

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

А. Н. Шуваев

инициалы, фамилия

« _____ » _____ 20__ г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Влияние магнитных наночастиц на клетки экспериментальной опухоли в
переменном магнитном поле

03.04.02 Физика

03.04.02.09 Технологическое сопровождение ядерной медицины и
медицинского оборудования

Научный руководитель	_____	профессор, д.ф.-м.н.	С. В. Столяр
	подпись, дата	должность, ученая степень	
Выпускник	_____		Н. В. Латышев
	подпись, дата		
Рецензент	_____	н.с. к.ф.-м.н.	И. Г. Важенина
	подпись, дата	должность, ученая степень	
Научный консультант	_____	с.н.с., к.б.н.	О.В. Крюкова
	подпись, дата	должность, ученая степень	

Красноярск 2021

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Влияние магнитных наночастиц на клетки экспериментальной опухоли в переменном магнитном поле» содержит 69 страницы текстового документа, 23 иллюстраций, 1 таблицу, 100 использованных источников.

ЭЛЕКТРОННЫЙ ПАРАМАГНИТНЫЙ РЕЗОНАНС, АСЦИТНАЯ КАРЦИНОМА ЭРЛИХА, МАГНИТНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ХИТОЗАНА, МАГНИТНОЕ ПОЛЕ, МЕТАЛЛСОДЕРЖАЩИЕ БЕЛКИ, СВОБОДНЫЕ РАДИКАЛЫ, ДЕНИТРОЗИЛЬНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ЖЕЛЕЗА, ОКСИД АЗОТА, АКТИВНЫЕ ФОРМЫ КИСЛОРОДА

Объект исследования – клетки асцитной карциномы Эрлиха.

Цель работы – оценить цитотоксический эффект магнитных наночастиц оксида железа с хитозаном на клетки асцитной карциномы Эрлиха при воздействии магнитного поля.

Задачи:

1. Выявить закономерности изменения содержания металлсодержащих белков и свободно-радикальных форм в процессе роста опухоли методом электронного парамагнитного резонанса.
2. Проанализировать спектры электронного парамагнитного резонанса клеток асцитной карциномы Эрлиха после инкубации с магнитными наночастицами при воздействии магнитного поля;
3. Определить содержание активных форм кислорода в суспензии асцитной карциномы Эрлиха при воздействии магнитными наночастицами и магнитным полем;
4. Оценить жизнеспособность клеток асцитной карциномы Эрлиха после воздействия магнитными наночастицами и магнитным полем.

В ходе работы было установлено, что метод электронного парамагнитного резонанса можно использовать для регистрации содержания свободно-радикальных форм и металлсодержащих белков, при этом необходимо учитывать магнитные свойства исследуемых наночастиц. Выявлены закономерности изменения содержания металлсодержащих белков и свободно радикальных форм в процессе роста опухоли методом ЭПР. Для асцитной карциномы Эрлиха оптимальным периодом исследований стали 10 сутки роста опухоли. Магнитные наночастицы с хитозаном проявляют антиоксидантные свойства при инкубации в суспензии. Полученные в ходе экспериментов данные показали, что магнитные наночастицы железа с хитозаном оказывают не значительный цитотоксический эффект на клетки асцитной карциномы Эрлиха.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. Литературный обзор	7
1.1 Магнитные наночастицы.....	7
1.1.1 Свойства магнитных наночастиц	8
1.1.2 Виды синтеза магнитных наночастиц и их модификация.....	9
1.1.3 Применение магнитных наночастиц в медицине	11
1.2 Проблемы связанные с использованием магнитных наночастиц.....	16
1.2.1 Биологические эффекты магнитных наночастиц и риски их применения	16
1.2.2 Транспорт магнитных наночастиц в клетки и их влияние на фагоцитарную активность и метаболизм во время фагоцитоза.....	17
1.2.3 Активные формы кислорода.....	21
1.2.4 Оксид азота	23
1.2.4.1 Роль оксида азота.....	23
1.2.4.2 Синтез оксида азота.....	25
1.2.5 Выведение магнитных наночастиц из организма.....	26
1.3 Клетки асцитной карциномы Эрлиха, как объект исследования.....	27
1.4 Электронный парамагнитный резонанс	29
2 Материалы и методы	31
2.1 Ход эксперимента	31
2.2 Магнитные наночастицы оксида железа с хитозаном	33
2.3 Фурье-спектрометр Eleksys E580	33
2.4 Подготовка образцов для получения спектров электронного парамагнитного резонанса	35
2.5 Анализ данных электронного парамагнитного резонанса.....	36
2.6 Установка генерации магнитного поля	37
2.7 Хемилюминесцентный анализ активных форм кислорода	38
2.8 Проточная цитофлуориметрия	40
2.8.1 Проточный цитометр CytoFLEX.....	40
2.8.2 Оценка жизнеспособности клеток при помощи ДНК-связывающих красителей - YO-PRO-1 и PI	41
2.9 Статистическая обработка результатов.....	43

