

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт Фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра медико-биологических систем и комплексов

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

« » июня 2020 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

ВЛИЯНИЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА КЛЕТКИ АСЦИТНОЙ
КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА

03.04.02 – Физика

03.04.02.09 – Технологическое сопровождение ядерной медицины и
медицинского оборудования

Руководитель _____ д.ф.-м.н., профессор С.В. Столяр

Выпускник _____ Е.М. Васильева

Рецензент _____ к.б.н., с.н.с ФИЦ КНЦ СО РАН А.В. Комина

Консультант _____ к.б.н., с.н.с ФИЦ КНЦ СО РАН О.В. Крюкова

Красноярск 2020

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Влияние магнитных наночастиц на клетки асцитной карциномы Эрлиха» содержит 59 страниц текстового документа, 15 иллюстраций, 1 таблицу, 121 используемый источник.

МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ, ЭПР, АСЦИТНАЯ КАРЦИНОМА ЭРЛИХА, ОКСИД АЗОТА (NO), ПОЛИСАХАРИД, АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА, АНТИОКСИДАНТЫ

Объект исследования – клетки асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ).

Цель работы – изучить влияние магнитных наночастиц, покрытых арабиногалактаном, на клетки асцитной карциномы Эрлиха.

В работе были поставлены следующие задачи:

1. Получить магнитные наночастицы, покрытые арабиногалактаном, определить размер и структуру изготовленных магнитных наночастиц методами ПЭМ, ЭПР, ЯГР, ИК-спектроскопией.
2. Изучить спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) клеток АКЭ после инкубации с МНЧ.
3. Оценить жизнеспособность клеток АКЭ в результате инкубирования с МНЧ.
4. Определить содержание свободно-радикальных форм (NO и АФК) в клетках АКЭ, инкубированных с МНЧ, методами ЭПР и хемилюминесценции.

Наночастицы ферригидрита ($Fe_2O_3 \cdot 5H_2O$) размером 2 нм, покрытые арабиногалактаном, были синтезированы методом химического осаждения. В ходе работы также обнаружено увеличение интенсивности резонансного поглощения клеток АКЭ после инкубации с МНЧ, обусловленного наличием парамагнитных динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ). Показано, что культивирование клеток АКЭ с МНЧ увеличивает долю погибших клеток в 1.5 раза, что может быть связано с увеличением выхода NO. Выявлена прооксидантная активность арабиногалактана при взаимодействии с клетками экспериментальной опухоли.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	5
1 Общая характеристика магнитных наночастиц.....	7
1.1 Биологические свойства МНЧ.....	8
1.2 Применение магнитных наночастиц.....	9
2 Характеристика экспериментальной опухоли – асцитной карциномы Эрлиха	11
2.1 Роль активных форм кислорода в развитии опухолевого процесса.....	13
2.2 Оксид азота.....	16
2.2.1 Дозозависимое действие оксида азота.....	17
2.3 Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) карциномы.....	19
3 Материалы и методы.....	21
3.1 Объекты исследования.....	21
3.2 Схема эксперимента.....	21
3.3 Приготовление магнитных наночастиц.....	22
3.4 Спектроскопия Мессбауэра.....	23
3.5 Ферромагнитный резонанс.....	23
3.6 ИК-Фурье спектроскопия.....	24
3.7 Подготовка суспензии клеток АКЭ с наночастицами.....	24
3.8 Метод электронного парамагнитного резонанса клеток АКЭ.....	25
3.9 Подсчет погибших клеток АКЭ.....	27
3.10 Определение содержания активных форм кислорода методом хемилюминесценции.....	27
3.11 Статистическая обработка результатов.....	29

4 Результаты и их обсуждение.....	30
Выводы.....	45
Список сокращений.....	46
Список использованных источников.....	47

ВВЕДЕНИЕ

Современную науку невозможно представить без применения нанотехнологий. Наноматериалы используются во многих областях. Интеграция нанотехнологии и биотехнологии привела к созданию нанобиотехнологии, которая является на сегодняшний день одним из самых перспективных направлений.

В настоящее время свойства новых магнитных наноматериалов тщательно изучают для возможного биомедицинского применения, используя, например, для целевой доставки лекарств, в качестве контрастного вещества для магниторезонансной томографии, для сепарации клеток и различных веществ [1].

Важными характеристиками магнитных наноматериалов являются биосовместимость и низкая токсичность. Это обеспечивается использованием в процессе получения полисахаридов.

Одно из перспективных направлений в этой области - использование природных полисахаридов в качестве стабилизирующих и восстанавливающих агентов [2, 3]. Создаваемые на основе полисахаридов магнитные нанобиокомпозиты обладают синергизмом свойств стабилизирующей полисахаридной матрицы и магнитной сердцевины.

Для внедрения нанотехнологий в различные сферы деятельности нужно учитывать не только физико-химические свойства, но и их биологическую активность. Использование наночастиц подразумевает непосредственный контакт с организмом, а значит, актуальным является исследование влияния МНЧ на органы и ткани.

Одним из веществ, повышающих биосовместимость нанокompозитов, является арабиногалактан. Он используется в качестве основания для МНЧ. Применение арабиногалактана при синтезе наночастиц позволяет получить МНЧ с новыми свойствами.

Цель работы – изучить влияние магнитных наночастиц, покрытых арабиногалактаном, на клетки асцитной карциномы Эрлиха.

Исходя из цели, были поставлены следующие задачи:

1. Получить магнитные наночастицы (МНЧ), покрытые арабиногалактаном, определить размер и структуру изготовленных наночастиц методами ПЭМ, ЭПР, ЯГР, ИК-спектроскопией.
2. Изучить спектры электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) клеток АКЭ после инкубации с МНЧ.
3. Оценить жизнеспособность клеток АКЭ в результате инкубации с МНЧ.
4. Определить содержание свободно-радикальных форм (NO и АФК) в клетках АКЭ, инкубированных с МНЧ методами ЭПР и хемилюминесценции.

Работа проводилась на оборудовании Красноярского регионального центра коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН и Уникальной научной установки «Комплекс оборудования для культивирования изолированных органов».

1 Общая характеристика магнитных наночастиц

Магнитные наночастицы (МНЧ) это природные частицы или синтетические материалы размером от 1 до 100 нм, обладающие магнитными характеристиками [4-6].

Согласно литературным данным, при производстве МНЧ обычно используются железо (Fe), никель (Ni), кобальт (Co) их оксиды [7]. Намагниченность чистых металлов уменьшается при окислении поверхности при контакте с атмосферным кислородом, это является их существенным недостатком. В связи с этим, все чаще, прибегают к использованию ферритов. Их общая формула $MO-Fe_2O_3$, где M – двухвалентный ион металла [4-7].

МНЧ оксидов железа обладают перечнем химических и физических свойств, которые, стоит подчеркнуть, основаны на проявлении МНЧ квантовых размерных эффектов [4-6]. Кроме того, эти эффекты обусловлены сильными изменениями плотности состояний в зоне проводимости и валентной зоне. Этот факт значительно влияет на свойства, обусловленные поведением элементов, в первую очередь магнитные, затем электрические [8].

На свойства малых частиц также влияет возрастание в них относительной доли «поверхностных» атомов. В результате изменяется характер взаимодействия между атомами, которые находятся на поверхности, и атомами внутри частицы [9].

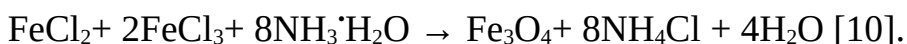
МНЧ на основе оксидов железа обладают выраженными магнитными свойствами. С помощью внешнего постоянного электромагнитного поля можно управлять перемещением данных частиц. Примеры МНЧ: магнетит (Fe_3O_4), маггемит ($\gamma-Fe_2O_3$), гематит ($\alpha-Fe_2O_3$), другие оксиды, например, Co_3O_4 , Mn_3O_4 , а также ферриты: $MnFe_2O_4$, $MgFe_2O_4$, $CoFe_2O_4$, $NiFe_2O_4$.

Существует несколько способов получения магнитных наночастиц оксидов железа. Они могут быть синтезированы в водных растворах различных уровней температур: от комнатной, до высоких показателей температуры,

дальнейшие свойства наночастиц будут зависеть от выбранного способа приготовления. Выбор способа синтеза зависит от простоты использования, стоимости реагентов и воспроизводимости.

Как правило, наиболее воспроизводимым методом получения ферригидрита является метод соосаждения [10]. Соответственно, МНЧ получают из водно-солевых растворов, через добавление оснований в инертной атмосфере при различных температурах, которые были выбраны..

Схема процесса образования ферригидрита:



Известно, что полное выпадение осадка происходит при рН от 8 до 14. Форма и состав частиц непременно зависят от выбранной соли (хлориды, сульфаты, нитраты), соотношения $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ [11] и температуры реакции [12], рН [13], а также типа основания и скорости перемешивания

1.1 Биологические свойства МНЧ

Наряду с физическими и химическими МНЧ обладают рядом биологических свойств. Они входят в состав многих биологически важных природных комплексов, участвуют в метаболизме и других процессах функционирования живых существ [14]. Магнетит и ферригидрит являются самыми распространенными частицами в живых организмах. МНЧ используются живыми организмами для самых различных целей. Например, высокоупорядоченные ансамбли МНЧ оксидов железа (Fe_3O_4 , вероятно с примесью $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) в магнитотактических бактериях (лат. *Magnetotactic spirillum*) обеспечивают возможность ориентации бактерий в существующем геомагнитном поле [15].

Помимо бактерий, МНЧ встречаются в клетках высших живых организмов. Считается, что анизотропные наночастицы содержащиеся внутри клеток, взаимодействуют с геомагнитным полем и передают информацию специальным биорецепторам. При помощи такого взаимодействия, живые

организмы могут определять свое положение относительно геомагнитного поля. Можно сказать, что, таким образом, осуществляется сезонная миграция птиц и рыб.

В организмах животных, а также растений самой распространенной формой негемового железа является ферритин – водорастворимый белок, состоящий из неорганического ядра с белковой оболочкой. Ядро состоит из ионов железа и представляет собой гидратированный оксид железа (III). В такой форме ферритин эффективно доставляет ионы железа, которые так важны для метаболизма животных и функционирования различных клеток.

1.2 Применение магнитных наночастиц.

Магнитные наночастицы широко используются в биомедицине. Например, диагностика *in vitro*. Использование данной технологии позволяет повысить чувствительность диагностических тестов, благодаря размеру наночастиц (повышается связывание с биомолекулой) [16-23].

Исходя из литературы, можно говорить о том, что процесс магнитной сепарации клеток лежит в основе методов выделения и очистки нуклеиновых кислот и белков [19], что в свою очередь позволяет использовать магнитные свойства наночастиц.

Согласно исследованиям [25], высокоэффективное выделение геномной ДНК кукурузы было достигнуто с использованием синтезированного магнетита и композиционного материала, покрытого кремнием. Кроме того, имеются работы [21,24], в которых модифицированные полиэтиленом частицы Fe_3O_4 использовались для выделения плазмидной ДНК.

Перспективной областью применения МНЧ также является создание высокочувствительных биосенсоров [26, 27]. Авторы [28] создали высокочувствительный цитометрический анализ образцов цельной крови, основанный на маркировке клеток крови ферромагнитными наночастицами.

Таким образом, можно говорить об использовании магнитных наночастиц непосредственно в цитологических исследованиях.

Магнитные наночастицы оксида железа в сочетании с антителами также используются для локализации опухолевых клеток в периферической крови, что позволяет оценить эффективность химиотерапии и выделения клеток методом магнитной сепарации [28, 29].

Нельзя не согласиться с тем, что использование наночастиц *in vivo* также перспективно для диагностики и терапии. Известно, что биологические ткани, безусловно, проницаемы для магнитных полей. На основании этого можно предположить, что становится возможным таргетное накопление МНЧ в органе или ткани. Управлять этими наночастицами можно при помощи внешнего электромагнитного поля [30].

МНЧ применяются для диагностики в качестве контрастирующих агентов магнитно-резонансной томографии (МРТ) [31, 32]. Наночастицы, введенные в организм, значительно усиливают МР-сигнал. На сегодняшний день, МНЧ применяются для МРТ-исследований лимфоузлов, миокарда, мозга, печени и желудочно-кишечного тракта [33].

Магнитные наночастицы используются в качестве тепловых локальных возбудителей в заданных областях (гипертермия) [34]. Гипертермия является важной областью исследований. Известно, что этот метод используется для терапии онкологических заболеваний.

Авторами [35, 36] предложен совершенно новый метод повышения эффективности терапии – локальная контролируемая гипертермия. Согласно им, некоторые типы опухолевых клеток, безусловно, более чувствительны к высоким температурам по сравнению со здоровыми, не дегенеративными клетками. Локальная контролируемая гипертермия используется в качестве дополнительного метода наряду с химиотерапией и лучевой терапией [39]. Согласно [37, 38], энергия магнитного поля переходит во внутреннюю энергию наночастиц, что приводит к их нагреву, или, другими словами, МНЧ реагируют

резонансом на изменения внешнего магнитного поля, передавая энергию наночастицам.

В 1978 г К. Дж. Уиддер предположил, что используя целевую доставку терапевтических агентов (лекарственных препаратов, белков и т.д.), возможно снижение дозы препарата во время химиотерапии, кроме того, он считал, что его идея позволит уменьшить побочные эффекты лечения [41, 42]. К. Дж. Уиддер полагал, что, комбинируя противоопухолевый препарат с магнитной наночастицей, можно добиться контроля с помощью сил внешнего магнитного поля [43].

Оценить влияние МНЧ возможно при помощи экспериментальной опухоли, а именно асцитной карциномы Эрлиха. Использование именно этой экспериментальной модели обусловлено удобством исследования, а также тем, что ее развитие происходит в короткие сроки, также АКЭ имеет все классические стадии развития опухолевого процесса.

2 Характеристика экспериментальной опухоли – асцитной карциномы Эрлиха

Экспериментальные опухоли часто используют для изучения процессов, происходящих в организмах с опухолью. Асцитная карцинома Эрлиха (АКЭ) является распространенной моделью среди экспериментальных опухолей, поскольку позволяет в короткие сроки наблюдать классические стадии развития опухолевого процесса.

АКЭ является недифференцированной опухолью с высокой трансплантационной способностью, обладает 100% злокачественностью и не имеет конкретных антигенов (TSTA – *tumor specific surface antigen*) [44]. Асцитная карцинома Эрлиха была открыта в 1905 году как спонтанный рак молочной железы. С.Л. Эрлих использовал ее в качестве экспериментальной опухоли путем пересадки тканей опухоли подкожно от мыши к мыши. В 1932

году Дж. Левенталь и Хэ Цзин Ян получили асцитную форму и назвали ее «асцитная карцинома». Опухоль представляет собой асцитную жидкость с клетками карциномы [45]. Асцитная жидкость серо-белая, иногда имеет светлый кровавый оттенок, она содержит до 10 миллионов опухолевых клеток на 0,1 см³.

После пересадки АКЭ в биологический организм не менее 3×10^6 кл./мл, клетки растут в три этапа: 1 – фаза адаптации в организме-реципиенте; 2 – фаза пролиферации, в которой количество опухолевых клеток экспоненциально увеличивается; 3 – фаза покоя, в которой количество клеток остается практически неизменным. По некоторым данным, количество клеток увеличивается экспоненциально до девятого дня после перевивки АКЭ, начиная с девятого, и на десятый день наступает фаза покоя [45, 46].

Рост опухоли происходит за счет быстрого деления клеток. Накопление асцитной жидкости в брюшной полости после некоторого времени обычно вызывает смерть животного из-за чрезмерного давления, оказываемого опухолью [45, 47].

