

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____ В. А. Кратасюк

«_____» _____ 2021 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Разработка магнитных нанокompозитов для выделения ДНК из клеток крови
для миелопролиферативных заболеваний

Руководитель _____ проф., д. ф.-м. н. С. В. Столяр
подпись, дата

Выпускник _____ А. Т. Сайтова
подпись, дата

Красноярск 2021

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Разработка магнитных нанокompозитов для выделения ДНК из клеток крови для миелопролиферативных заболеваний» содержит 39 страниц текстового документа, 6 иллюстраций, 37 литературных источников.

МАГНИТНЫЕ НАНОКОМПОЗИТЫ, ДНК, МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ, МИЕЛОПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ, МУТАЦИЯ JAK2.

Цель работы: синтез магнитных нанокompозитов на основе оксида железа с покрытием оксидом кремния для выделения ДНК из клеток крови, исследование их структуры, а также анализ пригодности разработанных нанокompозитов для молекулярно-генетических исследований в гематологии.

Актуальность работы обусловлена тем, что для проведения молекулярно-генетических исследований необходимо иметь материал высокого качества. Существуют различные методы выделения ДНК, например, метод сорбции на диоксиде кремния и выделение с помощью магнитных нанокompозитов, состоящих из магнитного ядра, покрытого плотной силикатной оболочкой. Их преимущество заключается в отсутствии необходимости центрифугирования и возможности автоматизации процесса выделения ДНК. Но наночастицы способны оказывать негативное влияние на молекулы и клетки, поэтому необходимо разрабатывать такие нанокompозиты, которые будут максимально биосовместимы, чтобы на этапе молекулярно-генетических исследований получать достоверные результаты.

В результате работы были разработаны магнитные нанокompозиты оксида железа с покрытием оксидом кремния. Последующие исследования показали, что разработанные нанокompозиты не оказывают негативного влияния на исследуемые образцы и пригодны для дальнейших молекулярно-генетических исследований.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	7
1. 1 Преимущества использования магнитных наночастиц.....	7
1. 2 Применение магнитных наночастиц.....	9
1. 3 Мутация JAK2 V617F.....	12
1. 4 Строение МНЧ.....	13
1. 4. 1 Покрытие МНЧ.....	14
1. 4. 2 Функциональные группы.....	15
1. 5 Токсичность магнитных наночастиц.....	16
1. 5. 1 Образование АФК и окислительный стресс.....	17
1. 5. 2 Повреждение ДНК.....	18
1. 6 Методы снижения токсичности магнитных наночастиц.....	19
1. 6. 1 Стабилизирующее покрытие.....	19
1. 6. 2 Растворимость наночастиц и переход в ионную форму.....	20
1. 6. 3 Форма.....	20
1. 6. 4 Размер.....	21
1. 6. 5 Поверхностный заряд.....	21
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	Ошибка! Закладка не определена.
2. 1 Материалы исследований.....	Ошибка! Закладка не определена.
2. 2 Методы исследований.....	Ошибка! Закладка не определена.
2. 2. 1 Получение магнитных наночастиц	Ошибка! Закладка не определена.

2. 2. 2 Покрытие магнитных наночастиц **Ошибка!** **Закладка** **не определена.**

2. 2. 3 Изучение свойств магнитных наночастиц **Ошибка!** **Закладка** **не определена.**

2. 2. 4 Выделение ДНК **Ошибка!** **Закладка** **не определена.**

2. 2. 5 Определение концентрации ДНК **Ошибка!** **Закладка** **не определена.**

2. 2. 6 Электрофорез..... **Ошибка!** **Закладка** **не определена.**

2. 2. 7 Полимеразная цепная реакция **Ошибка!** **Закладка** **не определена.**

2. 2. 8 Статистическая обработка данных **Ошибка!** **Закладка** **не определена.**

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ **Ошибка!** **Закладка** **не определена.**

ГЛАВА 4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ **Ошибка!** **Закладка** **не определена.**

ЗАКЛЮЧЕНИЕ 23

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 24

ВВЕДЕНИЕ

Нанотехнология в последнее время стала одной из быстро развивающихся областей знаний. Научные успехи нанотехнологии и биотехнологии породили создание новой дисциплины – нанобиотехнологии, благодаря которой появились наноконструкции, с помощью которых стало возможным управлять биосистемами на молекулярном уровне [32].

Открытие у нанообъектов особенных химических и физических свойств вызвал интерес ученых. Нанообъекты обладают квантовыми размерными эффектами, которые связаны с уменьшением размера и с изменением масштаба тела до нескольких сот или нескольких тысяч атомов, при этом плотность состояний в валентной зоне и в зоне проводимости резко изменяется, что отражается на магнитных и электрических свойствах объекта. Непрерывная плотность состояний, которая наблюдается в макромасштабе, заменяется на дискретные уровни. Расстояние между этими дискретными уровнями зависит от размеров самих частиц [21].

Одно из наиболее перспективных направлений использования наночастиц в биологии и медицине является выделение ДНК. Магнитные наночастицы, покрытые особым способом могут захватывать молекулы нуклеиновых кислот. Метод выделения ДНК с помощью таких наночастиц имеет ряд преимуществ, а именно: меньшие затраты времени по сравнению с методом осаждения, меньшая токсичность реагентов по сравнению с фенолхлороформной экстракцией, а также нет необходимости иметь в лаборатории прибор для центрифугирования. При этом данный метод выделения ДНК, позволяет получить нуклеиновые кислоты высокой чистоты, что необходимо для дальнейших исследований требовательными методами, например, секвенирование нового поколения и микрочипирование [37].