3 Результаты и обсуждения.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.1 Изменение компонент наблюдаемых при электронном парамагнитном резонансе на различных стадиях роста асцитной карциномы Эрлиха	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Воздействие магнитными наночастицами хитозана и магнитным полем на клетки асцитной карциномы Эрлиха	Ошибка! Закладка не определена.
3.3 Продукция активных форм кислорода в суспензии АКЭ.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.4 Оценка жизнеспособности клеток асцитной карциномы Эрлиха	Ошибка! Закладка не определена.
ВЫВОДЫ.....	45
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	46
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	47

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы в медицине широкое применение находят магнитные наночастицы (МНЧ) оксидов железа, однако их применение затрудняется различными факторами, связанными со свойствами наночастиц и реакции организма на наноразмерные объекты. МНЧ обладают собственным магнитным моментом, за счёт чего возможно управление, магнитными наночастицами с помощью внешнего магнитного поля (МП).

Известно, что высокое содержание свободных радикалов, таких как оксид азота (NO) и активных форм кислорода (АФК) оказывает цитотоксический эффект на организм и клетки опухоли [1-4]. Однако при небольших концентрациях NO может наблюдаться положительный эффект, *in vivo* [5, 6]. В области развития опухоли, обычно наблюдается повышенная продукция оксида азота макрофагами. Некоторые клетки опухоли, такие как асцитная карцинома Эрлиха (АКЭ), способны к самостоятельному выделению оксида азота [7, 8]. Наличие свободного железа и NO в области роста клеток может вызвать активное образование динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ), что является защитным механизмом макрофагов и клеток АКЭ от токсического действия [4, 9, 10].

Показано, что при добавлении магнитных наночастиц продукция оксида азота и активных форм кислорода макрофагами возрастает [11-16]. Такой эффект может сыграть ключевую роль при регуляции роста и апоптозе клеток опухоли.

Важными маркерами состояния организма являются металлсодержащие белки и свободно-радикальные формы. Их концентрация и доступность влияет на метаболизм и на патологические процессы связанные с развитием опухоли [17-19]. Такие белки, как трансферрин и ферритин отвечают за транспорт железа, которое в свободном виде необходимо для развития опухоли. Церулоплазмин – медьсодержащий белок, катализирующий реакции окисления железа, препятствуя при этом образованию свободно-радикальных форм [20].

В связи с вышесказанным, получение информации о содержании свободно-радикальных форм и металлсодержащих белков, является важной задачей при исследовании влияния НЧ на клетки опухоли. Металлсодержащие белки возможно отследить используя метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). ЭПР в последнее время получило широкое развитие при работе с биологическими объектами. Однако чаще, данный метод используется для получения дополнительной информации.

Цель работы – оценить цитотоксический эффект магнитных наночастиц оксида железа с хитозаном на клетки асцитной карциномы Эрлиха при воздействии магнитного поля.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Выявить закономерности изменения содержания металлсодержащих белков и свободно-радикальных форм в процессе роста опухоли методом электронного парамагнитного резонанса.
2. Проанализировать спектры электронного парамагнитного резонанса клеток асцитной карциномы Эрлиха после инкубации с магнитными наночастицами при воздействии магнитного поля;
3. Определить содержание активных форм кислорода в суспензии асцитной карциномы Эрлиха при воздействии магнитными наночастицами и магнитным полем;
4. Оценить жизнеспособность клеток асцитной карциномы Эрлиха после воздействия магнитными наночастицами и магнитным полем.

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

1. Литературный обзор

1.1 Магнитные наночастицы

Наночастицы (НЧ) находят применение в широком спектре областей. Это обусловлено их универсальностью, способностью к гибкой модуляции, с возможностью их применения для самых различных задач. НЧ обладают уникальными свойствами, которые присущи только нанообъектам и обусловлены квантово-размерными эффектами.

В последние годы в медицине широкое применение находят магнитные наночастицы оксидов железа. МНЧ обладают ярко выраженными магнитными свойствами, что позволяет управлять частицами с помощью внешнего электромагнитного поля. Они обладают собственным магнитным моментом, который может быть ориентирован в одном направлении, если речь идет о ферромагнитных частицах. Под влиянием внешнего переменного магнитного поля, возрастает прецессия магнитного момента МНЧ. Если подобрать резонансную частоту поля, можно добиться эффективного поглощения энергии магнитными наночастицами, что приводит к разогреву среды, с которой наночастицы контактируют. Благодаря таким свойствам МНЧ нашли широкое применение в медицине.

