УДК 544.77;577.164;577.19

ПОЛУЧЕНИЕ ЖЕЛАТИНОВЫХ НАНОЧАСТИЦ И ИССЛЕДОВАНИЕ ИХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С КУЛЬТИВИРУЕМЫМИ КЛЕТКАМИ

Т. О. СУХАН [1)]***, Т. Г. ШУТОВА*** [2)]***,***
А. М. УШЕНКИНА [2)]***, А. И. ПОТАПОВИЧ*** [1)]***, В. А. КОСТЮК*** [1)]

[1)]*Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь*
[2)]*Институт химии новых материалов НАН Беларуси,*
ул. Ф. Скорины, 36, 220141, г. Минск, Беларусь

Представлены экспериментальные данные, свидетельствующие о возможности использования желатиновых наночастиц в качестве средств доставки фармакологически активных субстанций в культивируемые нормальные и раковые клетки человека. Показано, что при инкубации наноструктурированного красителя нильского красного с клетками аденокарциномы молочной железы человека линии MDA-MB-231 и нормальными фибробластами содержание красителя в клетках возрастает с увеличением времени инкубации и достигает максимума через 24 ч, при этом накопление красителя в раковых клетках происходит значительно быстрее, чем в фибробластах. Установлено, что включение кверцетина в желатиновые наночастицы приводило к достоверному усилению его цитотоксического действия в отношении раковых клеток.

Ключевые слова: желатиновые наночастицы; фибробласты; клеточная линия MDA-MB-231; кверцетин; нильский красный.

Образец цитирования:
Сухан Т. О., Шутова Т. Г., Ушенкина А. М., Потапович А. И., Костюк В. А. Получение желатиновых наночастиц и исследование их взаимодействия с культивируемыми клетками // Журн. Белорус. гос. ун-та. Биология. 2018. № 1. С. 13–19.

For citation:
Suhan T. O., Shutava T. G., Ushenkina A. M., Potapovich A. I., Kostyuk V. A. Preparation of gelatinum nanoparticles and investigation of their interaction with cultivated cells. *J. Belarus. State Univ. Biol.* 2018. No. 1. P. 13–19 (in Russ.).

Авторы:
Татьяна Олеговна Сухан – кандидат биологических наук; старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.
Татьяна Геннадьевна Шутова – кандидат химических наук; ведущий научный сотрудник лаборатории биополимерных капсулированных структур.
Анастасия Михайловна Ушенкина – лаборант лаборатории биополимерных капсулированных структур.
Алла Ивановна Потапович – кандидат биологических наук; ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.
Владимир Андреевич Костюк – доктор химических наук, доцент; заведующий научно-исследовательской лабораторией физиологии кафедры физиологии человека и животных биологического факультета.

Authors:
Tatyana O. Suhan, PhD (biology); senior researcher at the scientific research laboratory of physiology at the department of human and animal physiology, faculty of biology.
tanyasuhan@mail.ru
Tatyana G. Shutava, PhD (chemistry); leading researcher at the laboratory of biopolymer encapsulated structures.
shutova@ichnm.basnet.by
Anastasiya M. Ushenkina, laboratory assistant at the laboratory of biopolymer encapsulated structures.
aushenkina@gmail.com
Alla I. Potapovich, PhD (biology); leading researcher at the scientific research laboratory of physiology at the department of human and animal physiology, faculty of biology.
pot-alla@rambler.ru
Vladimir A. Kostyuk, doctor of science (chemistry), docent; head of the scientific research laboratory of physiology at the department of human and animal physiology, faculty of biology.
kostyuk@bsu.by

Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2018. № 1. С. 13–19
Journal of the Belarusian State University. Biology. 2018. No. 1. P. 13–19