При переходе АКЭ из фазы пролиферации в фазу покоя, в клетках происходит ряд метаболических и морфологических изменений, такие как: структурные нарушения [48-52], снижение количества митохондрий [48-50], снижение скорости биосинтеза ДНК и РНК [48-50, 53], резкое уменьшение содержания внутриклеточных пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов, нуклеозидов [48-50, 54], снижение концентрации и скорости восстановления АТФ [57], снижение синтеза белка [48, 49, 55, 56], повышение концентрации тимидина с уменьшением активности тимидинкиназы [48, 55], снижение концентрации глутатиона [57, 58], наблюдается повышение триглицеридов, сложных эфиров и свободных жирных кислот [48, 58].

Известно, что опухолевые клетки обладают чрезвычайно повышенной гликолитической активностью, а также умеренной активностью дыхания. Одной из особенностей асцитной карциномы Эрлиха является то, что все цитохромы находятся в клетках, и цикл Кребса функционирует нормально [45].

Клетки АКЭ практически лишены способности синтезировать высшие жирные кислоты. Опухолевые клетки получают их в готовом виде из организма хозяина через асцитическую жидкость, в которую они переходят в комплексе с альбумином [47, 51, 54]. Большая часть свободных жирных кислот поглощается клетками опухоли, они входят в состав нейтральных жиров или фосфолипидов. Кроме того, стоит отметить, что экспериментальная опухоль функционирует в организме непосредственно как азотная ловушка [46, 51].

Исходя из вышесказанного, можно сделать вывод о том, что асцитная карцинома Эрлиха является хорошо изученной экспериментальной моделью для исследования влияния различных факторов, в том числе и влияние МНЧ на динамические параметры опухоли

2.1 Роль активных форм кислорода в развитии опухолевого процесса

В клетках асцитной карциномы Эрлиха, в процессе обмена веществ, постоянно образуются продукты неполного восстановления кислорода. Роль активных форм кислорода (АФК) в развитии онкологического процесса неоднозначна. С одной стороны АФК могут стимулировать про-онкогенную передачу сигналов, облегчая пролиферацию опухолевых клеток, выживание и адаптацию к гипоксии [59]. С другой стороны, АФК могут стимулировать противоопухолевую передачу сигналов и инициировать, вызванную окислительным стрессом (ОС), гибель патологических клеток [60].

Чтобы гиперактивировать клеточные сигнальные пути, необходимые для клеточной трансформации и онкогенеза, опухолевые клетки увеличивают скорость продукции АФК по сравнению с нормальными клетками. Для одновременного поддержания гомеостаза АФК и избегания клеточной смерти, опухолевые клетки увеличивают свою антиоксидантную способность [61]. Удаляя избыток АФК, опухолевые клетки поддерживают АФК на уровне, который обеспечивает активацию про-онкогенных сигнальных путей без индукции гибели раковых клеток. Таким образом, по сравнению с

нормальными клетками, опухолевые клетки имеют измененную окислительно-восстановительную среду с высокой скоростью выработки АФК, уравновешенной высокой скоростью удаления АФК. Эта уникальная характеристика опухолевых клеток может сделать их более чувствительными, чем нормальные клетки, к изменениям уровня АФК или редокс-манипуляциям [61].

АФК в клетке генерируются в процессе окислительно-восстановительных реакций (ОВР). К активным формам кислорода относятся перекись водорода (H_2O_2), супероксид анион-радикал ($O_2^{\cdot-}$), гидроксильный радикал ($\cdot OH$), синглетный кислород (1O_2), гипохлорид ($HOCl$), также АФК могут включать оксид азота (NO), пероксинитрит ($ONOO^-$), которые обладают высокой окислительной активностью [62].

Существует лишь несколько источников АФК: пероксисомы, эндоплазматический ретикулум, плазмалемма макрофагов и эндотелиоцитов [63].

Согласно исследуемой литературе [59-76], активные формы кислорода делятся на три типа:

- Первичный (индуцирующий). Они образуются при окислении определенных молекул. К ним относятся $O_2^{\cdot-}$ и $\cdot OH$. Они оказывают регулирующее воздействие.
- Вторичный. Они образуются в результате супероксидной атаки со стороны других молекул. К ним относятся гидроксильные радикалы, пероксинитриты и липидные радикалы. Они обладают сильным токсическим действием благодаря своей способности необратимо повреждать мембранные липиды, молекулы ДНК и белки.
- Третичный. Они образуются путем соединения вторичных радикалов с молекулами антиоксидантов и другими легко окисляемыми соединениями. Их роль может быть разной [62].

Известно, что HO_2^{\cdot} и OSl^- являются достаточно сильными окислителями. При развитии окислительного стресса H_2O_2 в присутствии двухвалентного

железа может генерировать HO_2^\bullet или превращаться в гипохлорит-анион (OCl^-) с помощью фермента миелопероксидазы. Эти АФК могут изменять белки, нуклеиновые кислоты и вызывать перекисное окисление липидов (ПОЛ). Этому процессу наиболее подвержены полиненасыщенные жирные кислоты, входящие в состав липидов мембран, в результате чего, естественно, происходит повреждение этих мембран [64].

Биологический организм имеет ряд ферментов, которые могут катализировать прямые реакции между субстратами и кислородом. Согласно исследованиям, вклад подобных реакций в общее потребление кислорода в организме невелик. Большая часть его потребляется в митохондриальной системе, дающей энергию клеткам в форме АТФ. Соответственно, эти реакции включены в различные пути биосинтеза, а также распада и в метаболизм ароматических соединений и стероидов. Такие ферменты включают флавопротеиноксидазу. Атомы водорода из ксантина, гипоксантина, L- и D-аминокислот передаются непосредственно в молекулярный кислород флавиновыми коферментами, минуя важную систему цитохромов и цитохромоксидазы. В этих случаях конечным продуктом окисления является перекись водорода [65].

В балансе тканевого дыхания процессы, заканчивающиеся непосредственным образованием H_2O , составляют около 93 – 95%, а образованием H_2O_2 – примерно только 5 – 7%. Полученная перекись водорода может разлагаться каталазой или, вероятно, использоваться в реакциях, катализируемых пероксидазой. Ферменты, участвующие в метаболизме перекиси водорода, согласно литературе [65-67], обнаруживаются в значительных количествах в клеточных органеллах, таких как пероксисомы. Простые флавопротеиды, способные самостоятельно окисляться, – ферменты уратоксидаза, оксидаза D-аминокислот, а также оксидаза α -оксикислот образуют в них перекись водорода, а каталаза разрушает ее [66-69].

Таким образом, принято считать, что образование АФК может происходить в следующих процессах: при переносе электронов в

митохондриальной дыхательной цепи; в реакциях, катализируемых оксидазами (образуется перекись водорода), в том числе в свободно-радикальных процессах, протекающих в фагоцитах; в микросомальных реакциях окисления при нейтрализации веществ с участием цитохрома P-450; при спонтанном (неферментативном) окислении веществ (гемоглобин, ферредоксины, адреналин и др.), в биологических системах с наличием ионов металлов с переменной валентностью и, прежде всего, железа [70].

Неоднозначную роль в опухолевом процессе также играет оксид азота. Как было сказано выше, он относится к первичным АФК. NO оказывает важное воздействие на различных стадиях канцерогенеза, таких как повреждение ДНК и генов-супрессоров опухолей, модуляция апоптоза и метастазирования [71-74]. Было показано, что противоопухолевые эффекты NO, продуцируемые системой иммунной защиты, функционируют против опухолей различного происхождения на моделях животных [75]. В тоже время, последствия про-онкогенных эффектов NO были связаны с экспрессией ферментов, продуцирующих оксид азота в опухолевых клетках [76].

Анализ литературы показал, что двойная роль активных форм кислорода, в частности оксида азота, является важной в отношении изучения механизмов в онкологическом процессе.

2.2 Оксид азота

Согласно источникам литературы, в свободном состоянии оксид азота (NO) представляет собой бесцветный газ без запаха с высокой реакционной способностью. Молекулярная масса 30.01 г/ моль, растворимость в воде-74 см³ / дм³, показатель преломления-1.0002697, температура плавления-163.6°C, температура кипения-151.7°C [77].

NO является важным регуляторным фактором во многих системах организма. Его бактерицидное и фитостатическое действие зависит от продуктов взаимодействия с активными формами кислорода (АФК) [80].

В таких реакциях образуются активные метаболиты-пероксинитрит, диоксид азота и др. они обладают высокой реакционной способностью и могут вызывать повреждение различных клеточных структур, изменяя их функциональную активность [78, 79]. Например, процесс нитролизирования белка при воздействии активных форм азота (АФА) является одним из механизмов регуляции активности определенных ферментных систем [80]. Кроме того, некоторые метаболиты NO, а также S-нитрозотиолы и сам NO могут проявлять антиоксидантную активность при определенных условиях [81]. Например, оксид азота может образовывать связи с ионами железа, которые катализируют реакции свободно-радикального окисления. Реакция связывания железа провоцирует торможение процесса разветвления цепи свободных радикалов.

Известно, что различные клетки организма, способны продуцировать оксид азота. К ним относятся эндотелиоциты, эпителиоциты, мезангиоциты, моноциты, лимфоциты, нейтрофилы, тромбоциты, макрофаги, моноциты, фибробласты, нейроны, гепатоциты, тучные клетки [77-81]. Способность NO контролировать многие функции и биохимические процессы в них показана в работах [82, 83]. Авторами [79] установлена роль оксида азота как внутриклеточного мессенджера. Это стало одним из самых важных открытий последнего десятилетия.

Оксид азота собрал в себе очень много разнообразных физиологических эффектов. Их все можно разделить на:

- регуляторное влияние;
- защитное действие;
- повреждающее действие [84, 85].

2.2.1 Дозозависимое действие оксида азота

Считается, что физиологические эффекты оксида азота можно объяснить, зная его концентрацию. Оксид азота играет неоднозначную роль в организме. С

одной стороны, он выполняет регуляторную функцию, с другой-стимулирует апоптоз.

Низкие концентрации NO ($<10^{-6}$ м) оказывают цито - и нейропротекторное действие [86]. В частности, благодаря прямому нитролизированию внутриклеточных цистеиновых протеаз (каспаз-3, -8) и других проапоптотических белков, низкие уровни концентрации NO, повидимому, обладают выраженной антиапоптотической активностью [86, 87].

Анализ литературы показал, что оксид азота в высоких концентрациях, вызывает разнообразные цитотоксические эффекты [89, 90]. NO способен подавлять многие вирусные протеиназы и транскрипционные факторы, необходимые для репликации вируса, и усиливает противовирусное действие интерферона- γ [91]. Известно, что в высоких концентрациях оксид азота, в свою очередь, вызывает апоптоз определенных типов клеток – макрофагов, тимоцитов, островковых клеток поджелудочной железы, некоторых нейронов и опухолевых клеток. В случае разрушения ДНК активными азотными радикалами, вероятно, происходит значительное накопление p53, что считается показателем отсутствия опосредованного апоптоза [88].

Авторы [92] показали, что NO и ONOO⁻ проявляют выраженное бактерицидное действие на стрептококки группы В (*Streptococcus*), золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*), микоплазму (*Mollicutes*), хламидии (*Chlamydia trachomatis*), Лейшманию (*Leishmania*) и туберкулез (*Euberculum*). Действие ингибирования каталазы на инфекционные агенты приводит к накоплению более ирксичных активных форм кислорода (H₂O₂ и HO₂·).

Исследования авторов [93] показали, что активные формы азота (АФА) катализируют или ингибируют белки ионных каналов, ядерные транскрипционные факторы, киназы, каспазы, металлопротеиназы, метилтрансферазы и фосфодиэстеразы. Можно утверждать, что длительное действие высоких концентраций оксида азота часто приводит к изменению баланса активности внутриклеточных сигнальных путей.

Из сказанного ранее вытекает, что различные действия оксида азота имеет дозозависимый эффект.

2.3 Электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) карциномы

Основы использования методов ЭПР для изучения органов и тканей человека и животных в норме и патологии были установлены и получили свое развитие в 1960-80-х годах [94-102]. В настоящее время этот метод активно применяется в исследованиях, связанных с онкологическими заболеваниями [103-113]. Методы ЭПР используются для определения активности окислительно-восстановительных единиц крови, таких как церулоплазмин, трансферрин, «свободное» железо (известное как лабильный железный пул), НАДФН-оксидаза, iNO-синтаза нейтрофилов и тромбоцитов [114].

Парамагнитные центры в тканях человека включают, прежде всего, молекулярные комплексы, содержащие железо Fe^{3+} (поставляемое в основном в трансферрине и гемоглобине), ионы меди Cu^{2+} (церулоплазмин) и «свободные» радикалы. Церулоплазмин человека – это гликопротеин, присутствующий в плазме крови (около 300 мкг/мл у здоровых взрослых людей) с молекулярной массой 132 кДа. Церулоплазмин в спектрах ЭПР тканей обычно определяется как сигнал от ионов Cu^{2+} со спектральной линией при $g=2,05$. Церулоплазмин участвует в метаболизме железа, катализируя окисление Fe^{2+} и, таким образом, облегчая включение Fe^{3+} в апотрансферрин. Церулоплазмин окисляет четыре иона Fe^{2+} и участвует в переносе четырех электронов в кислород, препятствуя ферментативному окислению железа с образованием «свободных» радикалов [115].

Апотрансферрин не вызывает ЭПР, но когда он связывает ионы Fe^{3+} , можно наблюдать отчетливый сигнал ЭПР с $g \approx 4.3$ от парамагнитных ионов Fe^{3+} из-за высокоспинового (электронного спина $S = 5/2$) железа в трансферрине.

Около 3-4 граммов железа распределяется между частями тела. У нормальных субъектов железо связано с белком. Примерно 70% общего железа циркулирует, в основном в гемоглобине эритроцитов. До 25% железа хранится в клетках цитозоля в виде ферритина или в лизосомах в виде гемосидерина. Только около 0,1% от общего количества железа в организме циркулирует в плазме, связанным с трансферрином. «Свободное» железо токсично для крови и тканей [115]. Во многих патологических процессах, включая рост опухоли, количество «свободного» железа в крови и тканях увеличивается из-за распада ионов Fe из ферритина и разрушения других гемовых и негемовых белков. Спектры ЭПР «свободного» железа (лабильный лабиринт железа) детектируются как широкий сигнал в окрестности $g = (2.2 - 2.4)$ [101, 107, 108].

По сравнению с нормальными, опухолевые клетки генерируют больше «свободных» радикалов. Когда «свободные» радикалы продуцируются в избыточных и неконтролируемых количествах, они и их производные продукты могут реагировать с различными клеточными макромолекулами, такими как липиды, белки и ДНК, и могут модулировать экспрессию генов [116, 117]. Окислительно-восстановительные состояния и нарушения электронного переноса связаны с синтезом активных форм кислорода (АФК) и деградацией белков матрикса, что впоследствии влияет на выживание клеток, инвазию и метастазирование [118]. Матриксные металлопротеиназы (ММП) способны разлагать белки внеклеточного матрикса, усиливая инвазию раковых клеток. Как правило, предполагается, что синтез и / или активация ММП усиливается окислительным стрессом, таким как, например, вызванный активированными нейтрофилами и АФК [118, 119].

Исходя из описанной литературы, можно говорить о том, что применение метода ЭПР объяснимо для изучения влияния магнитных наночастиц оксида железа на карциному.

3 Материалы и методы

3.1 Объекты исследования

В работе использовали синтезированные наночастицы, а также клетки асцитной карциномы Эрлиха, выделенные из перитонеальной полости лабораторных мышей самцов ICR. Животные, которым перевивали асцитную карциному Эрлиха, получены из питомника Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор».

Все манипуляции с животными проводились в соответствии с этическими нормами работы с лабораторными животными, предусмотренными Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в лабораторных исследованиях

3.2 Схема эксперимента

На первом этапе эксперимента было необходимо получить магнитные наночастицы с арабиногалактаном. Наночастицы синтезированы методом химического осаждения. Затем определялись физико-химические свойства МНЧ. Методом просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения был определен средний размер частиц, а также представлена дифракционная картина. Магнитные свойства частиц проверялись при помощи Мессбауэровской спектроскопии и ферромагнитного резонанса, наличие химических связей определяли ИК-Фурье спектрометром.

