

Краткие сообщения

УДК 544.77.051.7

EDN: MUMYAI

DOI: 10.21285/2227-2925-2023-13-3-454-460



Получение наночастиц mcl-полигидроксиалканоатов, стабилизированных неионогенным детергентом Tween 80

И.Н. Зубков***✉, В.В. Высочинская****, А.В. Кашина****, С.М. Шишлянников****

*Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

**Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок – филиал «ФНЦ Пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

***Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

****Институт высокомолекулярных соединений РАН, г. Санкт-Петербург, Российская Федерация

Аннотация. Наночастицы на основе биоразлагаемых полимеров находят множество применений в медицине как средства внутриклеточной доставки лекарственных препаратов. Одними из самых перспективных полимеров липидной природы являются поли-3-гидроксиалканоаты, получаемые биосинтетическим путем. Наиболее широко применяются полигидроксибутират и полигидроксиивалерат (scI-поли-3-гидроксиалканоаты), которые растворимы только в хлорорганических растворителях. Использование хлорорганических растворителей сопряжено с рядом трудностей, т.к. они оказывают канцерогенное действие на организм человека. Однако поли-3-гидроксиалканоаты, состоящие из остатков гидроксижирных кислот с 6–14 атомами углерода в главной цепи (mcl-поли-3-гидроксиалканоаты), растворимы не только в хлороформе или дихлорметане, но и в предельных углеводородах. Углеводороды (например, n-гексан) легко отделяются от водных растворов и не обладают высокой цитотоксичностью. Следовательно, использование mcl-поли-3-гидроксиалканоатов позволяет исключить возможность загрязнения готовой лекарственной формы хлорорганическими соединениями. Предложена методика синтеза наночастиц mcl-поли-3-гидроксиалканоатов, стабилизированных неионогенным детергентом Tween 80. Оптимизировано соотношение между концентрацией поли-3-гидроксиалканоата и детергента. Показано, что получаемые частицы имеют средний размер 200 ± 90 нм и электрокинетический потенциал -17 ± 5 мВ. Изучена стабильность раствора частиц при температуре 4 °С. Установлено, что наночастицы не изменяют размер и электрокинетический потенциал в течение 90 дней при температуре 4 °С. Методом флуоресцентной микроскопии показана возможность их доставки в клетки линии ВНК-21 в течение 2 ч. При концентрации до 200 мкг/мл получаемые наночастицы не оказывают токсического действия на клетки ВНК-21.

Ключевые слова: полигидроксиалканоаты, наночастицы, Tween 80, ВНК-21, цитотоксичность

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект 23-25-00165).

Для цитирования: Зубков И.Н., Высочинская В.В., Кашина А.В., Шишлянников С.М. Получение наночастиц mcl-полигидроксиалканоатов, стабилизированных неионогенным детергентом Tween 80 // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2023. Т. 13. N 3. С. 454–460. <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-454-460>. EDN: MUMYAI.

Brief communication

Preparation of mcl-polyhydroxyalkanoate nanoparticles stabilized by the Tween 80 nonionic surfactant

Ilya N. Zubkov***✉, Vera V. Vysochinskaya****, Anna V. Kashina****,

Sergey M. Shishlyannikov****

*Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russian Federation

**All-Russian Research Institute for Food Additives, Branch of V.M. Gorbato Federal Research Center for Food Systems (RAS), Saint Petersburg, Russian Federation

***Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russian Federation

© Зубков И.Н., Высочинская В.В., Кашина А.В., Шишлянников С.М., 2023

****Institute of Macromolecular Compounds of RAS, Saint Petersburg, Russian Federation

Abstract. Nanoparticles based on biodegradable polymers find numerous applications in medicine as substances for intracellular drug delivery. Biosynthetically produced poly-3-hydroxyalkanoates (P3HAs) are among the most promising polymers of a lipid nature. In particular, polyhydroxybutyrate and polyhydroxyvalerate (scl-poly-3-hydroxyalkanoates) are widely used compounds, which are soluble only in organochlorine solvents. The use of organochlorine solvents faces several obstacles, since such chemicals may exhibit carcinogenic effects on the human body. However, the P3HAs compounds consisting of hydroxybutyric acid residues with 6–14 carbon atoms in the main chain (mcl-poly-3-hydroxyalkanoates) are soluble not only in CHCl_3 or CH_2Cl_2 but also in paraffins. These hydrocarbons, such as *n*-hexane, can be easily separated from aqueous solutions and are not known to exhibit high cytotoxicity. Consequently, the application of mcl-poly-3-hydroxyalkanoates can prevent the contamination of prepared dosage forms with organochlorine compounds. To this end, a methodology for the synthesis of mcl-P3HA nanoparticles stabilized with the Tween 80 nonionic surfactant was proposed. The ratio between the concentration of P3HA and the detergent was optimized. The present study revealed that the obtained particles have an average size of 200 ± 90 nm and a zeta potential of -17 ± 5 mV. Upon investigating the stability of the particle solution at 4 °C, it was found that the nanoparticles did not alter their size and zeta potential for 90 days. The fluorescence microscopy method showed that they could be delivered into BHK-21 cells within 2 h. In addition, the nanoparticles synthesized had no toxic effect on BHK-21 cells at a concentration of up to 200 µg/mL.