PREPARATION OF GELATINUM NANOPARTICLES AND INVESTIGATION OF THEIR INTERACTION WITH CULTIVATED CELLS

T. O. SUHAN [a], ***T. G. SHUTAVA*** [b], ***A. M. USHENKINA*** [b], ***A. I. POTAPOVICH*** [a], ***V. A. KOSTYUK*** [a]

[a] *Belarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus*
[b] *Institute of Chemistry of New Materials, National Academy of Sciences of Belarus, 36 F. Skaryny Street, Minsk 220141, Belarus*

Corresponding author: V. A. Kostyuk (kostyuk@bsu.by)

Experimental data showing that gelatin nanoparticles may be used as a means of delivery of pharmacologically active substances into cultured human normal and cancer cells are presented in the paper. It was found that the incubation of the encapsulated dye Nile red with the cells of the human breast adenocarcinoma MDA-MB-231 and normal fibroblasts resulted to the increase of the dye content in the cells with the increasing incubation time and reached a maximum after 24 h, with the accumulation of dye in cancer cells much faster than in fibroblasts. It was found that the inclusion of quercetin in gelatin nanoparticles led to a significant increase in cytotoxic effect of this polyphenol against cancer cells.

Key words: gelatin nanoparticles; fibroblasts; cell line MDA-MB-231; quercetin; Nile red.

Введение

В качестве потенциальных средств хемопревенции в последние годы рассматриваются растительные полифенольные соединения (РПС). Некоторые из них, например куркумин и кверцетин, обладают цитотоксичностью в отношении многих типов опухолевых клеток. Кроме того, РПС характеризуются выраженным антиоксидантным действием [1]. Известно, что влияние на организм негативных физико-химических факторов приводит к гиперпродукции сильных оксидантов, повреждению тканей и развитию хронического воспаления, которое, в свою очередь, может стать причиной канцерогенеза и возникновения различных форм рака [2; 3]. В таких случаях в качестве онкопротекторов могут быть использованы антиоксиданты. Антиоксидантная терапия может оказаться эффективной и после проведения курса химиотерапии или лучевой терапии. Несмотря на выявленное в многочисленных эпидемиологических исследованиях положительное воздействие полифенолов на здоровье животных и человека, их фармацевтическое и медицинское использование все еще незначительно как в силу ограниченной растворимости, так и из-за низкой всасываемости в кишечнике. Кроме того, низкая биодоступность РПС обусловлена активно протекающими процессами биотрансформации (конъюгация, метилирование и окисление) в эпителиальных клетках желудочно-кишечного тракта и гепатоцитах [4].

Перспективным подходом для повышения биодоступности и улучшения терапевтического потенциала РПС стало использование в качестве средств доставки полимерных и липидных наноразмерных контейнеров-переносчиков. Включение РПС в наночастицы не только повышает их растворимость, но и защищает фитопрепараты от неблагоприятного внешнего воздействия, увеличивает физико-химическую стабильность и время их хранения, расширяет тканевую биодоступность, позволяет контролировать процесс высвобождения лекарственной субстанции [5]. Желатиновые нанокапсулы широко используются в качестве транспортных наноконтейнеров, повышающих биодоступность лекарственных средств. Преимуществом желатиновых наночастиц (ЖН) является прекрасная биосовместимость, а также отсутствие токсичности как у самого желатина (классифицируется Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов США как безопасное вещество), так и у продуктов его деградации. Кроме того, ЖН можно вводить неинвазивно (назально), что позволяет миновать гематоэнцефалический барьер, не дающий попасть в мозг через кровь большинству фармакологических препаратов [6; 7]. В настоящей работе предпринята попытка оценить возможности использования ЖН, полученных методом двухстадийной десольватации, в качестве средств доставки в культивируемые нормальные и раковые клетки человека фармакологически активных субстанций.

Материалы и методы исследований

Материалы. Желатин типа А (300 Блум), глутаровый альдегид (50 % водный раствор), полиэтиленимин (ПЭИ) (50 % водный раствор), полистиролсульфонат (ПСС) натрия, полиаллиламина гидрохлорид, изотонический фосфатный буфер (ИФБ) (pH 7,4), диметилсульфоксид (ДМСО), нильский

красный (НК), твин-80 поставлялись компанией *Sigma-Aldrich* (Германия). Ростовую среду Игла, модифицированную Дульбекко (ДМЕМ), покупали у фирмы *Lonza* (Бельгия), эмбриональную сыворотку – у фирмы *Gibco* (США).