Далее необходимо было проверить биологическую активность МНЧ. Для этого подготовили суспензию клеток АКЭ. Затем эту суспензию разделили на 5 групп (1 контрольную и 4 экспериментальные): 1 – контроль, 2 – с МНЧ, 3 – с арабиногалактаном, 4 – под воздействием магнитного поля, 5 – с МНЧ под воздействием магнитного поля.

Воздействие магнитным полем проводилось при частоте 100 Гц, мощность 2,7 мТл. Клетки АКЭ культивировали совместно с МНЧ в течение 60 минут при температуре 35 °С. Далее в каждой группе определяли спектры ЭПР и производился подсчет погибших клеток АКЭ. Доля выхода АФК регистрировалась методом хемилюминисценции (рис. 1.)

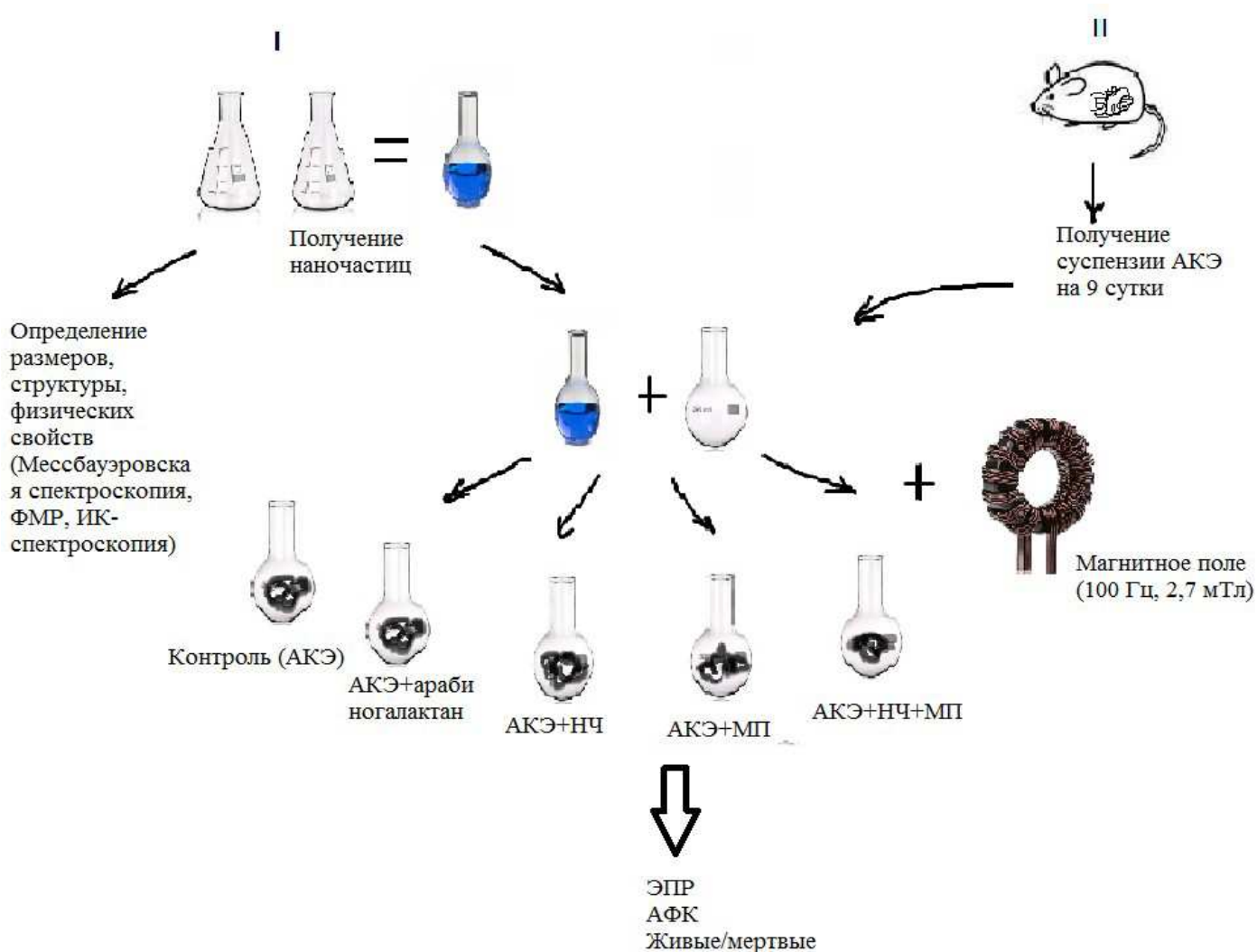


Рисунок 1 – Схема эксперимента

3.3 Приготовление магнитных наночастиц

Наночастицы были получены методом химического осаждения в присутствии раствора гидроксида аммония при ультразвуковой кавитации.

Готовили раствор, содержащий 0,4% нитрата железа $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ и 0,5% арабиногалактана (ООО Аметис, Россия). К полученному раствору по каплям добавляли раствор гидроксида аммония NH_4OH (2.5% об). В процессе синтеза раствор обрабатывали ультразвуком (50 Вт/см², 22 кГц).

В приготовленном растворе концентрация МНЧ – 1,6 мг/мл.

Полученные образцы исследовали с помощью просвечивающего электронного микроскопа Hitachi HT7700, для определения формы полученных магнитных нанокompозитов. С помощью микродифракции определяли распределение частиц по размерам и средние размеры одной частицы.

3.4 Спектроскопия Мессбауэра

Мессбауэровские спектры были получены при комнатной температуре с помощью спектрометра MS-1104Ем с источником ^{57}Co (Cr) на порошковых образцах толщиной 5-10 мг/см² в зависимости от содержания природного железа. Низкотемпературные измерения проводились с помощью криостата производства ООО "КРИОТРЕЙД". Показаны изомерные химические сдвиги относительно $\alpha\text{-Fe}$.

Спектры были расшифрованы в два этапа. На первом этапе определялось распределение ультратонких полей $P(H)$ в экспериментальном спектре. Затем по максимальным позициям оценивались число и параметры неэквивалентных положений ионов железа и строился модельный спектр. Этот модельный спектр был подогнан к экспериментальному путем изменения всего набора ультратонких параметров. Это действие позволило исключить ложные составляющие спектра и уточнить параметры реальных подспектров.

3.5 Ферромагнитный резонанс

Ферромагнитный резонанс (ФМР) – метод магнитного резонанса. Он заключается в избирательном поглощении энергии электромагнитного поля

ферромагнетиком. Спектры ФМР записывались при температуре от 120 до 360 К на ЭПР Фурье-спектрометре Elexsys E580 (Bruker) Красноярского регионального центра коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск.

3.6 ИК-Фурье спектроскопия

ИК-спектры определялись при помощи экспериментальной установки для снятия спектров инфракрасного поглощения – вакуумного Фурье-спектрометра Bruker Vertex 80V.

Для определения ИК-спектров, образцы смешивались с порошком KBr. Полученная смесь прессовалась под давлением от 10 до 104 Н/см². Диаметр полученных таблеток составлял 13 мм, толщина равнялась ≈0,5 мм.

При получении спектров в среднем ИК-диапазоне в качестве источника света использовали Globar (U-образная дуга из карбида кремния), детектор RT-DLaTGS; светоделитель KBr.

ИК-спектры были получены на Фурье-ИК спектрометре Vertex 80V в диапазоне 380-7000 см⁻¹.

3.7 Подготовка суспензии клеток АКЭ с наночастицами

Опухоль забиралась у мыши через 9 – 10 дней после прививки. Далее разводили суспензию клеток АКЭ раствором Хенкса с таким расчетом, чтобы после добавления наночастиц в 1 мл суспензии находилось 1×10^6 клеток.

Суспензия опухолевых клеток АКЭ, культивировалась совместно с наночастицами, покрытыми арабиногалактаном в течение 60 мин при температуре 35°C. Раствор МНЧ перед добавлением к АКЭ разводили в 200 раз.

3.8 Метод электронного парамагнитного резонанса клеток АКЭ

Метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) является основным для изучения парамагнитных частиц. Метод ЭПР основан на поглощении электромагнитного излучения радиочастотного диапазона неспаренными электронами, находящимися в магнитном поле (field).

При отсутствии внешнего магнитного поля, магнитные моменты электронов ориентируются случайным образом (см. рис. 2 А), и их кинетическая энергия практически не отличается друг от друга. При приложении внешнего магнитного поля, магнитные моменты электронов ориентируются в поле в зависимости от величины спинового магнитного момента (см. рис. 2 Б), а их энергетический уровень делится пополам (рис. 3)

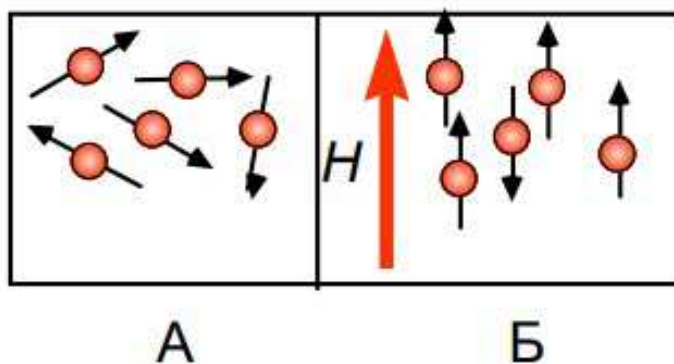


Рисунок 2 - Магнитные моменты электронов: А - в отсутствии внешнего магнитного поля, Б - при наложении внешнего магнитного поля

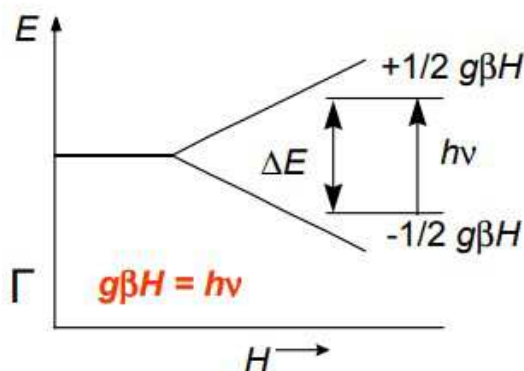


Рисунок 3 - Разделение энергетических уровней одиночных электронов в магнитном поле (эффект Зеемана)

Энергия взаимодействия магнитного момента электрона с магнитным полем выражается уравнением:

$$E = -\mu H \cos(\mu H) \quad (1.1)$$

где μ - магнитный момент электрона, H - напряженность магнитного поля, $\cos(\mu H)$ - косинус угла между μ и H .

Эффект Зеемана можно выразить следующим образом: энергетические уровни электронов, помещенных в магнитное поле, расщепляются в этом поле в зависимости от величины спинового магнитного момента и напряженности магнитного поля.

Устройство радиоспектрометра ЭПР представлено на рис.4 [120].

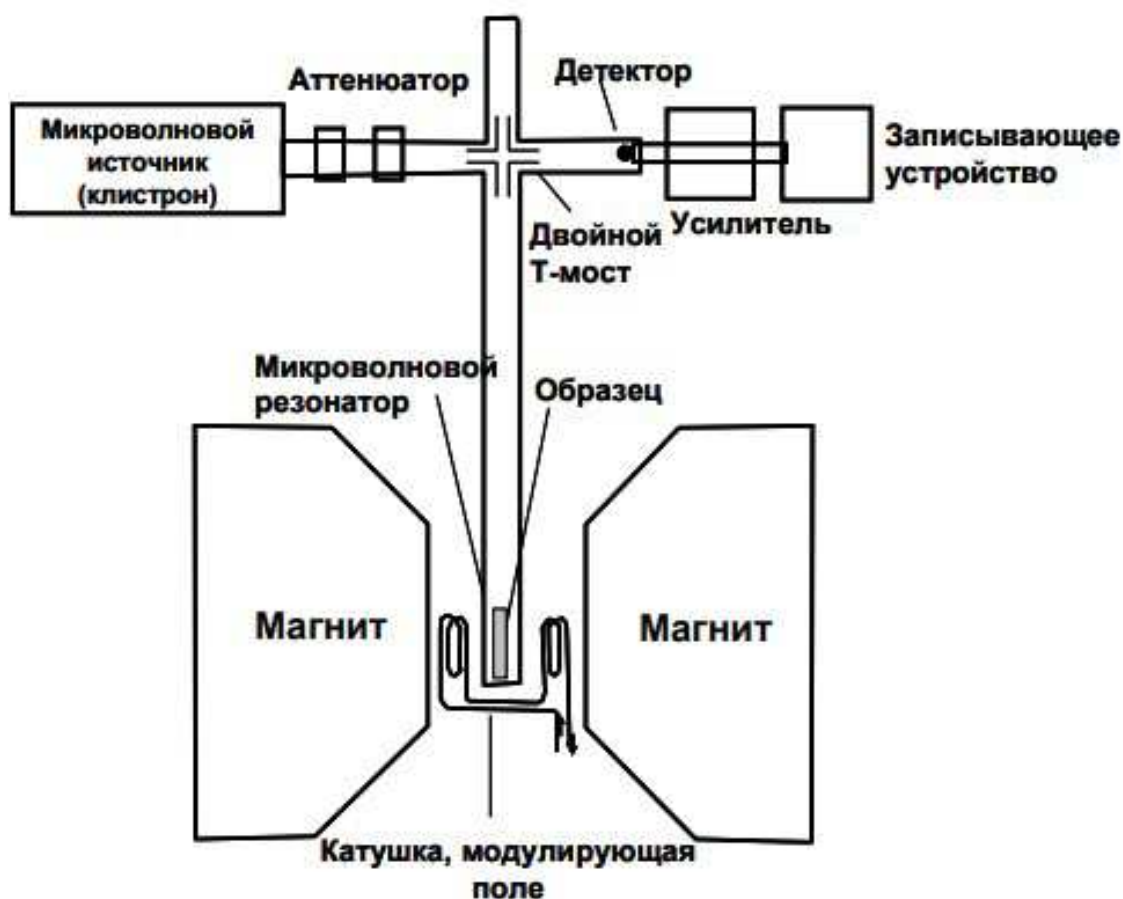


Рисунок 4 - Устройство ЭПР-спектрометра

Для проведения ЭПР анализа образцы замораживали в жидком азоте. Спектры ЭПР записывались в диапазоне X-band при температуре 85К на ЭПР Фурье-спектрометре Elexsys E580 (Bruker) Красноярского регионального центра коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск.

3.9 Подсчет погибших клеток АКЭ

В клеточную суспензию добавляли равный объем 0,1%-ного трипанового синего, приготовленного на физиологическом растворе. Трипановый синий-это кислотный анилиновый краситель, используемый при пожизненном анализе фагоцитарной и пиноцитарной активности клеток, а также при подсчете количества мертвых клеток в суспензии, которые, в отличие от живых клеток, окрашены в синий цвет.

Затем, окрашенную суспензию клеток АКЭ помещали в камеру Горяева. Производили подсчет клеток в 100 больших квадратах камеры с помощью светового микроскопа (ок. 10х, об.25х).

Данные о содержании погибших клеток в суспензии АКЭ представлены в процентах.

3.10 Определение содержания активных форм кислорода методом хемилюминесценции

Усиленная люминесцентными зондами хемилюминесценция, широко используется для обнаружения АФК, продуцируемых различными клетками и ферментативными системами. Выбранный нами метод регистрации интенсивности спонтанного свечения позволяет оценивать результат в биологических жидкостях, тканях и клеточных суспензиях. Метод является неинвазивным, высокочувствительным, а также отражает быстрые сдвиги в балансе про-и антиоксидантных систем.

