Федеральное государственное автономное

образовательное учреждение

высшего образования

«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Институт фундаментальной биологии и биотехнологии

Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

_____

подпись инициалы, фамилия

« 20 » июня 20 17 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Адресная противоопухолевая терапия с использованием магнитных наночастиц и ДНК аптамеров

06.04.01 Биология

06.04.01.03 Биофизика

Научный руководитель _____ д.б.н. Замай Т.Н.

подпись должность, ученая степень инициалы, фамилия

Выпускник _____ Белянина И.В.

подпись инициалы, фамилия

Рецензент _____ к.б.н. доцент Елсукова Е.И.

подпись должность, ученая степень инициалы, фамилия

Красноярск 2017

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ....4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ....7
1.1 Свойства магнитных наночастиц....7
1.2 Размер и форма магнитных наночастиц....8
1.3 Методы синтеза магнитных наночастиц....9
1.4 Поверхностные модификации магнитных наночастиц....13
1.5 Способы доставки магнитных наночастиц к поверхности опухолевых клеток....16
1.6 Доставка магнитных наночастиц в опухолевые клетки....17
1.7 Фармакокинетика и биораспределение магнитных наночастиц....18
1.8 Понятие аптамеров....20
1.9 Терапия опухолевых заболеваний с применением коньюгатов магнитных наночастиц с ДНК–аптамерами....21
1.9.1 Адресная доставка лекарственных средств коньюгатами магнитных наночастиц с ДНК–аптамерами....21
1.9.2 Магнитная гипертермия....23
1.9.3 Магнитомеханическое разрушение опухолевых клеток....24
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ....26
2.1 Объекты исследований....26
2.2 Функционализация покрытых золотом магнитных наночастиц ДНК-аптамерами....27
2.3 Магнитодинамическая нанотерапия *in vitro*....27
2.4 Анализ воздействий магнитных наночастиц покрытых золотом в низкочастотном переменном магнитном поле *in vitro*....27
2.5 Магнитодинамическая терапия *in vivo*....28
2.6 Активность каспазы в опухолевых тканях....29
2.7 Гистологический анализ....29
2.8 Исследование токсичности Au-МНЧ *in vivo*....29
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ....31

3.1 Оптимизация условий магнитодинамической терапии.....31
3.2 Исследование биологического эффекта функционализированных ДНК-аптамерами магнитных наночастиц (AS14-Au-МНЧ) в переменном электромагнитном поле *in vivo*.....32
3.3 Исследование механизма гибели опухолевых клеток с помощью магнитодинамической терапии.....34
3.4 Исследование токсичности Au-МНЧ *in vivo*.....40
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....42
ВЫВОДЫ:.....44
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....45

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания остаются одной из главных причин смертности в мире. Несмотря на успехи в понимании молекулярной биологии опухолей, применение таких методов как лучевая терапия, химиотерапия, хирургические методы, общая выживаемость больных опухолевыми заболеваниями значительно не увеличилась за последние два десятилетия. Это связано с тем, что данные методы не позволяют полностью разрушать и удалять все опухолевые клетки, включая новые очаги метастазирования, локализованные в разных областях тела, в результате чего через некоторое время случается формирование вторичных опухолей. Поэтому на сегодняшний день существует необходимость в разработке новой технологии персонализированного лечения, направленного на разрушение опухолей на уровне одной клетки для увеличения выживаемости пациентов и снижения образования рецидивов.

Таким методом является применение комбинаторных наносистем на основе магнитных наночастиц с ДНК – аптамерами. Магнитные наночастицы на нанометровом масштабе демонстрируют новые оптические, магнитные, электронные и структурные свойства [1, 2], которые делают их перспективными инструментами в противораковой терапии [3]. Основной недостаток наночастиц заключается в том, что они накапливаются в здоровых тканях, вызывая токсичные побочные эффекты [4, 5]. Целенаправленная доставка требует функционализации наночастиц молекулярными зондами, такими как аптамеры, которые специфически связываются с уникальными биомолекулами раковых клеток [6, 7]. Аптамеры представляют собой короткие синтетические одноцепочечные ДНК или РНК, которые специфически связываются с различными мишенями с высокой аффинностью и селективностью [3, 4, 8]. По сравнению с антителами, аптамеры обладают низкой иммуногенностью, токсичность и стоимостью, поэтому активно применяются для терапевтических целей [3].

В этом исследовании мы демонстрируем метод магнитодинамической терапии основанный на применении покрытых золотом магнитных наночастиц (Au-МНЧ) модифицированных ДНК аптамерами для разрушения опухоли у мышей *in vitro* и *in vivo*. Для адресной доставки мы использовали AS-14 аптамеры специфичные к фибронектину (Фн) асцитной карциномы Эрлиха [9]. Фибронектин представляет собой большой гликопротеин, который служит важным компонентом внеклеточного матрикса, собирающегося в фибриллы, прикрепляя клетки к коллагеновым волокнам. Было показано, что помимо внеклеточного фибронектина клетки карциномы Эрлиха синтезируют и высвобождают большие количества Фн в культуральную среду *in vitro*, в асцитную жидкость и плазму *in vivo* [10]. AS-14 аптамеры доставляют Au-МНЧ к опухоли карциномы Эрлиха и связывают частицы с молекулами фибронектина. Фн связывается с клеточной поверхностью через интегрины - большие трансмембранные адгезионные белки, которые обеспечивают физическую связь между внеклеточной матрицей и сократительным цитоскелетом [11]. Активация интегринов происходит за счет связывания лиганда и механической силы, вытягивающей β-субъединицу интегрина через фибронектин и возвращая ее в исходное положение. Недавно опубликованные экспериментальные данные и результаты молекулярного моделирования демонстрируют динамику активации интегрина за счет механической силы, вытягивающей интегрины до 6 нм в течение 6 нс [12]. Апоптоз, основанный на активации интегринов, может вызывать в дальнейшем активацию каспазы-8 [13 – 20]. Низкочастотное переменное магнитное поле (НПЭМП) вызывает колебания Au-МНЧ модифицированных аптамерами в комплексе с фибронектином. Таким образом, активность МНП управлялась НПЭМП. Преимущества предлагаемой технологии включают глубокое проникновение магнитного поля, высокую цитотоксическую активность в отношении раковых клеток и низкую токсичность для соседних нормальных клеток и тканей.

Цель работы – показать возможность противоопухолевого эффекта магнитодинамической терапии.

Задачи:

1. Разработать способ модификации покрытых золотом магнитных наночастиц ДНК-аптамерами;
2. Определить эффективность магнитодинамической терапии *in vitro* на клетках асцитной карциномы Эрлиха;
3. Определить эффективность магнитодинамической терапии *in vivo* на клетках асцитной карциномы Эрлиха.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Свойства магнитных наночастиц

За последние десятилетия нанотехнологии стали очень популярны. Это связано с тем, что с уменьшением размера и переходом в наноразмерное состояние отношение поверхности к объему и, следовательно, доля поверхностных атомов относительно объемных единиц увеличивается. Большое отношение поверхности к объему наночастиц является основным фактором в определении новых физических, химических и механических свойств. К физическим свойствам относятся оптические, электрические и магнитные свойства. Наиболее характерными являются магнитные свойства, исследования которых показали другое проявление в наноматериалах по сравнению с более массивными материалами. Кроме того было показано, что магнитный момент (в расчете на один атом) и магнитная анизотропия наночастиц может быть значительно больше, чем у массивного материала [21]. Это также относится и к другим магнитным свойствам, таким как температуры Кюри (T_C) или Нееля (T_N) и поле коэрцитивности (H_C) [21, 22].

В общем случае магнитное поведение наночастиц определяется важными физическими характеристиками, такими как химический состав, размер частиц, тип кристаллической решётки и морфология частиц [23].

Среди магнитных наночастиц в биомедицине главным образом используются ферромагнитные и суперпарамагнитные наночастицы. В ферромагнитных наночастицах на основе таких материалов как железо, никель, кобальт, атом имеет результирующий магнитный момент, обусловленный неспаренными электронами. Наночастица состоит из доменов, содержащих большое число атомов, магнитные моменты которых образуют общую сеть магнитных моментов домена, указывающую в каком-либо направлении. Случайным образом распределенные магнитные моменты доменов дают нулевой результирующий магнитный момент частицы. Когда

ферромагнитные наночастицы помещаются в магнитное поле, магнитные моменты доменов выравниваниваются вдоль направления примененного магнитного поля, образуя общий магнитный момент. Кроме того, у ферромагнитных наночастиц существует остаточный магнитный момент после того, как магнитное поле удаляется [21]. Поэтому еще одной важной характеристикой ферромагнитных наночастиц является коэрцитивная сила (Hc) - магнитное поле, необходимое для приведения намагниченности обратно к нулю [21, 22]

При достижении ферромагнитных наночастиц критического радиуса, обычно он составляют менее 50 нм, происходит прекращение их разделения на домены, в результате чего образуются суперпарамагнитные наночастицы, состоящие из одного домена и равномерно намагниченные вдоль одной из осей [23]. При наложении магнитного поля, МНЧ в суперпарамагнитном состоянии формируют быстрый ответ на изменения магнитного поля без остаточной намагниченности и коэрцитивности [21].

1.2 Размер и форма магнитных наночастиц

Размер и форма магнитных наночастиц могут значительно различаться. Так, размер наночастиц варьирует от нескольких нанометров до десятков микрометров, что сопоставимо с размерами клеток (10 – 100 мкм), вирусов (20 – 100 нм), белков (5 – 50 нм) и ДНК (шириной 1 нм, 10 – 100 нм). Благодаря наноразмерам частицы способны связываться и взаимодействовать с биологическими объектами.

Физические и химические свойства магнитных наноструктур, как известно, в значительной степени зависят от морфологии материала, поэтому в последнее время в результате синтеза наночастиц образуются наноструктуры различной формы в зависимости от цели их применения. В связи с этим форма магнитных наночастиц классифицируется по их размерности. Как правило, выделяются 0-D, 1-D и 3-D магнитные наноструктуры. 0-D магнитные наноструктуры включают сферы, кубы и

многогранники. 1-D наноструктуры включают (но не ограничиваются ими) нанопроволоки, наностержни и нанотрубки. К 3-D наноструктурам относятся объемные кластеры, нанокристаллические пленки и нанокомпозиты [24].

1.3 Методы синтеза магнитных наночастиц

В последнее время были разработаны различные методы химического синтеза с особым вниманием на получение контролируемых по форме, высокостабильных и монодисперсных магнитных наночастиц с потенциальным применением в тераностике [23]. Благодаря эффективным механизмам синтеза магнитных наночастиц образуются частицы с различным составом и фазами, включая чистые металлы оксида железа (Fe3 O4 и γ - Fe 2 O 3), ферриты в комплексе с магнитными металлами (MnFe2O4, CoFe2O4 и ZnFe2O4) и металлические сплавы (FeCo и FePt) [24].

К основным методам синтеза магнитных наночастиц относятся физические, химические и биологические методы.

Физические методы включают газофазное осаждение и электронно-лучевую литографию. Эти методы страдают от их неспособности контролировать размер частиц до нанометрового размера [25]. Так, например, Wang W и др. получили магнитные наночастицы Fe70Co30 размером 15 ± 1,5 нм кубической формы с использованием метода газофазного осаждения на основе магнетронного распыления [26]. Изготовленные наночастицы характеризовались высокой намагниченностью насыщения 220 emu/g. Другие исследования описывают метод литографии и магнетронного распыления, в результате которого может получиться диаметр частиц от 1 до 2,5 мкм, состоящий из трех слоев: слой пермаллоя, расположенный между двумя слоями золота [27, 28].

К химическому синтезу магнитных наночастиц относятся такие методы как золь-гель-синтез, метод окисления, химическое соосаждение, гидротермальные реакции, электрохимический метод, аэрозольный/вапрофразный метод, реакции сонохимического разложения,

флюидный метод, синтез с использованием нанореакторов и т.д. [29]. Химические методы являются наиболее предпочтительными, поскольку с их помощью возможно синтезировать магнитные наночастицы с однородным составом и размером [30]. К наиболее распространенным методам синтеза относятся химическое соосаждение, термическое разложение, гидротермальный и микроэмульсионный синтез.

Процесс химического соосаждения является, пожалуй, самым простым и наиболее эффективным химическим методом синтеза различных магнитных наночастиц, особенно суперпарамагнитных наночастиц оксида железа (SPION), которые обычно имеют средний размер менее 50 нм. Химическое соосаждение имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами, такие как хорошая однородность, низкая стоимость, высокая степень чистоты продукта и отсутствие необходимости в органических растворителях, поверхностно-активных веществах и высокотемпературной обработке. Данный способ основывается на осаждении гидроксидов железа и железа путем добавления оснований (NH_4OH или NaOH) в раствор солей Fe (III) и Fe (II). Затем полученный осадок гидроксида железа выделяют путем магнитной декантации или центрифугирования и обрабатывают концентрированными базовыми или кислотными растворами [29]. В этих условиях наночастицы магнетита образуются за счет агрегации первичных частиц в геле $Fe(OH)_2$ [31]. Amir Hassanjani-Roshan и др. произвели методом сонохимического осаждения наноразмерные частицы Fe_2O_3 из суспензии, содержащей $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ и водный NaOH, с помощью ультразвукового облучения в течение 1 ч, которое формировало сферические частицы среднего размера около 19 нм и размер кристаллита синтезированного образца находился в диапазоне от ~ 5 и ~ 7,5 нм для разных температур [32]. Stephen Z.R. и др. также использовали химическое соосаждение и получили агенты на основе суперпарамагнитных наночастиц для трансфекции гена с использованием полимерных модулей, состоящих из хитозана,

полиэтиленгликоля и полиэтилененимина, модифицированных катехином [33].