Клеточные культуры. В работе использовали нормальные фибробласты человека линии FL (*human lung fibroblasts*) и клетки аденокарциномы молочной железы человека линии MDA-MB-231. Клетки растили в полной среде ДМЕМ с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки, 2 ммоль/л L-глутамина и антибиотиков (100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина) при стандартных условиях (37 °C, 5 % CO_2).

Пролиферативная активность и жизнеспособность клеток. Пролиферативную активность и жизнеспособность клеток определяли в 96-луночных планшетах, используя реактив PrestoBlue™ (*Invitrogen*, США), содержащий нефлуоресцентный компонент голубого цвета резазурин, который модифицируется жизнеспособными клетками в высокофлуоресцентное соединение красного цвета резофурин. Реактив PrestoBlue™ разводили в культуральной среде (1 : 9) и добавляли к клеткам в количестве 100 мкл на лунку. Перед этим клетки отмывали один раз, добавляя в каждую лунку по 200 мкл ИФБ. На каждом планшете оставляли лунки с культуральной средой без клеток для определения базового уровня флуоресценции. Флуоресценцию измеряли после инкубации планшетов в CO_2-инкубаторе в течение 2 ч, используя значения Ex 560 нм (±25 нм), Em 590 нм (±10 нм).

Получение желатиновых наночастиц. Желатиновые наночастицы получали методом двухстадийной десольватации без использования поверхностно-активных веществ (ПАВ) по модифицированной методике [8]. Концентрацию ЖН в растворе в пересчете на сухое вещество рассчитывали по формуле

$$c = \frac{m_1 - m_0}{V}, \quad (1)$$

где c – концентрация ЖН, мг/мл; m_1 – масса пробирки с ЖН после высушивания, мг; m_0 – масса пустой пробирки, мг; V – объем аликвоты, мл.

Массовую долю желатина в ЖН определяли по формуле

$$w = \frac{m_1 - m_0}{m_2 - m_0} \cdot 100\ \%, \quad (2)$$

где w – массовая доля желатина в частицах, %; m_1 – масса пробирки с ЖН после высушивания, мг; m_0 – масса пустой пробирки, мг; m_2 – масса пробирки с ЖН перед высушиванием, мг.

Для измерения гидродинамических размеров и коэффициента полидисперсности желатиновых частиц методом динамического рассеяния света (ДРС), а также дзета-потенциала частиц (ζ-потенциал) методом электрофоретического рассеяния света использовали прибор Zetasizer Nano ZS (*Malvern*, Великобритания).

Исследование морфологии наночастиц желатина проводили при помощи атомно-силового микроскопа MultiMode Nanoscope III (США). При сканировании применяли зонды NPS-1 из нитрида кремния. Изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения *Nanoscope v5.31*. На поверхности кремниевых подложек формировали один бислой ПЭИ/ПСС, полимеры адсорбировали из их водных растворов с концентрацией 1 мг/мл в течение 5 мин и тщательно промывали дистиллированной водой. Затем на подложки наносили 20 мкл дисперсии ЖН, разбавленной до концентрации 1 мг/мл. Через 1 мин раствор отбирали с поверхности подложек, а подложки с ЖН сушили на воздухе в течение суток.

Получение желатиновых наночастиц, содержащих кверцетин. Для получения желатиновых наночастиц, содержащих кверцетин (Кв-ЖН), к 15 мл дисперсии ЖН в воде с концентрацией 1,4 мг/мл добавляли по каплям 3 мл 0,24 мг/мл раствора кверцетина в этиловом спирте при постоянной обработке ультразвуком. Смесь оставляли на 30 мин при комнатной температуре. Полученные ЖН отделяли центрифугированием (центрифуга Z36HK, Германия) при 6000 об/мин в течение 10 мин и редиспергировали в 2 мл дистиллированной воды. Для удаления остатков органического растворителя и неадсорбированных молекул кверцетина ЖН промывали водой. Полученный образец содержал ~10 мг/мл ЖН с 0,052 ммоль/г кверцетина (0,52 ммоль/л кверцетина).