В качестве «люминесцентных зондов» были выбраны люминол и люцигенин. Они достаточно легко окисляются свободно-радикальными формами кислорода с квантовым выходом люминесценции 3% в диапазоне 300-600 нм при максимальном излучении на длине волны 425 нм. Люминесцентные зонды могут участвовать в реакциях, образуя электронно-возбужденные продукты, к которым относятся химические активаторы или хемилюминесцентные зонды. Также они способны увеличивать квантовый выход фотонного излучения в результате передачи энергии электронного возбуждения к активатору (физические активаторы или хемилюминесцентные сенсбилизаторы) [66].

Известно, что люцигенин избирательно реагирует с образованием супероксида (O_2^-), в то время как люминол дает свечение под действием многих окислителей (OH^- , H_2O_2 др.) [66].

Для ХЛ анализа набирали 100 мкл суспензии исследуемых клеток (1×10^6 кл./мл), 200 мкл ($2,2 \times 10^{-4}$ М) люминола (Sigma, USA) или люцигенина (Sigma–Aldrich, Switzelend) в растворе Хэнкса и 50 мкл суспензии монодисперсных латексных частиц, опсонизированных белками сыворотки крови человека (ВНИИСК, С-Петербург) размером 2,3 мкм в концентрации 5×10^8 частиц/мл для активации фагоцитоза *in vitro*.

Регистрацию активных форм кислорода (АФК) *in vitro* с активацией антигена и без нее проводили в течение 90 мин при температуре 37°C на аппаратно-программном комплексе "Хемилюминометр КЛ–3604–ПК", предназначенном для измерения сверхслабого излучения биологической и физико-химической природы. Определяли следующие характеристики: максимальное значение интенсивности (I_{max}) хемилюминесцентной реакции и площадь под кривой, регистрирующей реакцию за 90 минут, которая характеризует общее количество образовавшихся АФК (S).

3.11 Статистическая обработка результатов

По результатам исследования, в пакете электронных таблиц MS Excel 2007, была сформирована база данных, на основе которой проводился статистический анализ. Выборку описывали с помощью подсчета среднего арифметического и стандартной ошибки среднего. Достоверность различий между показателями контрольной и опытных групп оценивалась по непараметрическому U-критерию Манна-Уитни при уровне значимости меньше 0,95.

4 Результаты и их обсуждение

В ходе проделанной работы были синтезированы магнитные наночастицы, покрытые арабиногалактаном.

Арабиногалактан – водорастворимый растительный полисахарид, выделенный из хвойных растений. При добавлении арабиногалактана в раствор, можно добиться устойчивости последнего, что достигается благодаря некоторым свойствам полисахарида, таких как: наличие высоких поверхностно-активных характеристик, высокой гидролитической устойчивости, стабилизации коллоидной системы, а также повышения активности НАДФН-оксидазы и супероксиддисмутазы [2].

После синтеза полученные частицы стабильны в растворе, не агрегируют и не садятся.

При помощи просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения были получены изображения магнитных наночастиц оксида железа (рис.5 (а)), а также картины микродифракции (рис.5 (б)). Средний размер частиц составил 2 нм.

Согласно дифракционному изображению, полученные наночастицы, вероятно, представляют собой ферригидрит.

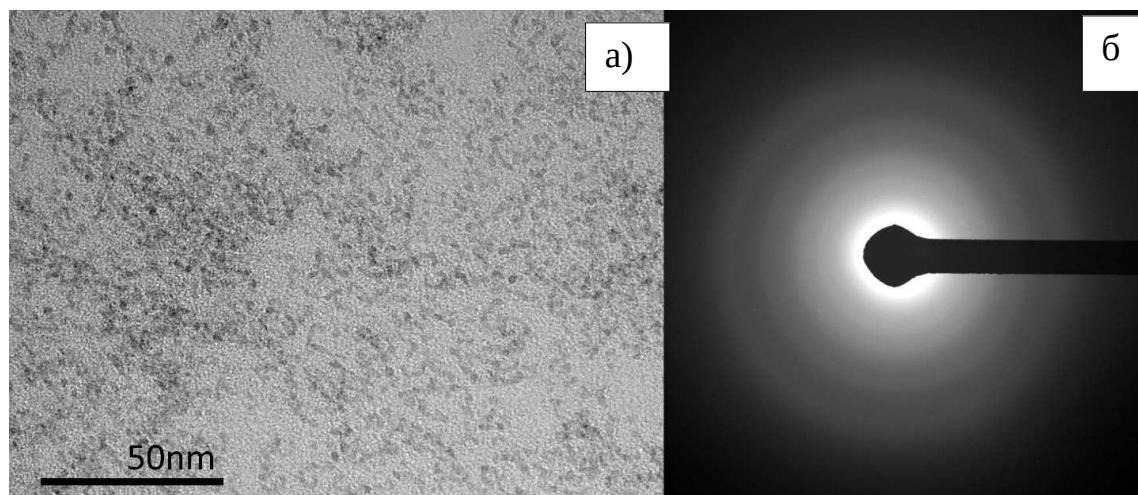


Рисунок 5 – Изображение наночастиц оксида железа на основе арабиногалактана (а) и картина микродифракции (б)

На рисунке 6 (а) представлен мессбауэровский спектр наночастиц оксида железа, измеренный при комнатной температуре. Спектр представляет собой квадрупольный дублет, характерный для разблокированных частиц в суперпарамагнитном состоянии. Анализ распределения квадрупольного расщепления $P(QS)$ в экспериментальном спектре (рис. 6 (б)) позволяет нам заключить, что существует, по меньшей мере, три неэквивалентных положения железа с октаэдрической средой и одно положение с тетраэдрической средой лигандов. Модельный спектр (рис. 6 (а)) был сформирован с учетом особенностей, наблюдаемых на распределении $P(QS)$, и адаптирован к экспериментальным спектрам при изменении всего набора ультратонких параметров.

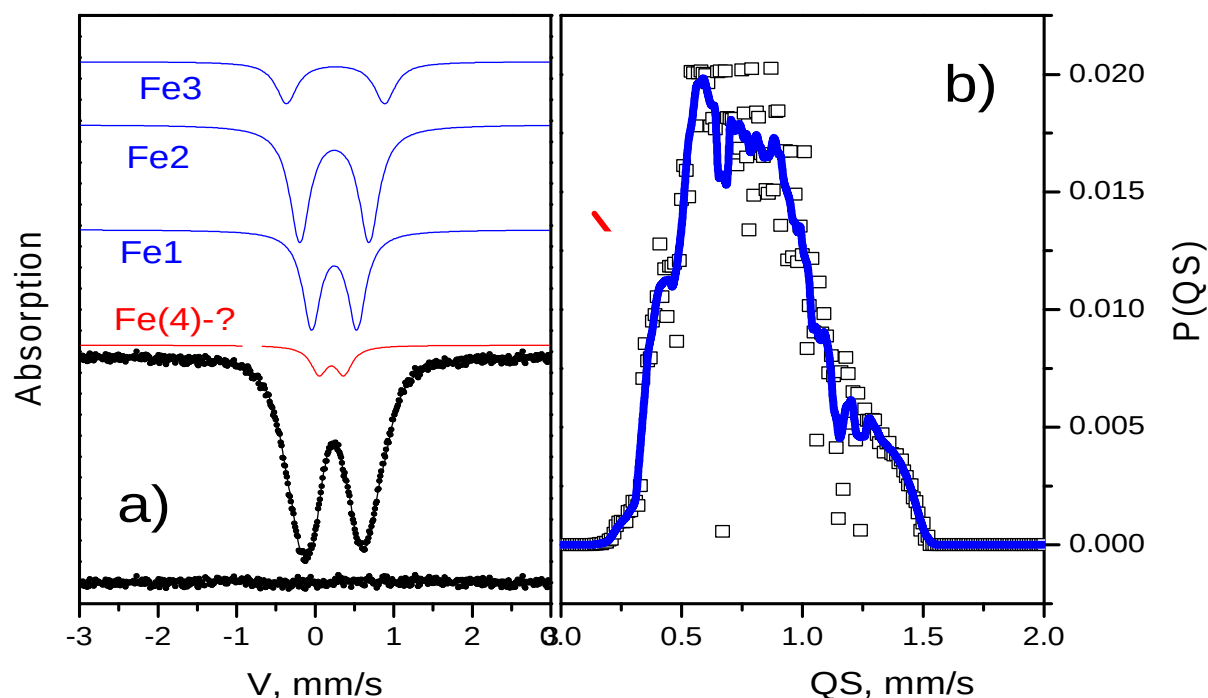


Рисунок 6 - Мессбауэровский спектр наночастиц (а), вероятностное распределение квадрупольных расщеплений в спектре (б). Примечание: по оси x - скорость перемещения образца, мм/с; по оси y - интенсивность поглощения, отн. единицы

Результаты интерпретации Мессбауэровских спектров приведены в таблице 1. Положения железа, обозначенные Fe1 и Fe2, соответствуют кубической и гексагональной упаковке лигандов, в то время как положение Fe3, вероятно, соответствует межслойным атомам железа. Параметры модельных спектров хорошо согласуются с результатами, полученными ранее на ферригидрите.

Таблица 1 – Параметры Мессбауэровской спектроскопии

IS	QS	W	A	Позиция
0,31	0,32	0,25	0,08	Fe(4)
0,35	0,58	0,28	0,32	Fe1(6)
0,35	0,88	0,31	0,44	Fe2(6)
0,37	1,25	0,32	0,16	Fe3(6)

На рисунке 7 приведены спектры ферромагнитного резонанса, измеренные в диапазоне температур от 120 до 360 К. Спектры поглощения представляют собой симметричные кривые Лоренца, а максимум поглощения находится около величины ω/γ . Интенсивность сигнала ферромагнитного резонанса наночастиц в исследуемом диапазоне температур уменьшалась почти линейно по всему измеряемому диапазону температур, что свидетельствует о том, что наночастицы находятся в разблокированном, суперпарамагнитном состоянии. На рис. 8 приведена температурная зависимость ширины линии ферромагнитного резонанса $\Delta H(T)$ наночастиц оксида железа. Значения резонансных полей ФМР исследуемых высушенных порошков монотонно увеличивались от 3320 Ое до 3380 Ое в используемом интервале температур.

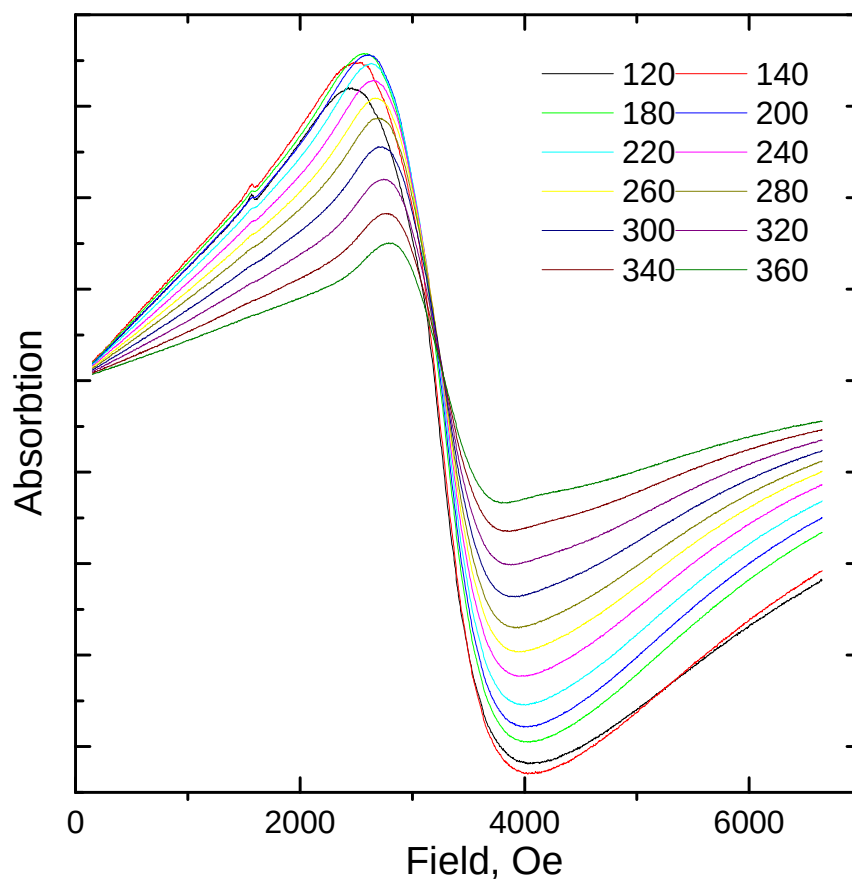


Рисунок 7 – Спектры ферромагнитного резонанса измеренные в диапазоне температур от 120 до 360 К. Примечание: по оси x – напряженность поля, Oe; по оси y - интенсивность поглощения, отн.ед.

Из данных литературы известно, что 350-400 К – температура упорядочения ферригидрита, т.е. при этой температуре исчезает магнитный порядок в частицах. На рисунке 9 при температуре измерения больше 300 К график выходит на «плато», что так же свидетельствует в пользу того, что структура полученных частиц соответствует ферригидриту.

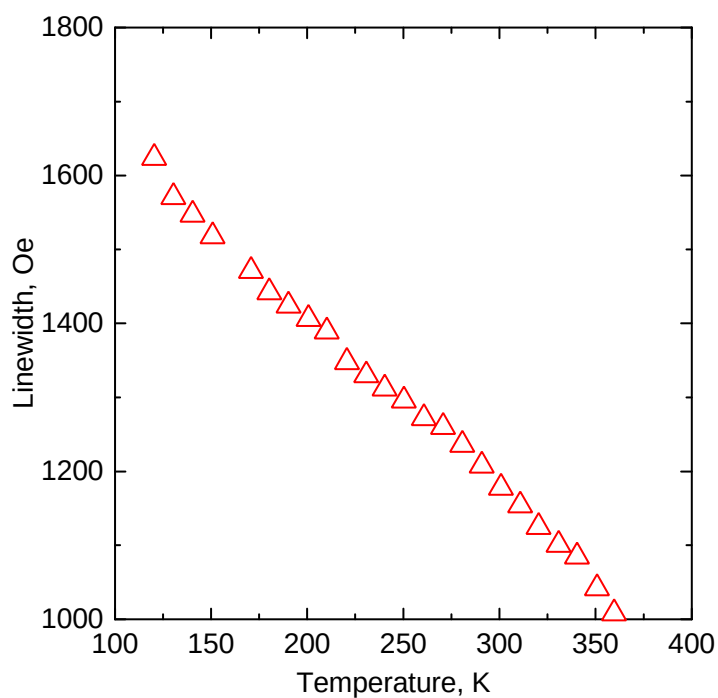


Рисунок 8 – Температурная зависимость ширины ферромагнитной линии резонанса для наночастиц оксида железа. Примечание: по оси x – температура, К; по оси y – ширина линии ФМР, Oe.

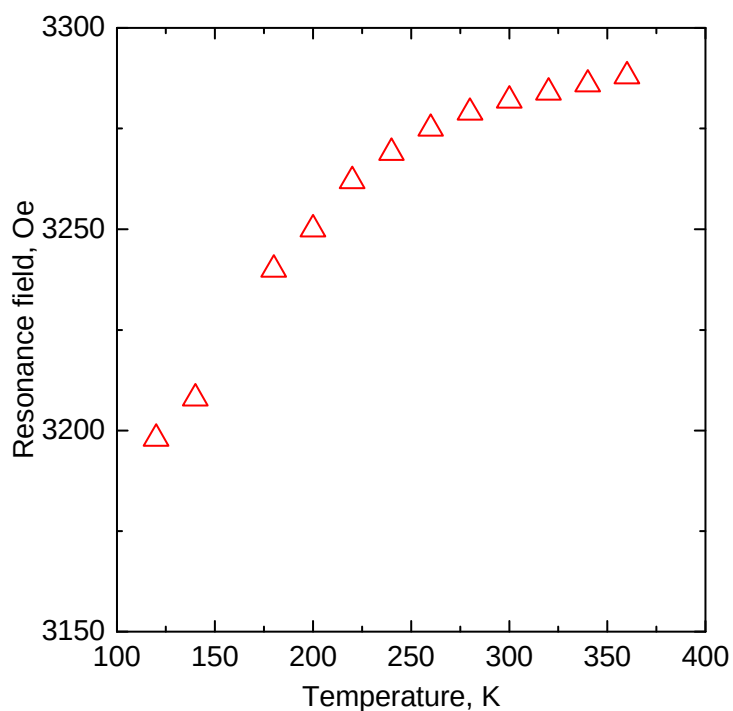


Рисунок 9 – Зависимость резонансного поля от температуры для наночастиц оксида железа. Примечание: по оси x – значение резонансного поля, Oe; по оси y – температура, К.