Метод термического разложения или восстановления получил значительное внимание, поскольку позволяет осуществлять точный контроль над размером, формой и структурой наночастиц по сравнению с другими методами [30]. Синтез магнитных наночастиц происходит путем помещения металлоорганических соединений в высококипящие органические растворители со стабилизирующими поверхностно-активными веществами, такими как олеиновая кислота или гексадециламин [23]. Размер и морфология магнитных наночастиц регулируется отношением металлоорганических соединений, поверхностно-активных веществ и растворителей, а также такими параметрами, как температура и время реакции [23]. Hyeon T. и др. обнаружили, что высокотемпературное (300 градусов Цельсия) выдерживание комплекса железа и олеиновой кислоты, полученного термическим разложением пентакарбонила железа в присутствии олеиновой кислоты при 100 градусах Цельсия, вызывает формирование высококристаллических и монодисперсных γ-Fe2O3 нанокристаллических частиц, размер которых может варьировать от 4 до 16 нм [34].

Метод микроэмульсий – это термодинамически стабильные коллоидные дисперсии, состоящие из двух жидкостей, чаще всего воды и масла, первоначально не смешивающиеся в одной фазе из-за присутствия молекул поверхностно-активных веществ. Синтез происходит путем диспергирования водной фазы в виде микрокапель (1-50 нм), окруженных монослоем молекул поверхностно-активного вещества в непрерывной углеводородной фазе микроэмульсии вода-в-масле. Спириновые ферриты и позолоченные наночастицы Co / Pt могут быть синтезированы микроэмульсиями. В результате синтеза методом микроэмульсий производится узкий диапазон магнитных наночастиц с разными формой и размерами, например, сфероиды, стержни, трубки и т.д [35]. Следует

отметить, что метод микроэмульсий недостаточно эффективен, потому что используется большое количество растворителей для производства небольшого количества магнитных наночастиц. Так J. J. Hao и др. синтезировали суперпарамагнитные нанокристаллы Fe_3O_4 со средним размером 15 нм путем химического осаждения в обратную микроэмульсию при комнатной температуре [36].

Метод гидротермального синтеза используется для синтеза магнитных наночастиц в водных средах в реакторах или автоклавах при высокой температуре (> 200 ° C) и высоком давлении (> 13 790 кПа).16,17,50 [29]. Процесс происходит спонтанно на поверхности раздела металлического линолеата и водно-этанольных растворов в замкнутой системе с высоким давлением либо высокой температурой. Магнитные наночастицы, формирующиеся на границе раздела, покрываются слоем линолевой кислоты, что приводит к спонтанному процессу разделения фаз и образованию гидрофобных наночастиц [24]. С помощью данного метода производится узкий диапазон наноструктурированных материалов и возможен контроль формы частиц при управлении экспериментальными параметрами, такими как время реакции, температура, концентрация реагентов, стехиометрия, природа растворителя, комплексообразование и т.д. [29].

Биологические и микробиологические методы, как правило, просты, универсальны и эффективны, с возможностью контролировать состав и геометрию магнитных наночастиц [36, 37]. Кроме того, такой подход обеспечивает высокую производительность, хорошую воспроизводимость и низкую стоимость, но процесс требует наличия низкой температуры и низкой энергии [29]. Используемыми микроорганизмами являются бактерии, актиномицеты, грибы и водоросли. Такие виды бактерий как Thermoanaerobacter и Shewanella, обладают способностью синтезировать Fe3O4 магнитные наночастицы в анаэробных условиях. Ферментация проводится путем инкубации предшественника β-FeOOH с бактериями, поддерживая температуру 65 ° C от нескольких дней до 3 недель с

периодическим добавлением доноров электронов в виде глюкозы. Микробный процесс способен производить частицы размером 5–90 нм [29]. Так, Shimoshige H. и др. в своей работе сообщают о выращивании магнитотактических бактерий Magnetospirillum magnetum strace RSS-1, синтезирующих уникальные магнитные наночастицы с уникальной структурой ядра и оболочки, состоящей из Fe3O4 покрытого тонким слоем оксида самария Sm2O3 [38].

1.4 Поверхностные модификации магнитных наночастиц

Свойство стабильности является важнейшим требованием при синтезе наночастиц и их применении. Но, несмотря на ряд изменений, которым подвергаются магнитные наночастицы, сохранение их стабильности в течение длительного периода без агломераций и осаждения остается проблемой [24]. Иногда это связано с тем, что металлы, такие как Fe, Co и Ni, в чистом виде и их (металлические) сплавы, как правило, неустойчивы из-за окисления на воздухе по мере уменьшения размера [39]. Для решения данной проблемы часто магнитные наночастицы модифицируются различными покрытиями и функциональными биологическими молекулами. Также наличие определенных модификаций приводит к увеличению биосовместимости и снижению токсичности магнитных наночастиц для живого организма. Тип покрытия может зависеть от терапевтических и диагностических целей.

В качестве покрытий для магнитных наночастиц используются органические и неорганические вещества, такие как декстран, полиэтиленгликоль (ПЭГ), крахмал, хитозан, липосомы, золото, поливинилэтанол, биотин, гепарин и т. д. [29, 30]. Полиэтиленгликоль (ПЭГ) является одним из наиболее распространенных поверхностных полимерных покрытий магнитных наночастиц [40, 41]. Полиэтиленгликоль растворим в воде, улучшает дисперсию наночастиц в биологических средах, имеет низкую иммуногенность, высокую биосовместимость, способен к быстрой

очистке, также он увеличивает время циркуляции наночастиц в крови, так как они плохо распознаются ретикулоэндотелиальной системой [42]. Кроме того, ПЭГ уменьшает абсорбцию наночастиц макрофагами и из-за присутствия полярных и неполярных групп способствует эффективному проникновению через клеточную мембрану [43]. Другим широко используемым полимерным покрытием является декстран, это связано с его биосовместимостью и полярными взаимодействиями (хелатирование и водородная связь) [29, 30, 44]. Кремниевое покрытие популярно благодаря легкости синтеза и его стабильности в водных условиях [29, 45, 46]. Модификация магнитных наночастиц с помощью слоя фосфолипидов (формирование липосом) также является типичным методом, поскольку структура липосом аналогична структуре биологических мембран, которые определяют их биосовместимость и эффективность в целевых системах доставки [40, 47]. В последнее время больше внимания уделяется синтезу магнитных наночастиц с углеродным покрытием из-за преимуществ, которые углеродные материалы имеют над полимерами или диоксидом кремния, а именно, гораздо более высокая химическая и термическая стабильность [48]. Неорганические металлы, такие как золото, защищают магнитное ядро от окисления, коррозии, агрегирования и увеличивают биосовместимость. Благодаря оптическим свойствам, таким как локализованный поверхностный плазмонный резонанс и поверхностное усиленное рассеяние, магнитные наночастицы, покрытые золотом, могут быть использованы в магнитно-резонансной томографии как контрастные или терапевтические средства [49].

Но, несмотря на то, что описанные функциональные покрытия придают магнитным наночастицам биосовместимость для применения в тераностике нередко существует необходимость в их модификации различными функциональными группами для конъюгации посредством ковалентного и нековалентного связывания целевых лигандов. Амино, карбоксильные, сульфгидрильные, гидроксильные, имидные, тиоловые группы являются одними из главных представителей, облегчающих связывание целевых

лигандов с поверхностями наночастиц, благодаря высокой аффинности ко многим материалам [50].

Для прямого конъюгирования лигандов, поверхность магнитных наночастиц обычно функционализируется амино- (-NH_2) или карбоксильными (–COOH) группами. Реакция сочетания между амино- и карбоксильной группами широко используется для связывания магнитных наночастиц с различными лигандами, такими как аптамеры, белки и различные малые молекулы для *in vivo* целевых МРТ и доставки лекарств. При конъюгировании с карбоксильной (–COOH) группой на поверхности наночастиц аминогруппы белков, пептидов и аптамеров непосредственно связываются путем образования амидных связей с помощью специальных реагентов связывания, таких как 1-этил-3- (3-диметиламинопропил) карбодиимид (EDC) и N-гидроксисукцинимид (NHS). Кроме того, альдегидная группа (–CHO) также может быть использована для конъюгации лигандов на поверхностях частиц [24].

В случаях, когда невозможна прямая конъюгация лигандов с магнитными наночастицами, применяются различные линкерные молекулы. Так, например, аминные группы на поверхности частиц могут быть активированы N-сукцинимидилйодацетатом для связывания с тиольными группами, предварительно конъюгированных с пептидами. Аминные группы также могут быть активированы путем присоединения малеимидных молекул, что очень характерно для связывания с тиольными группами через тиоленовую химию «щелчок». Этот метод конъюгации был зарегистрирован для глиомы *in vivo* [51]. Сульфосукцинимидил 6–3'(2-пиридилдитио) пропионамидо] гексаноат (Sulfo-LC-SPDP) можно использовать при связывании аминогрупп поверхности магнитных наночастиц с аминами на антителах или пептидах. Как только аминогруппы, связанные либо с наночастицами, либо с лигандами активируются Sulfo-LC-SPDP, фрагменты SPDP образуют дисульфидную связь, чтобы магнитные наночастицы функционализировались целевыми лигандами [51].

В качестве целевых лигандов кроме пептидов, аптамеров, антител используются полисахариды и небольшие молекулы в виде кислот [41]. Например, фолиевая кислота является водорастворимым витамином B6 и участвует в процессе быстрого клеточного роста и деления, особенно во время эмбрионального развития [52]. В исследованиях раковых заболеваний было обнаружено, что на поверхности наблюдается избыточная экспрессия рецепторов фолата. Таким образом, наночастицы, функционализированные фолиевой кислотой, связываются с высокой аффинностью с опухолевыми клетками [53]. Углеводы также зарекомендовали себя в качестве целевых лигандов. Так, асиалогликопротеиновый рецептор (ASGP-R), представленный в основном в гепатоцитах, легко связывает галактозу, маннозу, арабинозу, которые могут быть использованы в качестве агентов для направленной доставки в печень [53 – 56].

1.5 Способы доставки магнитных наночастиц к поверхности опухолевых клеток

Пассивный таргетинг тераностических МНЧ в опухолевые ткани, главным образом обусловлен усиленным эффектом проницаемости и удерживания опухоли. Активно растущая опухоль, объемом более 2 мм^3, характеризуется недостаточной сосудистой сетью, что приводит к появлению непроходимых сосудов с увеличенными щелевыми переходами от 100 нм до 2 мкм, в зависимости от типа опухоли, и наночастицы могут легко проникать в интерстиций опухоли [53]. Данные особенности опухолевой ткани обеспечивают усиленный эффект проницаемости и удерживания, благодаря которому происходит селективное накопление наночастиц в интерстиции опухоли. Однако пассивное нацеливание невозможно во всех опухолях, потому что степень васкуляризации опухоли, пористость опухолевых сосудов и скорость лимфатического дренажа могут варьировать в зависимости от типа и состояния [53, 57].

Одним из подходов для решения данной проблемы является активный таргетинг, который основывается на модификации поверхности магнитных наночастиц специфичными лигандами, которые избирательно связываются только с рецепторами, находящимися на опухолевых клетках мишенях. К специфичным лигандам относятся такие агенты как антитела, аптамеры, пептиды и малые молекулы, используемые для селективного связывания опухолевых биомаркеров [25, 58]. Эта стратегия доставки обеспечивает высокую специфичность и эффективность доставки магнитных наночастиц непосредственно к опухолевым клеткам, избегая неспецифического связывания и накопления частиц в нормальных тканях. Активный таргетинг также может быть осуществлен благодаря способности магнитных наночастиц реагировать на внешнее магнитное поле. Магнитная сила активно притягивает частицы в пространство опухоли (через входящую сосудистую сеть) и помогает в последующем удержании [59]. В то же время эффективность магнитного таргетинга ограничена целевой тканью, которая близка к поверхности тела, поскольку сила магнитного поля уменьшается с удалением от магнитного источника. Магнитный таргетинг был изучен для ряда опухолевых моделей [60, 61].