Keywords: Polyhydroxyalkanoates, nanoparticles, Tween 80, BHK-21, cytotoxicity

Funding. The work was financially supported by the Russian Science Foundation (project 23-25-00165).

For citation: Zubkov I.N., Vysochinskaya V.V., Kashina A.V., Shishlyannikov S.M. Preparation of mcl-polyhydroxyalkanoate nanoparticles stabilized by the Tween 80 nonionic surfactant. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya* = *Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*. 2023;13(3):454-460. (In Russian). <https://doi.org/10.21285/2227-2925-2023-13-3-454-460>. EDN: MUMYAI.

ВВЕДЕНИЕ

Наночастицы, состоящие из биоразлагаемых полимеров, с каждым годом все шире применяются в качестве средств доставки лекарственных препаратов [1]. Для получения наночастиц используют различные природные и синтетические полимеры, такие как белки (например, альбумин и желатин [2]), полисахариды (хитозан, целлюлозу или крахмал [3]), а также продукты конденсации органических кислот – полигликолид, полилактид и поли-3-гидроксиалканоат (ПГА) [4]. В отличие от полисахаридов и полипептидов, полимеры липидной природы способны образовывать комплексы с гидрофобными лекарственными препаратами, такими как доксорубин [5], рапамицин [6] и азатиоприн [7]. Одним из наиболее перспективных материалов для создания средств доставки лекарственных препаратов на основе полимерных наночастиц является ПГА [8]. ПГА деградирует в организме человека с образованием нетоксичных продуктов – 3-гидроксигирных кислот [9]. В зависимости от числа атомов углерода в главной цепи мономеров ПГА принято классифицировать на короткоцепочечные (scl-ПГА, состоят из остатков гидроксибутирата и гидроксивалерата), ПГА со средней длиной мономерных звеньев (mcl-ПГА, $\text{C}_6\text{--C}_{14}$) и длинноцепочечные (lcl-ПГА) с 15 и более атомами углерода в главной цепи мономеров [10]. Наиболее изученными являются scl-ПГА и частицы на их основе [8]. Главным недостатком scl-ПГА является слабая растворимость в нехлорированных органических растворителях [11]. При получении частиц scl-ПГА растворяют в хлороформе или дихлорметане, которые оказывают канцерогенное действие на организм человека [12]. В отличие от scl-ПГА, mcl-ПГА хорошо растворимы в углеводородах, которые не обладают значимой токсичностью и легко отделяются от водных растворов [13]. Для стабилизации наночастиц, состоящих из гидрофобных полимеров,

используют нетоксичные поверхностно-активные вещества, такие как полиэтиленгликоль [8], поливинилацетат [14] и полисорбат (например, Tween 80) [15]. В отличие от многих полимерных стабилизаторов, Tween 80 быстро выводится из организма человека и допущен к применению в составе вакцин [16].

Целью представленной работы была разработка метода синтеза стабилизированных Tween 80 наночастиц mcl-ПГА, а также изучение их доставки внутрь клеток эукариот и цитотоксичности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использованные в работе органические растворители, Tween 80 и вода имели степень чистоты analytical grade (Merck, Германия). Образец mcl-ПГА был получен биосинтетическим путем с помощью *Pseudomonas helmanticensis* P1 согласно методике [17]. Выделенный согласно методике [18] образец полимера состоял из остатков гидроксигексаноата (6%), гидроксооктаноата (49%), гидроксидеканоата (26%) и гидроксидодеканоата (24%), имел средневесовую молекулярную массу 100 кДа и среднечисловую молекулярную массу 67 кДа.