Цель работы – синтез магнитных наноконструкций на основе оксида железа с покрытием оксидом кремния для выделения ДНК из клеток крови,

исследование их структуры, а также анализ пригодности разработанных нанокомпозитов для молекулярно-генетических исследований в гематологии.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Синтезировать магнитные частицы оксида железа с покрытием оксидом кремния с учетом полученной информации о способах повышения биосовместимости.

2. Выделить ДНК из клеток крови при помощи полученных наночастиц. Оценить целостность выделенных молекул методом электрофореза в агарозном геле. Исследовать способность ДНК участвовать в реакции ПЦР в реальном времени.

3. Провести сравнительный анализ количества и качества ДНК, выделенной при помощи магнитных наночастиц и стандартным методом выделения на силике с центрифугированием.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. 1 Преимущества использования магнитных наночастиц

Нанообъекты являются интересными для исследователей благодаря тому, что при переходе в наноразмерное состояние изменяются свойства вещества. Площадь свободной поверхности материала в ультрадисперсном состоянии превышает площадь свободной поверхности вещества, сохраняющего высокую степень порядка. В следствии чего в твердом теле появляются новые физические характеристики, которые не возникали ранее и которые невозможно предугадать, исходя из строения вещества. Развитая поверхность, которая определяет поверхностные явления, является одним из фактором, устанавливающих физические свойства нанообъектов [32].

Во время перехода объекта в наносостояние модифицируются его магнитные и электрические качества, в следствии этого у нанокомпозитов выявляются суперпарамагнитные и ферромагнитные характеристики. Ферромагнетики обладают постоянным средним магнитным моментом и более сильными магнитными свойствами в отличии от супермагнетиков, которые магнитны при наложении поля.

Нанокомпозиты, которые имеют магнитные качества, являются интересными для биомедицины, так как благодаря им появляется возможность дистанционно управлять ими и структурами на их основе при наложении внешнего магнитного поля.

Сейчас разработано большое количество магнитных нанокомпозитов на основе различных металлов, например, кобальта, железа, никеля. Наночастицы на основе оксидов имеют более слабые магнитные характеристики, чем нанокомпозиты на основе металлов, но они менее подвержены окислению.

Магнитные нанокомпозиты обладают следующими свойствами, которые выделяют их в медицине и биологии:

1. **Ультрамалый размер.** Нанокомпозиты способны приближаться к биологическому объекту, взаимодействовать и соединяться с ним, благодаря

своему размеру менее 100 нанометров, который сопоставим с размерами клеток, вирусов, белков, ДНК [32].

2. Возможность бесконтактного управления. Магнитными нанокompозитами можно управлять благодаря использованию внешнего постоянного магнитного поля. Использование градиента магнитного поля дает возможность направить магнитные нанокompозиты в необходимую область, которая требует лечения, затем происходит их удержание до завершения лечебной процедуры и вывод из организма. Также, появилась возможность производить дистанционный нагрев магнитных нанокompозитов внутри живого объекта, что может способствовать локальному повышению температуры при терапии заболеваний, включая онкологические [23].

3. Упрощение автоматизации процесса. Применение МНЧ позволяет производить сепарацию молекул или клеток без использования центрифугирования. Это облегчает возможность автоматизации процесса сепарации, что, в свою очередь, снижает риск контаминации образцов.

Неоднородное распределение нанокompозитов по размерам, присуще для большей части способов их получения. Такие методики, как хроматография, центрифугирование, электрофорез обладают высокой стоимостью и низкой производительностью. Также магнитные нанокompозиты различного размера сильно отличаются магнитными характеристиками, а именно магнитным моментом. Данный факт применяется для магнитной сепарации наночастиц по фракциям [27].

В работе Омельченко А. И с соавторами выяснили, что магнитные ловушки с аксиально-симметричным магнитным полем позволяют эффективно осаждать магнитные наночастицы оксидов железа. Лазерное воздействие на наночастицы, находящиеся в крахмальном растворе приводит к образованию полимерных слоев на их поверхности. В результате лазерного нагрева наночастиц в растворе крахмала происходит увеличение размеров наночастиц, отражающееся на светорассеянии [30].

1. 2 Применение магнитных наночастиц

Благодаря появлению магнитных нанокompозитов появилась возможность их использования для магниторезонансной томографии в качестве материалов, в целенаправленном переносе биологически активных веществ и лекарств, а также для выделения, выявления и трансформации биоактивных веществ, органелл и клеток [33].

Подбор магнитных нанокompозитов для биомедицинских применений зависит от решаемых задач. Успешное использование наночастиц в биомедицине зависит от ряда параметров. Суперпарамагнитное поведение и высокая намагниченность частиц является одним из важных факторов.

Распределение частиц по размерам и их проникновение через мембраны клеток способствует верному расчету дозировок и режиму применения препаратов [24].

Ограничением, для использования магнитных нанокompозитов, является их токсичность. Широкое применение в медицине и биологии получили нанокompозиты оксида железа, благодаря их стабильным магнитным свойствам, а также относительно низкой токсичности. Магнитные наночастицы Co, Ni и сплава Nd — Fe—В обладают мощными магнитными качествами, но подвержены окислению и токсичны для живого организма [32].