1.6 Доставка магнитных наночастиц в опухолевые клетки

Для эффективной химиотерапии магнитные наночастицы, доставляющие лекарства в клетки, должны быть поглощены и инкапсулированы клеточной мембраной в процессе эндоцитоза с последующим формированием эндосом или лизосом. Эндоцитоз терапевтических магнитных наночастиц главным образом зависит от типов клеток, механизмов интернализации и свойств наночастиц. Yang K. and Ma Y. исследовали процессы физической транслокации наночастиц различных форм, таких как сферы, эллипсоиды, стержни, диски, с разными объемами. В результате было установлено, что анизотропия форм наночастиц и начальная ориентация являются решающими факторами, определяющими

взаимодействие между наночастицами и липидным бислоем [62]. Размер наночастиц также играет важную роль в процессе доставки лекарств через мембрану. Gao H. и др. и Zhang S. и др. в своих теоретических исследованиях исследовали размерный эффект наночастиц на эндоцитоз. Они определили оптимальный размер наночастиц, радиус которых составлял 25–30 нм, для эффективной доставки в клетку [63].

Следует отметить, что в проникновении наночастиц в клетку в процессе эндоцитоза важную роль играет энергия системы, которая управляется двумя основными силами: изгибная (упругая) энергия клеточной мембраны, вызванная изменением ее кривизны, и энергия связи лиганд-рецептор между поверхностью наночастицы и липидами, как сообщают Li Y. et.al [64]. В процессе проникновения энергия изгиба и энергия связи увеличиваются и уменьшаются, конкуренция между этими двумя энергиями регулирует эндоцитоз наночастиц. Когда взаимодействие лиганд–рецептор достаточно сильное, энергия связи может преодолеть энергетический барьер, индуцированный деформацией клеточной мембраны, в результате чего наночастица может быть полностью обернута липидами с дальнейшим формированием эндосом. Если энергетический барьер не преодолён, частицы окружаются клеточной мембраной частично, в результате чего не могут проникнуть в клетку и доставить лекарство [65].

1.7 Фармакокинетика и биораспределение магнитных наночастиц

После введения магнитных наночастиц в кровоток происходит непосредственное взаимодействие между наночастицами и белками плазмы (опсонины). Это взаимодействие приводит к адсорбции белков плазмы на магнитных частицах в процессе, называемом опсонизацией. Такой процесс адсорбции играет ключевую роль в биораспределении и элиминации наночастиц. Взаимодействие опсонических белков с поверхностью магнитных наночастиц составляют ван-дер-ваальсовские, электростатические связи и гидрофильный/гидрофобный баланс.

Опсонизация гидрофобных частиц происходит быстрее, чем опсонизация гидрофильных частиц. Опсонизированные наночастицы в результате быстрого клиренса из сосудистого русла захватываются макрофагами печени (клетки Кюпфера), селезенки и костного мозга, которые являются тканями, принадлежащими ретикулоэндотелиальной системе (RES) [29]. Накопление магнитных наночастиц в тканях ретикулоэдотелиальной системы может считаться благоприятным при условии, что эти органы являются предполагаемыми целевыми участками для диагностики и терапии. Следовательно, при доставке магнитных наночастиц к тканям, не относящимся к ретикулоэндотелиальной системе, минимизация быстрого клиринга частиц становится важной. Поэтому доставка магнитных наночастиц к необходимым мишеням может быть достигнута путем модификаций наночастиц разными покрытиями для создания оболочек на поверхности частиц и обеспечения экранирующего эффекта (также называемого свойством «стелс») [66].

Размер является одним из важных параметров, влияющих на фармакокинетику и биораспределение внутривенно введенных магнитных наночастиц. Это вязано с тем, что адсорбция опсонинов на поверхности зависит от размера частиц. Учеными было показано, что у наночастиц с небольшим размером (80 нм) количество адсорбированного белка плазмы было ниже, чем у наночастиц большего размера (171 нм и 240 нм). В результате системный клиренс мелких частиц был медленнее, чем у более крупных наночастиц [29]. Кроме того, было показано, что магнитные наночастицы с гидродинамическим диаметром 10-100 нм являются фармакокинетически оптимальными для применения *in vivo* [67]. Магнитные наночастицы менее 10 нм подвержены тканевой экстравазации и почечному клиренсу, в то время как частицы больше 100 нм быстро опсонизируются и элиминируются из циркуляции через ретикулоэндотелиальную систему [57, 67].

Поверхностный заряд магнитных наночастиц может также иметь важное значение в биораспределении после внутривенной инъекции. Наночастицы с нейтральным зарядом минимально взаимодействуют с белками плазмы, что способствует увеличению времени циркуляции наночастиц, тогда как поверхностный заряд (положительный или отрицательный) усиливает процесс фагоцитоза [29, 68]. Влияние поверхностного заряда на биораспределение магнитных наночастиц было продемонстрировано в исследовании Chouly, C. И др., проведенном на мышах. В исследовании использовались покрытые декстраном Fe3O4 магнитные наночастицы с нейтральным, отрицательным (– 30 мВ) или положительным (+ 20 мВ) поверхностным зарядом. Результаты исследований показали, что печеночное поглощение наночастиц было в 3 раза ниже для электрически нейтральных частиц, чем для заряженных частиц [69]. Следует отметить, что кроме физико-химических характеристик магнитных наночастиц, путь введения может также влиять на их биораспределение. При локальном введении в пораженный участок, например, подкожно или в опухоль, небольшие магнитные частицы подвергаются пассивной инфильтрации в интерстициальные пространства вокруг места инъекции и постепенно абсорбируются лимфатической капиллярной системой. По этой причине локально вводимые НЧ (≤ 60 нм) используются для лимфатического нацеливания (например, химиотерапия или визуализация лимфатических опухолей). В этом случае магнетизм может не быть обязательным условием, но может быть полезным свойством для иммобилизации частиц на месте в течение более длительного времени или для обеспечения гипертермии [29].

1.8 Понятие аптамеров

Аптамеры представляют собой класс зондов для молекулярного распознавания, подразделяющиеся на два типа, таких как пептидные аптамеры и нуклеиновые кислоты. К нуклеиновым кислотам относятся ДНК и РНК олигонуклеотиды, которые благодаря своей уникальной вторичной и

третичной структуре способны распознавать и связываться со своими целевыми мишенями с очень высокой специфичностью и афинностью [70]. Пептидные аптамеры представляют собой простые пептиды, содержащие петлевую область в центре, а также концы, связанные с белками. Петлевая область отвечает за селективные свойства пептидов [71]. Диапазон мишеней аптамеров включает в себя разные молекулы, белки, вирусы, бактерии, специфичные типы клеток и тканей [40]. Функционально аптамеры представляют собой аналоги антител, но благодаря своим физико-химическим свойствам и способу получения обладают рядом преимуществ по сравнению с антителами, такими как высокая специфичность, долгая стабильность в виде сухого порошка или в растворе, слабая иммуногенность, способность выдержать обратимую денатурацию и низкая стоимость [71]. Кроме того, аптамеры связываются с большими и маленькими мишенями, в то время как антитела главным образом связываются с крупными молекулами [40]. Наиболее часто учеными применяются именно ДНК аптамеры из-за их сравнительно простого получения и небольшой стоимости при очень высоких показателях аффинности и специфичности к мишеням.

1.9 Терапия опухолевых заболеваний с применением коньюгатов магнитных наночастиц с ДНК–аптамерами

1.9.1 Адресная доставка лекарственных средств коньюгатами магнитных наночастиц с ДНК–аптамерами

Уникальные свойства магнитных наночастиц и конъюгатов на их основе успешно применяются в различных направлениях биомедецины. Одним из способов использования магнитных наночастиц является контролируемая адресная доставка лекарственных средств в опухолевые ткани, основанная на модификации магнитных наночастиц аптамерами. Главным преимуществом адресной доставки лекарственных средств магнитными наночастицами является увеличение локальной концентрации лекарств в необходимых опухолевых мишенях с отсутствием значительных

побочных эффектов. Доставка наночастиц с терапевтическими лекарствами также может быть достигнута благодаря способности магнитных наночастиц реагировать на внешнее магнитное поле. Магнитная сила, создаваемая градиентом, активно притягивает частицы в пространство опухоли (через входящую сосудистую сеть) и помогает в последующем удержании в ткани [59]. Но, тем не менее, использование только магнитного поля не является достаточным специфическим методом доставки наночастиц, поэтому магнитное поле активно применяется совместно с конъюгатами магнитных наночастиц и аптамеров для увеличения эффективности терапии.

Jalalian S. и др. сообщают об использовании суперпарамагнитных наночастиц оксида железа, загруженных эпирубицином, где в качестве агента для активного таргетинга применяется 5pt1 аптамеры, специфичные к клеткам карциномы толстой кишки. Исследование показало, что данные комплексы являются менее токсичными по сравнению с применением только эпирубицина и приводят к значительному уменьшению роста опухоли в *in vivo* [72]. Высокого ингибирования глиомы крыс добился Guo J. и др. в своем исследовании, с использованием наночастиц, загруженных паклитакселом в комплексе с AS1411 ДНК-аптамерами, специфически связывающимися с нуклеолином, находящимся в плазматической мембране раковых и эндотелиальных клеток в ангиогенных кровеносных сосудах [73]. В качестве терапевтического противоопухолевого средства активно используется доксорубицин (DOX). Например, Xie X. и др. в своей статье описывали использование аптамеров, специфичных к молекулам адгезии эпителиальных клеток (EpCAM) в комплексе с мезопористыми наночастицами кремнезема для целенаправленной доставки доксорубицина в раковые клетки толстой кишки. Адресная доставка противоопухолевого доксорубицина показала терапевтическую эффективность при одновременном снижении токсичности [74]. Yu M. K. и др. получили конъюгаты аптамеров, связывающихся с простата-специфическими (CGA) 7-мембранными антигенами, с термически сшитыми суперпарамагнитными наночастицами оксида железа, поверхность

которых была загружена молекулами доксорубицина. В ходе исследования была продемонстрирована эффективность селективной доставки лекарств конъюгатами в моделях рака предстательной железы *in vitro* и *in vivo* с использованием раковых клеток с избыточной экспрессией PSMA и раковых клеток PS3-негативных PC3 [75]. Catuogno S. и др. также использовали для адресной химиотерапии рака предстательной железы суперпарамагнитные наночастицы, функционализированные аптамерами и загруженные доксорубицином [76].

1.9.2 Магнитная гипертермия

Как было доказано учеными, опухолевые клетки более чувствительны к теплу, чем нормальные ткани. Этот факт вызвал появление нескольких методов разрушения опухолей с помощью высокой температуры. Одним из наиболее успешных стала магнитная гипертермия с использованием магнитных наночастиц, модифицированных аптамерами. Механизм разрушения основывается на том, что наночастицы селективно связываются с опухолевыми клетками с помощью аптамеров и трансформируют энергию переменного электромагнитного поля в термальную энергию, в результате чего происходит локальное нагревание только опухолевых тканей в диапазоне 41 – 47 °C [30, 77].

Во многих исследованиях описывается магнитная гипертермия как эффективный метод лечения [78,79]. Guo F. и др. провели адресную гипертермию MCF-7 рака молочной железы и HepG2 рака печени человека с помощью синтезированных MUC1 аптамер-модифицированных металлических наночастиц (MUC1-МНЧ). Исследования показали, что MUC1-МНЧ способны генерировать высокую температуру под воздействием ПЭМП, которая повреждает MUC1-положительные раковые клетки. Кроме того, MUC1-МНЧ по сравнению с немодифицированными МНЧ значительно усиливали адресную гипертермию ($p<005$), в то время как

немодифицированные МНЧ вызывали минимальное разрушение опухолевых клеток [80].

Магнитная гипертермия с применением магнитных наночастиц, конъюгированных с аптамерами, может быть использована в сочетании с химиотерапией. Так, например, Pala K. и др. 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 результате было показано, что магнитное поле (300 А, 280 кГц) в комплексе с наночастицами оксида трехвалентного железа, покрытых декстраном и модифицированных HER2 аптамерами, вызвали 50% гибель опухолевых клеток, в то время как в контрольных группах наблюдалась 100% выживаемость [81].

Sivakumar B. и др. исследовали наносистему, представленную аптамерами, связанными с лекарственными средствами (куркумин и гемцитабин) и магнитными наночастицами, инкапсулированными PLGA-наночастицами для лечения рака поджелудочной железы. Balasubramanian Sivakumar и др. сообщили, что воздействие конъюгатов на опухолевые клетки без присутствия магнитного поля не вызывало значительного разрушительного цитотоксического эффекта. В то время как конъюгаты в комплексе с переменным магнитным полем приводили к сильному снижению жизнеспособности опухолевых клеток. Кроме того, было выявлено, что куркумин и гемцитабин после магнитной гипертермии рассеивались, что приводило к гибели клеток при последующей инкубации [82].

1.9.3 Магнитомеханическое разрушение опухолевых клеток

Переменное магнитное поле способно вызывать колебания магнитных наночастиц и этот процесс лег в основу сравнительно нового метода магнитодинамического разрушения опухолевых клеток. В этом методе аптамеры играют одну из главных ролей, так как осуществляют доставку

магнитных наночастиц к клеткам – мишеням и являются линкерами, позволяющими магнитным наночастицам связываться с мишенями.

Kim P.D. и др. в своей работе использовали ДНК-аптамеры, связанные с магнитными никелевыми микродисками, покрытыми с обеих сторон золотом для терапии асцитной карциномы Эрлиха. Магнитные диски, связанные с опухолевыми клетками аптамерами, под воздействием переменного магнитного поля вызывали сильное растяжение мембраны, что приводило к ее повреждению и гибели [83].

