

Изучение новых систем доставки противоопухолевых препаратов на основе наночастиц нитрида бора

И.Ю. Житняк¹, И.В. Сухорукова², А.М. Ковальский², А.Т. Матвеев², И.Н. Бычков³,
Д.В. Штанский², Н.А. Глушанкова¹

¹НИИ канцерогенеза ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24;

²Национальный исследовательский технологический университет «Московский институт стали и сплавов»;
Россия, 119991, Москва, Ленинский проспект, 4;

³ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский университет им. Н.Н. Пирогова»;
Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

Контакты: Наталия Александровна Глушанкова natglu@hotmail.com

Одной из главных проблем лечения онкологических заболеваний является множественная лекарственная устойчивость неопластических клеток, возникающая в результате опухолевой прогрессии. Перспективным подходом для решения этой проблемы может стать использование наночастиц, так как в этом случае химиопрепараты способны проникать в опухолевые клетки посредством эндоцитоза и концентрироваться в околоядерной области вне зоны действия мембранных транспортеров. Одно из направлений для создания наночастиц противоопухолевых препаратов — получение структур на основе нитрида бора, обладающего химической инертностью и высокой стойкостью к окислению. Наночастицы гексагонального нитрида бора размером 100–150 нм с гладкой и развитой поверхностью были получены методом химического осаждения из газовой фазы. Были отработаны условия загрузки наночастиц нитрида бора доксорубицином, которые позволили получить наноконъюгаты с содержанием доксорубина до 95 мкг/мг частиц. Показано, что наночастицы нитрида бора, нагруженные доксорубицином, стабильны при нейтральном pH, но эффективно высвобождают химиопрепарат в среде с pH 4,5–5,5. Для изучения взаимодействия наноконъюгатов с неопластическими клетками были использованы культуры чувствительных к доксорубину линий IAR-6-1, KB-3-1, K562 и линий с множественной лекарственной устойчивостью KB-8-5 и IS-9. Конфокально-микроскопические исследования показали, что наноконъюгаты успешно проникают как в чувствительные, так и в резистентные к доксорубину клетки и накапливаются в околоядерной области. Выявлена колокализация наночастиц, нагруженных доксорубицином, с эндосомальным/лизосомальным компартментом клеток.

Ключевые слова: наночастицы нитрида бора, наноконъюгаты частиц нитрида бора с доксорубицином, конфокальная микроскопия, эндосома/лизосома

DOI: 10.17650/2313-805X-2016-3-2-34–41

The study of new anticancer drug delivery system based on the boron nitride nanoparticles

I. Yu. Zhitnyak¹, I. V. Sukhorukova², A. M. Koval'skiy², A. T. Matveev², I. N. Bychkov³, D. V. Shtanskiy², N. A. Glushankova¹

¹Research Institute of Carcinogenesis, N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow, 115478, Russia;

²National University of Science and Technology, Moscow Institute of Steel and Alloys; 4 Leninskiy prospekt, Moscow, 119049, Russia;

³N.I. Pirogov Russian National Research Medical University; 1 Ostrovityanova St., Moscow, 117997, Russia

The main problem in the treatment of many cancers is multidrug resistance due to tumor progression. Using nanosized drug delivery systems allows to overcome the mechanisms of multidrug resistance of cancer, in this case, chemotherapeutic agents can effectively introduce into cancer cells by endocytosis and accumulate near the nucleus and far from ATP-binding cassette transporters. Creation of boron nitride-based drug delivery nanocarriers with high chemical and oxidative stability is one of the perspective ways. Using chemical vapor deposition spherical boron nitride particles, 100–150 nm in diameter (BNNPs), with peculiar petal-like surfaces or smooth surfaces were fabricated. BNNPs were loaded with doxorubicin.

Drug loading efficacy of BNNPs-DOX was about 0.095 mg/mg of particles. BNNPs-DOX were relatively stable at neutral pH, whereas DOX is effectively released from the BNNPs at acidic pH (pH 4.5–5.5). Using confocal microscopy, the uptake of BNNPs-DOX by IAR-6-1, KB-3-1, K562 cells and multidrug resistant KB-8-5 u IS-9 cells was studied. Most of BNNPs-DOX had been co-localized with LysoTracker, indicating that BNNPs-DOX are located in the endosomes/lysosomes after intracellular delivery.

Key words: boron nitride nanoparticles, boron nitride nanocarriers loaded with doxorubicin, confocal microscopy, endosome/lysosome

Введение

Современные исследования в области разработки высокоэффективных способов лечения онкологических заболеваний включают такое важное направление, как разработка систем доставки противоопухолевых препаратов. Одна из главных проблем лечения онко-

логических заболеваний — множественная лекарственная устойчивость неопластических клеток, возникающая в результате опухолевой прогрессии. Основным механизмом, обеспечивающим невосприимчивость к химиотерапевтическим препаратам клеток с множественной лекарственной устойчивостью, является

гиперэкспрессия в них белков ABC (ATP-binding cassette) семейства мембранных транспортеров, которые обеспечивают выведение препаратов из опухолевых клеток [1, 2].

Применение наночастиц может быть перспективным для преодоления множественной лекарственной устойчивости, так как в этом случае химиопрепараты проникают в опухолевые клетки не диффузией через клеточную мембрану, а посредством эндоцитоза, концентрируясь в околядерной области вне зоны действия мембранных транспортеров и обеспечивая гибель опухолевой клетки [3, 4]. Известны примеры преодоления множественной лекарственной устойчивости с использованием полимерных и металлических наночастиц, насыщенных доксорубицином [4]. Другим преимуществом использования наночастиц является уменьшение или полное отсутствие токсических эффектов, вызванных воздействием лекарственных препаратов.