Области применения магнитных нанокompозитов можно разделить на несколько направлений:

1. Диагностика

При помощи МНЧ возможно производить анализ изменений, возникающих в клетках в результате различных воздействий, влияния лекарств и гормонов на механические свойства мембран и клеточный отклик.

Наиболее распространенным на сегодняшний день методом диагностики с использованием магнитных нанокompозитов является магнитно-резонансная томография (МРТ). В следствии попадания магнитных нанокompозитов в пораженные ткани контраст между нормальной и пораженной тканями усиливается.

Для специфического анализа различных типов клеток к магнитным наночастицам прикрепляют пептиды, антитела, другие биовекторы, способные распознавать клетку и обеспечивать ее детекцию [24].

2. Направленная доставка препаратов

Магнитные наноконпозиты можно удерживать во внутреннем органе с помощью действия магнитной силы, путем прижатия их к стенкам сосудов. Если орган расположен глубоко в организме, то необходимо как можно дальше от рабочей поверхности создать градиент индукции магнитного поля, который бы обеспечил прижатие магнитных наноконпозитов к стенкам органа живого организма [26].

Стремление доставки магнитных частиц, нагруженных лекарственным препаратом, в мишеневую область организма с последующей активацией лекарственного средства, является одним из активно исследуемых направлений применения магнитных наночастиц в медицине и биологии.

3. Гипертермия и термоабляция

Гипертермия - метод локального теплового воздействия, который основан на явлении выделения суперпарамагнитными частицами тепла при поглощении ими энергии осциллирующего магнитного поля. Переменное поле индуцирует токи в металлических объектах, пропорциональные магнитному полю и размеру объекта. Частоты воздействия должны лежать в диапазоне 100— 1000 кГц в зависимости от размера формы частиц и свойств ткани [1].

Эффект гипертермии используют в биологии и медицине прежде всего в терапии онкологических заболеваний [24].

При использовании метода термоабляции осуществляется нагрев до более высоких температур (вплоть до 55°C). Воздействие термоабляции не ограничивается больными клетками.

Необходимость использования термоабляции обусловлена рецидивами опухолей после гипертермии. Термоабляция опухоли возможна при испускании электромагнитной волны высокочастотным источником (>100 МГц),

имплантированным в пораженную область, или с помощью ряда внешних микроволновых излучателей [15].

Guo с коллегами в своей работе провели адресную гипертермию MCF-7 рака молочной железы и HepG2 рака печени человека с помощью синтезированных MUC1 аптамер-модифицированных металлических наночастиц (MUC1-МНЧ). Guo утверждает: «MUC1-МНЧ способны генерировать высокую температуру под воздействием ПЭМП, которая повреждает MUC1-положительные раковые клетки. Кроме того, MUC1-МНЧ по сравнению с немодифицированными магнитными наночастицами значительно усиливали адресную гипертермию ($p < 0.05$), в то время как немодифицированные МНЧ вызвали минимальное разрушение опухолевых клеток» [5].

В сочетании с химиотерапией, возможно использовать гипертермию с применением магнитных наночастиц. Это было показано в исследовании Pala с коллегами, которые получили покрытые декстраном наночастицы оксида железа, модифицированные аптамерами, специфичными к рецепторам эпидермального фактора роста (HER2), и использовали их для индукции магнитной гипертермии SK-BR3 аденокарциномы человека. В заключении работы Pala пишет: «Магнитное поле (300 А, 280 кГц) в комплексе с нанокompозитами оксида трехвалентного железа, покрытых декстраном и модифицированных HER2 аптамерами, вызывают 50% гибель опухолевых клеток, в то время как в контрольных группах наблюдается 100% выживаемость» [14].

Sivakumar с коллегами исследовали наносистему, представленную аптамерами, связанными с лекарственными веществами (куркумин и гемцитабин) и магнитными нанокompозитами, инкапсулированными PLGA наночастицами для лечения рака поджелудочной железы. Sivakumar утверждает: «Воздействие конъюгатов на опухолевые клетки без присутствия магнитного поля не оказывает значительного разрушительного цитотоксического эффекта. В то время, как конъюгаты в комплексе с

переменным магнитным полем приводят к сильному снижению жизнеспособности опухолевых клеток. Кроме того, было выявлено, что куркумин и гемцитабин после магнитной гипертермии рассеиваются, что приводит к гибели клеток при последующей инкубации» [16].

4. Сепарация объектов (белков, нуклеиновых кислот, клеток)

Сепарационные технологии позволяют отделять генетически поврежденные молекулы ДНК, РНК, извлекать стволовые клетки опухоли посредством узнавания поверхностных антигенов, очищать биологические жидкости.

1. 3 Мутация JAK2 V617F

Белок JAK2 принадлежит семейству нерецепторных тирозинкиназ, которое включает в себя четыре белка: JAK1, JAK2, JAK3 и TYK2. Для гемопоэза особое значение среди них имеет киназа JAK2, осуществляющая передачу сигнала от эритропоэтина, тромбопоэтина и колониестимулирующего фактора гранулоцитов (G-CSF). Функция данных белков состоит в том, что они являются промежуточным звеном между рецепторами на мембране клетки и сигнальными молекулами. Эти молекулы, связываясь с рецепторами JAK-киназ на поверхности клетки, активируют их, что приводит к активации сигнальных путей с участием ряда белков, которые передают сигналы для транскрипции, пролиферации и дифференцировки бластных предшественников.