Tatiana N. Zamay и др. также в своих исследованиях использовали ДНК-аптамеры с покрытыми золотом микродисками. Механизм разрушения опухолевых клеток основывался на том, что аптамеры прочно прикрепляются к микродискам и к белкам–мишеням, при воздействии магнитного поля с частотой 100 Гц и вырывают целевые белки из мембраны, чем вызывают её повреждение. Также они сообщили, что кроме механического разрушения конъюгаты микродисков с аптамерами могут вызывать апоптоз опухолевых клеток, что также было продемонстрировано на культурах асцитной карциномы Эрлиха [84].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы следующие реактивы и материалы: белые мыши Imprinting Control Region (ICR) 6–недельного возраста, весом 25 г; покрытые золотом магнитные наночастицы (Au-МНЧ) 50 нм с магнитным сердечником 8–12 нм и золотой оболочкой толщиной 30–40 нм (NITmagoldCit, Nanoimmunotech, Испания); HPLC очищенные олигонуклеотиды, комплементарные к 5' аптамерам 5'-CGT GGTTACAGTCAGAGGAGAA- / 5ThioMC6-D / -3', модифицированных в 3'-положении 6-гидроксигексилдисульфидной группой (Integrated DNA Technologies, USA); ДНК аптамеры AS-14 (5'-TCCTCTGACTGTAACCACGAAGGTGTCGGCCTTAGTAAGGCTACAGCCA AGGGAAC GTAGCATAGGTAGTCCAGAAGCC-3'); DPBS-буфер (Sigma-Aldrich, USA); аннексин V-Cy3 (Sigma Aldrich, USA); CellEvent ™ Caspase-3/7 Detection Reagent (Thermo Fisher Scientific, USA); натрий-чувствительный краситель SBFI (Thermo Fisher Scientific, USA).

Исследования были проведены с использованием следующего оборудования: магнитная катушка 21,4 Ом с магнитным полем 100 Э на частоте 50 Гц и мощностью приблизительно 1,7 Вт; проточный цитометр (FC-500, Beckman Coulter, USA); криостат HM 525 (Carl Zeiss, Germany); лазерный сканирующий микроскоп (Carl Zeiss LSM780, Germany).

2.1 Объекты исследований

Для исследований *in vivo* использовались белые мыши Imprinting Control Region (ICR) 6–недельного возраста, весом 25 г, предоставленные Сибирским Федеральным Университетом. Для эксперимента каждой мыши были трансплантированы в правую ногу два миллиона клеток асцитной карциномы Эрлиха. Для исследований *in vitro* применялись клетки асцитной карциномы Эрлиха.

2.2 Функционализация покрытых золотом магнитных наночастиц ДНК-аптамерами

Стабилизация наночастиц проводилась с олигонуклеотидами, комплементарными 5' аптамерам 5' - CGT GGTTACAGTCAGAGGAGAA - / 5ThioMC6-D / - 3', модифицированных в 3' - положении 6 – гидроксигексилдисульфидной группой (Integrated DNA Technologies, USA), в буфере для хранения Au-МНЧ в течение 24 часов при 4 °C на шейкере (конечная концентрация 500 нм). Эту смесь разбавляли дважды, смешивая ее с DPBS-буфером (с кальцием и магнием), смешивание производилось в соотношении 1:1 с эквимолярным количеством аптамеров AS-14 (5'-TCCTCTGACTGTAACCACGAAGGTGTCGGCCTTAGTAAGGCTACAGCCA AGGGAAC GTAGCATAGGTAGTCCAGAAGCC-3'), которые предварительно нагревали в течение 10 минут до 95 °C и охлаждали на льду с последующей инкубацией в течение дополнительных 24 часов при 4 °C.

2.3 Магнитодинамическая нанотерапия *in vitro*.

Для исследований *in vitro* было сформировано 3 группы асцитных клеток по 3 пробы в каждой: в первой группе клетки асцитной карциномы Эрлиха инкубировали с AS-14-Au-МНЧ; во второй – с нефункционализированными Au-МНЧ при соотношении 1:100 (конечная концентрация 1×10^8 частиц на 1 мл); в третьей группе клетки асцитной карциномы Эрлиха инкубировали с DPBS в течение 30 минут при 37 °C. Затем пробы промывались и помещались в магнитную катушку, формирующую низкочастотное переменное электромагнитное поле (НПЭМП), на 10 минут.

2.4 Анализ воздействий магнитных наночастиц покрытых золотом в низкочастотном переменном магнитном поле in vitro

Возникновение апоптоза оценивали активацией каспазного каскада в опухолевых клетках через 3 часа после обработки НПЭМП, используя

CellEvent ™ Caspase-3/7 Detection Reagent (5 мкМ в PBS С 5% FBS) (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 30 минут при 37°С. Флуоресцентный сигнал от CellEvent Caspase-3/7 Detection Reagent был обнаружен с использованием проточной цитометрии (FC-500, Beckman Coulter, USA). Апоптоз оценивали также с помощью аннексина V-Cy3 (Sigma Aldrich, США) по транслокации фосфатидилсерина и диацетата 6-карбоксифлуоресцеина (6-CFDA) (Sigma Aldrich, USA), который поступает в клетку и гидролизуется эстеразами, присутствующими в живых клетках до флуоресцентного соединения 6-карбоксифлуоресцеина, что указывает на жизнеспособность клеток (для идентификации механизмов клеточной смерти). Процедуры выполнялись в соответствии с протоколом производителя и анализировались с использованием проточной цитометрии. Внутриклеточное содержание натрия оценивали с помощью натрий-чувствительного красителя SBFI (Thermo Fisher Scientific, США) методом проточной цитометрии (FC-500, Beckman Coulter, USA) в соответствии с протоколами производителя.

2.5 Магнитодинамическая терапия *in vivo*

В исследовании использовались 6-недельные самцы мышей ICR массой 25 г. За две недели до экспериментов животные были обучены сохранять спокойствие внутри магнитной катушки. Два миллиона клеток карциномы Эрлиха были трансплантированы в правую ногу каждой мыши. Каждый второй день, начиная с пятого дня после трансплантации опухоли до девятого дня, животным проводили 10 минутную магнитодинамическую терапию в НПЭМП с AS-14-Au-МНЧ, немодифицированными Au-МНЧ, только с AS-14 и только с DPBS (рис. 1B). Инъекции мышам вводились в хвостовую вену на 5, 7 и 9 день после трансплантации опухоли. В этом эксперименте осуществлялось деление мышей на четыре группы, каждая из которых включала по 7 животных:

Группа 1: Инъекция AS-14-Au-МНЧ в 100 мкл DPBS (1,6 мкг $кг^{-1}$);

Группа 2: Инъекция только Au-МНЧ в 100 мкл DPBS (1,6 мкг $кг^{-1}$);

Группа 3: Инъекция только AS-14 в 100 мкл DPBS (0,4 мг кг $^{-1}$);

Группа 4: Инъекция 100 мкл DPBS.

Спустя 30 минут животных помещали внутрь магнитной катушки и обрабатывали низкочастотным переменным магнитным полем в течение 10 минут.

2.6 Активность каспазы в опухолевых тканях

Для оценки возникновения апоптоза по активности каспазы в опухолевых клетках через 3 часа после магнитодинамической терапии, опухоль была забрана из ноги мыши и окрашена CellEvent™ Caspase-3/7 (5 мкМ в PBS с 5% FBS) (Thermo Fisher Scientific, США) в течение 30 минут при 37 °C. Затем её промывали DPBS и фиксировали 3,7% формалином. Серию срезов ткани размером 30 мкм готовили с использованием криостата HM 525 (Carl Zeiss, Германия), фиксировали на предметных стеклах и визуализировали с помощью лазерного сканирующего микроскопа (Carl Zeiss LSM780, Germany).

2.7 Гистологический анализ

Для оценки гистологических изменений опухолей после магнитодинамической терапии была выполнена микроскопия срезов тканей (Axioskop 40, Carl Zeiss, Германия). Опухоли собирали и помещали в 3,7% формалин. Серию срезов ткани размером 10 мкм готовили с использованием криостата HM 525 (Carl Zeiss, Германия) и фиксировали на предметных стеклах для окрашивания гематоксилином и эозином.

2.8 Исследование токсичности Au-МНЧ *in vivo*

В исследовании использовали здоровых 6-недельных мышей ICR массой 25 г, 10 животных на группу (5 женского пола и 5 мужского пола в каждой группе). Мышам вводили инъекции в хвостовые вены в 1, 3 и 5 дни (всего 3 раза) следующим образом:

Группа 1: Инъекция Au-МНЧ в 100 мкл DPBS (1,6 мкг кг$^{-1}$);

Группа 2: Инъекция 100 мкл DPBS.

Токсичность оценивалась на основании изменений биохимических показателей крови (холестерина, общего белка, аланин-аминотрансферазы, щелочной фосфатазы и билирубина), которые проводились с использованием анализатора COBAS INTEGRA 400 plus (Roche Diagnostics, Switzerland). Параметры мужского и женского пола анализировались отдельно. Все данные были представлены как среднее ± стандартная ошибка среднего.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Оптимизация условий магнитодинамической терапии

Для оптимизации терапевтической процедуры, были проведены исследования влияния времени инкубации AS-14-Au-МНЧ с клетками асцитной карциномы Эрлиха в условиях *in vitro*. Результаты исследований приведены на рисунке 1 (А1). Показано, что время инкубации не оказывает существенного влияния на связывание наночастиц с асцитными клетками при концентрации наночастиц в растворе, соответствующей соотношению 75 и 100 частиц на клетку. При этой концентрации достаточно даже 5 минут для проявления эффекта связывания. Однако снижение концентрации до 25 и 50 частиц на клетку приводило к увеличению времени эффективного связывания (рисунок 1, А3).

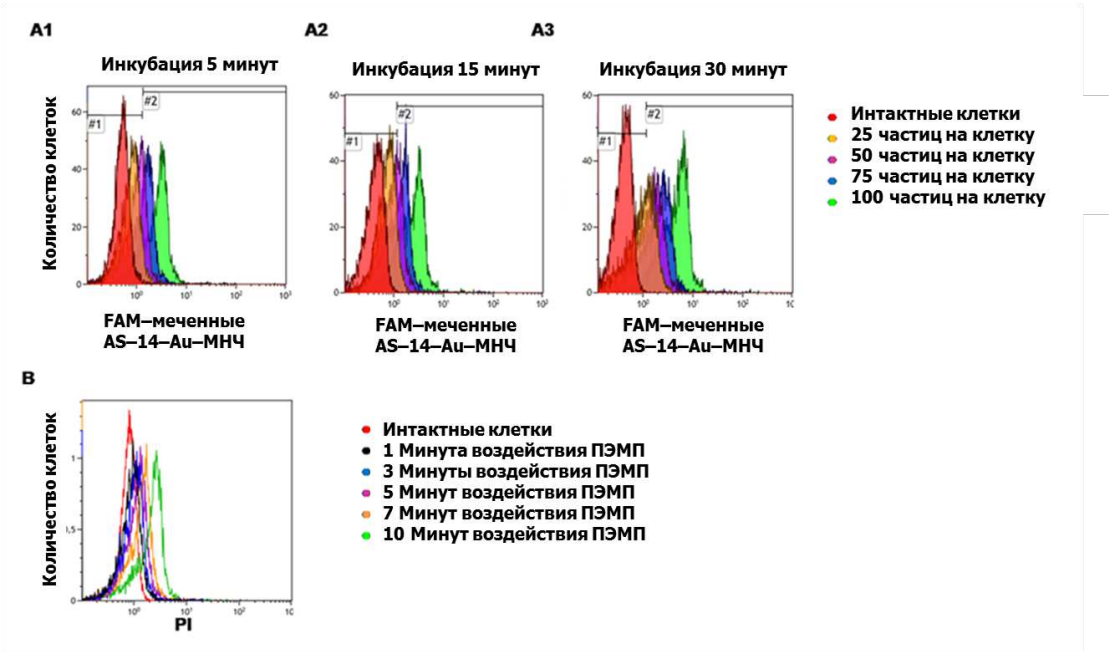

Рисунок – 1. Оптимизация условий магнитодинамической нанотерапии *in vitro*. (А) Определение времени связывания для различных концентраций AS-4-Au-МНЧ на клетку. Гистограммы для связывания 25 частиц на

клетку (оранжевый); 50 частиц на клетку (фиолетовый); 75 частиц на клетку (синий) и 100 частиц на клетку (зеленый) через 5 минут (A1); 15 минут (A2) и 30 минут инкубации (A3). (B) Жизнеспособность асцитных клеток Эрлиха, предварительно инкубированных с AS-14-Au-МНЧ (соотношение 100 частиц на клетку в течение 30 минут) через 1, 3, 5, 7 и 10 минут воздействия НПЭМП.

Таким образом, предварительно проведенные исследования показали, что 100 магнитных наночастиц на клетку является оптимальным, а оптимальное время инкубация, достаточное для их связывания – 30 мин.