В работе использовали перевиваемую культуру клеток ВНК-21 (фибробласты почки сирийского хомячка), полученную из банка клеточных культур ATCC (Американская типовая коллекция клеточных культур, США). Клетки ВНК-21 культивировали на питательной среде MEM (Gibco, США) с добавлением 4 mM L-глутамин и 10% FBS (Gibco, США). Все эксперименты проводили без добавления антибиотиков. Для проведения экспериментов использовали суточный монослой. Все клеточные культуры поддерживали при температуре 37 °C и 5% CO_2 .

Для получения наночастиц 20 мкл 2%-го раствора ПГА в *n*-гексане смешивали с 20 мкл водного

раствора Tween 80 с концентрацией 0,02–0,4% и подвергали смесь воздействию ультразвука в диспергаторе (22 кГц, 150 Вт) в течение 5 мин. Водный слой отбирали и разбавляли водой в 10 раз. К 50 мкл разбавленного раствора частиц для изучения проникновения в клетки эукариот добавляли 2,5 мкл раствора нильского красного в ацетоне (40 мкг/мл). Распределение частиц по размеру и электрокинетический потенциал измеряли методом динамического рассеяния света на установке Zetasizer Nano (Malvern Instruments, Великобритания).

Для изучения доставки полученных частиц за день до эксперимента клетки ВНК-21 рассеивали в 96-луночные планшеты в количестве $1,5 \times 10^4$ на лунку для достижения 80–90% монослоя в день эксперимента. К клеткам ВНК-21 добавляли приготовленный раствор частиц непосредственно в ростовую среду с 10% FBS в объеме 10 мкл на лунку 96-луночного планшета и инкубировали в течение 2 ч. Клетки промывали изотоническим фосфатным буферным раствором и окрашивали красителями NucBlue™ Live ReadyProbes™ Reagent (Thermo Fisher Scientific, США) и CellMask™ Plasma Membrane Stains (Thermo Fisher Scientific, США) для визуализации ядерных и мембранных структур согласно методике производителя. Флуоресцентные микрофотографии клеточных культур получали с помощью Cytell Imaging System (Image Solutions, Великобритания).

Для изучения цитотоксичности метаболическую активность клеток ВНК-21 после добавления полученных частиц измеряли с помощью колориметрического MTS-теста (CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS), Promega, США) согласно инструкции производителя. Клетки ВНК-21 рассеивали в 96-луночный планшет в количестве $1,5 \times 10^4$ /лунку для достижения 90% суточного монослоя. Добавляли 10 мкл раствора частиц в рассчитанных концентрациях и культивировали в течение 24 ч при температуре 37 °C и 5% CO₂. После инкубирования в каждую лунку добавляли по 20 мкл раствора MTS и продолжали инкубацию в течение 2 ч. Оптическую плотность растворов при 490 нм измеряли с помощью планшетного спектрофотометра CLARIOstar (BMG Labtech, Германия). Метаболическую активность клеток определяли по формуле:

$$m.a. = \frac{OD_{p+} - OD_K}{OD_{p-} - OD_K} \cdot 100\%$$

где *m.a.* – метаболическая активность клеток ВНК-21; *OD_{p+}* – поглощение лунки, содержащей обработанные частицами mcl-ПГА клетки ВНК-21; *OD_{p-}* – поглощение лунки, содержащей клетки ВНК-21 без добавления частиц; *OD_K* – фоновое поглощение лунки с растворителем.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Зависимость размера частиц и их электрокинетического потенциала от концентрации Tween 80 в реакционной среде представлена в таблице. Наименьший гидродинамический диаметр частиц (200 нм) наблюдается при соотношении концентраций ПГА и Tween 80 20:1. При увеличении концентрации Tween 80 в растворе наблюдается рост среднего диаметра частиц, вызываемый, по всей видимости,

образованием многослойных структур [19]. При концентрациях Tween 80 0,04 и 0,02% диаметр частиц также повышается: вероятнее всего, это обусловлено низкой стабильностью частиц и их агрегацией из-за недостатка детергента. Таким образом, 0,1% Tween 80 способствует образованию частиц наименьшего диаметра, которые лучше проникают внутрь клетки [20]. Снижение электрокинетического потенциала по сравнению с контрольным образцом, вероятно, обусловлено наличием в молекулах ПГА отрицательно заряженных концевых карбоксильных групп.