Ген JAK2 расположен в локусе 9p24.1. Соматическая мутация 617V/F выражается в замене нуклеотида G→T в позиции 1849, которая в свою очередь приводит к замене фенилаланина на валин в 617 позиции аминокислотной последовательности белка.

Аллельная нагрузка V617F, которая определяется как уровень мутантного аллеля, в соотношении к нормальному аллелю [36].

Соматическая мутация V617F в гене янускиназы-2 (JAK2) приводит к активации JAK-STAT-сигнального пути, независимо от его физиологической рецепторной регуляции. Обусловленная мутацией пролиферативная активность

миелоидного ростка кроветворения вовлечена в патогенез хронических Ph-негативных миелоидных опухолей и обнаруживается у 95% пациентов с истинной полицитемией и примерно в половине случаев при эссенциальной тромбоцитемии и первичном миелофиброзе.

Носительство мутации V617F JAK2 приводит к не зависящей от уровня циркулирующих клеток крови активации тромбоцитов и значительно увеличивает риск как артериальных, так и венозных тромбозов. Тромбозы сосудов головного мозга в 3,8—6,6% случаев развиваются на фоне мутации V617F JAK2. Носительство этой мутации обуславливает около 16% случаев развития тромбозов висцеральных вен кишечника и до 40% случаев синдрома Budd-Chiari [35].

1. 4 Строение МНЧ

Магнитные нанокompозиты были найдены в составе природных биокompлексов. Они имеют большую роль в механизмах метаболизма и функционирования живых организмов. Наиболее распространенными магнитными нанокompозитами являются магнетит, маггемит и ферригидрит.

Магнитные нанокompозиты можно встретить в бактериях и в клетках высших живых организмов. Анизотропные нанокompозиты магнетита, которые содержатся в клетках могут взаимодействовать с магнитным полем Земли и передавать соответствующую информацию другим рецепторам организма. Пространственная ориентация многих высших живых организмов, например, при сезонной миграции птиц и рыб связана с их способностью определять свое положение относительно магнитного поля Земли [25].

Одна из более распространенных форм негемового железа в организмах животных и растений – ферритин. Ферритин необходим для сохранения запаса железа в организме, он является водорастворимым белком, состоящим из ядра, содержащим около 4500 ионов Fe^{3+} и диаметром 7 нм, а также белковой оболочки толщиной 6 нм. По своей магнитной структуре ферритин относится к антиферромагнетикам, но из-за неполной компенсации магнитных моментов

двух подрешеток ядро ферритина, как и другие магнитные наночастицы таких размеров, обладает ненулевым магнитным моментом. Сам ферритин проявляет суперпарамагнитные свойства [18].

Антиферромагнитный ферригидрит с относительно небольшим магнитным моментом преимущественно содержится в качестве ядра натурального ферритина. Модифицированный магнетоферритин, в котором феррогидратное ядро заменено на магнетитное или маггемитное с большей намагниченностью чаще используется для выполнения прикладных задач. [11].

1. 4. 1 Покрытие МНЧ

Для достижения большинства целей необходимо разрабатывать такие наносистемы, которые будут содержать кроме магнитных нанокомпозигов биологические или синтетические материалы, формирующие их покрытие. Покрытия наночастиц должны быть нетоксичными, обладать биосовместимостью, обеспечивать локализацию наночастиц в определенных тканях, органах или клетках. Благодаря функциолизации покрытия магнитных нанокомпозигов нуклеотидами, антителами, ферментами можно обеспечить точное попадание в определенные биосистемы, лекарства или гены. От природы покрытия зависят скорость выведения частиц из организма, продолжительность циркуляции наносистем в организме, их распределение по органам и тканям, скорость диффузии наносистем и терапевтических препаратов в тканях [9].

Общие требования к покрытиям наночастиц, используемых для биомедицинских целей можно свести к следующим:

1. Гемосовместимость и тромборезистентность – способность не вызывать изменений в системе крови: повышенной свертываемости, иммунного ответа и пр.

2. Химическая и механическая стойкость – устойчивость к трениям при движении в организме и неспособность разрушаться по действием ферментов, солей и других компонентов биологической системы.

3. Устойчивость к агрегации – частицы не должны взаимодействовать между собой, образуя агломераты.

4. Наличие функциональных групп – способность прочно связывать и не препятствовать активации доставляемых молекул.

5. Магнитоуправляемость – при всей возможной многослойности, покрытие не должно нарушать магнитные свойства частиц (Бычкова и др, 2012)

На сегодняшний день используются и исследуются различные покрытия МНЧ, которые в той или иной мере должны отвечать заявленным требованиям.

Среди них:

1. Покрытия из поверхностно-активных веществ и синтетических полимеров:

- из полиэтиленгликоля,
- из полиэтиленimina,
- из поливинилового спирта;

2. Покрытия из природных макромолекул:

- из углеводов,
- из белков и пептидов;

3. Кремнийорганические покрытия;

4. Покрытия из неорганических соединений:

- углеродные покрытия,
- из благородных металлов,
- из магнитных материалов [24].

1. 4. 2 Функциональные группы

Если на поверхности нанокompозитов имеются гидроксильные группы, то они могут образовать связь с поверхностно-активными веществами или полимерами гидроксильных, карбоксильных, фосфатных, сульфатных или других групп. Стабилизация и модификация магнитных нанокompозитов с помощью соединений, содержащих такие группы, может осуществляться как в

водной, так и в органической среде в зависимости от химической структуры веществ [25].