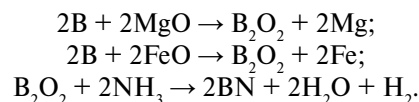
Современные знания о характеристиках различных типов наноматериалов и цитотоксичности наноструктур, конъюгированных с химиопрепаратами, остаются неполными и зачастую противоречивыми. К настоящему времени для транспорта лекарственных препаратов были опробованы различные типы носителей: белки [5], мицеллы [6], липосомы [7] дендримеры [8], неорганические наночастицы [9–14] и др. Одни носители прошли этапы доклинических исследований, другие проходят различные фазы клинических испытаний. На данный момент 5 препаратов на основе липосом утверждены для терапии опухолевых заболеваний [15]. Продолжаются активные попытки получить биосовместимые наночастицы на основе новых материалов с высокой способностью к нагрузке лекарственными препаратами и последующим контролируемым освобождением препарата в опухолевой клетке, индуцированным изменением pH. Для успешного применения в биомедицине нанотранспортеров необходимо изучить их фармакологическую эффективность, а также проконтролировать их возможную цитотоксичность *in vitro* на культурах клеток.

Одним из перспективных материалов для создания наночастиц противоопухолевых препаратов является нитрид бора. Этот материал обладает химической инертностью и высокой стойкостью к окислению [16]. Показана возможность получения наноструктур нитрида бора с различной морфологией: нанотрубки [16–18], нановолокна [19, 20], нанопластины (графеноподобные структуры) [21], наносферы [22]. Кроме того, недавние исследования показали, что наноструктуры нитрида бора не токсичны [23, 24], что позволяет их использовать в медицине.

Цель работы — обработка условий получения наноконъюгатов на основе нитрида бора, нагруженных химиотерапевтическим препаратом доксорубицином, и изучение их взаимодействия с трансформированными клетками.

Материалы и методы

Объект исследования. Наночастицы гексагонального нитрида бора размером 100–150 нм были получены методом химического осаждения из газовой фазы (I. V. Sukhorukova и соавт. [25]). Для получения газообразного оксида бора использовали смесь FeO: MgO:B = 150:28:75 при температуре +1310 °C. Процесс высокотемпературного химического синтеза наноструктур нитрида бора из газовой фазы описан С. Tang и соавт. [26] и предполагает следующую последовательность химических реакций:



Морфология поверхности наночастиц нитрида бора зависела от скоростей подачи транспортного (Ar) и реакционного (NH₃) газов. Для синтеза наночастиц с гладкой наружной поверхностью скорости потока для Ar и NH₃ составляли 500 и 100 см³/мин соответственно, а для синтеза наночастиц с развитой наружной поверхностью — 250 и 50 см³/мин.

Для получения устойчивых лизолов индивидуальных наночастиц нитрида бора использовали метод ультразвукового диспергирования на установке Sonopuls HD 2200 (Bandelin, Германия). Для изучения структуры наночастиц применяли просвечивающий электронный микроскоп JEM-2100 (JEOL, Япония).

Клеточные линии. Для исследований использовали трансформированные диметилнитрозамином эпителиоциты печени крысы линии IAR-6–1 [27], клетки линии хронического миелоидного лейкоза человека K562 и ее производной — линии IS-9 с множественной лекарственной устойчивостью, индуцированной в результате стабильной трансфекции белка Р-гликопротеина [28], клетки линии карциномы человека KB-3–1 и ее производной — линии KB-8–5 с устойчивостью к доксорубицину, полученной в результате селекции [29].

Получение наноконъюгатов частиц нитрида бора с доксорубицином. Доксорубин разводили до концентрации 0,5 мг/мл или 2,5 мг/мл в NaAc-буферах с разным уровнем pH (5,4; 7,4; 8,4; 9,4) или в дистиллированной воде (H₂O). Наночастицы центрифугировали и к осадкам добавляли раствор доксорубина (1 мл раствора на 2 мг частиц), затем инкубировали 24 ч при температуре +37 °C на качалке. Нагруженные доксорубицином наночастицы центрифугировали 15 мин при скорости 13 400 об/мин. Осадки нагруженных доксорубицином наночастиц ресуспендировали в H₂O и центрифугировали в течение 15 мин при скорости 13 400 об/мин, такую отмывку повторяли 3–5 раз.

Экстракция доксорубина из наноконъюгатов. Доксорубин экстрагировали из отмывых наноконъюгатов с помощью DMSO или 0,1 моль NaAc-буфера (pH 4,0) 24 ч при температуре +37 °C. После этого наночастицы центрифугировали 15 мин при скорости

13 400 об/мин. Надосадочную жидкость отбирали в эпепдорфы и измеряли оптическую плотность (optical density, OD) при длине волны 488 нм.

MTT-тест. Клетки рассеивали в концентрации 20 000 клеток/мл в 24-луночные плашки по 1,9 мл в лунку или в 96-луночные плашки по 200 мкл в лунку в культуральной среде с 10 % телячьей эмбриональной сывороткой. На следующий день добавляли раствор доксорубина для получения конечных концентраций 25, 50, 100, 250 и 500 нг/мл, а также 1, 5 и 10 мкг/мл. Через 72 ч среду заменяли на 200 мкл среды без сыворотки, добавляли 20 мкл готового раствора MTT (5 мг/мл в фосфатном буфере) и инкубировали 4 ч при температуре +37 °С. Затем среду удаляли, образовавшийся нерастворимый формазан экстрагировали добавлением 150 мкл демитилсульфоксида и ресуспендировали. Измерения OD проводили при длине волны 570 нм. Результаты теста MTT оценивали путем сопоставления OD в опытных и контрольных образцах и рассчитывали долю выживших клеток. На основании полученных данных рассчитывали концентрацию препарата, вызывающую гибель 50 % клеток IC_{50} .