Получение желатиновых наночастиц, содержащих НК. Для получения желатиновых наночастиц, содержащих флуоресцентный краситель НК, к 30 мл дисперсии ЖН в дистиллированной воде с концентрацией 5,25 мг/мл порциями (по 0,2 мл) добавляли 6 мл раствора НК (0,45 мг/мл) и обрабатывали образец ультразвуком в течение 1 мин после введения каждой порции красителя. Полученную дисперсию оставляли на 30 мин при комнатной температуре, после чего разделяли на аликвоты по 1 мл и отделяли ЖН от супернатанта путем центрифугирования при 5500 об/мин в течение 10 мин. Желатиновые наночастицы диспергировали в 0,5 мл дистиллированной воды и объединяли аликвоты. Полученный

образец хранили при температуре 4 °С. Содержание НК в ЖН определяли спектрофлуориметрически при длине волны возбуждения 550 нм и длине волны испускания 650 нм. Предварительно краситель дважды экстрагировали этиловым спиртом.

Для визуализации процесса накопления нильского красного в клетках использовали флуоресцентный микроскоп Axiovert 25 (*Carl Zeiss*, Германия), оснащенный цифровой фотокамерой.

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов проводили с использованием стандартной компьютерной программы *Excel*. Результаты представлены как среднее значение и стандартная ошибка среднего (Mean ± SE). Достоверность различий между экспериментальными группами определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Физико-химические свойства желатиновых наночастиц. Средний гидродинамический диаметр (*D*) желатиновых частиц, полученных методом двухстадийной десольватации, по интенсивности светорассеяния равен 264 ± 5 нм. В дисперсии ЖН в наибольшей степени представлены фракции частиц, имеющих диаметр в диапазоне от 190 до 220 нм (рис. 1, *а*). Их содержание достигает 46,9 % общего числа частиц. Средний диаметр и диаметр частиц, составляющих наибольшую долю в образце, различаются незначительно, что указывает на узкое распределение ЖН по размерам. Коэффициент полидисперсности ЖН равен 0,030 ± 0,012. Для ЖН характерно высокое значение ζ-потенциала, равное +20,50 ± 0,23 мВ. Достаточно большой положительный заряд на поверхности частиц обусловливает высокую коллоидную устойчивость раствора. Хранение ЖН в течение шести месяцев при температуре 4 °С не приводит к их укрупнению.

Согласно атомно-силовой микроскопии (АСМ) (рис. 1, *б*) средний диаметр ЖН составляет около 360 нм, а их высота не превышает 70 нм. Некоторое увеличение латеральных размеров частиц на АСМ-изображениях по сравнению с диаметром, определенным методом ДРС, связано с высушиванием ЖН, нанесенных на подложку, при приготовлении препаратов для атомно-силовой микроскопии. Тем не менее с учетом этого данные АСМ хорошо согласуются с результатами, полученными методом ДРС.