Средний диаметр частиц и их электрокинетический потенциал, измеренные методом динамического светорассеяния. Доверительные интервалы рассчитаны с помощью t-критерия Стьюдента. Tween – концентрация Tween 80 (%), PHA/Tween – соотношение концентраций ПГА и Tween 80, *d* – диаметр частиц (нм), ζ – электрокинетический потенциал (мВ), контроль – контрольный образец (0,1% водный раствор Tween 80)

Mean diameter of the particles and their electrokinetic potential measured by dynamic light scattering. Confidence intervals are calculated using the Student t-test. Tween – Tween 80 concentration (%), PHA/Tween – ratio between PHA and Tween 80 concentrations, *d* – diameter of the particles (nm); ζ – electrokinetic potential (mV); Control – control sample (0,1% aqueous Tween 80)

Tween, %	PHA/Tween	<i>d</i> , нм	ζ, мВ
0,4	5	340 ± 180	-15±6
0,2	10	270 ± 140	-14±6
0,1	20	200 ± 90	-17±5
0,04	50	460 ± 200	-10±6
0,02	100	850 ± 300	-8±7
Контроль		130 ± 20	-5±3

Показано, что при хранении в течение 90 дней (4 °C) раствора наночастиц, в которых соотношение ПГА к Tween 80 составляет 20:1, не наблюдается изменения их размера и электрокинетического потенциала. Таким образом, Tween 80 обеспечивает высокую агрегативную устойчивость наночастиц ПГА, делая их перспективными с точки зрения технологии производства.

На рис. 1 представлена флуоресцентная микрофотография клеток ВНК-21, инкубированных с окрашенными нильским красным частицами (оранжево-красное свечение). Поглощение частиц клетками происходит в течение 2 ч, а наблюдаемое увеличение их метаболической активности (рис. 2) при концентрации ПГА до 200 мкг/мл связано, по всей видимости, с расщеплением ПГА эндогенными липазами и использованием 3-гидроксигирных кислот в качестве источника углерода и энергии. При концентрации ПГА 400 мкг/мл метаболическая активность клеток снижается, что может быть обусловлено токсичностью Tween 80 (его концентрация составляет 20 мкг/мл) [21].

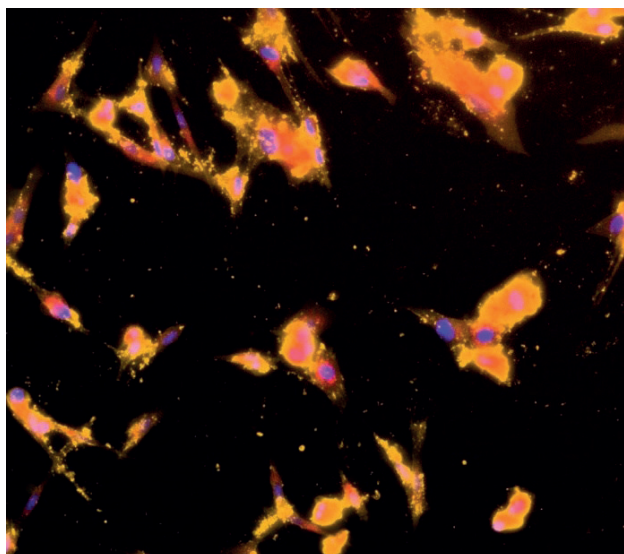


Рис. 1. Флуоресцентная микрофотография клеток ВНК-21, обработанных окрашенными нильским красным частицами. Красный – частицы поли-3-гидроксиалканоеата, желтый – мембраны, голубой – ядро

Fig. 1. Fluorescent microphotograph of BHK-21 cells incubated with the Nile red stained particles. Red, PHA particles; yellow, membranes; blue, nucleus