После качественного анализа спектров образца арабиногалактана и образца наночастиц покрытых арабиногалактаном были определены основные характеристические частоты (рис.10). Из данных ИК-спектроскопического исследования продуктов модифицирования магнитными наночастицами выявлены структурные изменения в продукте реакции по сравнению с исходным соединением.

В спектре арабиногалактана (красный спектр) наблюдается широкая полоса в области 3400 и 2900 см^{-1} , в которой происходит наложение полос поглощения O–H-связей (3400 см^{-1}) и CH, CH₃-, CH₂- ($\sim 2900\text{ см}^{-1}$) углеводных звеньев. Колебание 1640 см^{-1} соответствует колебаниям карбонильной группы, 1370 см^{-1} – деформационные колебания диольных спиртовых групп δ OH. В области $1200\text{-}1000\text{ см}^{-1}$ наблюдаем ряд полос, принадлежащих валентным колебаниям C-O связи пиранозного и фуранозного циклов, деформационные колебания циклов ($714, 775, 882\text{ см}^{-1}$).

Макромолекула арабиногалактана имеет высоко разветвленное строение. Было установлено, что каждое галактозное звено его основной цепи содержит 2, а концевые и боковые звенья имеют 3 незамещенные гидроксильные группы. Все они потенциально способны участвовать в химических реакциях.

Основным отличием ИК-спектра чатиц AG (синий спектр) от ИК-спектра арабиногалактана (красный спектр) выступает появление полос поглощения в области $395, 564\text{ см}^{-1}$, которые связываем с наличием связи Fe-O структуры магнитных наночастиц (черный спектр). Такие изменения могут свидетельствовать о формировании нанобиокомпозита арабиногалактана с магнитными частицами.

Судя по спектральным изменениям, можно предположить, что в этой реакции, когда образуется нанобиокомпозит, появляются диолспиртовые группы, которые однозначно способны связывать металлы с атомами кислорода гидроксильных групп, образуя сильные диолатные комплексы. Можно предположить, что это свойство углеводов связано не с ионизацией

гидроксильных групп, а, вероятно, с их способностью диссоциировать в присутствии ионов металлов в диапазоне рН.

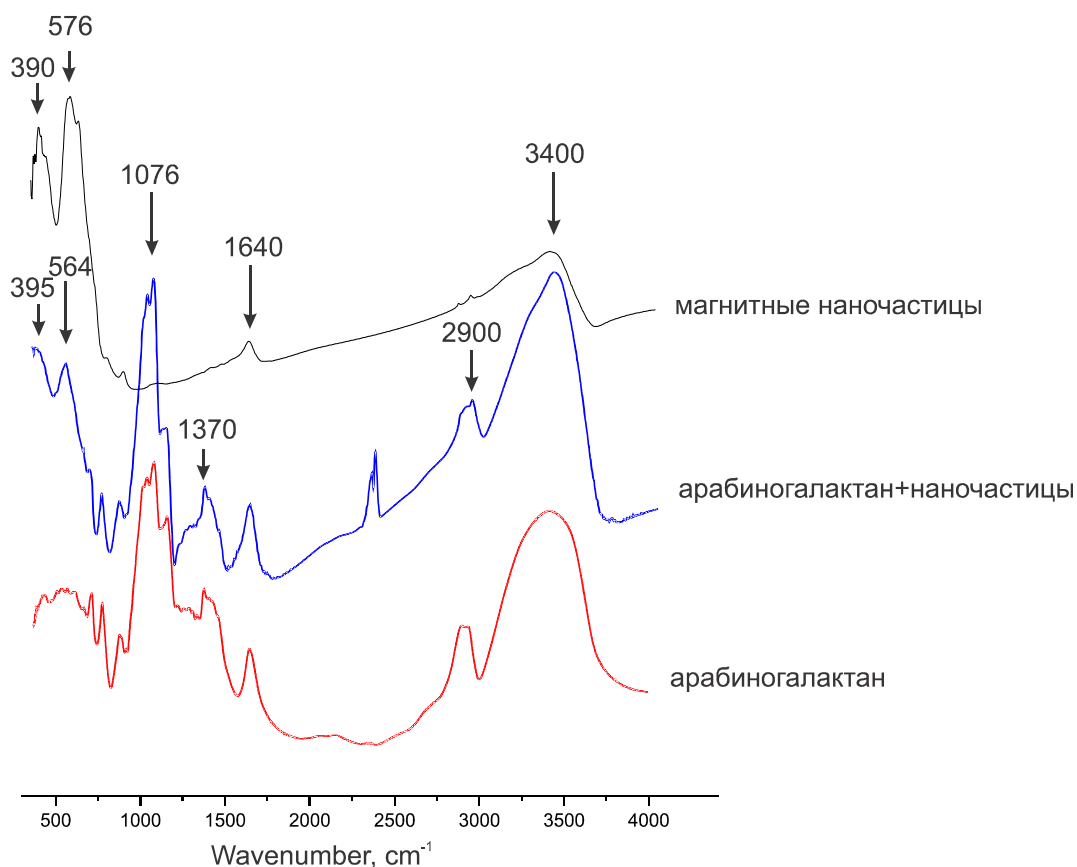


Рисунок 10 – ИК-спектры поглощения арабиногалактана, магнитных наночастиц и наночастиц с арабиногалактаном. Примечание: по оси x – волновое число, см⁻¹; по оси y - интенсивность поглощения, отн.ед.

Таким образом, выполнив первую часть работы – синтез наночастиц и определение их структуры можно заключить, что полученные наночастицы оксида железа по своей структуре являются ферригидритом, покрытым арабиногалактаном.

Для оценки биологической активности полученных наночастиц проводили инкубацию клеток асцитной карциномы Эрлиха с МНЧ и анализировали ЭПР-спектры в образцах.

На рис. 11 (а) приведена характерная кривая резонансного поглощения суспензии АКЭ. Видны пики поглощения, обусловленные трансферрином, молекулами цитохрома, церулоплазмином, а также свободно-радикальными формами.

NO в клетках и тканях может образовывать парамагнитные динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) [121], которые надежно регистрируются методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) - поглощения с g-фактором 2,01-2,04, обозначенные на рисунке цифрой 4. Данные поглощения обусловлены наличием парамагнитных динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ), включающих в себя эндогенное Fe и тиоловые (серосодержащие) группы. В этих низкоспиновых комплексах неспаренный электрон локализован на dz_2 орбитали атома железа. Геометрическая структура комплексов – октаэдр или квадрат с цисрасположением лигандов в плоскости квадрата. Железо находится в состоянии Fe^+ (электронная конфигурация d_7), а NO лиганды – в состоянии NO^+ .

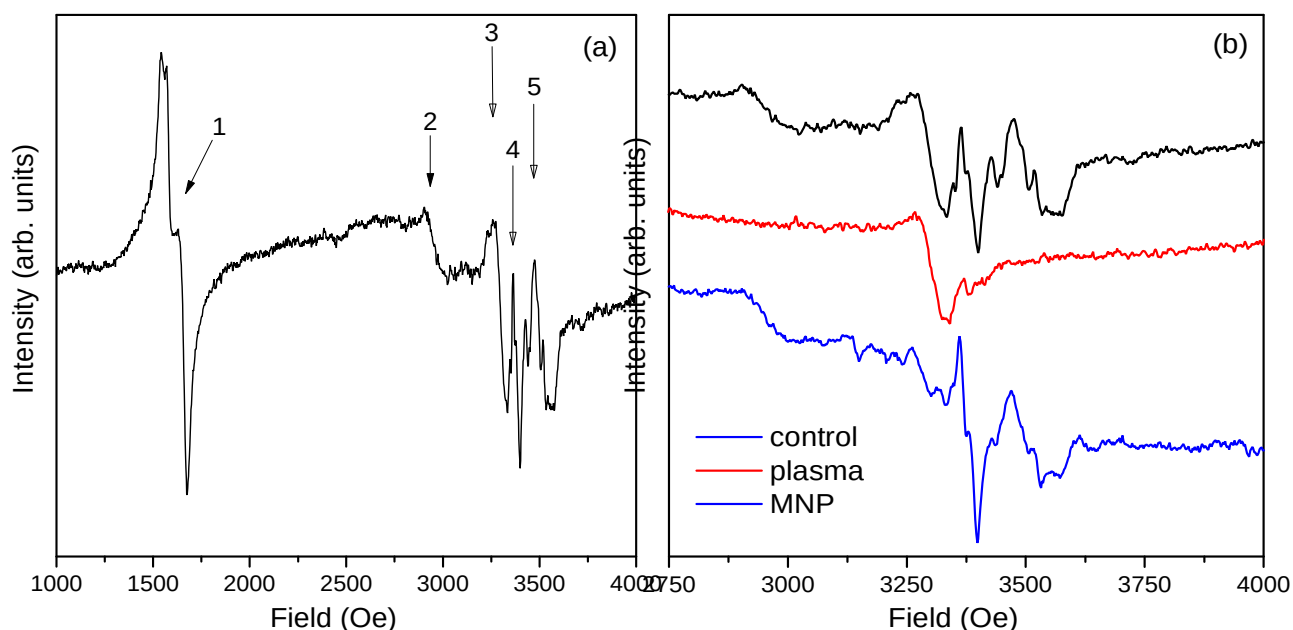
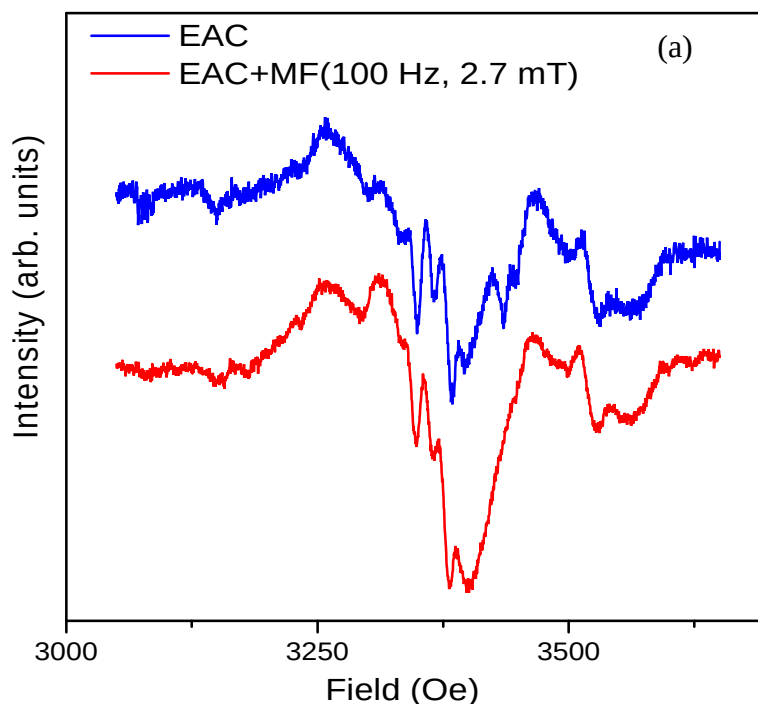


Рисунок 11 – ЭПР спектры. Примечание: а – ЭПР спектр АКЭ, присутствуют сигналы: 1 – трансферрин; 2 – цитохром; 3 – церулоплазмин; 4 - NO; 5 – свободно-радикальные формы; б – ЭПР-спектры образцов – контроль АКЭ,

плазма, и АКЭ с добавлением наночастиц; по оси x – напряженность поля, Oe; по оси y – интенсивность поглощения, отн.ед.

На рис.11 (б) приведены высокополевые участки трех резонансных кривых: выделенной опухоли (контроль), клеток АКЭ, культивируемых с используемыми наночастицами (МНЧ) и плазмы, полученной после центрифугирования суспензии АКЭ.

Сопоставление этих кривых указывает на то, что церулоплазмин и трансферин находятся исключительно в плазме, а наличие динитрозильных комплексов железа и радикальных форм связано с присутствующими в суспензии АКЭ опухолевыми клетками и перитонеальными макрофагами. На рис. 11 (б) видно, что культивирование суспензии АКЭ с наночастицами приводит к заметному уменьшению сигнала от церулоплазмينا, и увеличению сигнала от динитрозильных комплексов ДНКЖ.



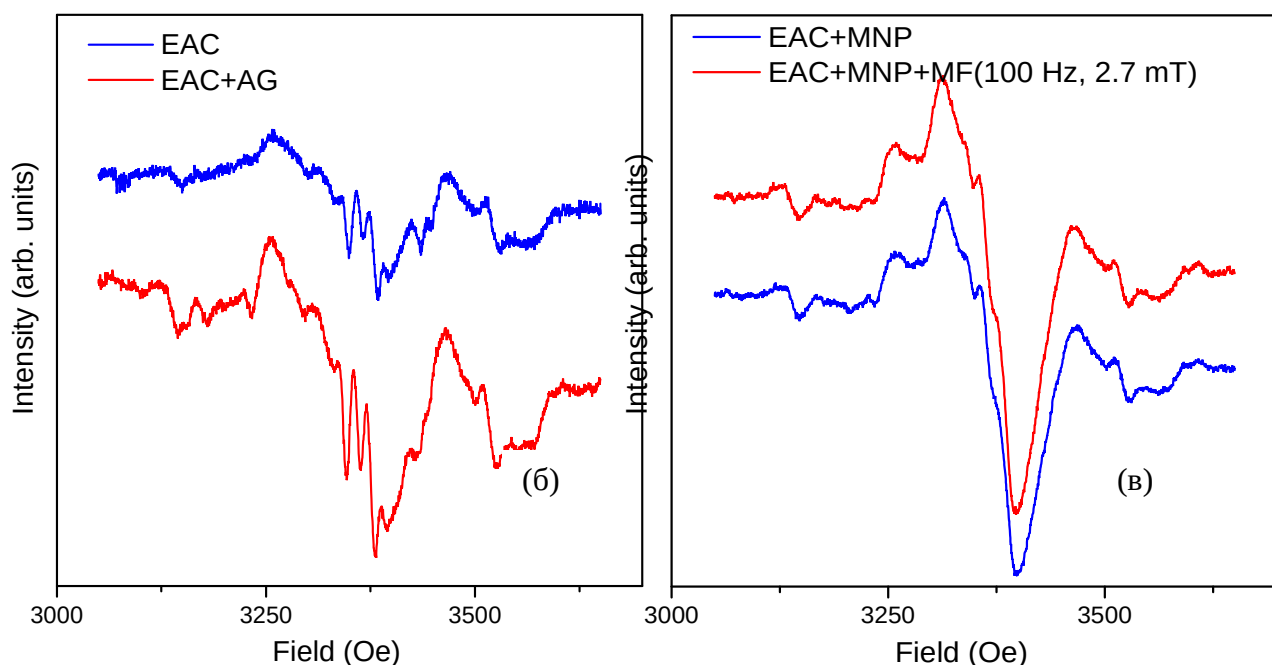


Рисунок 12 - ЭПР спектры асцитной карциномы Эрлиха. Примечание: а – влияние магнитного поля (MF) (100 Гц, 2,7 мТл) на АКЭ (ЕАС); б – влияние арабиногалактана (AG) на АКЭ; в – влияние наночастиц (MNP) и магнитного поля; по оси x – напряженность поля, Oe; по оси y - интенсивность поглощения, отн.ед.