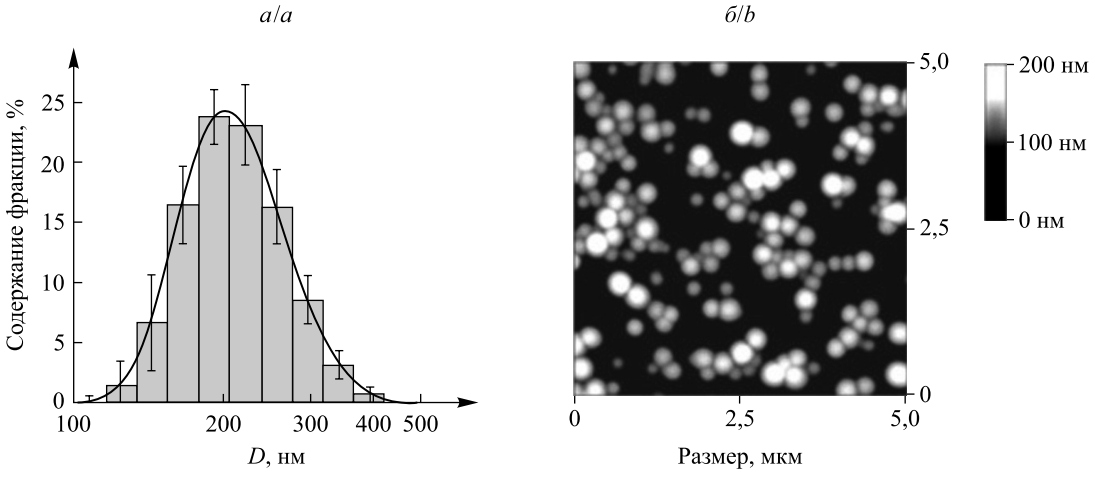


Рис. 1. Распределение по размерам (*а*) и изображение желатиновых наночастиц, полученное с помощью атомно-силовой микроскопии (*б*)

Fig. 1. The distribution in size (*a*) and the image of gelatin nanoparticles, obtained using atomic force microscopy (*b*)

Определение способности желатиновых наночастиц проникать и накапливаться в нормальных фибробластах и раковых клетках человека (MDA-MB-231). Для оценки эффективности клеточного поглощения свободного (НК) или инкапсулированного (НК-ЖН) нильского красного клетки растили в 24-луночных планшетах до конфлюэнтности 60 %, затем заменяли полную среду на среду без сыворотки (1 мл на лунку), содержащую 10 мкмоль/л свободного или инкапсулированного красителя, инкубировали 1, 4 и 24 ч, после чего удаляли среду инкубации, клеточный монослой дважды промывали ИФБ (pH 7,4) и замораживали прикрепленные клетки при температуре –70 °С. После оттаивания клеток при комнатной температуре в каждую лунку 24-луночного планшета добавляли по 300 мкл ДМСО и выдерживали планшет 1 ч в темноте при постоянном перемешивании на мини-шейкере (PSU-2T, *BioSan*, Латвия), после чего аликвоты из каждой лунки в трех повторах переносили в лунки 96-луночного планшета (100 мкл на лунку) и измеряли интенсивность флуоресценции (Ex/Em = 550/650).

Таблица 1

Концентрация нильского красного, экстрагируемого ДМСО из клеток, предварительно инкубированных с НК или НК-ЖН, мкмоль/л

Table 1

The concentration of Nile red, extracted by DMSO from cells pre-incubated with Nile red or Nile red – nanoparticles, μmol/l

Время инкубации, ч	MDA-MB-231		Фибробласты	
	НК	НК-ЖН	НК	НК-ЖН
1	4,6 ± 0,2	2,3 ± 0,7**	2,4 ± 0,6	0,3 ± 0,1**#
4	4,1 ± 0,2	6,7 ± 0,2**	4,1 ± 0,1	1,1 ± 0,2**#
24	4,1 ± 0,2	9,4 ± 0,6**	4,3 ± 01	5,3 ± 0,1*#

*, ** Различия достоверны по отношению к клеткам, инкубированным с НК, при $p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно; # – различия достоверны по отношению к MDA-MB-231, инкубированным с НК-ЖН, при $p < 0,01$.