ВЫВОДЫ

Предложена методика получения стабилизированных Tween 80 наночастиц mcl-ПГА без использования хлорорганических растворителей. Установлено, что соотношение концентраций ПГА и Tween 80 20:1 обеспечивает образование частиц наименьшего диаметра.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Gagliardi A., Giuliano E., Venkateswararao E., Fresta M., Bulotta S., Awasthi V., et al. Biodegradable polymeric nanoparticles for drug delivery to solid tumors // *Frontiers in Pharmacology*. 2021. Vol. 12. P. 601–626. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.601626>.
2. Herrera D.A., Ashai N., Perez-Soler R., Cheng H. Nanoparticle albumin bound-paclitaxel for treatment of advanced non-small cell lung cancer: an evaluation of the clinical evidence // *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2019. Vol. 20, no. 1. P. 95–102. <https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1546290>.
3. Safdar R., Omar A.A., Arunagiri A., Regupathi I., Thanabalan M. Potential of chitosan and its derivatives for controlled drug release applications – a review // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019. Vol. 49. P. 642–659. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.10.020>.
4. Maity S., Chakraborti A.S. Formulation, physico-chemical characterization and antidiabetic potential of naringenin-loaded poly D, L lactide-co-glycolide (N-PLGA) nanoparticles // *European Polymer Journal*. 2020. Vol. 134. P. 109818. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109818>.
5. Maksimenko O., Malinovskaya Yu., Shipulo E., Osipova N., Razzhivina V., Arantseva D., et al. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastomas: towards the pharmaceutical development // *International Journal of Pharmaceutics*. 2019. Vol. 572. P. 118733. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118733>.

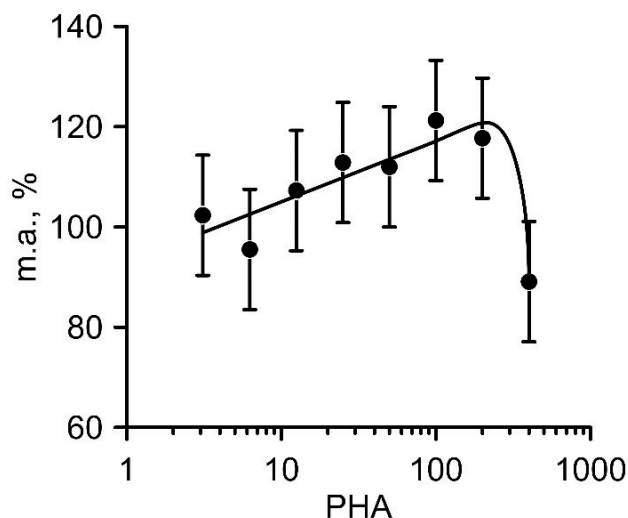


Рис. 2. Зависимость метаболической активности клеток ВНК-21 (*m.a.*) от концентрации частиц (PHA, мкг/мл), измеренная на фоне контрольного образца. Доверительные интервалы рассчитаны с использованием *t*-критерия Стьюдента

Fig. 2. Dependence of BHK-21 cells metabolic activity (*m. a.*) on particles concentration (PHA, µg/mL) measured against control. Confidence intervals are calculated using the Student *t*-test

Получаемый раствор наночастиц может храниться до 3 месяцев при температуре 4 °С. Показано, что получаемые частицы способны проникать внутрь клеток линии ВНК-21 и при концентрации до 200 мкг/мл не обладают значимой цитотоксичностью.

6. Lu X.-Yu., Li M.-C., Zhu X.-L., Fan F., Wang L.-L., Ma J.-G. Microbial synthesized biodegradable PHBHHxPEG hybrid copolymer as an efficient intracellular delivery nanocarrier for kinase inhibitor // *BMC Biotechnology*. 2014. Vol. 14. P. 4. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-4>.
7. Hu J., Wang M., Xiao X., Zhang B., Xie Q., Xu X., et al. A novel long-acting azathioprine polyhydroxyalkanoate nanoparticle enhances treatment efficacy for systemic lupus erythematosus with reduced side effects // *Nanoscale*. 2020. Vol. 12. P. 10799–10808. <https://doi.org/10.1039/D0NR01308K>.
8. Prakash P., Lee W.-H., Loo C.-Ye., Wong H.S.J., Parumasivam T. Advances in polyhydroxyalkanoate nanocarriers for effective drug delivery: an overview and challenges // *Nanomaterials*. 2022. Vol. 12, no. 1. P. 175. <https://doi.org/10.3390/nano12010175>.
9. Miu D.M., Eremia M.C., Moscovici M. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) as biomaterials in tissue engineering: production, isolation, characterization // *Materials*. 2022. Vol. 15, no. 4. P. 1410. <https://doi.org/10.3390/ma15041410>.
10. Sehgal R., Gupta R. Polyhydroxyalkanoate and its efficient production: an eco-friendly approach towards development // *3 Biotech*. 2020. Vol. 10. P. 549. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02550-5>.
11. Jacquelin N., Lo C.-W., Wu H.-S., Wei Yu-H., Wang S.S. Solubility of polyhydroxyalkanoates by experiment and

thermodynamic correlations // *Thermodynamics*. 2007. Vol. 53, no. 10. P. 2704–2714.
<https://doi.org/10.1002/aic.11274>.