Свободные карбоксильные группы могут быть, использованы для прикрепления лекарственных веществ [19].

Широкое распространение получили методики создания покрытий, включающие модификацию биологических и синтетических соединений (ПЭГ, глюкозы, сахарозы, крахмала) функциональными группами для связывания поверхностью магнитных наночастиц. Вещества на основе полиэтилгликоля ортофосфорной кислоты связываются с поверхностью магнитных нанокompозитов оксидов металлов. Чтобы присоединить к концевым группам различных веществ молекулы дофамина и аскорбиновой кислоты, необходимо связать их с поверхностью магнитных нанокompозитов оксида железа [25].

Покрытия из синтетических полимеров и поверхностно-активных веществ используют для магнитных наночастиц, синтезированных в органической среде, в водной дисперсии. Для перевода магнитных наночастиц из гидрофобной в гидрофильную среду используют агенты перевода фазы — соединения, содержащие гидрофильные группы, например, гидроксильные [13].

1. 5 Токсичность магнитных наночастиц

Несмотря на преимущества, наносистемы имеют существенный недостаток: в «чистом» виде магнитные наночастицы могут обладать нейро-, кардио-, гено- и гепатотоксичностью, способны вызывать воспалительную реакцию [24].

Нанокompозиты, разработанные без учета биосовместимости, способны повреждать клеточные мембраны и органеллы, распространять по организму потенциально токсичные компоненты. Поэтому при разработке нанокompозитов необходимо оценивать соотношение риска от их введения в биологический объект и лечебного воздействия.

Токсичность нанокompозитов зависит от их химического состава, размеров, формы и свойств покрытия. В экспериментах *in vivo* выявлено, что магнитные наночастицы оксидов железа относительно безопасны, они не накапливаются в жизненно важных органах, быстро выводятся из организма и характеризуются меньшей токсичностью, чем другие магнитных наночастиц. Это связано с тем, что продуктами преобразования магнитных наночастиц оксидов железа в процессах клеточного гомеостаза могут быть ионы железа. При этом, катион Fe^{3+} не обладает токсичностью, в то время как Fe^{2+} уже токсичен [24]. Возможность участвовать в реакциях образования свободных радикалов - активных форм кислорода и азота, обуславливает токсичные свойства нанокompозитов.

Если поверхность наночастиц обладает большой плотностью катионов, то это способно привести к снижению целостности клеточной мембраны, нарушению работы клетки в целом. Катионные наночастицы более токсичны по отношению к клеткам и вызывают гемолиз, агрегацию тромбоцитов, чем нейтральные и анионные.

После захвата фагоцитами наносистемы, как правило, разлагаются. Материалы, трудно поддающиеся разложению, опасны для организма. Одним из факторов, влияющих на захват частиц фагоцитами, является их форма. Частицы несферической формы лучше избегают захвата, проходят через капилляры и адсорбируются на стенках сосудов. Удлиненные частицы (углеродные нанотрубки) могут «протыкать» фагоциты и нарушать их функционирование.

Если в состав наночастиц входят токсичные вещества, то наночастицы меньшего размера обладают большей опасностью при введении в биологический объект, чем крупные [24].

Далее рассмотрены основные принципы повреждающего действия магнитных наночастиц на биологические объекты.

1. 5. 1 Образование АФК и окислительный стресс

В своей работе Пахомова В. Г. с коллегами утверждают: «Добавление биогенного ферригидрита в перфузионный раствор Кребса стимулирует прооксидантную активность в отношении продукции первичных активных форм кислорода клетками, расположенными вблизи магистральных сосудов. Активные формы кислорода играют важную роль в регуляции многих процессов в клетках: они могут выступать индукторами как адаптации, так и гибели клеток. Использование нанокompозитов биогенного ферригидрита, обладающего прооксидантной активностью, при фармакологической регуляции свободно-радикального окисления может являться перспективным направлением в разработке новых средств лекарственной терапии онкологических заболеваний, однако требует особенного изучения для нахождения баланса между желаемым и нежелательным эффектом» [31].

1. 5. 2 Повреждение ДНК

В исследовании Короткова А. М. с коллегами говорит: «Никельсодержащие нанокompозиты в малых концентрациях вызывают системную деградацию ДНК до дискретных фрагментов менее 1000 н.п. Нанокompозиты Ni, которые имеют электронейтральный заряд могут легко проникать через ядерные поры и вызывать повреждение генетического материала прямым взаимодействием с ДНК, блокировать функций аквапоринов и тем самым вызывать гибель клеток. Генотоксический эффект нанокompозитов оксида Ni реализуется за счет электростатического взаимодействия положительно заряженных ионов Ni^{2+} , высвобожденных из их матрикса частицы, и фосфатными группами полианиона ДНК, а также выделяемыми $HO\cdot$ радикалами в цикле Хабера-Вейсса» [28].

Наиболее серьезными в отношении цитотоксичности и повреждении ДНК являются наночастицы CuO, определенное воздействие на жизнеспособность клеток и повреждения ДНК оказывают наночастицы ZnO в то время, как наночастицы TiO_2 вызывают только повреждение ДНК, а цитотоксичность

наночастицы на основе Fe_3O_4 и Fe_2O_3 либо отсутствовала, либо была низкой [29].