Полученные данные демонстрируют зависимость между интенсивностью резонансного поглощения обусловленного наличием парамагнитных динитрозильных комплексов (ДНКЖ) и числом погибших клеток АКЭ после культивирования опухолевых клеток с магнитными наночастицами (рис 13).

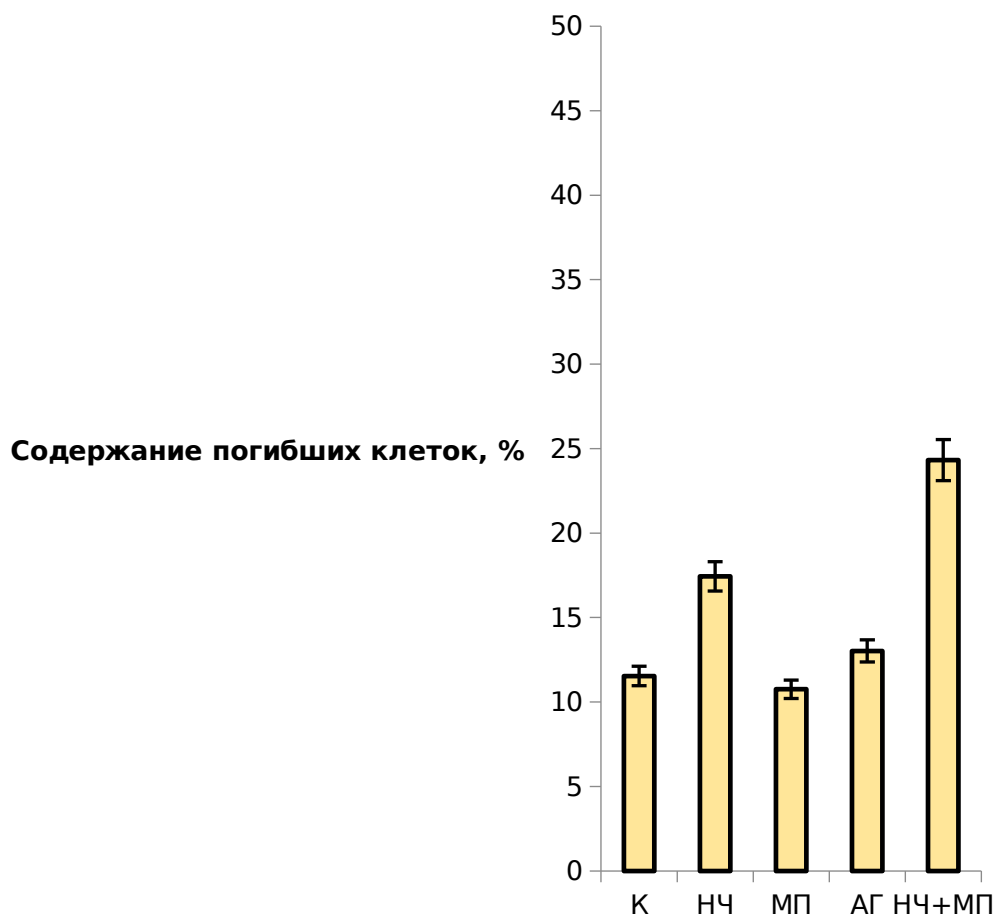


Рисунок 13 – Доля погибших клеток в суспензии асцитной карциномы Эрлиха (К) при добавлении наночастиц с арабиногалактаном (НЧ), воздействии магнитного поля 100 Гц, 2,7 мТл (МП), отдельно арабиногалактана (АГ) и сочетанного влияния факторов (НЧ+МП).

При увеличении интенсивности сигнала ДНКЖ в группах, где добавляли наночастицы и проводили воздействие магнитного поля. (рис 12 (в)), увеличивается доля погибших клеток. Или другими словами, гибель опухолевых клеток АКЭ связана с увеличением концентрации NO, о которой свидетельствует увеличение пика поглощения. Уникальная особенность клеток АКЭ заключается в том, что они сами способны вырабатывать оксид азота (см. рис.12 (а)), что, по-видимому, связано с их механизмами защиты от иммунной системы [58]. NO может стимулировать синтез ряда агентов: интерлейкина-10

(IL-10), факторов роста TGF β и TGF β_1 , простагландина E2 (PGE 2), которые подавляют защитную активность макрофагов и увеличивают проницаемость капилляров брюшной полости для транспорта питательных веществ, что положительно сказывается на росте опухолевых клеток[79] .

Культивирование клеток АКЭ с магнитными частицами повышают выход оксида азота NO (см.рис. 12 (в)). Более высокие концентрации NO, а, следовательно, и активных форм азота (АФА), приводят к реакциям, которые вызывают повреждения ДНК, активацию различных факторов транскрипции, за счет чего может увеличиваться, например, экспрессия белка p53, вызывая апоптоз клеток и их гибель [83].

В ходе работы также были получены данные об образовании активных форм кислорода в клетках АКЭ. Определяли следующие характеристики: максимальное значение интенсивности (I_{\max}) хемилюминесцентной реакции и площадь под кривой, регистрирующей реакцию за 90 минут, которая характеризует общее количество образовавшихся АФК (S).

При спонтанной реакции происходит увеличение максимального количества АФК относительно контроля, исключая последнюю группу (см.рис. 14 (а)). Эксперимент показал снижение интенсивности в люминол-зависимом активированном ХЛ процессе (см.рис.14 (б)).

Максимальная интенсивность образования АФК в люцигенин-зависимой реакции (см.рис.14 (в, г)) снижается как при спонтанной, так и при активированной реакции относительно контроля, исключая группу 2 для обеих реакций.

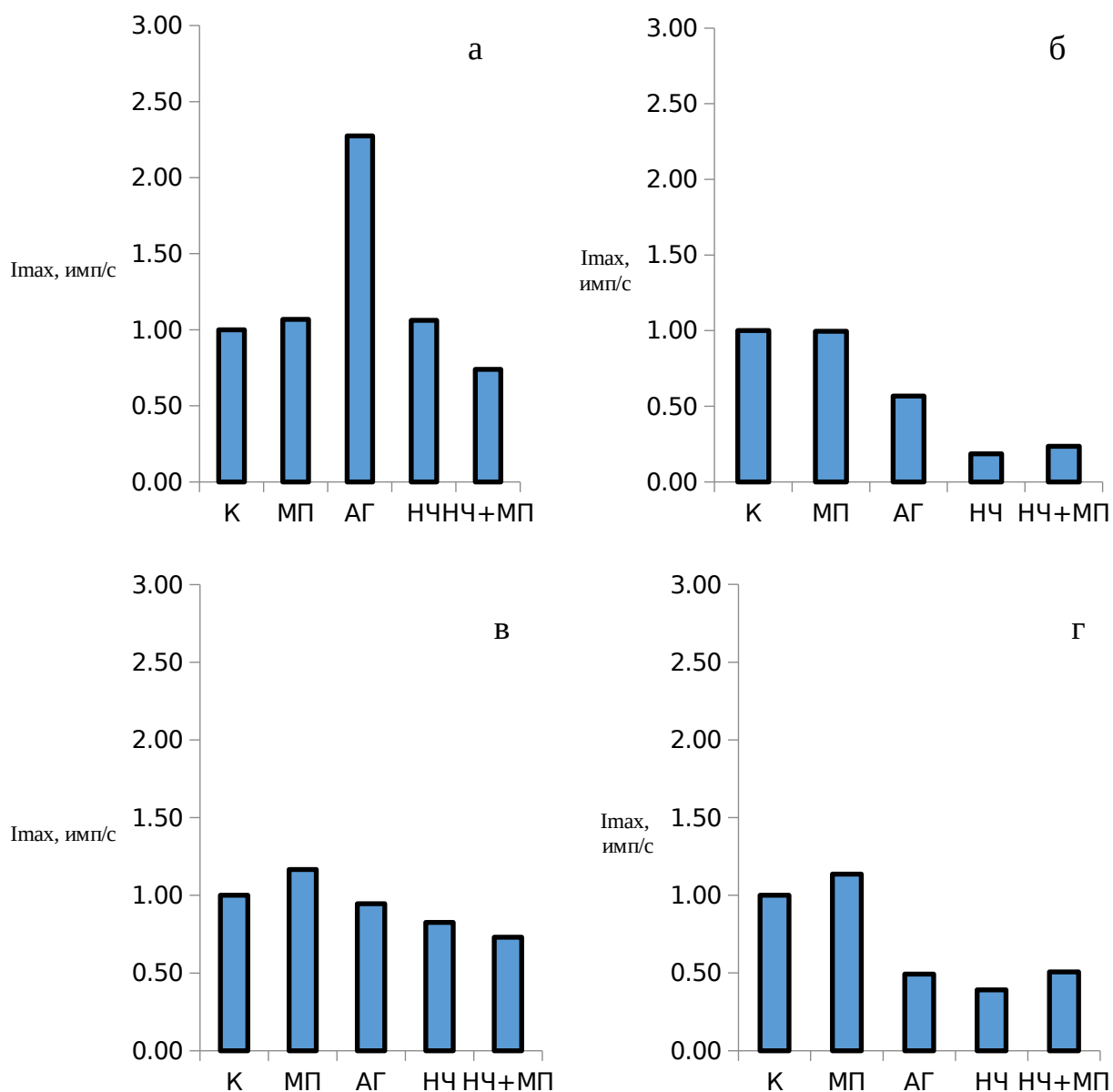


Рисунок 14 - Интенсивность хемилюминесценции в спонтанной (а) и активированной (б) люминолом реакции и спонтанной (в) и активированной (г) люцегенином. Примечание: К – контроль, суспензия АКЭ; НЧ – добавление наночастиц к АКЭ; МП – воздействие магнитного поля 100 Гц, 2,7 мТл на АКЭ; АГ – добавление арабиногалактана к АКЭ и НЧ+МП сочетанное влияние факторов.

В спонтанной ХЛ-реакции (см.рис.15 (а)) наблюдается увеличение максимальной генерации АФК в группах АКЭ при воздействии магнитного

поля и АКЭ с арабиногалактаном. В оставшихся двух группах площадь под кривой остается на уровне, близком к контрольному. Общее количество образовавшихся АФК (см.рис.15 (б)) в люминол-зависимой ХЛ-реакции после активации частицами латекса снижается относительно контроля. Исключением является группа клеток АКЭ при воздействии магнитного поля, где наблюдается тенденция к увеличению площади под кривой.

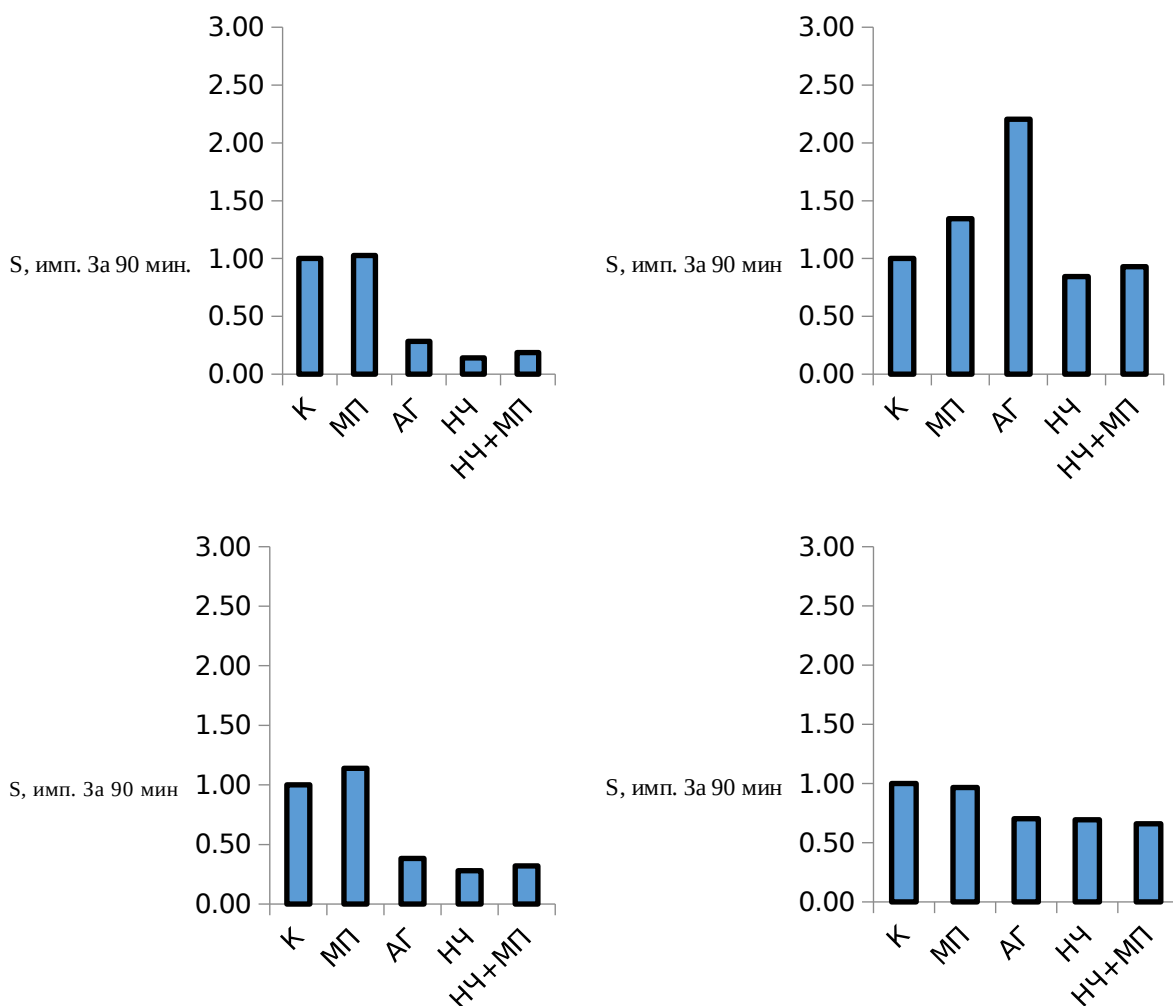


Рисунок 15 – Общее количество образовавшихся активных форм кислорода в спонтанной (а) и активированной (б) люминолом реакции и спонтанной (в) и активированной (г) с люцегинином. Примечание: К – контроль, суспензия АКЭ; НЧ – добавление наночастиц к АКЭ; МП – воздействие магнитного поля 100 Гц, 2,7 мТл на АКЭ; АГ – добавление арабиногалактана к АКЭ и НЧ+МП сочетанное влияние факторов.

При сравнении рисунков 12 (б), 14 (б) и 15 (б) можно видеть, что на изображении спектра в зоне, соответствующей поглощению свободно-радикальных продуктов, имеется увеличение пика при анализе данных группы, в которой клетки культивировались с арабиногалактаном. Также в хемилюминесцентной реакции при регистрации с люминолом возрастает интенсивность сигнала и общее количество образовавшихся вторичных радикалов (OH^\cdot , H_2O_2 др.). Данные, полученные в активированной хемилюминесцентной реакции показывают, что потенциал клеток к выработке АФК снижен при добавлении наночастиц и арабиногалактана. Это связано с истощением клетки после активного выброса свободно-радикальных форм без дополнительной активации клеток.

Из полученных данных можно заключить, что переменное магнитное поле, используемое для упорядочения магнитных моментов наночастиц, не влияет на образование динитрозильных комплексов, генерацию АФК и гибель клеток опухоли.