Микроскопия. Этапы взаимодействия наночастиц с живыми и фиксированными клетками анализировали с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Германия) и инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Япония), оборудованного дифференциальной интерференционно-контрастной оптикой и камерой высокого разрешения ORCA-ER (Hamamatsu, Япония).

Флуоресцентно-микроскопический анализ накопления доксорубина в клетках. Клетки рассеивали в концентрации 100 тыс. клеток на чашку со стеклянным дном, через 24 ч меняли среду на бесцветную DMEM/F-12 с HEPES и 10 % телячьей эмбриональной сывороткой. В чашки добавляли доксорубин до конечной концентрации 5 мкг/мл. С помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Япония) выполняли съемку 10 полей зрения для каждой линии в флуоресцентном канале с одинаковой выдержкой (временные точки 0, 15, 75, 120, 180, 240, 300, 360 мин и 24 ч). Обработку изображений проводили в программе ImageJA 1.45b с измерением параметра MGv (Mean Gray Value) для фона, свободного от клеток, цитоплазмы (ЦП) и ядра на флуоресцентном изображении по 2 точки на каждый кадр. Показатель интенсивности флуоресценции (ИФ) вычисляли по формуле:

$$ИФ_{\text{ядро/ЦП}} = (MGV_{\text{ядро/ЦП}} - MGV_{\text{фон}}) / MGV_{\text{фон}}.$$

Трансфекция. Временную трансфекцию клеток KB-8—5 конструкцией EGFP (Evrogen, Россия) выполняли с помощью Lipofectamine LTX and Plus Reagent (Invitrogen, Life Technologies, США).

Визуализация эндосом/лизосом в клетках. Прижизненное окрашивание эндосом/лизосом проводили не-

посредственно перед началом наблюдения с использованием LysoTracker Green (Molecular Probes, Life Technologies, США).

Обработка данных. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью программы MS Excel, графики и диаграммы были построены с использованием программы GraphPad Prism 6 Version 6.07 (GraphPad Software).

Результаты и обсуждение

Наночастицы гексагонального нитрида бора. При разработке систем для доставки лекарств на основе наночастиц критическими параметрами являются их форма и размер. Полученный нами размер наночастиц лекарственных препаратов составлял 100–150 нм и был оптимальным (рис. 1).

При отработке методов получения наночастиц необходимо принимать в расчет несколько факторов:

1) размер наночастиц должен быть меньше диаметра тончайших капилляров, в которых будет осуществляться их циркуляция;

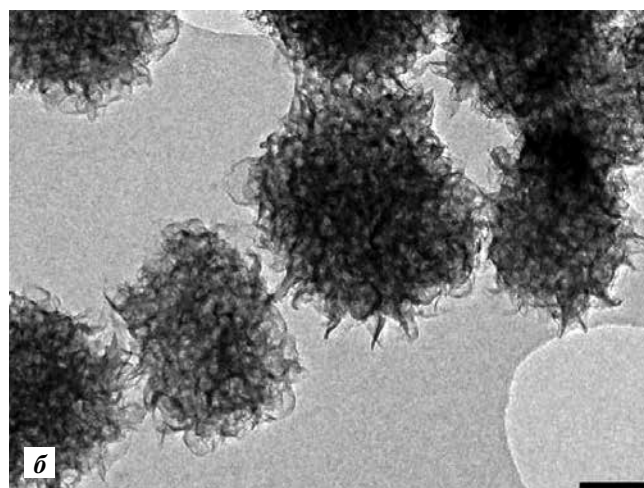
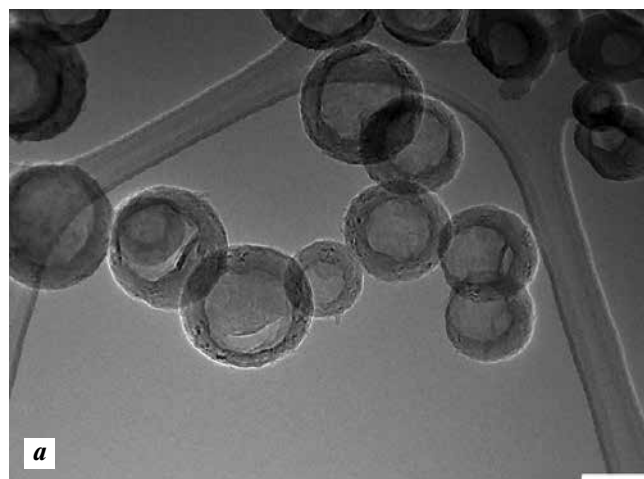


Рис. 1. Типы наночастиц (шкала 100 нм): а — наночастицы нитрида бора с гладкой поверхностью; б — наночастицы нитрида бора с развитой поверхностью

Концентрация доксорубина в растворах после нагрузки наночастиц

Концентрация нагрузочного раствора доксорубина, мг/мл	pH нагрузочного буфера 0,1 M NaAc	Концентрация доксорубина в растворе после нагрузки, мг/мл
0,5	7,4	$0,056 \pm 0,004$
	8,4	$0,028 \pm 0,001$
	9,4	$0,0005 \pm 0,0004$
2,5	7,4	$0,642 \pm 0,006$
	8,4	$0,609 \pm 0,022$
	9,4	$0,458 \pm 0,113$

2) наночастицы должны иметь форму и размер, способствующие их проникновению в опухолевые клетки;

3) размер наночастиц должен препятствовать их быстрому выведению ретикулоэндотелиальной системой;

4) частицы размером < 50 нм лучше поглощаются клетками, однако они и быстрее выводятся из клетки;

5) частицы размером < 100 нм могут покидать кровеносные сосуды через «окна» в эндотелиальной выстилке;

6) частицы размером около 100 нм дольше удерживаются внутри опухолевых клеток.

7) наночастицы размером > 200 нм накапливаются в печени, почках, селезенке;

8) для частиц размером > 500 нм выше вероятность поглощения макрофагами, что препятствует доставке лекарств в опухолевые клетки.