При инкубации НК-ЖН с клетками линии MDA-MB-231 установлено, что содержание красителя в клетках возрастает с увеличением времени инкубации и достигает максимума через 24 ч (табл. 1). При этом через 1 ч инкубации количество нильского красного в клетках составляло 25 %, а через 4 ч – 71 % от максимального значения. При инкубации НК-ЖН с фибробластами содержание красителя в клетках также возрастает с увеличением времени инкубации и достигает максимума через 24 ч, однако в этом случае клеточное поглощение желатиновых наночастиц происходит существенно медленнее: через 1 и 4 ч инкубации количество красителя в клетках составляло 6 и 21 % от максимального значения соответственно. Следует также отметить, что максимальное содержание красителя в клетках аденокарциномы молочной железы человека (MDA-MB-231) было в 1,8 раза выше ($p < 0,01$), чем в нормальных фибробластах. При внесении в культуральную среду свободного НК максимальное содержание красителя в клетках MDA-MB-231 наблюдалось через 1 ч, а в фибробластах – через 4 ч инкубации (см. табл. 1).

Увеличение в клетках содержания нильского красного в ходе их инкубации с наноструктурированным красителем подтверждено с помощью флуоресцентной микроскопии (рис. 2).

Поглощение клетками желатиновых наночастиц может быть обусловлено неспецифическим адсорбционным эндоцитозом. Кроме того, известно, что на поверхности фибробластов и клеток линии MDA-MB-231 присутствуют Arg-Gly-Asp-зависимые коллагеновые рецепторы [9; 10], посредством которых может осуществляться специфическое связывание ЖН с плазматической мембраной, облегчающее их

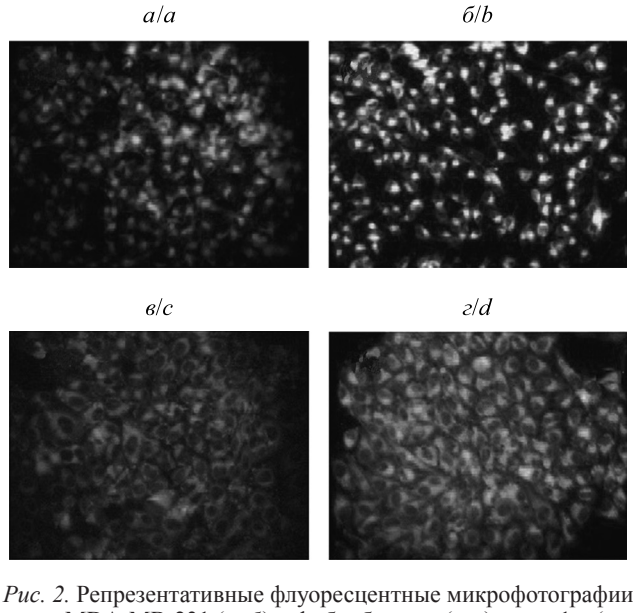


Рис. 2. Репрезентативные флуоресцентные микрофотографии клеток MDA-MB-231 (*а*, *б*) и фибробластов (*в*, *г*) через 1 ч (*а*, *в*) и 6 ч (*б*, *г*) инкубации с НК-ЖН в концентрации 10 мкмоль/л

Fig. 2. Representative fluorescent micrographs of MDA-MB-231 cells (*a*, *b*) and fibroblasts (*c*, *d*) after 1 h (*a*, *c*) and 6 h (*b*, *d*) incubation with Nile red – gelatin nanoparticles at the concentration of 10 μmol/l

последующее поглощение клеткой. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что процессы адсорбции и эндоцитоза ЖН эффективнее протекают в трансформированных клетках линии MDA-MB-231, чем в нормальных фибробластах.

Влияние кверцетина и кверцетина в составе желатиновых наночастиц на пролиферативную активность и жизнеспособность культивируемых клеток человека. Цитостатическая и цитотоксическая активность природных и синтетических соединений свидетельствует об их потенциальной способности блокировать рост опухоли в результате прямого токсического воздействия на раковые клетки. Для первичного выявления такого рода активности оценивают влияние потенциальных противораковых средств на рост и пролиферацию различных линий раковых клеток.