12. Axelson O. Chlorinated hydrocarbons and cancer: epidemiologic aspects // *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1980. Vol. 6, no. 5-6. P. 1245–1251.
<https://doi.org/10.1080/15287398009529943>.

13. Reddy V.U.N., Ramanaiah S.V., Reddy M.V., Chang Yo.-C. Review of the developments of bacterial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs) // *Bioengineering*. 2022. Vol. 9, no. 5. P. 225.
<https://doi.org/10.3390/bioengineering9050225>.

14. Shirmard L.R., Javan N.B., Khoshayand M.R., Kebriaee-zadeh A., Dinarvand R., et al. Nanoparticulate fingolimod delivery system based on biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV): design, optimization, characterization and in-vitro evaluation // *Pharmaceutical Development and Technology*. 2017. Vol. 22, no. 7. P. 860–870.
<https://doi.org/10.3109/10837450.2015.1108982>.

15. Pachiyappan S., Selvanantham D.S., Kuppa S.S., Chandrasekaran S., Samrot A.V. Surfactant-mediated synthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) nanoparticles for sustained drug delivery // *IET Nanobiotechnology*. 2019. Vol. 13, no. 4. P. 414–425.
<https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2018.5053>.

16. Ravichandran V., Lee M., Cao T.G.N., Shim M.S. Polysorbate-based drug formulations for brain-targeted drug delivery and anticancer therapy // *Applied Sciences*. 2021. Vol. 11, no. 19. P. 9336.
<https://doi.org/10.3390/app11199336>.

17. Зубков И.Н., Букин Ю.С., Сорокоумов П.Н., Шишлянников С.М. Получение полигидроксиалканоев с помощью культуры *Pseudomonas helmanticensis* в нестерильных средах, содержащих глицерин и додецилсульфат натрия // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2022. Т. 12. N 3. С. 479–484.
<https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-479-484>. EDN: HFSIOR.

18. Rebocho A.T., Pereira J.R., Freitas F., Neves L.A., Alves V.D., Sevrin C., et al. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas citronellolis* grown in apple pulp waste // *Applied Food Biotechnology*. 2019. Vol. 6, no. 1. P. 71–82. <http://dx.doi.org/10.22037/afb.v6i1.21793>.

19. Thakkar M., Brijesh S. Physicochemical investigation and *in vivo* activity of anti-malarial drugs co-loaded in Tween 80 niosomes // *Journal of Liposome Research*. 2018. Vol. 28, no. 4. P. 315–321.
<https://doi.org/10.1080/08982104.2017.1376684>.

20. Prabha S., Arya G., Chandra R., Ahmed B., Nimesh S. Effect of size on biological properties of nanoparticles employed in gene delivery // *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2016. Vol. 44, no. 1. P. 83–91.
<https://doi.org/10.3109/21691401.2014.913054>.

21. Arechabala B., Coiffard C., Rivalland P., Coiffard L.J.M., de Roeck-Holtzauer Y. Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release // *Journal of Applied Toxicology*. 1999. Vol. 19, no. 3. P. 163–165.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1263\(199905/06\)19:3<163::AID-JAT561>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1263(199905/06)19:3<163::AID-JAT561>3.0.CO;2-H)

REFERENCES

1. Gagliardi A., Giuliano E., Venkateswararao E., Fresta M., Bulotta S., Awasthi V., et al. Biodegradable polymeric nanoparticles for drug delivery to solid tumors. *Frontiers in Pharmacology*. 2021;12:601-626.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.601626>.

2. Herrera D.A., Ashai N., Perez-Soler R., Cheng H. Nanoparticle albumin bound-paclitaxel for treatment of advanced non-small cell lung cancer: an evaluation of the clinical evidence. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2019;20(1):95-102.
<https://doi.org/10.1080/14656566.2018.1546290>.

3. Safdar R., Omar A.A., Arunagiri A., Regupathi I., Thanabalan M. Potential of chitosan and its derivatives for controlled drug release applications – a review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2019;49:642-659.
<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2018.10.020>.

4. Maity S., Chakraborti A.S. Formulation, physico-chemical characterization and antidiabetic potential of naringenin-loaded poly D, L lactide-co-glycolide (N-PLGA) nanoparticles. *European Polymer Journal*. 2020;134:109818.
<https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.109818>.