Таким образом, оптимальный размер наночастиц лекарственных препаратов составляет 100–150 нм [30–31]. Форма наночастиц должна быть сферической для лучшего поглощения опухолевыми клетками.

Условия для получения наноконъюгатов частиц нитрида бора с доксорубином. Для сравнения эффек-

тивности нагрузки наночастиц доксорубином в различных концентрациях и при различном уровне pH использовали растворы с концентрацией доксорубина 0,5 и 2,5 мг/мл. Наночастицы перед отмывкой от нагрузочных растворов центрифугировали 15 мин при скорости 13 400 об/мин. Надосадочную жидкость отбирали в эппендорфы и проводили спектрофотометрические измерения OD доксорубина, оставшегося в растворе, при длине волны 488 нм (см. таблицу). Результаты исследования показали, что 0,5 мг/мл — оптимальная концентрация раствора доксорубина для нагрузки наночастиц, так как после нагрузки в растворе практически не остается свободного доксорубина. Использование раствора доксорубина в концентрации 2,5 мг/мл не увеличивало аккумуляцию доксорубина на частицах (данные не представлены), поэтому для дальнейших экспериментов была выбрана концентрация 0,5 мг/мл.

Анализ растворов доксорубина после нагрузки наночастиц химиопрепаратом показал, что в растворах с высоким уровнем pH остается меньше свободного доксорубина, что свидетельствует о более эффективной нагрузке наночастиц препаратом при повышении уровня pH (см. таблицу, рис. 2a). Измерения концент-

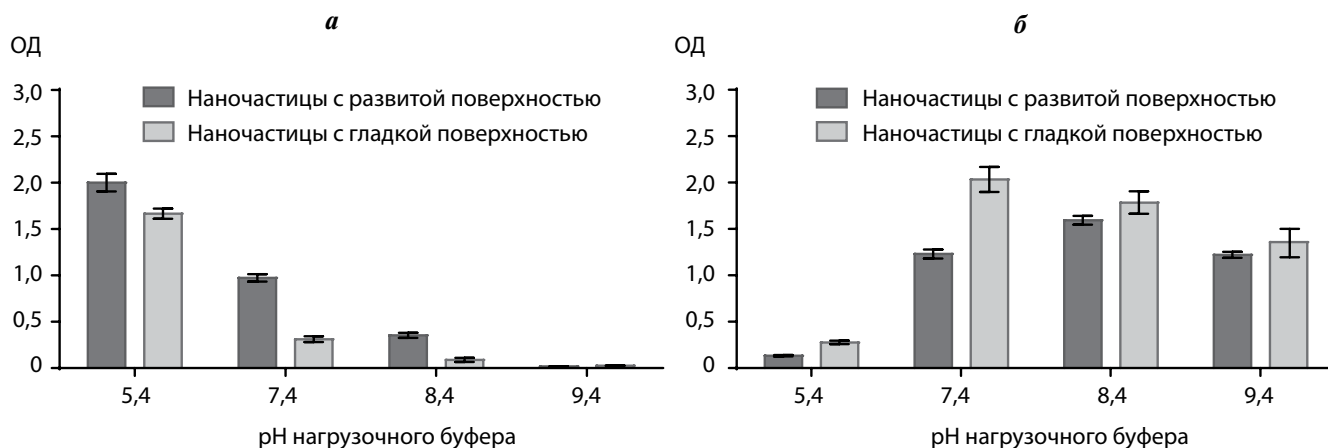


Рис. 2. Эффективность нагрузки наночастиц нитрида бора при различных уровнях pH раствора доксорубина: а — оставшийся в растворе доксорубин (чем выше уровень pH раствора, тем меньше свободного доксорубина остается в растворе после 24 ч инкубации с наночастицами); б — экстрагированный доксорубин (из частиц, нагруженных в кислой среде, экстрагируется значительно меньше доксорубина, чем из частиц, нагруженных в нейтральной и щелочной среде)

рации доксорубина после экстракции наноконъюгатов в демитилсульфоксиде показали, что большее количество доксорубина выходит из наноконъюгатов, полученных в слабощелочных растворах доксорубина (рис. 2б). В дальнейших экспериментах были использованы наноконъюгаты нитрида бора с доксорубином, полученные нагрузкой химиопрепарата в 0,1 М NaAc (pH 8,4).

Спектрофотометрические измерения количества нагруженного на частицы доксорубина после экстракции демитилсульфоксида в раствор показали, что с гладких частиц экстрагировалось около 95 мкг/мг частиц, а с частиц с развитой поверхностью — около 85 мкг/мг частиц, что свидетельствует о высоком уровне нагрузки наноконъюгатов химиопрепаратом.

Условия выхода доксорубина из наноконъюгатов.

В серии экспериментов был проведен анализ выхода доксорубина из наноконъюгатов в NaAc-буферах с различным уровнем pH. Как видно из рис. 3, доксорубин наиболее эффективно выходит из наноконъюгатов в кислой среде (pH 4,5–5,5). Уже за 2 ч в среде с уровнем pH 4,4 доксорубина из наноконъюгатов выходит в 3,5 раза больше, чем при pH 7,4. Известно, что клетки эндосомы и лизосомы имеют кислый pH, поэтому описанные особенности высвобождения доксорубина из наноконъюгатов могут повысить эффективность действия препарата, доставляемого с помощью наночастиц нитрида бора.

Тестирование клеточных систем. Сравнительные исследования цитотоксического эффекта свободного доксорубина проводили с помощью теста на выживаемость клеток (MTT-тест) (рис. 4). При анализе результатов были выявлены выраженные различия исследуемых линий в чувствительности к доксорубину. Для линии K562 IC_{50} составляла $0,10 \pm 0,04$ мкг/мл, для линии IS-9 — $2,5 \pm 1,19$ мкг/мл (разница в 24 раза). Для линии KB-3-1 IC_{50} была равна $0,1 \pm 0,002$ мкг/мл, для линии KB-8-5 — $1,8 \pm 1,2$ мкг/мл (разница в 18 раз).