Для оптимизации времени воздействия переменного магнитного поля, клетки карциномы Эрлиха, связанные с AS-14-Au-МНЧ (соотношение частиц 1: 100 после 30 минут инкубации), помещали в центр магнитной катушки, создающей НПЭМП 100 Э с частотой 50 Гц и мощностью приблизительно 1,7 Вт, на 1, 3, 5, 7 и 10 минут (рисунок 1B). Оценку погибших клеток проводили с помощью пропидий – йодидного (PI) красителя методом проточной цитометрии. Было выяснено, что оптимальное время воздействия ПЭМП для деструкции опухолевых клеток составляет 10 минут. Деструкция асцитных клеток была заметна уже через два часа после воздействия магнитного поля.

3.2 Исследование биологического эффекта функционализированных ДНК-аптамерами магнитных наночастиц (AS14-Au-МНЧ) в переменном электромагнитном поле *in vivo*

In vivo противоопухолевый эффект AS-14-Au-МНЧ в НПЭМП оценивался на мышах с асцитной карциномой Эрлиха. Асцитные клетки были трансплантированы в бедро для формирования солидной опухоли. Принципиальная схема эксперимента подробно описана в разделах «Материалы и методы». Для оценки биологического эффекта магнитодинамической терапии было сформировано 4 группы: 1 группа –

инъекции модифицированных AS-14-Au-МНЧ, 2 группа – инъекции Au-МНЧ, 3 группа – аптамеры AS-14 и 4 группа – инъекции фосфатного буфера (DPBS). Животные всех групп подвергались в течение 10 минут действию переменного магнитного поля. Процедура терапии повторялась три раза, начиная с 5-го дня после трансплантации опухоли.

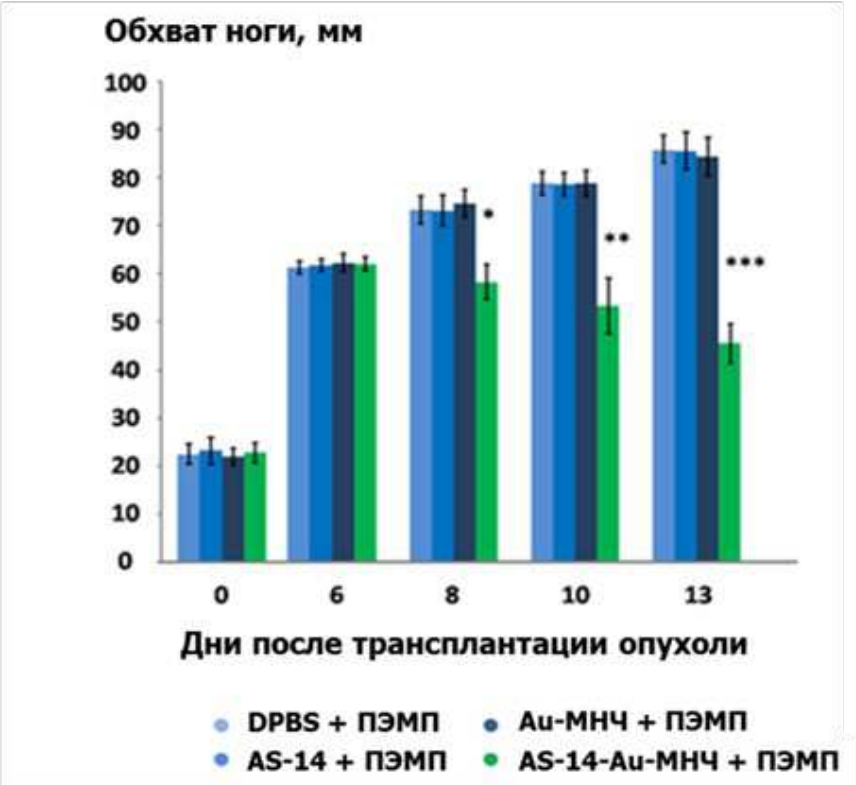

Рисунок – 2. Эффективность магнитодинамической нанотерапии *in vivo*. (A) Изменение размера опухоли во время лечения (* p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001). (B) Изображение восстановления опухоли после лечения НПЭМП.

Влияние магнитодинамической терапии на рост асцитной карциномы Эрлиха представлена на рисунке 2А. Размеры опухоли оценивались путем регулярного измерения обхвата ноги каждый день после лечения. Размер опухоли визуально снижался только у 1-ой группы животных, у которых воздействие переменного магнитного поля сочеталось с инъекциями AS-14-Au-МНЧ. На 6-й день после начала терапии у животных этой группы наблюдалось подкожное кровоизлияние в ноге с опухолью у каждой мыши, которой инъецировали AS-14-Au-МНЧ и воздействовали НПЭМП в течение 10 мин (рисунок 2В). После второй процедуры лечения рост опухоли затормозился и на месте опухоли развивался некроз. После третьей инъекции на месте некротизированной опухоли началось восстановление тканей и через сутки размер кожные покровы практически полностью восстановились. В других группах мышей снижение размеров опухоли не наблюдалось.

3.3 Исследование механизма гибели опухолевых клеток с помощью магнитодинамической терапии

Магнитодинамическая деструкция опухоли могла осуществляться различными способами, включая апоптотическую и некротическую гибель. Для выявления механизма клеточной гибели использовали определение аннексина V, CFDA и каспазы 3 или 7 в опухолевой ткани животных, активирующейся при апоптозе.

Чтобы доказать предложение о том, что колебания AS-14-Au-МНЧ, связанных с фибронектином в НПЭМП, вытягивают (тянут) интегрины через фибронектин и приводят к активации каскада каспаз (рисунок 5), мы провели эксперименты связывания с антителами специфичными к фибронектину, которые блокируют взаимодействие AS-14 с фибронектином (рисунок 3).

Через три часа после проведения процедуры лечения с AS-14-Au-МНЧ и НПЭМП активация каспаз 3 или 7 происходила в 35% клеток. Антитела специфичные к фибронектину, добавленные к клеткам до воздействия НПЭМП, занимали сайты связывания для AS-14-Au-МНЧ и ингибировали каспазный каскад, тогда как анти – актин антитела, используемые в качестве контроля, не вызывали ингибирования каспазного каскада (рисунок 3, A1), что подтверждает наше предположение.

В интактных клетках каспаза 3 или 7 активировалась в 11% клеток, лечение Au-МНЧ и НПЭМП увеличивало интенсивность флуоресценции, но не количество апоптотических клеток (рисунок 3, A2). Следует отметить, что эти эксперименты проводились на клеточных культурах, которые росли в суспензии и, таким образом, экспрессировали меньше внеклеточного фибронектина, чем в солидной опухоли *in vivo* [10]. Анти – фибронектин антитела связываются только с 60% клеток (рисунок 3, 4B).

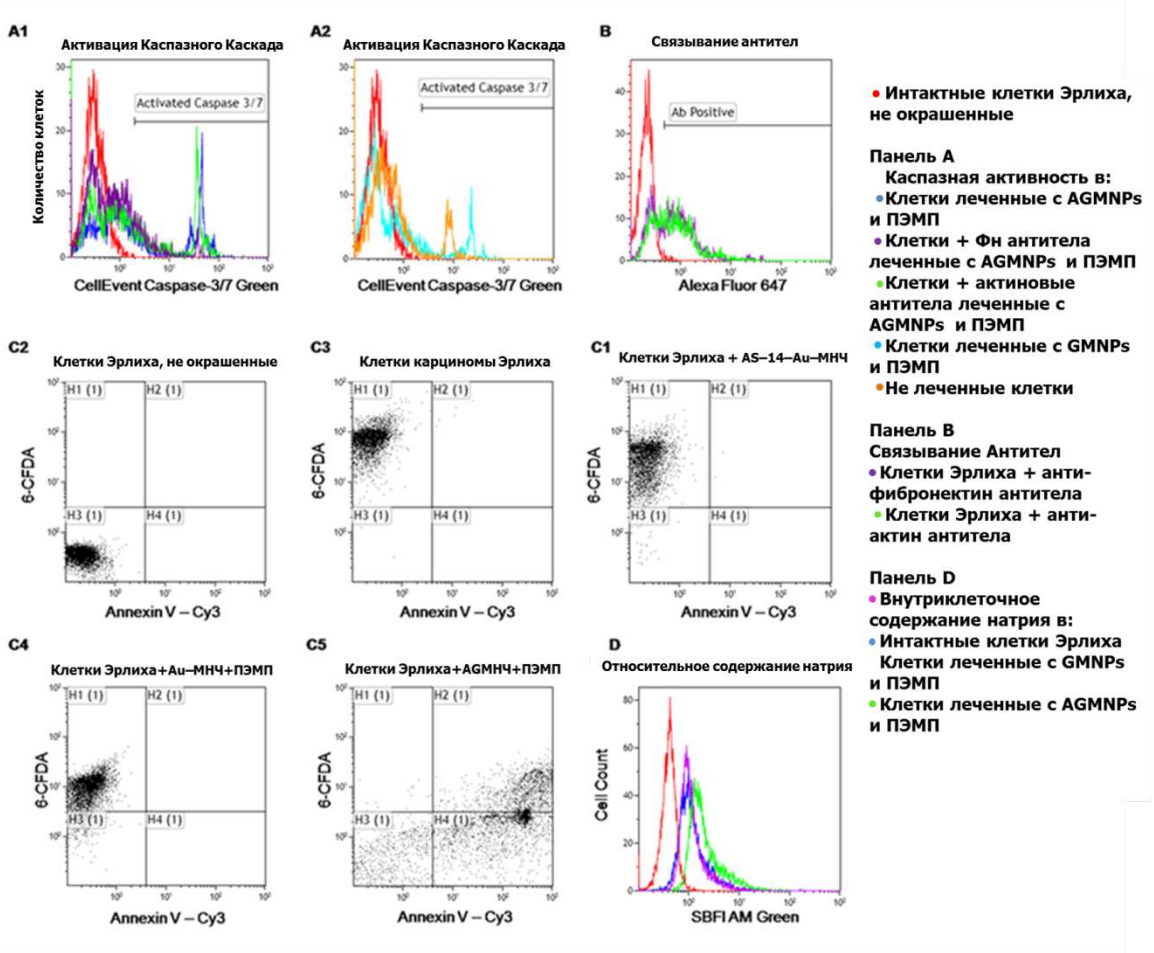

Рисунок – 3. Механизмы и эффективность магнитодинамической нанотерапии in vitro. (A) Апоптоз, исследованный по активности каспазы 3/7; (B) Апоптоз, исследованный с помощью метки аннексина V-Cy3 и окрашивания 6-карбоксифлуоресцеиндиацетатом (6-CFDA) клеток карциномы Эрлиха: (1) Интактные клетки без окрашивания; (2) Жизнеспособность живых клеток; (3) Состояние клеток через 3 часа после воздействия НПЭМП; (4) Состояние клеток через 3 часа после терапии с Au-МНЧ и НПЭМП; (5) Состояние клеток через 3 часа после терапии с AS-14-Au-МНЧ и НПЭМП. (C) Относительное содержание натрия, оцененное по интенсивности флуоресценции SBFI: красная кривая соответствует клеткам без окрашивания, фиолетовая – не леченным клеткам; синяя - клеткам, леченным Au-МНЧ в НПЭМП, зеленая - клеткам, леченным AS-14-Au-МНЧ в НПЭМП.

В экспериментах с клеточной культурой было продемонстрировано, что AS-14-Au-МНЧ в НПЭМП индуцировали гибель клеток карциномы, которая начиналась с апоптотической транслокации фосфатидилсерина и сопровождалась некрозом (рисунок 3, C5). После лечения с AS-14-Au-МНЧ и НПЭМП большинство клеток, связывающихся с аннексином V, были также отрицательными по CFDA, что указывает на то, что они были мертвы. Контрольные эксперименты только с AS-14-Au-МНЧ без магнитного поля и Au-МНЧ без аптамеров с применением НПЭМП не вызывали смерти клеток карциномы, но тем не менее клетки накапливали CFDA в меньшем количестве, чем клетки леченные с AS-14-Au-МНЧ и НПЭМП, поэтому их мембраны могли быть слегка повреждены. Также, содержание катионов натрия в клетках карциномы увеличилось после лечения с AS-14-Au-МНЧ и НПЭМП, что свидетельствует о некрозе (рисунок 3D). Таким образом, смерть клеток карциномы Эрлиха может быть вызвана активацией различных молекулярных путей, включая апоптоз, некроз и аутофагию, характеризующихся морфологическими и биохимическими особенностями [33]. Процессы смерти сопровождаются изменением объема клетки из-за

изменения потоков ионов, особенно ионов натрия. Значительная потеря ионов натрия, калия и хлора необходима для активации каспаз и нуклеаз для развития апоптоза [34]. Напротив, некроз, характеризуется набуханием клетки из-за повышенного содержания натрия. Отсутствие энергии для Na + / K + -АТФаз в клеточном некрозе вызывает набухание клетки с последующим разрывом мембраны и воспалением.

Результаты исследований показали, что через пять часов после терапии с AS-14-Au-МНЧ в НПЭМП каспаза 3 или 7 была активна в опухолевых клетках (рисунок 3А), в то время как только Au-МНЧ или AS-14 с НПЭМП не вызывали этого эффекта.