Таблица 2

Пролиферативная активность и жизнеспособность клеток (в % по отношению к контролю (100 %)) через 24 ч инкубации с Кв или Кв-ЖН

Table 2

Proliferative activity and cell viability (in % to control (100 %)) after 24 h incubation with quercetin or quercetin – gelatin nanoparticles

Тип клеток	Кв, мкмоль/л			Кв-ЖН, мкмоль/л		
	12	25	50	12	25	50
MDA-MB-231	95,0 ± 5,8	94,0 ± 9,6	94,3 ± 8,0	100,0 ± 5,4	92,0 ± 8,4	69,0 ± 9,7*
Фибробласты	94,1 ± 6,3	94,9 ± 7,2	73,3 ± 4,6**	92,4 ± 8,0	88,7 ± 8,2	65,6 ± 5,6**

*, ** Различия достоверны по отношению к контрольным клеткам при $p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно.

В данном разделе представлены результаты сравнительного исследования цитотоксического действия наноструктурированного и свободного кверцетина в отношении культивируемых клеток аденокарциномы молочной железы линии MDA-MB-231 и нормальных фибробластов. В этих экспериментах в культуральную среду клеток, культивируемых в 96-луночных планшетах, добавляли кверцетин в виде раствора в ДМСО (Кв) или наноструктурированный кверцетин в ЖН (Кв-ЖН). В обоих случаях конечные концентрации кверцетина находились в диапазоне от 12 до 50 мкмоль/л. Как следует из данных, приведенных в табл. 2, Кв в рассматриваемом диапазоне концентраций не оказывал статистически достоверного воздействия на жизнеспособность клеток MDA-MB-231, но при концентрации 50 мкмоль/л снижал пролиферативную активность и жизнеспособность нормальных фибробластов на 27 %. Включение кверцетина в ЖН приводило к усилению его цитотоксического действия в отношении нормальных фибробластов и особенно раковых клеток. Так, наноструктурированный кверцетин Кв-ЖН в концентрации 50 мкмоль/л снижал пролиферативную активность и жизнеспособность нормальных фибробластов и клеток линии MDA-MB-231 на 34 и 31 % соответственно.

Принимая во внимание данные, приведенные в табл. 1, свидетельствующие о выраженной способности исследованных клеток поглощать ЖН, можно предположить, что повышение цитотоксичности наноструктурированного кверцетина (см. табл. 2) обусловлено облегчением его трансмембранного переноса и, как следствие, более высокой внутриклеточной концентрацией в сравнении с растворимой формой.

Выводы

Желатиновые наночастицы, полученные методом двухстадийной десольватации без использования ПАВ, могут быть предложены в качестве средств доставки фармакологически активных субстанций к клеткам-мишеням. Показано, что желатиновые наночастицы поглощаются раковыми клетками значительно быстрее, чем нормальными фибробластами. Включение кверцетина в желатиновые наночастицы приводит к достоверному усилению его цитотоксического действия в отношении раковых клеток.

Библиографические ссылки

1. *Костюк В. А., Потапович А. И.* Биорадикалы и биоантиоксиданты. Минск : БГУ, 2004.

2. *Shacter E., Beecham E. J., Covey J. M., et al.* Activated neutrophils induce prolonged DNA damage in neighboring cells // Carcinogenesis. 1988. Vol. 9, issue 12. P. 2297–2304.

3. *Brigelius-Flohé R., Flohé L.* Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors // Antioxid. Redox Signal. 2011. Vol. 15, issue 8. P. 2335–2381. DOI: 10.1089/ars.2010.3534.

4. *Костюк В. А.* Биотрансформация и биодоступность растительных полифенольных соединений // Тр. БГУ. Сер.: Физиол., биохим. и мол. основы функционирования биосистем. 2016. Т. 11, ч. 2. С. 47–55.

5. *Conde J., Doria G., Baptista P.* Noble metal nanoparticles applications in cancer // J. Drug Deliv. 2012. Atricle ID: 751075. DOI: 10.1155/2012/751075.