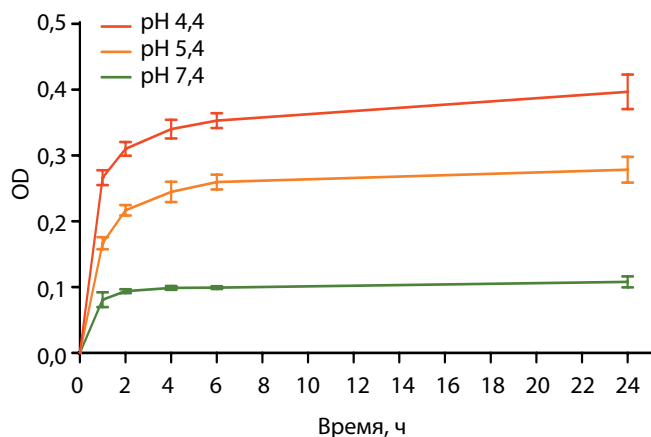


Рис. 3. pH-зависимое высвобождение доксорубина из наноконъюгатов. Измерение OD доксорубина в растворах на протяжении 24 ч исследования

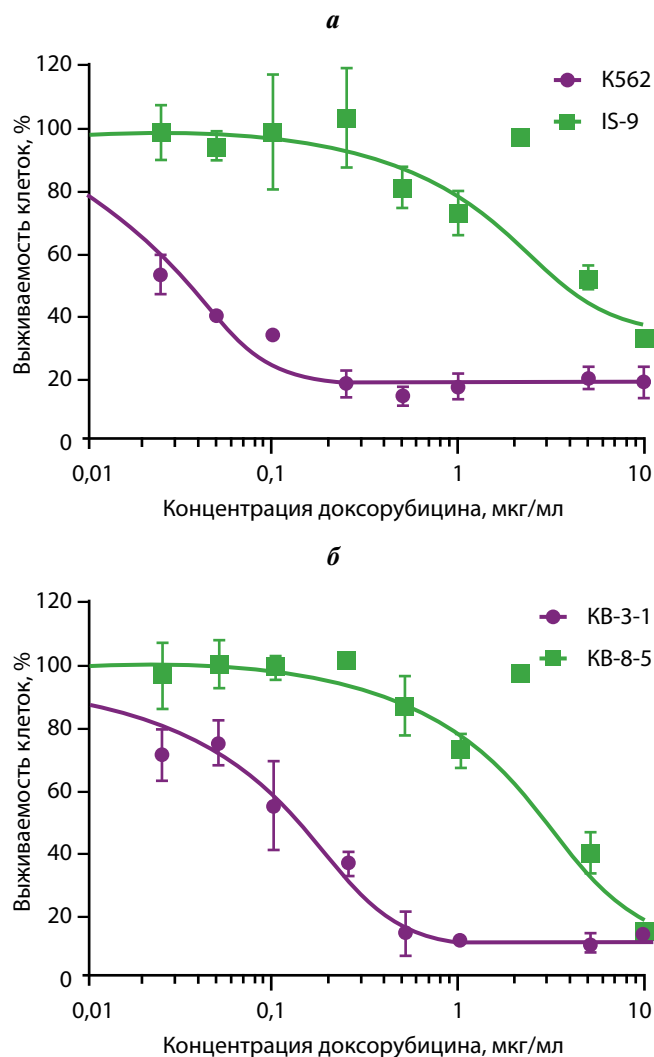


Рис. 4. Выживаемость клеток после воздействия различных концентраций доксорубина (MTT-тест): а — клетки линий K562 и IS-9; б — клетки линий KB-3-1 и KB-8-5

Флуоресцентно-микроскопический анализ накопления доксорубина в клетках. С помощью флуоресцентной микроскопии были проанализированы закономерности накопления свободного доксорубина в чувствительных KB-3-1 и резистентных KB-8-5 клетках (рис. 5). Проведенный анализ показал существенную разницу в накоплении доксорубина в клеточных компартментах. В чувствительных клетках KB-3-1 доксорубин прогрессивно аккумулируется в основном в клеточном ядре, через 24 ч его концентрация в ядре в 2,5 раза больше, чем в ЦП. В резистентных клетках KB-8-5 доксорубин накапливается гораздо слабее, при этом уже через 5 ч его накопление в ядре выходит на плато, а через 24 ч флуоресценция доксорубина в ЦП в 1,5 раза выше, чем в ядре (см. рис. 5б).

Визуализация наноконъюгатов в неопластических клетках. С использованием конфокальной микроскопии было исследовано взаимодействие нагруженных доксорубином наночастиц нитрида бора с трансформированными клетками. Как видно на рис. 6, нано-