В работе Дыбковой С. М. с соавторами были получены показатели поврежденной ДНК благодаря активности нанопрепаратов железа, которые позволяют сделать вывод о наличии генотоксических свойств наночастиц размером 14, 18 и 23 нм (показатель «% ДНК в хвосте» составляет 16%, 15% и 13% соответственно, положительный контроль - 25%, отрицательный - 0,4%). Наночастицы железа размером 77 нм не проявляли генотоксического действия [20].

1. 6 Методы снижения токсичности магнитных наночастиц

1. 6. 1 Стабилизирующее покрытие

Строение поверхности нанокompозитов оказывает влияние на заряд поверхности, агрегативную устойчивость суспензий, их растворимость в различных средах и напрямую сказывается на токсичности наночастиц. Также наночастицы модифицируют разными химическими веществами для приобретения ими необходимых качеств, функций и их стабилизации [24].

В исследовании Вае с коллегами было описано влияние стабилизатора на антибактериальную активность нанокompозитов Ag в отношении грамотрицательной бактерии *E. coli*. Для модифицирования нанокompозитов Ag применялись анионные и катионные поверхностно-активные вещества, а также нейтральные и заряженные полимеры. В результате работы Вае утверждает: «Катионные поверхностно-активные вещества увеличивают антибактериальную активность наночастиц, а биосовместимые неионогенные стабилизаторы не изменяют активности серебряных нанокompозитов. Также было показано, что совместное действие стабилизатора и наносеребра приводит к синергетическому усилению антибактериальной активности» [2].

Модификация поверхности магнитных наночастиц за счет нанесения нетоксичных органических (хитозана, декстрана, липосом) и неорганических (углерода, золота) покрытий — основной способ минимизации токсикологического воздействия. Выделение токсичных катионов возможно при использовании магнитных наночастиц металлов и ферритов. Для уменьшения токсического воздействия поверхности таких частиц модифицируют антиоксидантами [24].

От свойств покрытий зависят продолжительность циркуляции частиц в организме и путь их выведения, а также способность частиц проникать в клетки и вызывать в них патологические изменения.

1. 6. 2 Растворимость наночастиц и переход в ионную форму

Наноконпозиты при попадании в водную среду, в зависимости от их состава частично или полностью переходят в ионную форму [3].

Перерастворение наночастиц и их переход в ионную форму существенно влияют на поведение и токсический эффект наноконпозитов. Скорость растворения зависит от площади их поверхности, поэтому наноконпозиты обладают более высокой растворимостью в среде по сравнению с крупными частицами такого же состава [4].

1. 6. 3 Форма

На токсические свойства наноконпозитов влияет форма. Tuttle в своём исследовании говорит: «Наноконпозиты Au, имеющие форму стержней показывают низкий уровень накопления в клетках животных по сравнению со сферическими наноконпозитами. Наноконпозиты серебра сферической формы и нанопроволоки, напротив, обладают меньшей токсичностью, чем частицы в виде нанопластин в отношении эпителиальных клеток жабр и эмбрионов рыб *Danio rerio*» [17].

Lee с коллегами в своей работе утверждают: «Наностержни оксидов железа токсичнее для клеток макрофагов мышей, чем сферическая форма нанокompозитов оксида железа» [8].

1. 6. 4 Размер

На проникновение в клетки, передвижение и накопление в организме значительно влияет размер нанокompозитов. Также установлено, что реакционная способность наночастиц зависит от их размеров.

В работе Сутунковой М. П. с соавторами изучалась токсичность наночастиц оксида никеля двух размеров. В исследовании Сутункова М. П. установила: «В печени накопление Ni было одинаково, как при введении 11 нм нанокompозитов, так и 25 нм, а в селезенке скапливалось больше нанокompозитов диаметром 25 нм, чем частиц диаметром 11 нм» [34].

Богословская О. А. с соавторами показали: «Благодаря снижению размеров повышается токсичность нанокompозитов Cu» [22].

1. 6. 5 Поверхностный заряд

С помощью определенного поверхностного заряда нанокompозиты способны проникать внутрь клетки. Если нанокompозиты имеют положительный заряд, то они проникают в клетки быстрее, чем нанокompозиты, которые имеют отрицательный заряд, это может быть связано с тем, что клетки обладают общим отрицательным зарядом. В связи с этим есть предположения о том, что нанокompозиты с положительным зарядом могут быть более опасными, из-за повышения клеточной проходимости [12].

В связи с авторским правом изъяты страницы с 22 по 33.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполнения работы были синтезированы магнитные нанокompозиты на основе оксида железа с покрытием оксидом кремния для выделения ДНК из клеток крови, исследована их структура, а также проведен анализ пригодности разработанных нанокompозитов для молекулярно-генетических исследований в гематологии.

Анализ разработанных магнитных наночастиц с помощью просвечивающей электронной микроскопии показал наличие магнитных вкраплений в силикатной капсуле.

Среднее количество выделенной ДНК магнитными наночастицами 37,6 мг/мл, что в 3,2 раза больше, чем количество ДНК, выделенной коммерческим набором «ДНК-собр-В». Также на электрофореграмме видно, что большее количество ДНК, выделяется с помощью разработанных магнитных наночастиц.

Графики амплификации показали, что t_{ga} у эталонных и экспериментальных образцов совпадают, что говорит об одинаковой эффективности выделения ДНК обоими методами.