5. Maksimenko O., Malinovskaya Yu., Shipulo E., Osipova N., Razzhivina V., Arantseva D., et al. Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles for the chemotherapy of glioblastomas: towards the pharmaceutical development. *International Journal of Pharmaceutics*. 2019;572:118733.
<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2019.118733>.

6. Lu X.-Yu., Li M.-C., Zhu X.-L., Fan F., Wang L.-L., Ma J.-G. Microbial synthesized biodegradable PHBHxPEG hybrid copolymer as an efficient intracellular delivery nanocarrier for kinase inhibitor. *BMC Biotechnology*. 2014;14:4.

<https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-4>.

7. Hu J., Wang M., Xiao X., Zhang B., Xie Q., Xu X., et al. A novel long-acting azathioprine polyhydroxyalkanoate nanoparticle enhances treatment efficacy for systemic lupus erythematosus with reduced side effects. *Nanoscale*. 2020;12:10799-10808.
<https://doi.org/10.1039/D0NR01308K>.

8. Prakash P., Lee W.-H., Loo C.-Ye., Wong H.S.J., Parumasivam T. Advances in polyhydroxyalkanoate nanocarriers for effective drug delivery: an overview and challenges. *Nanomaterials*. 2022;12(1):175.
<https://doi.org/10.3390/nano12010175>.

9. Miu D.M., Eremia M.C., Moscovici M. Polyhydroxyalkanoates (PHAs) as biomaterials in tissue engineering: production, isolation, characterization. *Materials*. 2022;15(4):1410. <https://doi.org/10.3390/ma15041410>.

10. Sehgal R., Gupta R. Polyhydroxyalkanoate and its efficient production: an eco-friendly approach towards development. *3 Biotech*. 2020;10:549.
<https://doi.org/10.1007/s13205-020-02550-5>.

11. Jacquelin N., Lo C.-W., Wu H.-S., Wei Yu.-H., Wang S.S. Solubility of polyhydroxyalkanoates by experiment and thermodynamic correlations. *Thermodynamics*. 2007;53(10):2704-2714.
<https://doi.org/10.1002/aic.11274>.

12. Axelson O. Chlorinated hydrocarbons and cancer: epidemiologic aspects. *Journal of Toxicology and Environmental Health*. 1980;6(5-6):1245-1251.
<https://doi.org/10.1080/15287398009529943>.

13. Reddy V.U.N., Ramanaiah S.V., Reddy M.V., Chang Yo.-C. Review of the developments of bacterial medium-chain-length

polyhydroxyalkanoates (mcl-PHAs). *Bioengineering*. 2022;9(5):225. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9050225>.

14. Shirmard L.R., Javan N.B., Khoshayand M.R., Kebriaee-zadeh A., Dinarvand R., et al. Nanoparticulate fingolimod delivery system based on biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) (PHBV): design, optimization, characterization and in-vitro evaluation. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2017;22(7):860-870. <https://doi.org/10.3109/10837450.2015.1108982>.

15. Pachiyappan S., Selvanantham D.S., Kuppa S.S., Chandrasekaran S., Samrot A.V. Surfactant-mediated synthesis of polyhydroxybutyrate (PHB) nanoparticles for sustained drug delivery. *IET Nanobiotechnology*. 2019;13(4):414-425. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2018.5053>.

16. Ravichandran V., Lee M., Cao T.G.N., Shim M.S. Polysorbate-based drug formulations for brain-targeted drug delivery and anticancer therapy. *Applied Sciences*. 2021;11(19):9336. <https://doi.org/10.3390/app11199336>.

17. Zubkov I.N., Bukin Yu.S., Sorokoumov P.N., Shishlyannikov S.M. Preparation of polyhydroxyalkanoates using *Pseudomonas helmanticensis* in non-sterile media containing glycerol and sodium dodecyl sulfate. *Izvestiya Vuzov. Prikladnaya Khimiya i Biotekhnologiya = Proceedings of Universities. Applied Chemistry and Biotechnology*.

2022;12(3):479-484. (In Russian).

<https://doi.org/10.21285/2227-2925-2022-12-3-479-484>. EDN: HFSIOR.

18. Rebocho A.T., Pereira J.R., Freitas F., Neves L.A., Alves V.D., Sevrin C., et al. Production of medium-chain-length polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas citronellolis* grown in apple pulp waste. *Applied Food Biotechnology*. 2019;6(1):71-82. <http://dx.doi.org/10.22037/afb.v6i1.21793>.