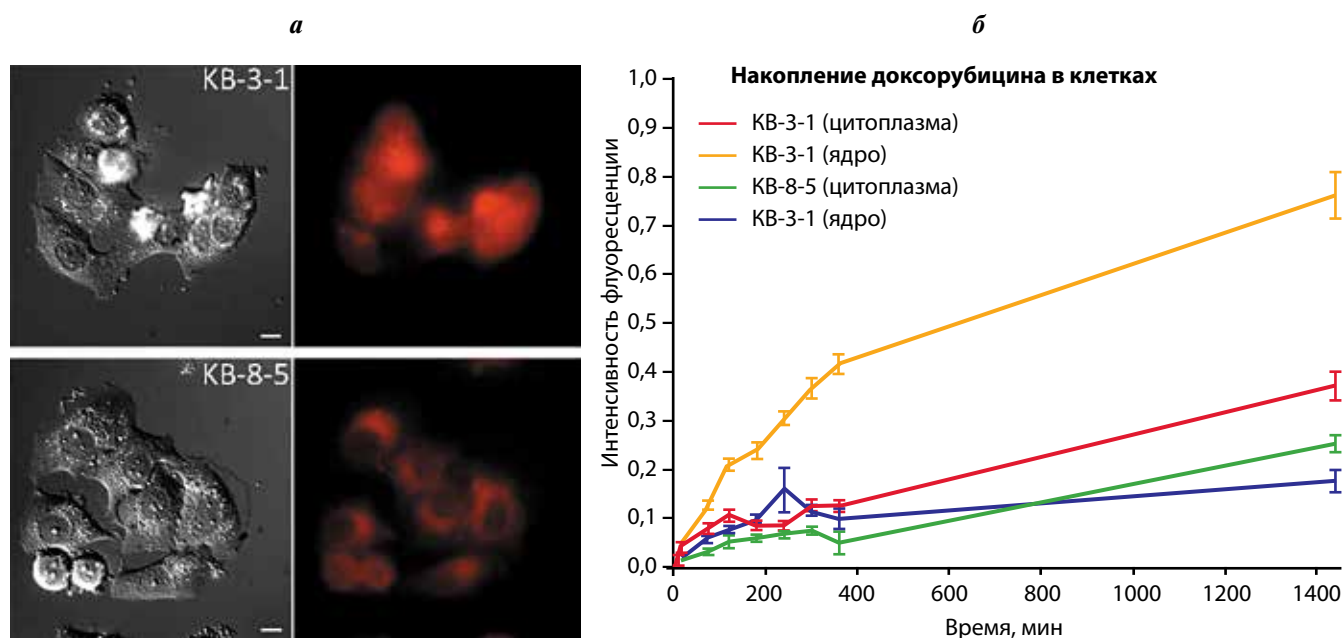


Рис. 5. Различия в накоплении доксорубина в клетках KB-3-1 и KB-8-5: а — клетки KB-3-1 и KB-8-5 после 24 ч инкубации в среде, содержащей 5 мкг/мл доксорубина (DIC (слева) и флуоресцентная микроскопия (справа); шкала 10 мкм); б — динамика накопления доксорубина в цитоплазме и в ядре клеток KB-3-1 и KB-8-5 при инкубации в среде, содержащей 5 мкг/мл доксорубина

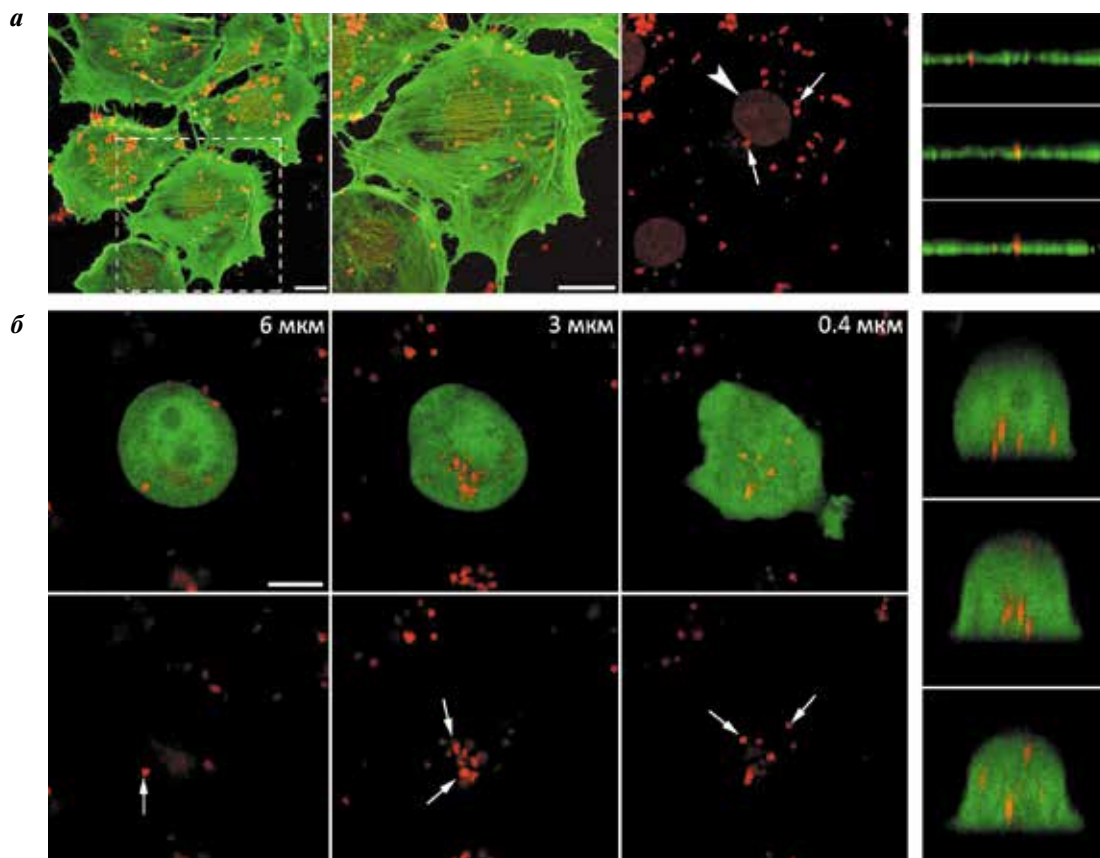


Рис. 6. Наночастицы нитрида бора, нагруженные доксорубином, в неопластических клетках (конфокальная микроскопия; шкала 10 мкм): а — трансформированные эпителиальные клетки IAR-6-1 после 7 ч инкубации с наноконъюгатами (актиновый цитоскелет, окрашивание Alexa488-phalloidin (зеленый), флуоресценция доксорубина (красный); левая часть — проекция хуэ, правая часть — проекция хзу; стрелки — нагруженные доксорубином частицы нитрида бора; флажок — заметна флуоресценция доксорубина в ядре); б — клетки KB-8-5 после 24 ч инкубации с нагруженными доксорубином наночастицами нитрида бора (для визуализации клетки были трансфицированы GFP; зеленый — GFP, красный — флуоресценция доксорубина; левая часть — проекции хуэ с указанием расстояния до подложки, правая часть — проекции хзу; стрелки — нагруженные доксорубином частицы нитрида бора