Была рассчитана корреляция данных о доле мутантной ДНК JAK2 V617F в пробах крови пациентов с ХМПЗ, выделенных при помощи разработанных магнитных наночастиц и коммерческого набора, которая равна 0,99, что говорит о функциональной зависимости между двумя выборками.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Babincova M. Blood-specific whole-body electromagnetic hyperthermia / M. Babincová, P. Sourivongb, D. Leszczynska, P. Babineca // *Medical hypotheses*. – 2000. – Т. 55. – №. 6. – С. 459-460.
2. Bae E. J. Effect of chemical stabilizers in silver nanoparticle suspensions on nanotoxicity / E. J. Bae, H. J. Park, J. Park [и др.] // *Bulletin of the Korean Chemical Society*. – 2011. – Т. 32, №2. – С. 613-619.
3. Batley G. E. Fate and risks of nanomaterials in aquatic and terrestrial environments / G. E. Batley, J. K. Kirby, M. J. McLaughlin // *Accounts of chemical research*. – 2013. – Т. 46, №3. – С. 854-862.
4. Dobrovolskaia M. A. Immunological properties of engineered nanomaterials / M. A. Dobrovolskaia, S. E. McNeil // *Nature nanotechnology*. – 2007. – Т. 2, №8. – С. 469.
5. Guo F. Enhancement of thermal damage to adenocarcinoma cells by iron nanoparticles modified with MUC1 aptamer / F. Guo, Y. Hu, L. Yu [и др.] // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. – 2016. – Т.16, №3. – С. 2246-2253.
6. Murugadoss S., Lison D., Godderis L., Van Den Brule S., Mast J., Brassinne F., Sebaihi N., Hoet P. H. Toxicology of silica nanoparticles: an update. // S. Murugadoss, D. Lison, L. Godderis, S. Van Den Brule, J. Mast, F. Brassinne, N. Sebaihi, P. H. Hoet / *Arch Toxicol*. 2017 Sep;91(9):2967-3010.
7. Bai Y., Cui Y., Paoli G. C., Shi C., Wang D., Zhou M., Zhang L., Shi X. Synthesis of amino-rich silica-coated magnetic nanoparticles for the efficient capture of DNA for PCR. / Y. Bai, Y. Cui, G. C. Paoli, C. Shi, D. Wang, M. Zhou, L. Zhang, X. Shi // *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2016 Sep 1; 145:257-266.
8. Lee, J. H. Rod-shaped iron oxide nanoparticles are more toxic than sphereshaped nanoparticles to murine macrophage cells / J. Lee, J. E. Ju, B. I. Kim, P. J. Pak, E.-K. Choi, H.-S. Lee, N. Chung // *Environmental Toxicology and Chemistry*. – 2014. – Т. 33, №12. - С. 2759–2766.

9. Longmire M. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats / M. Longmire, P. L. Choyke, H. Kobayashi // *Nanomedicine*. – 2008. - Т. 3, №5.
10. Лапа С. А., Волкова О. С., Спицын М. А., [и др.] Эффективность амплификации и субстратные свойства флуоресцентно-меченных трифосфатов дезоксиуридина в ПЦР с ДНК-полимеразами, не обладающими 3'-5'-экзонуклеазной активностью / С. А. Лапа, О. С. Волкова, М. А. Спицын, В. Е. Шершов, В. Е. Кузнецова, Т. О. Гусейнов, А. С. Заседателев, А. В. Чудинов // *Биоорганическая химия*. 2019. Т. 45. № 4. С. 263-272.
11. Melníková L. Structural characterization of magnetoferritin / L. Melníková, Z. Mitróová, M. Timko, J. Kováč [и др.] // *Mendeleev Communications*. – 2017. – №24. – С.80-81.
12. Oh, W.-K. Cellular uptake, cytotoxicity, and innate immune response of silicitania hollow nanoparticles based on size and surface functionality / W.-K. Oh, S. Kim, M. Choi, C. Kim, Y. S. Jeong, B.-R. Cho, J. Jang // *ACS Nano*. – 2010. – Т. 4, №9. – С. 5301–5313.
13. Owens III D. E. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles / D. E. Owens III, N. A. Peppas // *International journal of pharmaceutics*. – 2006. – Т. 307. – №1. – С. 93-102.
14. Pala K. Tumor-specific hyperthermia with aptamer-tagged superparamagnetic nanoparticles /K. Pala, A. Serwotka, F. Jeleń, P. Jakimowicz, J.Otlewski // *International journal of nanomedicine*. – 2014. – Т. 9. – С. 67.
15. Paulides M. M. A head and neck hyperthermia applicator: Theoretical antenna array design / M. M. Paulides, J. F. Bakker, A. P. M. Zwamborn, G. C. van Rhooon // *International journal of hyperthermia*. – 2007. – Т. 23, №1. – С. 59-67.
16. Sivakumar B. Augmented cellular uptake and antiproliferation against pancreatic cancer cells induced by targeted curcumin and SPION encapsulated PLGA nanoformulation / B. Sivakumar, R. G. Aswathy, Y. Nagaoka, I. Seiki, T. Hasumura [и др.] // *Materials Express*. – 2014. – Т. 4. – №. 3. – С. 183-195.