19. Thakkar M., Brijesh S. Physicochemical investigation and in vivo activity of anti-malarial drugs co-loaded in Tween 80 niosomes. *Journal of Liposome Research*. 2018;28(4):315-321. <https://doi.org/10.1080/08982104.2017.1376684>.

20. Prabha S., Arya G., Chandra R., Ahmed B., Nimesh S. Effect of size on biological properties of nanoparticles employed in gene delivery. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2016;44(1):83-91. <https://doi.org/10.3109/21691401.2014.913054>.

21. Arechabala B., Coiffard C., Rivalland P., Coiffard L.J.M., de Roock-Holtzauer Y. Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. *Journal of Applied Toxicology*. 1999;19(3):163-165. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1263\(199905/06\)19:3<163::AID-JAT561>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1263(199905/06)19:3<163::AID-JAT561>3.0.CO;2-H)

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Зубков Илья Николаевич,
специалист,

Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, 197022, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 15/17, Российская Федерация;
лаборант-исследователь,
Всероссийский научно-исследовательский институт пищевых добавок – филиал «ФНЦ Пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН, 191014, г. Санкт-Петербург, Литейный пр., 55, Российская Федерация,
zub-i@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6533-8139>

Высочинская Вера Валерьевна,
научный сотрудник,
Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, 197022, г. Санкт-Петербург,
ул. Проф. Попова, 15/17, Российская Федерация;
младший научный сотрудник,
Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251, г. Санкт-Петербург,
ул. Политехническая, 29, Российская Федерация,
veravv2509@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-3533-2606>

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Ilya N. Zubkov,
Specialist,
Smorodintsev Research Institute of Influenza, 15/17, Prof. Popov St., Saint Petersburg, 197022, Russian Federation;
Laboratory Assistant,
All-Russian Research Institute for Food Additives, Branch of V.M. Gorbatoev Federal Research Center for Food Systems RAS, 55, Liteyniy Ave., St. Petersburg, 191014, Russian Federation,
zub-i@bk.ru
<https://orcid.org/0000-0002-6533-8139>

Vera V. Vysochinskaya,
Researcher,
Smorodintsev Research Institute of Influenza, 15/17, Prof. Popov St., Saint-Petersburg, 197022, Russian Federation;
Junior Researcher,
Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, 29, Politekhnikeskaya St., Saint Petersburg, 195251, Russian Federation,
veravv2509@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-3533-2606>

Кашина Анна Вячеславовна,
к.х.н., старший научный сотрудник,
Институт высокомолекулярных соединений РАН,
199004, г. Санкт-Петербург,
Большой пр-т Васильевского острова, 31,
Российская Федерация,
kashina.anna@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4119-8191>

Шишлянников Сергей Михайлович,
к.б.н., научный сотрудник,
Научно-исследовательский институт гриппа
им. А.А. Смородинцева Минздрава России,
197022, г. Санкт-Петербург,
ул. Проф. Попова, 15/17, Российская Федерация;
доцент,
Санкт-Петербургский политехнический
университет Петра Великого,
195251, г. Санкт-Петербург,
ул. Политехническая, 29,
Российская Федерация,
sershilin@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-6377-7445>

Вклад авторов

Все авторы сделали эквивалентный вклад
в подготовку публикации.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта
интересов.

*Все авторы прочитали и одобрили окончательный
вариант рукописи.*

Информация о статье

Поступила в редакцию 09.08.2023.
Одобрена после рецензирования 12.09.2023.
Принята к публикации 15.09.2023.

Anna V. Kashina,
Cand. Sci. (Chemistry), Senior Researcher,
Institute of Macromolecular Compounds RAS,
31, Bolshoy pr. V.O., Saint Petersburg, 199004,
Russian Federation,
kashina.anna@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-4119-8191>

Sergey M. Shishlyannikov,
Cand. Sci. (Biology), Researcher,
Smorodintsev Research Institute of Influenza,
15/17, Prof. Popov St., Saint Petersburg, 197022,
Russian Federation;
Associate Professor,
Peter the Great St. Petersburg Polytechnic
University,
29, Politekhnicheskaya St., Saint Petersburg,
195251, Russian Federation,
sershilin@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-6377-7445>

Contribution of the authors

The authors contributed equally to this article.

Conflict interests

The authors declare no conflict of interests regarding
the publication of this article.

*The final manuscript has been read and approved by
all the co-authors.*

Information about the article

*The article was submitted 09.08.2023.
Approved after reviewing 12.09.2023.
Accepted for publication 15.09.2023.*