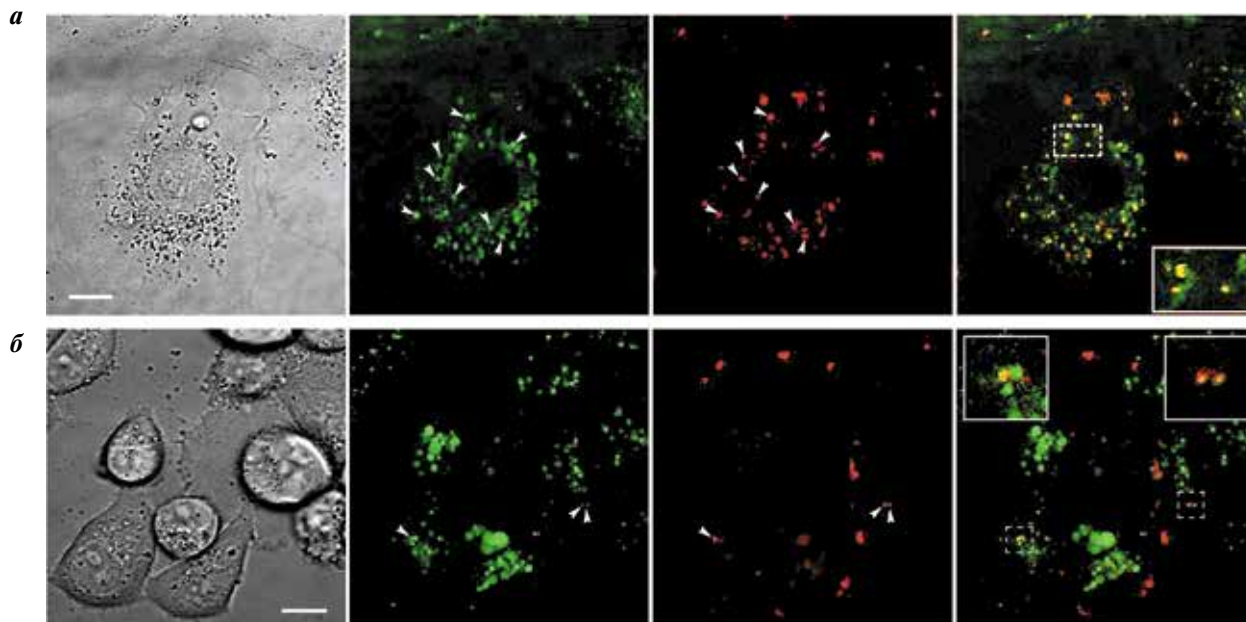


Рис. 7. Выявление наноконъюгатов в эндосомальном/лизосомальном компартменте неопластических клеток (флажки — колокализация доксорубицина с лизосомами; во врезках увеличенные фрагменты изображения; конфокальная микроскопия; шкала 10 мкм): а — трансформированные эпителиальные клетки IAR-6—1 после 4 ч инкубации с наноконъюгатами; б — клетки KB-8—5 после 2,5 ч инкубации с наноконъюгатами (слева направо: DIC-микроскопия; лизосомы, окрашенные LysoTracker Green (зеленый); флуоресценция доксорубицина (красный); наложение каналов)

конъюгаты успешно проникают внутрь клеток и концентрируются около ядра. В чувствительных клетках (см. рис. 6а) также видно, что доксорубицин с частиц аккумулируется в ядре.

Для прояснения механизмов проникновения нагруженных доксорубицином частиц нитрида бора в клетки был проведен сравнительный анализ распределения наноконъюгатов и эндосом/лизосом, окрашенных с помощью специфического красителя LysoTracker Green. По данным конфокальной микроскопии как в чувствительных, так и в резистентных клетках наблюдается колокализация наноконъюгатов и эндосом/лизосом (рис. 7). Ранее мы также показали, что ингибитор динаминопосредованного эндоцитоза динасор угнетает накопление доксорубицина в клетках, инкубированных с частицами нитрида бора, нагруженными доксорубицином [25]. Полученные данные указывают на то, что наноконъюгаты нитрида бора с доксорубицином высвобождают химиопрепарат вне зоны мембранных транспортеров и поэтому могут рассматриваться в плане их возможного применения для преодоления механизмов множественной лекарственной устойчивости.

Заключение

Наночастицы гексагонального нитрида бора размером 100–150 нм, полученные методом химического осаждения из газовой фазы, были использованы для получения наноконъюгатов с высоким уровнем нагрузки доксорубицина. Наночастицы нитрида бора, нагруженные доксорубицином, стабильны при нейтральном уровне pH, но эффективно высвобождают химиопрепарат в среде с уровнем pH 4,5–5,5. Проведенные исследования показали, что трансформированные клетки, как чувствительные, так и резистентные к доксорубицину, способны активно эндоцитировать наноконъюгаты, высвобождая доксорубицин в ЦП. Эксперименты по исследованию действия наноконъюгатов частиц нитрида бора с доксорубицином на чувствительные и резистентные к химиопрепаратам клетки будут продолжены.