Таким образом, синтезированные магнитные наночастицы оксида железа по структуре представляют собой ферригидрит, покрытый арабиногалактаном. При добавлении к суспензии клеток экспериментальной опухоли вызывают гибель клеток, опосредованную в большей степени увеличением образования NO радикалов.

ВЫВОДЫ

1. Получены магнитные наночастицы ферригидрита размером 2 нм, покрытые арабиногалактаном.
2. Обнаружено увеличение интенсивности резонансного поглощения клеток АКЭ после инкубации с МНЧ, обусловленного наличием парамагнитных динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ).
3. Показано, что культивирование клеток АКЭ с МНЧ увеличивает долю погибших клеток в 1.5 раза, что может быть связано с увеличением выхода NO.
4. Выявлена прооксидантная активность арабиногалактана при взаимодействии с клетками асцитной карциномы Эрлиха.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АКЭ – асцитная карцинома Эрлиха
- АТФ – аденозинтрифосфат
- АФА – активные формы азота
- АФК – активные формы кислорода
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа
- ИА – индекс активации
- ИК – инфракрасный
- ММП – матриксные металлопротеиназы
- МНЧ – магнитные наночастицы
- МРТ – магнитно резонансная томография
- ОВР – окислительно-восстановительная реакция
- ОС – окислительный стресс
- ПОЛ – перекисное окисление липидов
- ФМР – ферромагнитный резонанс
- ХЛ – хемилюминисценция
- ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Colombo, M. Biological applications of magnetic nanoparticles / M. Colombo, S. Carregal-Romero, M.F. Casula, L. Gutierrez, M.P. Morales, I.B. Bohm, J.T. Heverhagen, D. Prospero, W.J. Parak // *Chem. Soc. Rev.* – 2012. – Vol. 41, № 11. – P. 4306-4334.
2. Gasilova, E. R. Colloidal aggregates of Pd nanoparticles supported by larch arabinogalactan / E. R. Gasilova, G. N. Matveeva, G. P. Aleksandrova, B. G. Sukhov, B. A. Trofimov // *S. Phys. Chem. B.* – 2013. – V. 117, № 7. – P. 2134-2141.
3. Rakhmanberdyeva, R. K. Structure of arabinogalactan and pectin from the silbum marianum / R. K. Rakhmanberdyeva, K. S. Zhaunbayeva, S. N. Senchenkova, A. S. Shashkov, K. M. Bobakulov // *Carbohydrate Research.* – 2019. – V. 485, № 1. – P. 1077-1097.
4. Губин, С. П. Магнитные наночастицы: методы получения, строение и свойства / С. П. Губин, Ю. А. Кокшаров, Г. Б. Хомутов, Г. Ю. Юрков // *Успехи химии.* – 2005. – Т. 74, № 6. – С. 539–574.
5. Баранов, Д. А. Магнитные наночастицы: проблемы и достижения химического синтеза / Д. А. Баранов, С. П. Губин // *Наносистемы.* – 2009. – Т. 1, № 1-2. – С. 129–147.
6. Егунова, О. Р. Магнитные наночастицы магнетитов, разделение и концентрирование / О. Р. Егунова, Т. А. Константинова, С. Н. Штыков // *Известия саратовского университета, новая серия: химия, биология, экология.* – 2014. – Т. 14, № 4. – С. 27–35.
7. Yin, Y. Colloidal Nanocrystal synthesis and the organic-inorganic interface / Y. Yin, A. P. Alivisatos // *Nature/* – 2005. – № 437. – P. 664–670.
8. Ashoori, R. C. Electrons in Artificial Atoms / R. C. Ashoori // *Nature.* – 1996. – № 379. – P. 413-419.

9. Leewen, D. A. Quenching of Magnetic Moments by Ligand-Metal Interactions in Nanosized Magnetic Metal Clusters / D. A. Leeuwen, J. M. Ruitenbeek, L. J. Jongh, A. Ceriotti, G. Paccioni, O. D. Haberlen, N. Rosch // *Phys. Rev. Lett.* – 1994. – № 73, 10. – P. 1432-1436.
10. Gao, R. Magnetisation behaviour of mixtures of ferrofluids and paramagnetic fluids with same particle volume fractions / R. Gao, J. Li, S. Han, B. Wen, T. Zhang, H. Miao, Q. Zhang // *J. Exp. Nanosci.* – 2011. – V. 7, № 3. – P. 282-297.
11. Hyeon, T. Chemical synthesis of magnetic nanoparticles / T. Hyeon // *Chem. Commun.* – 2003. – № 8. – P. 927-934.
12. Shen, L. Surfactant Stabilized Magnetic Fluids: Synthesis and Interactions at Interfaces / L. Shen, P.E. Laibinis, T.A Hatton // *Langmuir.* – 1998. – V. 15, № 2. – P. 447-453.
13. Massart, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media / R. Masart // *IEEE Trans. Magn.* – 1981. – V. 17, № 2. – P. 1247-1248.
14. Nikiforov, V. N. Filinova E.Yu. Biomedical applications of the magnetic nanoparticles. / V. N. Nikiforov, E. Y. Filinova // *Wiley.* – 2009. – V. 6, № 5. – P. 245-250.
15. Moriarty, P. Nanostructured materials / P. Moriarty // *Reports on Progress in Physics.* – 2001. – №3. – 64 p.
16. Talreja, N. Engineered Nanoparticles' Toxicity: Environmental Aspects / N. Talreja, D. Kumar // *In: Nanotechnology in Environmental Science. Editors.* – 2018. – № 23. – P. 737–758.
17. Carbone, M. Silver nanoparticles in polymeric matrices for fresh food packaging / M. Carbone, D. Donia, G. Sabbatella // *Journal of King Saud University Science.* – 2016. – V. 28, № 4. – P. 273–279.
18. Ovais, M. Wound healing applications of biogenic colloidal silver and gold nanoparticles: recent trends and future prospects / M. Ovais, I. Ahmad, A. Khalil // *Applied Microbiology and Biotechnology.* – 2018. – V. 102, № 1. – P. 1–14.

19. Berry, C. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine / C. Berry, A. Curtis // *J. Phys. D. Appl. Phys.* – 2003. – V. 8. – 36 p.
20. Jain, T. K. Iron oxide nanoparticles for sustained delivery of anticancer agents / T. K. Jain, M. A. Morales, S. K. Sahoo // *Am. Chem. Soc.* – 2003. – V. 125 (51). – P. 15754–15755.
21. Никифоров, В. Н. Медицинские применения магнитных наночастиц / В. Н. Никифоров // *Известия Академии инженерных наук им. А.М. Прохорова.* – 2013. – С. 23-34.
22. Добрецов, К. Г. Изучение свойств магнитных наночастиц и оториноларингологии / К. Г. Добрецов, В. Ю. Афонькин, С. В. Столяр, В. П. Ладыгина, А. В. Сипкин, К. В. Пуртов, О. А. Баюков, А. С. Лопатин // *Научные статьи.* – 2009. – С. 51-56.
23. Добрецов, К. Г. Новый способ лечения хронического риносинусита / К. Г. Добрецов, А. С. Лопатин, С. В. Столяр, А. В. Сипкин, В. П. Ладыгина, Ю. В. Пронина // *Оригинальные статьи.* – 2010. – Т 5, № 4. – стр. 84-88.
24. Chiang, C. L. Application of superparamagnetic nanoparticles in purification of plasmid DNA from bacterial cells / C. L. Chiang, C. S. Sung, T. F. Wu // *J. of Chromatography B.* – 2005. – V. 822. – P. 54—60.
25. Taylor, J. I. Application of magnetite and silica — magnetite composites to the isolation of genomic DNA / J. I. Taylor, C. D. Hurst, M. J. Davies // *J. of Chromatography .* – 2000. – V. 890. – P. 159—166.
26. Molday, R. S. Immunospecific ferromagnetic iron-dextran reagents for the labeling and separation of cells / R. S. Molday, D. Mackenzie // *J. of Immunological Methods.* – 1982. – V. 52. – P. 353—367.
27. Tan, W. Bionanotechnology based on silica nanoparticles / W. Tan, K. Wang, X. He // *Medicinal Research Reviews.* – 2004. – V. 24, № 5. – P. 621—638.
28. Tibbe, A. Optical tracking and detection of immunomagnetically selected and aligned cells / A. Tibbe, B. Grooth, J. Greve // *Nature Biotechnol.* – 1999. – V. 17. – P. 1210—1213.

29. Zigeuner, R. E. Isolation of circulating cancer cells from whole blood by immunomagnetic cell enrichment and unenriched immunocytochemistry in vitro / R. E. Zigeuner, R. Riesenberger, H. Pohla // *J. Urol.* 2003. – V. 169. – P. 701–705.
30. Forster, H. Separation of nanoparticles: Filtration and scavenging from waste incineration plants / H. Forster, T. Thajudeen, C. Funk // *Waste Management.* – 2016. – V. 52. – P. 346–352.
31. Bonnemain, B. Superparamagnetic agents in magnetic resonance imaging: physiochemical characteristics and clinical applications-a review / B. Bonnemain // *J. Drug Target.* – 1998. – V. 6. – P. 167–174.
32. Weissleder, R. Long circulating iron oxides for MR imaging / R. Weissleder, A. Bogdanov, E. A. Neuwelt // *Adv. Drug. Delivery Rev.* – 1995. – V. 16. – P. 321–334.
33. Berry, C. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine / C. Berry, A. Curtis // *J. Phys. D. Appl. Phys.* – 2003. – V. 15. – 36 p.
34. Fortin, J-P. Size-Sorted Iron Oxide Nanomagnets as Colloidal Mediators for Magnetic Hyperthermia / J-P. Fortin, C. Wilhelm, J. Servais, C. Menager, J-C. Bacri, F. Gazeau // *J. Am. Chem. Soc.* – 2007. – V. 129. – P. 2628-2635.
35. Jordan, A. Inductive heating of ferrimagnetic particles and magnetic fluids: physical evaluation of their potential for hyperthermia / A. Jordan, P. Wust, H. Fahling // *Int. J. Hyperthermia.* – 1997. – V. 9. – P. 51–68.
36. Neilsen, O. S. A future hyperthermia in cancer treatment? / O. S. Neilsen, M. Horsman, J. Overgaard // *E. J. Cancer.* – 2001. – V. 37. – P. 1587—1589.
37. Chan, D. C. F. Synthesis and evaluation of colloidal magnetic iron-oxides for the site-specific radiofrequency induced hyperthermia of cancer / D. C. F. Chan, D. Kirpotin, P. A. Bunn // *J. Magn. Mater.* – 1993. – V. 122. – P. 374—378.
38. Pankhurst, Q. A. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine / Q. A. Pankhurst, J. Connolly, S. K. Jones, J. Dobson // *J. Phys. D. Appl. Phys.* – 2003. – V. 36. – P. 167—181.

39. Hilger, I. Heating potential of iron oxides for therapeutic purposes in interventional radiology / I. Hilger, K. Fruhauf, W. Andra // Acad. Radiol. – 2002. – V. 9. – P. 198—202.
40. Widder, K. J. Magnetic microspheres: a model system for site specific drug delivery in vivo / K. J. Widder, A. E. Senyei, D. G. Scarpelli // Proc. Soc. Exp. Biol. Med. – 1978. – V. 58. – P. 141—146.
41. Jordan, A. Scientific and clinical applications of magnetic carriers. / A. Jordan, P. Wust, R. Scholz // New York: Plenum Press. – 1997. – 569 p.
42. Lubbe, A. S. Preclinical experiences with magnetic drug targeting: tolerance and efficacy / A. S. Lubbe, C. Bergemann, W. Huhnt // Cancer Res. – 1996. – V. 56. – P. 4694—4701.
43. Jurgons, R. Drug loaded magnetic nanoparticles for cancer therapy / R. Jurgons, C. Seliger, A. Hilpert // J. Phys. Condens. Matter. – 2006. – V. 18. – P. 2893—2902.
44. Иммунология опухолей [Электронный ресурс] / Ун-т Южной Каролины. Режим доступа: http://pathmicro.med.sc.edu/ghaffar/tumor_immunol00.htm
45. Инжеваткин, Е. В. Практикум по экспериментальной онкологии на примере асцитной карциномы Эрлиха: метод. разработка / Е. В. Инжеваткин. – Красноярск. гос. ун-т, 2004. – 10 с.
46. Эмануэль, Н. М. Кинетика экспериментальных опухолевых процессов. / Н. М. Эмануэль. – Москва: Наука, 1977. – 419 с.
47. Siems, W. G. Purine nucleotide levels in host tissues of Ehrlich ascites tumor bearing mice in different growth phases of the tumor / W. G. Siems, T. Grune, H. Schmidt, Y.V. Tikhonov, M. A. Pimenov // Cancer Res. – 1993. – V. 53. – P. 5143–5147.
48. Schmidt, H. ATP-Producing and consuming processes of Ehrlich mouse ascites tumor cells in proliferating and resting phases / H. Schmidt, W. Siems, M. Müller, R. Dumdey, S. M. Rapoport // Exp. Cell Res. – 1991. – V. 194. – P. 122–127.
49. Schwendel, A. Transitions of hepatic purine metabolism of Ehrlich ascites tumor bearing mice in different phases of tumor growth / A. Schwendel, W. G. Siems,

- T. Grune, G. H. Holzhütter // *Biochem. Mol. Biol. Int.* – 1994. – V. 34, № 3. – P. 457–463.
50. Segura, J. A. Ehrlich ascites tumor cells expressing anti-sense glutaminase RNA lose their capacity to evade the mouse immune system. / J. A. Segura, M. A. Ruiz-Bellido, M. Arenas, C. Lobo, J. Marquez, F. J. Alonso // *Int. J. Cancer*, 2001. – V. 91. – P. 379–384.
51. Latha, P. G. Immunomodulatory and antitumor properties of *Psoralea corylifolia* seeds. / P. G. Latha, D. A. Evans, K. R. Panikkar, K. K. Jayavardhanan // *Fitoterapia.* – 2000. – V. 71. – P. 223–231.
52. Bulan, O. Ehrlich ascites tumor cell kinetics line between cells with aging cellars. / O. Bulan // *Master's Thesis. Istanbul University Institute of Science and Technology. istanbul.* – 1990. – V. 17. – P. 153–163.
53. Grune, T. Adenine metabolism of Ehrlich mouse ascites cells in proliferating and resting phases of tumor growth. / T. Grune, W. Siems, R. Uhlig, M. Jakstadt. // *Biochemical Int.* – 1992. – V. 26, № 2. – P. 199–209.
54. Skog, S. Lack of correlation between thymidine kinase activity and changes of DNA synthesis with tumour age: an In Vivo study in Ehrlich ascites tumour. / S. H. Q. Skog, B. Tribukait // *Cell Tissue Kinetics.* – 1990. – V. 23. – P. 603–617.
55. Estrela, M. J. Regulation of glutathione metabolism in Ehrlich ascites tumour cells. / M. J. Estrela, R. Hernandez, P. Terradez, M. Asensi, R. Puertes // *Biochem.* – 1992. – V. 286 – P. 257–262.
56. Lobo, C. Inhibition of glutaminase expression by antisense mRNA decreases growth and tumorigenicity of tumour cells. / C. Lobo, M. A. Ruiz-Bellido, J. C. Aledo, J. Marquez, I. N. De Castro, F. J. Alonso // *Biochem.* – 2000. – V. 348. – P. 257–261.