В экспериментах *in vivo* опухоли не реагировали на терапию с DPBS и НПЭМП. Клетки оставались жизнеспособными, опухоли росли и разрушали мышечную ткань, а иммунный ответ был слабым (рисунок 4, В1– 3). Лечение контрольных групп с помощью аптамеров AS-14 и НПЭМП не выявила значительных изменений в структуре опухоли, лимфоцитарная инфильтрация все еще была низкой, припухлость промежуточных пространств была умеренной, а мышечные волокна были дегенеративными (рисунок 4, В4 – 6).

Терапия только с Au-МНЧ вызвала частичный некроз опухолевых тканей, оставшихся в форме «островов» (рисунок 4, В7-В9). Мы наблюдали опухолевые клетки с вакуолизацией цитоплазмы и признаками кариолиза, что является необратимым результатом разрушительных эффектов лечения (рисунок 4, В9). Воспалительная лимфоцитарная инфильтрация была слабо выражена вокруг опухоли (рисунок 4, В7 – В9).

Значительный терапевтический эффект наблюдался в тканях опухоли после терапии с AS-14-Au-МНЧ и НПЭМП (рисунок 4, В9 – В12). На периферии больших областей наблюдалось небольшое количество некротизированных клеток карциномы с полным разрушением или необратимыми изменениями в виде кариорексиса, кариолизиса, плазморексиса (рисунок 4, В12). Это лечение вызывало значительный иммунный ответ, поскольку наблюдалась видимая воспалительная

инфильтрация сегментированных лейкоцитов на границах некротических областей. Также наблюдались отек и разрушительные изменения микроокружения опухолевой ткани (рисунок 4, В9 – В12).

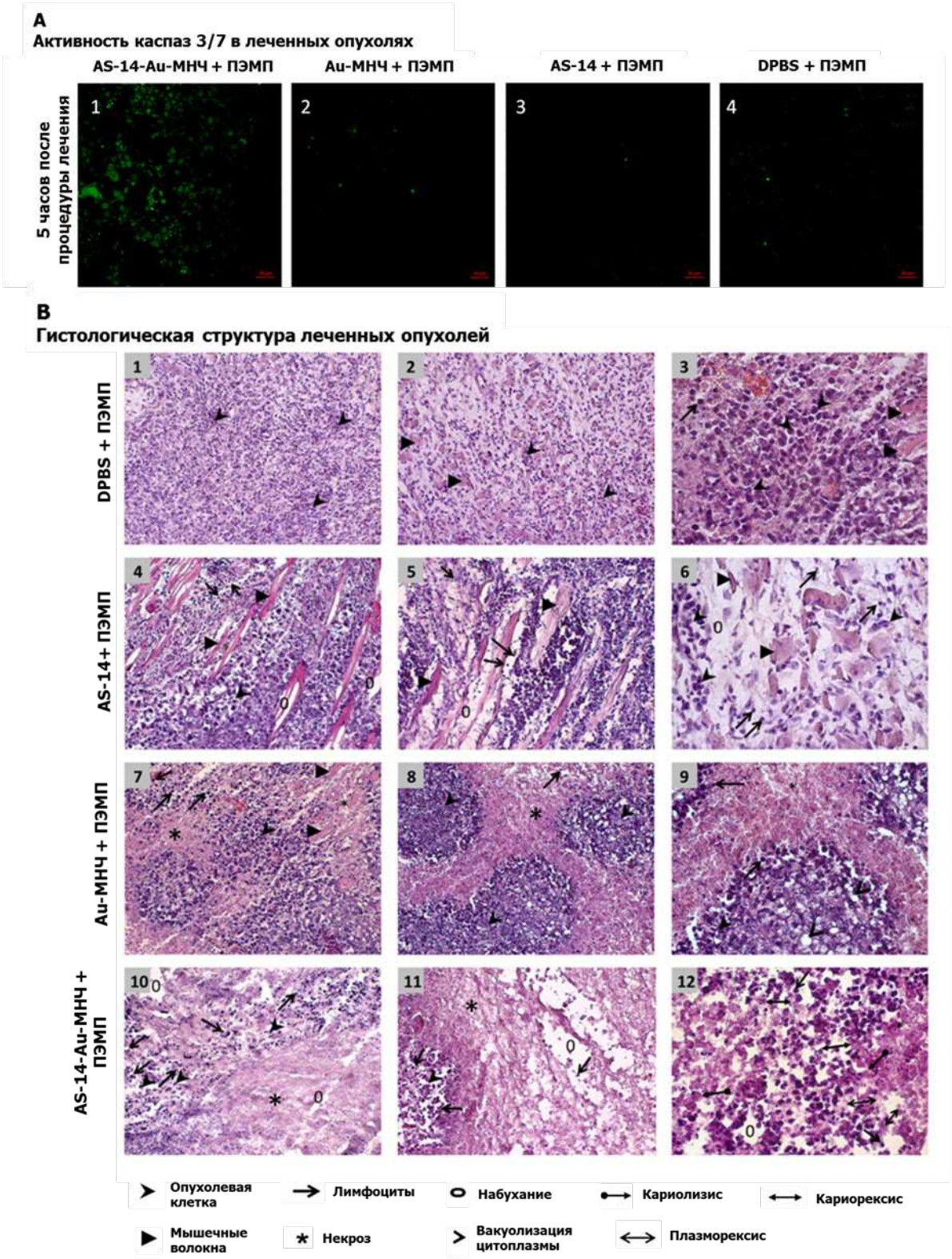

Рисунок – 4. Реакция опухоли на магнитодинамическую нанотерапию. (A) Активность каспазы 3 или 7 в раковых клетках из участков тканей опухолей, собранных через 5 часов после лечения.
(B) Гистологическая структура опухолей прошедших лечение. B1–B3 – DPBS и НПЭМП – карцинома Эрлиха имеет прочную структуру и врастает в мышечную ткань, состоящую из атипичных клеток с плеоморфными, гиперхроматическими ядрами различной формы и объема. Нет иммунного ответа: очень редкие лимфоциты. B4 – B6 – AS–14 и НПЭМП – леченные карциномы имеют умеренное набухание промежуточных пространств, слабую лимфоцитарную инфильтрацию и мышечные волокна с дегенеративными изменениями. B7 – B9 –Au–МНЧ и НПЭМП леченные карциномы проявляют рассеянный некроз опухолей со слабо выраженной воспалительной инфильтрацией, опухолевая ткань остается в форме «островов», в которых большинство раковых клеток с вакуолизацией цитоплазмы и признаками кариолиза. B10 – B12 – AS–14–Au–МНЧ и НПЭМП – леченные карциномы показывают большие области некроза опухолей, набухание, разрушительные изменения микроокружения опухолевой ткани и воспалительную инфильтрацию сегментированных лейкоцитов. На периферии оставшиеся опухолевые клетки мертвы с присутствием кариоррексиса, кариолизиса, плазморексиса. Увеличение: (B1) × 100; (B2, B4, B5, B7, B8, B10, B11) × 200; (B3, B6, B9, B12) × 400.

Также для того чтобы доказать, что разрушение опухолевых клеток происходило не из – за воздействия высокой температуры, формирующейся в результате воздействия НПЭМП при низкой частоте (50 Гц) на AS-14-Au-МНЧ, были проведены математические расчеты, которые показали, что применение НПЭМП не вызывает гипертермию в присутствии Au-МНЧ и

AS-14-Au-МНЧ. Поэтому механическое воздействие НПЭМП на Au-МНЧ, связанное через аптамеры с опухолевыми клетками, можно объяснить следующим образом: фибронектин вызывает подергивание β-домена интегрина, которое приводит к активации [12] и инициированию гибели клеток путем возникновения каспазного каскада первичного апоптоза (рисунок 5А), за которым следует увеличение содержания натрия (рисунок 3В) и некроз раковых клеток (рисунок 4, В10-В12). Значительное повреждение опухоли *in vivo* и уменьшение размера опухоли с помощью НПЭМП произошло только тогда, когда Au-МНЧ были модифицированы аптамерами и доставлены к сайтам связывания опухоли.

3.4 Исследование токсичности Au-МНЧ *in vivo*

Токсичность магнитных наночастиц, функционализированных аптамерами, оценивали по изменениям в биохимии сыворотки крови (таблица 1). Кроме того, мы попытались оценить распределение железа и золота в разных органах после внутривенной инъекции AS-14-Au-МНЧ в DPBS. Электронная микроскопия показала, что однократная доза AS-14-Au-МНЧ (1,6 мкг $кг^{-1}$) недостаточна для обнаружения ионов железа и золота в опухоли, других органах и моче через 1, 5 и 24 часа. Холестерин, сывороточная аланиновая аминотрансфераза (АЛТ), щелочная фосфатаза (АЛР) и билирубин являются стандартными параметрами для оценки гепатотоксичности препарата [85]. АЛТ участвует в энергетическом обмене в печени с более низкой ферментативной активностью в других тканях, поэтому он рассматривается как специфический биомаркер функции печени. Общий билирубин, продукт деградации гемоглобина, является маркером гепатобилиарной травмы и гемолиза [85]. АЛР связан с повреждением клеточной мембраны гепатоцитов [85]. В наших экспериментах 3 инъекции AS-14-Au-МНЧ, вводимых здоровым мышам самкам и самцам, не вызывали изменений этих параметров по сравнению с контрольной группой, получавшей DPBS, и не зависели от пола. Состояние воспаления и

гидратации животных, обработанных наночастицами, оценивали по общей концентрации белка [85], которая не значимо отличалась среди групп мышей самок и самцов, получавших AS-14-Au-МНЧ (таблица 1).

Таблица 1. Параметры биохимии сыворотки крови, выполненные отдельно для мышей самок и самцов, леченных AS-14-Au-МНЧ в фосфатном буфере (DPBS) или DPBS отдельно.

Образец	Холестерин, ммоль/л	Общий белок, г/л	АЛТ, МЕ/л	АСТ, МЕ/л	Общий билирубин мкмоль/л
AS14-Au-МНЧ					
Мыши самки (N = 5)	1.45±0.01	50.75±3.32	18.40±3.67	214.30±74.81	5.67±0.38
Мыши самцы (N = 5)	1.56±0.48	55.97±6.21	31.90±13.17	254.87±122.29	6.05±0.21
DPBS					
Мыши самки (N = 5)	2.30±0.28	53.90±1.27	13.55±4.78	177.67±27.13	6.25±0.70
Мыши самцы (N = 5)	2.32±0.26	55.90±2.76	20.93±6.9	251.40±71.13	6.20±0.53

Таким образом, биохимические тестируемые параметры указывают на то, что лечение с AS-14-Au-МНЧ безопасно, не вызывает гепатотоксических эффектов и не зависит от пола мышей (самки или самцы).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наше исследование демонстрирует эффективность целенаправленного магнитодинамического разрушения раковых клеток на примере асцитной карциномы Эрлиха с использованием Au-МНЧ *in vitro* и *in vivo* в низкочастотном переменном магнитном поле. Математическое моделирование показало, что синусоидальное магнитное поле 100 Э при частоте 50 Гц вызывает магнитодинамическое разрушение клеток с минимально возможными тепловыми эффектами на клетки и ткани. Для адресной доставки Au-МНЧ мы использовали аптамеры AS-14 специфичные к фибронектину асцитной карциномы Эрлиха, специфика которого заключается в посттрансляционных модификациях в 5 доменах фибронектина типа III (ФнIII5): треонин ацетилируется в положении 32 и фосфорилируется в положении 36. Описание этих модификаций в настоящее время отсутствует в Белковом банке данных http://www.rcsb.org/pdb/protein/P02751, что свидетельствует о их уникальности [9].

В данном исследовании аптамеры AS-14 доставляют Au-МНЧ в опухоль карциномы Эрлиха и связывают частицы с молекулами ФнIII5. Низкочастотное переменное магнитное поле вызывает колебания Au-МНЧ в комплексе с аптамерами, связанными с ФнIII5. Математическое моделирование магнитомеханического действия AS-14-Au-МНЧ на клетках показало, что низкочастотное переменное электромагнитное поле не вызывало локальную гипертермию. НПЭМП вращает наночастицу,

связанную с ФнIII5 по часовой стрелке, вытягивая β-субъединицу интегрина через фибронектин и возвращая ее в исходное положение (рисунок 5).