Благодарим К.Л. Фаерштейна (НИТУ «МИСЦ») за помощь в проведении просвечивающей электронной микроскопии и Е.Ю. Рыбалкину (ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина») за предоставленные культуры клеток.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Kirtane A.R., Kalscheuer S.M., Panyama J. Exploiting nanotechnology to overcome tumor drug resistance: Challenges and opportunities. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65(13–14): 1731–47.
2. Amin M.L. P-glycoprotein inhibition for optimal drug delivery. *Drug Target Insights* 2013;7:27–34.
3. Hillaireau H., Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci* 2009;66(17):2873–96.
4. Couvreur P. Nanoparticles in drug delivery: past, present and future. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65(1):21–3.
5. Torchilin V.P., Lukyanov A.N. Peptide and protein drug delivery to and into tumors: challenges

- and solutions. *Drug Discov Today* 2003;8(6):259–66.
6. Oerlemans C., Bult W., Bos M. et al. Polymeric micelles in anticancer therapy: targeting, imaging and triggered release. *Pharm Res* 2010;27(12):2569–89.
 7. Kaasgaard T., Andresen T.L. Liposomal cancer therapy: exploiting tumor characteristics. *expert opin drug deliv* 2010;7(2):225–43.
 8. Mintzer M.A., Grinstaff M.W. Biomedical applications of dendrimers: a tutorial. *Chem Soc Rev* 2011;40(1):173–90.
 9. Dreaden E.C., Mackey M.A., Huang X. et al. Beating cancer in multiple ways using nanogold. *Chem Soc Rev* 2011;40(7):3391–404.
 10. Lal S., Clare S.E., Halas N.J. Nanoshell-enabled photothermal cancer therapy: impending clinical impact. *Acc Chem Res* 2008;41(12):1842–51.
 11. Jokerst J.V., Gambhir S.S. Molecular imaging with theranostic nanoparticles. *Acc Chem Res* 2011;44(10):1050–60.
 12. Trewyn B.G., Slowing I.I., Giri S. et al. Synthesis and functionalization of a mesoporous silica nanoparticle based on the sol-gel process and applications in controlled release. *Acc Chem Res* 2007;40(9):846–53.
 13. Bonacchi S., Genovese D., Juris R. et al. Luminescent silica nanoparticles. extending the frontiers of brightness. *Angew Chem Int Ed Engl* 2011;50(18):4056–66.
 14. Xie J., Huang J., Li X. et al. Iron oxide nanoparticle platform for biomedical applications. *Curr Med Chem* 2009;16(10):1278–94.
 15. Torchilin V.P. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov* 2014;13(11):813–27.
 16. Hurst J. Chapter 9 – Boron nitride nanotubes, silicon carbide nanotubes, and carbon nanotubes – a comparison of properties and applications. In: *Nanotube Superfiber Materials*. Elsevier, 2014. Pp. 267–287.
 17. Ciofani G., Del Turco S., Genchi G.G. et al. Transferrin-conjugated boron nitride nanotubes: Protein grafting, characterization, and interaction with human endothelial cells. *Int J Pharm* 2012;436(1–2):444–53.
 18. Ferreira T.H., Marino A., Rocca A. et al. Folate-grafted boron nitride nanotubes: possible exploitation in cancer therapy. *Int J Pharm* 2015;481(1–2): 56–63.
 19. Li X., Wen G., Zhang T. et al. Synthesis of continuous boron nitride nanofibers by electrospinning. *Physics Procedia* 2012;25:185–8.
 20. Lin L.X., Zheng Y., Li Z.-H. et al. A simple method to synthesize polyhedral hexagonal boron nitride nanofibers. *Solid State Sci* 2007;9:1099–104.
 21. Lacerda L., Raffa V., Prato M. et al. Cell-penetrating CNTs for delivery of therapeutics. *Nano Today* 2007;2:38–43.
 22. Yamakov V., Park C., Kang J.H. et al. Piezoelectric molecular dynamics model for boron nitride nanotubes. *Computat Mater Sci* 2014;95:362–70.
 23. Ciofani G., Danti S., Genchi G.G. et al. Boron nitride nanotubes: biocompatibility and potential spill-over in nanomedicine. *Small* 2013;9(9–10):1672–85.
 24. Salvetti A., Rossi L., Iacopetti P. et al. *In vivo* biocompatibility of boron nitride nanotubes: effects on stem cell biology and tissue regeneration in planarians. *Nanomedicine* 2015;10(12):1911–22.
 25. Sukhorukova I.V., Zhitnyak I.Y., Kovalskii A.M. et al. Boron nitride nanoparticles with petal-like surface as anticancer drug delivery system. *ACS Appl Mater Interfaces* 2015;7(31):17217–25.
 26. Tang C., Bando Y., Sato T., Kurashima K. A novel precursor for synthesis of pure boron nitride nanotubes. *Chem Commun* 2002;12:1290–1.
 27. Bannikov G.A., Guelstein V.I., Montesano R. et al. Cell shape and organization of cytoskeleton and surface fibronectin in non-tumorigenic rat liver cultures. *J Cell Sci* 1982;54:47–67.
 28. Park S.W., Lomri N., Simeoni L.A. et al. Analysis of P-glycoprotein-mediated membrane transport in human peripheral blood lymphocytes using the uic2 shift assay. *Cytometry A* 2003;53(2):67–78.
 29. Richert N., Akiyama S., Shen D. et al. Multiply drug-resistant human KB carcinoma cells have decreased amounts of a 75-kDa and a 72-kDa glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82(8): 2330–3.
 30. Dreher M.R., Liu W., Michelich C.R. et al. Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. *J Natl Cancer Inst* 2006;98:335–44.
 31. Champion J.A., Katare Y.K., Mitragotri S. Particle shape: A new design parameter for micro- and nanoscale drug delivery carriers. *J Control Release* 2007;121(1–2):3–9.