17. Tuttle G. R. Size and surface area dependent toxicity of silver nanoparticles in zebrafish embryos (*Danio rerio*). / G. R. Tuttle // Oregon State University – 2012.
18. Yamashita I. Ferritin in the field of nanodevices / I. Yamashita, K. Iwahori, S. Kumagai // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)* – 2010. – Т. 1800. – №8. – С. 846-857.
19. Yu M. K. et al. Drug- loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for combined cancer imaging and therapy in vivo / M. K. Yu, Y. Y. Jeong, J. Park, S. Park, J. W. Kim, J. J. Min, K. Kim, S. Jon // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2008. – Т. 47, №29. – С. 5362-5365.
20. Дыбкова С. М., Романько М. Э., [и др.] Взаимодействие наночастиц с биологическими объектами (обзор) / С. М. Дибкова, М. Э. Романько, Т. Г. Грузина, [и др.] // *Биотехнология*, Т. 2, №3, 2009.
21. Баранов Д. А. Магнитные наночастицы: достижения и проблемы химического синтеза / Д. А. Баранов, С. П. Губин // *Радиоэлектроника. Наносистемы. Информационные технологии*. – 2009. – Т.1. – №1-2.
22. Богословская О. А. Изучение безопасности введения наночастиц меди с различными физикохимическими характеристиками в организм животных / О. А. Богословская, Е. А. Сизова, В. С. Полякова [и др.] // *Вестник Оренбургского государственного университета*. – 2009. – №. 2.
23. Брылева М. А. Локальная магнитная гипертермия наночастиц: фундаментальные основы, теория, методы и средства измерения / М. А. Брылева, О. Е. Положенцев, Р. В. Матвеев // *Фундаментальные основы, теория, методы и средства измерений, контроля и диагностики. Материалы 19-ой Международной молодежной научно-практической конференции*. – 2018. – С. 34-39.
24. Бычкова А. В. Многофункциональные биосовместимые покрытия на магнитных наночастицах / А. В. Бычкова, О. Н. Сорокина, М. А. Розенфельд, А. Л. Коварский // *Успехи химии*. – 2012. – Т. 81, №11. – С. 1026-1050.

25. 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.
26. Дудченко А. К. Магнитный аппликатор для направленной доставки магнитных наночастиц в орган-мишень / А. К. Дудченко, Ю. А. Алексейцев, Н. А. Дудченко, О. М. Михайлик // Альманах клинической медицины. – 2008. – №17-2.
27. Загирняк М. В. Сепарация наночастиц по фракциям с использованием магнитной системы Фарадея / М. В. Загирняк, Е. Е. Волканин // Известия высших учебных заведений. Электромеханика. – 2014. – №4. – С. 30-34.
28. Короткова А. М. Днк-повреждающие эффекты наночастиц NI⁰ и NIO в растениях вида *Triticum vulgare* / А. М. Короткова, С. В. Лебедев, Е. А. Русакова // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2015. – №10 (185).
29. Сарапульцев А. П., Ремпель Ю. В., [и др.] Взаимодействие наночастиц с биологическими объектами (обзор) / А. П. Сарапульцев, С. В. Ремпель, Ю. В. Кузнецова, Г. П. Сарапульцев // Вестник уральской медицинской академической науки, № 3, 2016.
30. Омельченко А. И. Биофункциональные наночастицы в лазерной медицине / А. И. Омельченко // Вестник Югорского государственного университета. – 2011. – №. 2 (21).
31. Пахомова В. Г. Изменение генерации активных форм кислорода в печени после введения биогенного ферригидрита / В. Г. Пахомова, К. В. Шадрин, Г. В. Макарская, С. В. Тарских [и др.] // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2017. – №. 3 (70).
32. Першина А. Г., Сазонов А. Э., Мильто И. В. Использование магнитных наночастиц в биомедицине / А. Г. Першина, А. Э. Сазонов, И. В. Мильто // Бюллетень сибирской медицины. – 2008. – Т. 7. – №. 2.

33. Старчиков С. С. Магнитные, структурные и электронные свойства наночастиц сульфидов и оксидов железа с различной кристаллической структурой : дис. ... канд. физ.-мат. наук : 01.04.07 / Старчиков Сергей Сергеевич. – Москва, 2015.

34. Сутункова М. П. Экспериментальная оценка токсичности наночастиц оксида никеля двух размеров в субхроническом эксперименте / М. П. Сутункова, Б. А. Кацнельсон, С. Н. Соловьёва [и др.] // Здоровье населения и среда обитания. – 2018. – №. 12 (309).

35. Ольховский И. А. Выявляемость пациентов с онкогенной соматической мутацией янускиназы-2 (V617f Jak2) в рамках программ диспансерного и профилактического осмотров/ И. А. Ольховский, Г. Э. Карапетян, [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. Т. 61, №5. – С. 275-278.

36. Носков Я. А. Клинико-лабораторные особенности течения миелопролиферативных неоплазий на фоне различных видов интерферонотерапии: дис. ... канд. мед. наук : 14.01.04 / Носков Ярослав Алексеевич. – Санкт-Петербург, 2016.

37. Комина А. В. Магнитные частицы для выделения ДНК из клеток крови / А. В. Комина, Р. Н. Ярославцев [и др.] // Известия РАН. Серия физическая. – 2020. Т. 84, №11. – С. 1597-1600.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой


В. А. Кратасюк В. А. Кратасюк


« 16 » июня 2021 г.

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 - Биология

Разработка магнитных нанокompозитов для выделения ДНК из клеток крови
для миелопролиферативных заболеваний

Руководитель  16.06.21 проф., д. ф.-м. н. С. В. Столяр
подпись, дата

Выпускник  16.06.21 А. Т. Сайтова
подпись, дата

Красноярск 2021