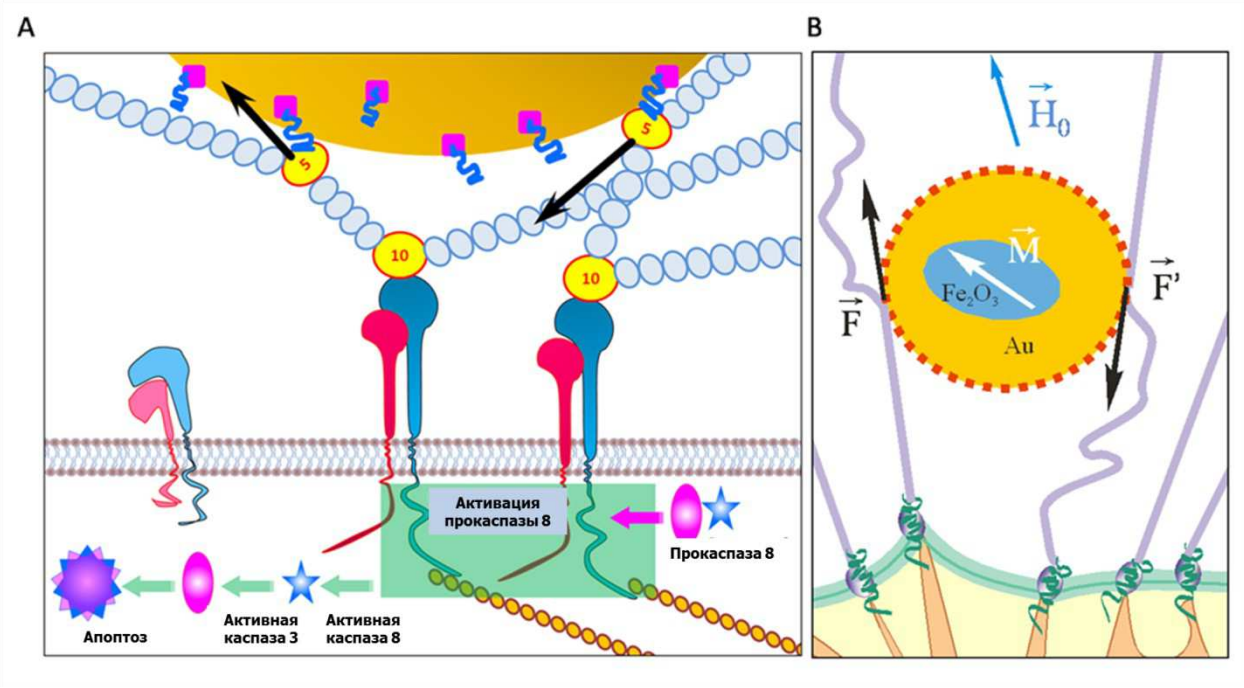

Рисунок - 5. Схематическое изображение апоптического каскада каспаз. (A) Каскад вызван колебаниями фибронектина в низкочастотном переменном магнитном поле, контролируемом AS-14- Au-МНЧ. (B) Силы, применяемые к AS-14- Au-МНЧ в присутствии низкочастотного переменного магнитного поля, где $\vec{F}$ - сила, тянущая фибронектин; $\vec{M}$ - магнитный момент Au-МНЧ; и $\vec{H}_0$ - внешнее магнитное поле.

ВЫВОДЫ:

1. Разработан способ модификации покрытых золотом магнитных наночастиц ДНК-аптамерами, основанный на использовании тиоловых групп (–SH) в качестве связующего линкера аптамеров с магнитными наночастицами;
2. По результатам проточной цитометрии было показано, что магнитодинамическая терапия *in vitro* вызывает разрушение клеток асцитной карциномы Эрлиха;
3. По результатам лазерной сканирующей микроскопии гистологических срезов карцином Эрлиха прошедших 3 процедуры лечения магнитодинамической терапии *in vivo* была показана эффективность терапии в виде некротизированных клеток карциномы с полным разрушением или необратимыми изменениями в виде кариорексиса, кариолизиса, плазморексиса.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. El – Sayed, M. Small is different: Shape-, size-, and composition-dependent properties of some colloidal semiconductor nanocrystals / M. El – Sayed // Accounts of Chemical Research. – 2004. – № 37. – P. 326 – 333.
2. Davis, M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer / M. Davis, Z. Chen, D. Shin // Nature Reviews Drug Discovery. – 2008. – № 7. – P. 771 – 782.
3. Liu, Q. Aptamer-conjugated nanomaterials for specific cancer cell recognition and targeted cancer therapy / Q. Liu, C. Jin, Y. Wang, X. Fang, X. Zhang, Z. Chen // Npg Asia Materials. – 2014. – № 6.
4. Banerjee, R. Nanomedicine: Magnetic Nanoparticles and their Biomedical Applications / R. Banerjee, Y. Katsenovich, L. Lagos, M. McIintosh, X. Zhang, C. Li // Current Medicinal Chemistry. – 2010. – № 17. – P. 3120 – 3141.
5. Dreaden, E. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine / E. Dreaden, A. Alkilany, X. Huang, C. Murphy, M. El-Sayed // Chemical Society reviews. – 2012. – № 41. – P. 2740 – 2779.
6. Wu, P. High specific detection and near-infrared photothermal therapy of lung cancer cells with high SERS active aptamer-silver-gold shell-core

nanostructures / P. Wu, Y. Gao, Y. Lu, H. Zhang, C. Cai // Analyst. – 2013. – № 138. – P. 6501 – 6510.

7. Malik, M. AS1411 – conjugated gold nanospheres and their potential for breast cancer therapy / M. Malik, M. O'Toole, L. Casson, S. Thomas, G. Bardi, E. Reyes-Reyes // Oncotarget. – 2015. – № 6. – P. 22270 – 22281.
8. Gu, F. Targeted nanoparticles for cancer therapy / F. Gu, R. Karnik, A. Wang, F. Alexis, E. Levy – Nissenbaum, S. Hong // Nano today. – 2007. – № 2. – P. 14 – 21.
9. Kolovskaya, O.S. DNA-Aptamer/Protein Interaction as a Reason of Apoptosis and Proliferation Stop in Ehrlich Ascites Carcinoma Cells / O.S. Kolovskaya, T.N. Zamay, A.S. Zamay, Y.E. Glazyrin, E.A. Spivak, O.A. Zubkova // Biologicheskie Membrany. – 2013. – № 30. – P. 398 – 411.
10. Zardi, L. Concentration of fibronectin in plasma of tumor-bearing mice and synthesis by Ehrlich ascites tumor cells. Cancer Research / L. Zardi, C. Cecconi, O. Barbieri, B. Carnemolla, M. Picca, L. Santi // – 1979. – № 39. – P. 3774 – 3779.
11. Hynes, R. The emergence of integrins: a personal and historical perspective / R, Hynes // Matrix Biology. – 2004. – № 23. – P. 333 – 340.
12. Puklin – Faucher, E. How the headpiece hinge angle is opened: new insights into the dynamics of integrin activation / E. Puklin-Faucher, M. Gao, K. Schulten, V. Vogel // J. Cell Biol. – 2006. – № 175. – P. 349 – 360.
13. Campbell, I. Integrin Structure, Activation, and Interactions / I. Campbell, M. Humphries // Cold Spring Harbor perspectives in biology. – 2011. – № 3.
14. Danen, E. Integrin Proteomes Reveal a New Guide for Cell Motility / E. Danen // Science signaling. – 2009. – № 2.
15. Danen, E. Mechanisms of Melanoma Cell-Adhesion to Fibronectin / E. Danen, D. Ruiter, G. Vanmuijen // Biochemical Society transactions. – 1995. – № 23. – P. 403-S.

16. Danen, E. Integrins in regulation of tissue development and function / E. Danen, A. Sonnenberg // Journal of Pathology. – 2003. – № 201. – P. 632 – 641.
17. Danen, E. Dual stimulation of Ras/Mitogen-activated protein kinase and RhoA by cell adhesion to fibronectin supports growth factor-stimulated cell cycle progression / E. Danen, P. Sonneveld, A. Sonnenberg, K. Yamada // J Cell Biol. – 2000. – № 151. – P. 1413 – 1422.
18. Danen, E. Integrins control motile strategy through a Rho-cofilin pathway / E. Danen, J. van Rheenen, W. Franken, S. Huveneers, P. Sonneveld, K. Jalink // J Cell Biol. – 2005. – № 169. – P. 515 – 526.
19. Zhang, Y. Isthmin exerts pro-survival and death-promoting effect on endothelial cells through alphavbeta5 integrin depending on its physical state / Y. Zhang, M. Chen, S. Venugopal, Y. Zhou, W. Xiang, Y. Li // Cell death & disease. – 2011. – № 2.
20. Gubin, S.P. et al. Magnetic nanoparticles: Preparation, structure and properties / S.P. Gubin, Y.A. Koksharov, G.B. Khomutov, G.Y. Yurkov // Russ. Chem. Rev. – 200. – № 74. – P. 489 – 520.
21. Issa, B. et al. Magnetic nanoparticles: surface effects and properties related to biomedicine applications / B. Issa, I.M. Obaidat , B.A. Albiss , Y. Haik // Int. J. Mol. Sci. – 2013. – № 14. – P. 21266 – 21305.
22. Баранов, Д. А. Магнитные наночастицы: достижения и проблемы химического синтеза / Д. А. Баранов, С. П. Губин // Наносистемы. Т. 1. – 2009. – №1. – С. 129 – 147.
23. Banerjee, R et al. Nanomedicine: Magnetic Nanoparticles and their Biomedical Applications / R. Banerjee, Y. Katsenovich, L. Lagos, M. McIntosh, X. Zhang, C.Z. Li // Current Medicinal Chemistry. – 2010. – № 17. – P. 3120 – 3141.
24. Xie, J. Controlled Synthesis and Surface Modification of Magnetic Nanoparticles with High Performance for Cancer Theranostics Combining Targeted MR Imaging and Hyperthermia / J. Xie, N. Gu, Y. Zha // Springer

Series in Biomaterials Science and Engineering. – 2016. – № – 2. – P. 39 – 73.

25. Hajba, L. The use of magnetic nanoparticles in cancer theranostics: Toward handheld diagnostic devices / L. Hajba, A. Guttman // Biotechnology Advances. – 2016. – № 34. – P. 354 – 361.
26. Wang, W. Surface modification and bioconjugation of FeCo magnetic nanoparticles with proteins / W. Wang, Y. Jing, S. He, J.P. Wang, J.P. Zhai. // Colloids Surf B Biointerfaces. – 2014. – № 117. – P. 449 – 456.
27. Rozhkova, E. Ferromagnetic microdisks as carriers for biomedical applications / E. Rozhkova // Journal of Applied Physics. – 2009. – № 105.
28. Vitol, E. Microfabricated magnetic structures for future medicine: from sensors to cell actuators / E. Vitol, V. Novosad, E. Rozhkova // Nanomedicine. – 2012. – № 7. – P. 1611 – 1624.
29. Reddy, L. Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications / L. Reddy, J. Arias, J. Nicolas, P. Couvreur // Chemical Reviews. – 2012. – № 11. – P. 5818 – 5878.
30. De, M. Nanotechnology-Based Precision Tools for the Detection and Treatment of Cancer / M. De, S. Chu, M. Jaiswal, M. Rotz, T. J. Meade, V. P. Dravid // – 2015. – P. 51 – 83.
31. Herranz, F. Superparamagnetic Nanoparticles for Atherosclerosis Imaging / F. Herranz, B. Salinas, H. Groult, J. Pellico, A.V. Lechuga – Vieco, R. Bhavesh, J. Ruiz-Cabello // Nanomaterials (Basel). – 2014. – № 2. – P. 408 – 438.
32. Roshana, A. H. Particuology Synthesis of iron oxide nanoparticles via sonochemical method and their characterization / A. H. Roshana, M. R. Vaezib, A. Shokuhfarc, Z. Rajabalic // – 2011. – № 1. – P. 95 – 99.
33. Stephen, Z.R. Approach to Rapid Synthesis and Functionalization of Iron Oxide Nanoparticles for High Gene Transfection / Z.R. Stephen, C.J.

Dayringer, J.J. Lim, R.A. Revia, M.V. Halbert, M. Jeon, A. Bakthavatsalam, R. G. Ellenbogen, M. Zhang // ACS Appl Mater Interfaces. – 2016. – № 10. – P. 6320 – 6328.

34. Kang, T. Surface design of magnetic nanoparticles for stimuli-responsive cancer imaging and therapy / T. Kang, F. Li, S. Baik, W. Shao, D. Ling, T. Hyeon // Biomaterials. – 2017. – № 136. – P. 98 – 114.
35. Jyoti Verma. Wound healing applications of sericin/chitosan-capped silver nanoparticles incorporated hydrogel / J.Verma, J. Kanoujia, P. Parashar, C.B.Tripathi, S.A.Saraf // Drug Deliv Transl Res. – 2017. – № 1. – P. 77 – 88.
36. Moon, J. Large-scale production of magnetic nanoparticles using bacterial fermentation / C. J. Rawn, A. J. Rondinone, L.J. Love, Y. Roh, S. M.Everett,
    a. R. J. Lauf, T. J. Phelps // Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. – 2010. – № 37. – P. 1023 – 1031.
37. Moon, J. Microbial preparation of metal-substituted magnetite nanoparticles / J. Moon, Y. Rohb, R. J. Laufa, H. Valic, L. W. Yearyd, T. J. Phelpsa // Journal of Microbiological Methods. – 2007. – № 70. – P. 150 – 158.
38. Shimoshig, H. Formation of Core-Shell Nanoparticles Composed of Magnetite and Samarium Oxide in Magnetospirillum magneticum Strain RSS-1 / H. Shimoshige, Y. Nakajima, H. Kobayashi, K. Yanagisawa, Y. Nagaoka, S. Shimamura, T. Mizuki, A. Inoue, T. Maekawa // PLoS One. – 2017. – № 12.
39. 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. – № 36. – P. 167 – 181.
40. Lee, H. Recent Developments in Magnetic Diagnostic Systems / H. Lee, T. Shin, J. Cheon, R. Weissleder // Chemical Reviews. – 2015. – № 115. – P. 10690 – 10724.