57. Burns, E. R. Initiations of DNA synthesis in the parotid salivary gland of adult mice by a factor isolated from acellular fluid of Ehrlich ascites carcinoma. / E. R. Burns, H. Yeh, Y. Yeh // *Biosci. Rep.* – 1983. – V. 3, № 2. – P. 113–125.
58. Aikemu, A. Immunomodulatory and anti-tumor effects of *Nigella glandulifera* Freyn and its seeds on Ehrlich ascites carcinoma in mouse model. / A. Aikemu, X. Xiaerfuding, C. Shiwenhui, M. Abudureyimu, D. Maimaitiyiming. // *Oharmacogn Mag.* – 2013. – V. 9, № 35. – P. 187–191.
59. Sabharwal, S. S. Mitochondrial ROS in cancer: initiators, amplifiers or an Achilles' heel / S. S. Sabharwal, P. T. Schumacker // *Nat. Rev. Cancer.* – 2014. – V. 14. – P. 709–721.
60. Nogueira, V. Akt determines replicative senescence and oxidative or oncogenic premature senescence and sensitizes cells to oxidative apoptosis. / V. Nogueira, Y. Park, C. Chen, P. M. Xu // *Chen Cancer Cell.* – 2008. – V. 14. – P. 458–470.
61. Gorrini, C. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. / C. Gorrini, I.S. Harris, T.W. Mak // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2013. – V. 12. – P. 931–947.
62. Гривенникова, В. Г. Генерация активных форм кислорода митохондриями / В. Г. Гривенникова, А. Д. Виноградов // *Успехи биол. химии.* – 2013. – Т. 53. – С. 245–296.
63. Зоров, Д. Б. Перспективы митохондриальной медицины / Д. Б. Зоров, Н. К. Исаев, Е. Ю. Плотников, Д. Н. Силачев // *Биохимия.* – 2013. – Т. 78, № 9. – С. 1251–1264.
64. Ross, M. F. Accumulation of lipophilic dications by mitochondria and cells / M. F. Ross, T. D. Ross, F. H. Blaikie // *Biochem. J.* – 2006. – V. 400. – P. 199–208.
65. Storey, B. Antioxidant defenses and metabolic depression. The hypothesis of preparation for oxidative stress in land snails / M. Hermes-Lima, J. M. Storey, K. B. Storey // *Comparative Biochemistry and Physiology.* – 1998. – V. 120. – P. 437–448.
66. Владимиров, Ю. А. Сверхслабые свечения при биохимических реакциях / Ю. А. Владимиров // М.: Наука. – 1966. – 126 с.

67. Kovacic, P. Electromagnetic fields: mechanism, cell signaling, other bioprocesses, toxicity, radicals, antioxidants and beneficial effects / P. Kovacic, R. Somanathan // *Journal of Receptors and Signal Transduction Research*. – 2010. – V. 30, № 4. – P. 214–226.
68. Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы и клеточная хемилюминесценция / Ю. А. Владимиров, Е. В. Проскурнина // *Успехи биологической химии*. – 2009. – Т. 49. – С. 341-388.
69. Казаринов, К. Д. Изучение биологических эффектов микроволнового излучения с помощью хемилюминесцентного метода / К. Д. Казаринов, И. Г. Полников // *Электронная техника, Сер.1, СВЧ-техника*. – 2010. – № 2 (505). – С. 57-71.
70. Camara, K. S. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production in Excitable Cells: Modulators of Mitochondrial and Cell Function / D. F. Stowe, A. K. S. Camara // *Antioxidants & redox signaling*. – 2009. – V. 11. – P. 1373-1414.
71. Lala, P. K. Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from experimental tumors. / P. K. Lala, A. Orucevic // *Cancer Metastasis*. – 1998. – № 17. – P. 91–106.
72. Wink, D. A. The reemergence of nitric oxide and cancer. / D. A. Wink, L. A. Ridnour, S. P. Hussain, C. C. Harris // *Nitric Oxide: Biol.Chem.* – 2008. – № 19. – P. 65–67.
73. Wink, D. A. The role of nitric oxide chemistry in cancer treatment / D. A. Wink, Y. Vodovotz, J. A. Cook, M. C. Krishna, S. Kim, D. Coffin // *Biochemistry*. – 1998. – V. 63. – P. 802–809.
74. Wink, D. A. The multifaceted roles of nitric oxide in cancer / D. A. Wink, Y. Vodovotz, J. Laval, F. Laval, M. W. Dewhirst, J. B. Mitchell // *Carcinogenesis*. – 1998. – V.19. – P. 711–721.
75. MacMicking, J. Nitric oxide and macrophage function / J. MacMicking, Q. W. Xie, C. Nathan // *Annu. Rev.Immunol.* – 1997. – V.15. – P. 323–350.

76. Nathan, C. Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make? / C. Nathan // *J. Clin. Investig.* – 1997. – V. 100. – P. 2417–2423.
77. Голдовская, Л. Ф. Химия окружающей среды : учебник / Л. Ф. Голдовская. – Москва : Мир, 2005. – 296 с.
78. Weidinger, A. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction / A. Weidinger, A. V. Kozlov // *Biomolecules.* – 2015. – № 5. – P. 472–484.
79. Ванин, А. Ф. Оксид азота в биомедицинских исследованиях / А. Ф. Ванин // *Вестн. Росс. АМН.* – 2000. – № 4. – С. 3–5.
80. Kozlov, A. V. Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria / A. V. Kozlov, K. Staniek, H. Nohl // *FEBS.* – 1999. – V. 454. – P. 127–130.
81. Hogg, N. Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis / N. Hogg, B. Kalyanaraman, J. Joseph, A. Struck, S. Parthasarathy // *FEBS.* – 1993. – V. 33. – P. 170-174.
82. Сепиашвили, Р. И. Оксид азота при астме и различных формах иммунопатологии / Р. И. Сепиашвили, М. Г. Шубич, В. Б. Карпюк // *Астма.* – 2001. – Т. 2, № 2. – С. 5-14.
83. Синяченко, О. В. Оксид азота в терапевтической практике : учебное пособие / О. В. Синяченко, Т. В. Звягинаю. – Донецк : ООО«Юго-ВостокЛтд.», 2001. – 258 с.
84. Полетаев, А. Б. Регуляторная метасистема. Иммунонейроэндокринная регуляция гомеостаза : учебное пособие / А. Б. Полетаев, С. Г. Морозов, И. В. Ковалев. – Москва : Медицина, 2002. – 168 с.
85. Рябов, Г. А. Роль оксида азота как регулятор клеточных процессов при формировании полиорганной недостаточности / Г. А. Рябов, Ю. М. Азизов // *Анестезиология и реаниматология.* – 2001. – № 1. – С. 8-13.

86. Виничук, С. М. Ишемический инсульт: эволюция взглядов на стратегию лечения : учебное пособие / С. М. Виничук, Т. М. Черенько – Киев : Комполис, 2003. – 120 с.
87. Ballou, D. P. Revisiting the kinetics of nitric oxide (NO) binding to soluble guanylate cyclase: the simple NO-binding model is incorrect / D. P. Ballou, Y. Zhao, P. E. Brandish, M. A. Marietta // Proc. Natl. Acad. Sci. US A. – 2002. – V. 99, № 19. – P. 12097-12101.
88. Абатуров, А. Е. Роль монооксида азота в неспецифической защите респираторного тракта / А. Е. Абатуров // Здоровье ребёнка. – 2009. – № 1. – 16 с.
89. Гриневич, В. В. Основы взаимодействия нервной, эндокринной и иммунной систем : учебное пособие / В. В. Гриневич, И. Г. Акмаев, О. В. Волкова. – Санкт-Петербург : Symposium, 2004. – 159 с.
90. Малахов, В. А. Проблема оксида азота в неврологии : монография / В. А. Малахов, А. Н. Завгородняя, В. С. Лычко, Т. Т. Джанелидзе, Ф. А. Волох. – Суми : Видавництво Сум ДПУ им. А.С. Макаренка, 2009. – 242 с.
91. Torre, D. Role of nitric oxide in HIV-1 infection: friend or foe? / D. Torre, A. Pugliese, F. Speranza // Lancet Infect Dis. – 2003. – № 3. – P. 128-129.
92. Мартусевич, А. К. Молекулярная стереотипия в реализации эффекта некоторых лечебных физико-химических факторов: роль NO / А. К. Мартусевич, С. П. Перетягин // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2012. – № 2 (3). – С. 205-210.
93. Сомова, Л. М. Оксид азота как медиатор воспаления / Л. М. Сомова, Н. Г. Плехова // Вестник ДВОРАН. – 2006. – № 6. – С. 7-80.
94. Mallard, J. R. Electron spin resonance in biological tissues / J. R. Mallard, M. Kent // Physics in Medicine and Biology. – 1969. – V. 14, № 3, P. 373–396.
95. Vanin, A. F. Nature of the EPR signals of a new type found in cancer tissues / A. F. Vanin, L. V. Vakhnina, A. G. Chetverikov // Biophysics. – 1970. – V. 15, № 6, P. 1082–1089.

96. Emanuel, N. M. Cancer Biophysics / N. M. Emanuel, R. E. Kavetskii, B. N. Tarusov, E. P. Sidorik // Naukova dumka. – 1976. – V. 18. – P. 847-861.
97. Konstantinov, A. A. Semiquinone Q in the respiratory chain of electron transport particles: Electron spin resonance studies / A. A. Konstantinov, E. K. Ruuge // FEBS Letters. – 1977. – V. 81, № 1. – P. 137–141.
98. Emanuel, N. M. Physical, biochemical and biophysical bases for creation of new effective anticancer agents / N. M. Emanuel // Pure and Applied Chemistry. – 1980. – V. 52, № 1. – P. 11–32.
99. Gutierrez, P. L. Paramagnetic changes in cancer: Growth of Walker 256 carcinoma studied in frozen and lyophilized tissues / P. L. Gutierrez, H. M. Swartz // British Journal of Cancer. – 1979. – V. 39, № 1. – P. 24–34.
100. Azhipa, J. I. Medical-biological aspects in electron paramagnetic resonance method applications / I. Azhipa // Nauka. – 1983. – V. 23. – P. 17-26.
101. Pulatova, M. K. Electron Spin Resonance in Molecular Radiobiology / M. K. Pulatova, G. T. Rikhireva, Z. V. Kuropteva // Energoatomizdat. – 1989. – V. 16. – P. 67-81.
102. Saifutdinov, R. G. Electron paramagnetic resonance in biochemistry and medicine / R. G. Saifutdinov, L. I. Larina, T. I. Vakulskaya, M. G. Voronkov // Springer. – 2001. – V. 79. – P. 1158-1175.
103. Burlaka, A. P. Superoxide-and NO-Dependent Mechanisms of the Reprogramming of Bone Marrow Cells by Tumor Cells / A. P. Burlaka, I. I. Ganusevich, S. N. Lukin, M. R. Gafurov, E. P. Sidorik // Applied Magnetic Resonance. – 2014. – V. 45, № 11. – P. 1261–1273.
104. Burlaka, A. P. Stomach cancer: interconnection between the redox state, activity of MMP-2, MMP-9 and stage of tumor growth / A. P. Burlaka, I. I. Ganusevich, M. R. Gafurov, S. M. Lukin, E. P. Sidorik Cancer Microenvironment. – 2016. – V. 9, № 1. – P. 27–32.

105. Burlaka, A. P. Electron paramagnetic resonance in the experimental oncology: implementation examples of the conventional approaches / A. P. Burlaka, M. R. Gafurov, K. B. Iskhakova // *BioNanoScience*. – 2014. – V. 6, № 4. – P. 431–436.
106. Yurtaeva, S. V. Magnetic Resonance of Ferritin Crystalline Particles in Tumor Tissue / S. V. Yurtaeva, V. N. Efimov, N. I. Silkin // *Applied Magnetic Resonance*. – 2012. – V. 42, № 3. – P. 299–311.
107. Burlaka, A. P. Electron paramagnetic resonance study of tumor affected bone marrow / A. P. Burlaka, I. I. Ganusevich, M. R. Gafurov, S. N. Lukin, E. P. Sidorik // *Cancer Microenvironment*. – 2013. – V. 6, № 3. – P. 273–276.
108. Preoteasa, E. A. EPR detection of possible superparamagnetic polyiron nanoparticles and free radicals in the blood serum of patients with homozygous β -thalassemia / E. A. Preoteasa, G. Schianchi, D. C. Giori // *Applied Magnetic Resonance*. – 2014. – V. 45, № 6. – P. 537–571.
109. Mrakic-Sposta, S. A quantitative method to monitor reactive oxygen species production by electron paramagnetic resonance in physiological and pathological conditions / S. Mrakic-Sposta, M. Gussoni, M. Montorsi, S. Porcelli, A. Vezzoli // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2014. – V. 12. – P. 1–10.
110. Chelyshev, Y. Paramagnetic manganese in the atherosclerotic plaque of carotid arteries / Y. Chelyshev, M. Gafurov, I. Ignatyev // *BioMed Research International*. – 2016. – V. 16. – P. 168–182.
111. Olczyk, P. Application of numerical analysis of the shape of electron paramagnetic resonance spectra for determination of the number of different groups of radicals in the burn wounds / P. Olczyk, K. Komosinska-Vassev, P. Ramos, Ł. Mencner, K. Olczyk, B. Pilawa // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2017. – V. 17. – P. 207–218.
112. Prosser, K. E. Electron paramagnetic resonance as a tool for studying the mechanisms of paramagnetic anticancer metallodrugs / K. E. Prosser, C. J. Walsby // *European Journal of Inorganic Chemistry*. – 2017. – V. 116, № 12. – P. 1573–1585.

113. Lohan, S. B. EPR technology as sensitive method for oxidative stress detection in primary and secondary keratinocytes induced by two selected nanoparticles / B. Lohan, S. Ahlberg, A. Mensch // *Cell Biochemistry and Biophysics*. – 2017. – V. 75, № 3-4. – P. 359–367.
114. Mittal, M. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury / M. Mittal, M. R. Siddiqui, K. Tran, S. P. Reddy, A. B. Malik // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2014. – V. 20, №. 7. – P. 1126–1167.
115. Crook, M. A. *Clinical Biochemistry and Metabolic Medicine* / M. A. Crook. – Boca Raton : CRC Press, 2012. – 232 p.
116. Lin, S. Reactive oxygen species and colorectal cancer / S. Lin, Y. Li, A. A. Zamyatnin, J. Werner, A. V. Bazhin // *Journal of Cellular Physiology*. – 2018. – V. 233, № 7. – P. 5119–5132.
117. Perse, M. Oxidative stress in the pathogenesis of colorectal cancer: Cause or consequence? / M. Perse // *BioMed Research International*. – 2013. – V. 20. – 9 p.
118. Graves, D. B. The emerging role of reactive oxygen and nitrogen species in redox biology and some implications for plasma applications to medicine and biology / D. B. Graves // *Journal of Physics D: Applied Physics*. – 2012. – V. 45, № 26. – P. 456–472.
119. Kessenbrock, K. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment // K. Kessenbrock, V. Plaks, Z. Werb // *Cell*. – 2010. – V. 141, № 1. – P. 52–67.
120. Осипов, А. Н. Метод электронного парамагнитного резонанса [Электронный ресурс] : лаб. практикум / А. Н. Осипов. – Москва, 2014. – Режим доступа: http://fumo.phys.msu.ru/ArxivOldSite_UMS_Physics/med/epr_nmr/rs_01me.pdf
121. Ванин, А. Ф. Парамагнитные нитрозильные комплексы гемового и негемового железа / А. Ф. Ванин, А. Г. Четвериков // *Биофизика*. – 1967. – т. 13, № 7. – С. 608 – 615.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт Фундаментальной биологии и биотехнологии
Базовая кафедра медико-биологических систем и комплексов

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой


А.Н. Шуваев

« » июня 2020 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ


ВЛИЯНИЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ НА КЛЕТКИ АСЦИТНОЙ
КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА


03.04.02 — Физика

03.04.02.09 - Технологическое сопровождение ядерной медицины и
медицинского оборудования

Руководитель  д.ф.-м.н., профессор С.В. Столяр

Выпускник  Е.М. Васильева

Рецензент  к.б.н., с.н.с ФИЦ КНЦ СО РАН А.В. Комина

Консультант  к.б.н., с.н.с ФИЦ КНЦ СО РАН О.В. Крюкова

Красноярск 2020