, Wilson; Tavares, Anthony J.; McGilvray, Ian D.; Chan, Warren C. W. (2016): Nanoparticle-liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination. In *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society* 240, pp. 332–348. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.01.020.
85. Zheng, Bing-De; He, Qin-Xue; Li, Xingshu; Yoon, Juyoung; Huang, Jian-Dong (2021): Phthalocyanines as contrast agents for photothermal therapy. In *Coordination Chemistry Reviews* 426, p. 213548. DOI: 10.1016/j.ccr.2020.213548.
86. Zou, Lili; Wang, Hong; He, Bin; Zeng, Lijuan; Tan, Tao; Cao, Haiqiang et al. (2016): Current Approaches of Photothermal Therapy in Treating Cancer Metastasis with Nanotherapeutics. In *Theranostics* 6 (6), pp. 762–772. DOI: 10.7150/thno.14988.