6. *Jin Y., Kim I. Y., Kim I. D., et al.* Biodegradable gelatin microspheres enhance the neuroprotective potency of osteopontin via quick and sustained release in the post-ischemic brain // Acta Biomater. 2014. Vol. 10, issue 7. P. 3126–3135. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.02.045.

7. *Joachim E., Kim I. D., Jin Y., et al.* Gelatin nanoparticles enhance the neuroprotective effects of intranasally administered osteopontin in rat ischemic stroke model // Drug Deliv. Transl. Res. 2014. Vol. 4, issues 5–6. P. 395–399. DOI: 10.1007/s13346-014-0208-9.

8. *Coester C. J., Langer K., Van Briesen H., et al.* Gelatin nanoparticles by two-step desolvation a new preparation method, surface modifications and cell uptake // J. Microencapsul. 2000. Vol. 17, issue 2. P. 187–193. DOI: 10.1080/026520400288427.

9. *Lu M. L., McCarron R. J., Jacobson B. S.* Initiation of HeLa cell adhesion to collagen is dependent upon collagen receptor upregulation, segregation to the basal plasma membrane, clustering and binding to the cytoskeleton // J. Cell Sci. 1992. Vol. 101. P. 873–883.

10. *Agrez M. V., Bates R. C., Boyd A. W., et al.* Arg-Gly-Asp-containing peptides expose novel collagen receptors on fibroblasts: implications for wound healing // Cell Regul. 1991. Vol. 2, issue 12. P. 1035–1044.

References

1. Kostyuk V. A., Potapovich A. I. [Bioradicals and bioantioxidants]. Minsk : BSU, 2004 (in Russ.).

2. Shacter E., Beecham E. J., Covey J. M., et al. Activated neutrophils induce prolonged DNA damage in neighboring cells. *Carcinogenesis*. 1988. Vol. 9, issue 12. P. 2297–2304.

3. Brigelius-Flohé R., Flohé L. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxid. Redox Signal.* 2011. Vol. 15, issue 8. P. 2335–2381. DOI: 10.1089/ars.2010.3534.

4. Kostyuk V. A. [Biotransformation and Bioavailability of Plant Polyphenolic Compounds]. *Proc. BSU. Ser.: Physiol., biochem. and mol. basis of funct. of biosyst.* 2016. Vol. 11, part 2. P. 47–55 (in Russ.).

5. Conde J., Doria G., Baptista P. Noble metal nanoparticles applications in cancer. *J. Drug Deliv.* 2012. Atricle ID: 751075. DOI: 10.1155/2012/751075.

6. Jin Y., Kim I. Y., Kim I. D., et al. Biodegradable gelatin microspheres enhance the neuroprotective potency of osteopontin via quick and sustained release in the post-ischemic brain. *Acta Biomater.* 2014. Vol. 10, issue 7. P. 3126–3135. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.02.045.

7. Joachim E., Kim I. D., Jin Y., et al. Gelatin nanoparticles enhance the neuroprotective effects of intranasally administered osteopontin in rat ischemic stroke model. *Drug Deliv. Transl. Res.* 2014. Vol. 4, issues 5–6. P. 395–399. DOI: 10.1007/s13346-014-0208-9.

8. Coester C. J., Langer K., Van Briesen H., et al. Gelatin nanoparticles by two-step desolvation a new preparation method, surface modifications and cell uptake. *J. Microencapsul.* 2000. Vol. 17, issue 2. P. 187–193. DOI: 10.1080/026520400288427.

9. Lu M. L., McCarron R. J., Jacobson B. S. Initiation of HeLa cell adhesion to collagen is dependent upon collagen receptor upregulation, segregation to the basal plasma membrane, clustering and binding to the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 1992. Vol. 101. P. 873–883.

10. Agrez M. V., Bates R. C., Boyd A. W., et al. Arg-Gly-Asp-containing peptides expose novel collagen receptors on fibroblasts: implications for wound healing. *Cell Regul.* 1991. Vol. 2, issue 12. P. 1035–1044.

Статья поступила в редколлегию 10.01.2018.
Received by editorial board 10.01.2018.