41. Xie, J. Multi-modal Mn-Zn ferrite nanocrystals for magnetically-induced cancer targeted hyperthermia: a comparison of passive and active targeting effects / J. Xie, C. Yan, Y. Yan, L. Chen, L. Song, F. Zang, Y. An, G. Teng, N. Gu, Y. Zhang // Nanoscale. – 2016. – № 8. – P. 16902 – 16915.
42. Harris, J. Effect of pegylation on pharmaceuticals / J. Harris, R. Chess // Nature Reviews Drug Discovery. – 2003. –№ 2. – P. 214–221.
43. Zhang, Y. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake / Y. Zhang, N. Kohler, M. Zhang // Biomaterials. – 2002. – № 23. – P. 1553 – 1561.
44. Can, H. K. Preparation, characterization and dynamical mechanical properties of dextran-coated iron oxide nanoparticles (DIONPs) / H. K. Can, S. Kavlak, S. P.Khosroshahi, A. Güne // Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology. – 2017.
45. Bi, S. In – situ formation of Fe3O4 nanoparticles within the thermo sensitive hairy hybrid particles / S. Bi, X. Wei, N. Li, Z. Lei // Materials Letters. – 2008. – P. 2963 – 2966.
46. Sun, C. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery / C. Sun, J. Lee, M. Zhang // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2008. – № 60. – P. 1252 – 1265.
47. Fortin-Ripoche, J. Magnetic targeting of magnetoliposomes to solid tumors with MR imaging monitoring in mice: Feasibility / J. P. Fortin-Ripoche, M.S. Martina, F. Gazeau, C. Me´nager, C. Wilhelm, J. C. Bacri, S. Lesieur, O. Cle´ment // Radiology. – 2006. – № 239. – P. 415 – 424.
48. Lu, A. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application / A. Lu, E. Salabas, F. Schuth // Angewandte Chemie-International Edition. – 2007. – № 46. – P. 1222 – 1244.
49. Silva, S. M. Gold Coated Magnetic Nanoparticles: Preparation, Surface Modification for Analytical and Biomedical Applications / S. M. Silva, R. Tavallaie, L. Sandiford, R.D. Tilleya, J.J. Gooding // – 2013.

50. Shah, B. P. Core–Shell Nanoparticle-Based Peptide Therapeutics and Combined Hyperthermia for Enhanced Cancer Cell Apoptosis / B. P. Shah, N. Pasquale, G. De, T. Tan, J. Ma, K. B. Lee // ACS Nano. – 2014. – № 8. – P. 9379 – 9387.
51. Chen, K. Triblock copolymer coated iron oxide nanoparticle conjugate for tumor integrin targeting / K. Chen , J. Xie , H. Xu , D. Behera , M. Michalski , S. Biswal , A. Wang , X. Chen // Biomaterials. – 2009. – № 30. – P. 6912
52. McCarthy, J. Targeted nanoagents for the detection of cancers / J. McCarthy, J. Bhaumik, M. Karver, S. Erdem, R. Weissleder // Molecular Oncology. – 2010. – № 4. – P. 511 – 528.
53. Yu, M. Targeting Strategies for Multifunctional Nanoparticles in Cancer Imaging and Therapy / M. Yu, J. Park, S. Jon // Theranostics. – 2012. – № 2. – P. 3 – 44.
54. Shen, Z. A galactosamine-mediated drug delivery carrier for targeted liver cancer therapy / Z. Shena, W. Weic, H. Tanakab, K. Kohamab, G. Mac, T. Dobashid, Y. Makid, H. Wangb, J. Bia, S. Daia // Pharmacological Research. – 2011. – № 64. – P. 410 – 419.
55. Kim, E. Asialoglycoprotein receptor targeted gene delivery using galactosylated polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol): In vitro and in vivo studies / H.J. Jeong, I.Park, C. Cho, H. Moon, D.Yu, H. Bom, M. Sohn, J. Oh // Journal of Controlled Release. – 2005. – № 108. – P. 557 – 567.
56. Yang, Y. Galactosylated Poly(2-(2-aminoethyoxy)ethoxy)phosphazene / DNA Complex Nanoparticles: In Vitro and In Vivo Evaluation for Gene Delivery / Y. Yang, Z. Zhang, L. Chen, W. Gu, Y. Li // Biomacromolecules. – 2010. – № 11. – P. 927 – 933.
57. Nandwana, V. Nanotechnology-Based Precision Tools for the Detection and Treatment of Cancer / V. Nandwana, M. De, S.Chu, M. Jaiswal, M. Rotz, T. J. Meade, V. P. Dravid // – 2015. – P. 51 – 83.

58. Chandola, C. Application of aptamers in diagnostics, drug-delivery and imaging / C. Chandola, S. Kalme, M. Casteleijn, A. Urtti, M. Neerathilingam // Journal of Biosciences. – 2016. – № 41. – P. 535 – 561.
59. Cole, A. Cancer theranostics: the rise of targeted magnetic nanoparticles / A. Cole, V. Yang, A. David // Trends in Biotechnology. – 2011. – № 29. – P. 323 – 332.
60. Chertok, B. Glioma selectivity of magnetically targeted nanoparticles: a role of abnormal tumor hydrodynamics / B. Chertoka, A. E. Davida, Y. Huanga, V.C. Yanga // J Controlled Release. – 2007. – № 3. – P. 315 – 323.
61. Dobson, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery / J. Dobson // Drug Dev Res. – 2006. – № 1. – P. 55 – 60.
62. Yang, K. Computer simulation of the translocation of nanoparticles with different shapes across a lipid bilayer / K. Yang, Y.Q. Ma // NatNanotechno. – 2010. – № 8. – P. 579 – 583.
63. Gao, H. Mechanics of receptor-mediated endocytosis / H. Gao, W. Shi, L.B. Freund // Proc Natl Acad Sci USA. – 2005. – № 27. – P. 9469 – 9474.
64. Stroberg, Y.L.W. Multiscale modeling and uncertainty quantification in nanoparticle-mediated drug/gene delivery / Y. L. W. Stroberg, T. R. Lee, H. S. Kim, H. Man, D. Ho, P. Decuzzi, W. K.Liu // Computational Mechanics. – 2014. – № 3. – P. 511 – 537.
65. Shi, X. Cell entry of one-dimensional nanomaterials occurs by tip recognition and rotation / X. Shi, A. Bussche, R.H. Hurt, A.B. Kane, H. Gao // Nat Nanotechnol. – 2011. – № 11. – P. 714 – 719.
66. Arruebo, M. Magnetic nanoparticles for drug delivery / M. Arruebo, R. Fernández – Pacheco, M. R. Ibarra, J. Santamaría // Nano Today. – 2007. – № 3. – P. 22 – 32.
67. Gupta, A K. Surface-modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: preparation, characterization, and cytotoxicity studies / A.K. Gupta, S. Wells // IEEE Trans Nanobiosci. – 2004. – № 3. – P. 66 – 73.
68. Weissleder, R. Adv. Drug Delivery Rev. – 1995. – № 16.

69. Chouly, C. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution / C. Chouly, D. Pouliquen, I. Lucet, J. J. Jeune, P. J. Jallet // Microencapsulation. – 1996. – № 13. – P. 245 – 255.
70. Suna, H. Aptamers: versatile molecular recognition probes for cancer detection / H. Suna, W. Tan, Y. Zua // Analyst. – 2016. – № 2. –P. 403 – 415.
71. Ang, C.Y. Recent advances in biocompatible nanocarriers for delivery of chemotherapeutic cargoes towards cancer therapy / C.Y. Ang, S.Y. Tan, Y. Zhao // Org Biomol Chem. – 2014. – № 27. – P. 4776 – 4806.
72. Jalalian, S. Epirubicin loaded super paramagnetic iron oxide nanoparticle-aptamer bioconjugate for combined colon cancer therapy and imaging in vivo / S. H. Jalalian, S.M. Taghdisi, N.S. Hamedan, S. A.M. Kalat, P. Lavaee, M. ZandKarimi, N. Ghows, M. R. Jaafari, S. Naghibi, N.M. Danesh, M. Ramezani, K. Abnous // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2013. – № 50. – P. 191 – 197.
73. Guo, J. Aptamer-functionalized PEG-PLGA nanoparticles for enhanced anti-glioma drug delivery / J. Guo, X. Gao, L. Su, H. Xia, G. Gu, Z. Pang, X. Jiang, L. Yao, J. Chen, H. Chen // Biomaterials. – 2011. – P. 8010 – 8020.
74. Xie, X. EpCAM aptamer-functionalized mesoporous silica nanoparticles for efficient colon cancer cell-targeted drug delivery / X. Xie, F. Li, H. Zhang, Y. Lu, S. Lian, H. Lin, Y. Gao, L. Jia // Eur J Pharm Sci. – 2016. – № 15. – P. 28 – 35.
75. Yu, M.K. Image-guided prostate cancer therapy using aptamer-functionalized thermally cross-linked superparamagnetic iron oxide nanoparticles / M.K. Yu, D. Kim, I.H. Lee, J.S. So, Y.Y. Jeong, S. Jon // Small. – 2011. – № 15. – P. 2241 – 2249.

76. Catuogno, S. Aptamer-Mediated Targeted Delivery of Therapeutics: An Update / // S. Catuogno, C.L. Esposito, V. Franciscis. Pharmaceuticals (Basel). – 2016. – № 4. – P. 69 – 73.
77. Gupta, A. Recent advances on surface engineering of magnetic iron oxide nanoparticles and their biomedical applications / A. Gupta, R. Naregalkar, V. Vaidya, M. Gupta // Nanomedicine.– 2007. – № 2. – P. 23 – 39.
78. Hauser, A. Magnetic nanoparticles and nanocomposites for remote controlled therapies / A. Hauser, R. Wydra, N. Stocke, K. Anderson, J. Hilt, // Journal of Controlled Release. – 2015. – № 219. – P. 76 – 94.
79. Kumar, C. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery / C. Kumar, F. Mohammad // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2011. – № 63. – P. 789 – 808.
80. Guo, F. Enhancement of Thermal Damage to Adenocarcinoma Cells by Iron Nanoparticles Modified with MUC1 Aptamer / F. Guo, Y. Hu, L. Yu, X. Deng, J. Meng, C. Wang, X.D. Yang // J Nanosci Nanotechnol. – 2016. – № 3. – P. 2246 – 2253.
81. Pala, K. Tumor-specific hyperthermia with aptamer-tagged superparamagnetic nanoparticles / K. Pala, A. Serwotka, F. Jeleń, P. Jakimowicz, J. Otlewski // Int J Nanomedicine. – 2014. – № 9. – P. 67 – 76.
82. Balasubramanian Sivakumar
83. Kim, P.D. The antitumor effect of magnetic nanodiscs and DNA aptamer conjugates / P.D. Kim, S. S. Zamay, T.N. Zamay, V.S. Procopenko, O.S. Kolovskaya, G.S. Zamay, V.Y. Princ, V.A. Seleznev, A.I. Komov, E.A. Spivak, R.Y. Rudenko, A.V. Dybinina, A.V. Komarov, V.V. Denisenko, M.A. Komarova, A.E. Sokolov, A.A. Narodov, V.P. Zjivaev, A.S. Zamay // Doklady Biochemistry and Biophysics. – 2016. – № 446. – P. 616 – 619.
84. Zamay, T.N. Noninvasive Microsurgery Using Aptamer-Functionalized Magnetic Microdiscs for Tumor Cell Eradication / T.N. Zamay, G. S., I.V.

Belyanina, S.S. Zamay, V.V. Denisenko, O.S. Kolovskaya, T.I. Ivanchenko, V.L. Grigorieva, I.V. Garanzha, D.V. Veprintsev, Y.E. Glazyrin, A.V. Shabanov, V.Y. Prinz, V.A. Seleznev, A.E. Sokolov, V.S. Prokopenko, P.D. Kim, A.B. Gargaun, M.V. Berezovski, A.S. Zamay // Nucleic Acid Therapeutics. – 2016. – № 2. – P. 1 – 10.

85. Hayes, A. W. Principles and Methods of Toxicology, Sixth Edition / A. W. Hayes, L. Claire, K. Hayes // – 2014. – № 15. – P. 824 – 827.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
Кафедра биофизики

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____
подпись инициалы, фамилия
« 20 » июня 20 17 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Адресная противоопухолевая терапия с использованием магнитных наночастиц и ДНК аптамеров

06.04.01 Биология
06.04.01.03 Биофизика

Научный руководитель _____ к.б.н. _____ Замай Т.Н.
подпись должность, ученая степень инициалы, фамилия

Выпускник _____ Белянина И.В.
подпись инициалы, фамилия

Рецензент _____ к.б.н. доцент Елсукова Е.И.
подпись должность, ученая степень инициалы, фамилия

Красноярск 2017