Наиболее ярко магнитные свойства выражены у наночастиц на основе оксидов железа, таких как: магнетит (Fe_3O_4), гематит ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) маггемит ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), различные ферриты: MnFe_2O_4 , MgFe_2O_4 , CoFe_2O_4 , NiFe_2O_4 , и такие оксиды как Co_3O_4 , Mn_3O_4 [21-23].

Ионы металлов с магнитным моментом являются неотъемлемым компонентом многих живых организмов и биологических объектов. Чаще всего они встречаются в различных цитохромах или металлсодержащих белках, таких как ферритин, трансферрин или гемоглобин [23].

МНЧ можно получить различными способами: в водных растворах при комнатной и при высоких температурах, причем от выбранного способа получения будут зависеть дальнейшие свойства наночастиц. Таким образом

проявляется универсальность и высокая вариативность в применении магнитных наночастиц.

1.1.1 Свойства магнитных наночастиц

Как уже говорилось ранее, свойства МНЧ и других нанообъектов (от 1 до 100 нм) определяются квантово-размерными эффектами. В первую очередь данный эффект сказывается на электронных оболочках атомов нанообъекта. Изменяется плотность состояний, и как следствие электромагнитные свойства НЧ. Это происходит при определенном масштабе, когда макрообъект теряет присущие ему свойства, но при этом их свойства отличны и от атомов. [24].

Не менее значимым свойством НЧ, является высокая поверхностная активность по сравнению с обычными материалами и веществами. Высокая поверхностная активность наночастиц и наноматериалов обусловлена большой площадью при сравнительно не больших объемах материала, а также особым характером взаимодействия между поверхностными атомами и атомами внутри НЧ. За счет такой особенности наночастиц, возможно легко изменять их поверхностные свойства, сохраняя при этом внутренние. Например, модифицируя МНЧ $\text{Ni}_{38}\text{Pt}_6$ карбонильными лигандами, пропадают поверхностные магнитные свойства, однако внутри кластера магнитное поведение атомов сохраняется [25]. За счёт увеличения площади поверхности материала или уменьшение размеров одной частицы, происходит прирост количества потенциально возможных химических реакций и, следовательно, эффективность взаимодействия материала. Однако изменение в поверхностных слоях НЧ может повлиять и на внутренние свойства. В наибольшей степени это зависит от химической природы наночастиц. Например, магнитные НЧ кобальта активно реагируют с кислородом, после чего на их поверхности образуется антиферромагнитный слой оксида кобальта. Поверхностный слой взаимодействует с внутренней металлической частью ядром НЧ, таким образом изменяются магнитные свойства всей

частицы, в данном случае уменьшается коэрцитивность (устойчивость к размагничиванию материала). Этот эффект называется обменной анизотропией и позволяет управлять коэрцитивностью магнитных наночастиц и наноматериалов на их основе [26-28].

1.1.2 Виды синтеза магнитных наночастиц и их модификация

Сегодня магнитные наночастицы получают механическими, физико-химическими методами или методами, основанными на сборке из атомов, ионов, молекул [21, 23]. От того каким образом синтезированы МНЧ зависят и их свойства. Метод сборки осуществляется в растворах при различных условиях. Как правило, данный метод менее затратный и более гибкий по сравнению с механическим синтезом. Гибкость выражается в возможности сравнительно простого контроля над: формой, размерами и составом МНЧ. От этих параметров зависят свойства и процессы самоорганизации, что в конечном счёте сильно сказывается на состоянии поверхности МНЧ. Химические методы синтеза наночастиц в свою очередь делятся на неорганический, металлоорганический и органический синтез с процессами гетерогенного фазообразования в коллоидных системах. Таким образом способ синтеза МНЧ выбирается исходя из целей последующего применения этих частиц.

Серьёзной проблемой производства наночастиц и в особенности МНЧ, является их агломерация в растворе, которая происходит благодаря высокой поверхностной энергии, а в случае магнитных наночастиц этот эффект усиливается собственной намагниченностью. Поэтому в процессе получения всегда возникает вопрос о стабилизации МНЧ. Для уменьшения вероятности образования скоплений наночастиц их покрывают защитной оболочкой, препятствующей окислению и агрегации. При этом сохраняются однодоменность и магнитные свойства [21-23]. Для того чтобы получить материал с постоянными свойствами, наночастицы стабилизируют на стадии их химического синтеза.

Итак, в случае синтеза МНЧ химическим путём, для их стабилизации могут применяться два основных метода. В первом случае частицы покрывают поверхностно-активными веществами (ПАВ). При этом удаётся сохранить магнитные свойства ядра и снизить вероятность образования более крупных частиц. К тому же такой вариант стабилизации открывает новые возможности для модификации МНЧ. Как уже говорилось ранее, при изменении поверхностной активности наночастиц, могут изменяться и их свойства. Чтобы как можно лучше сохранить первоначальные свойства при стабилизации МНЧ встраивают в твёрдые полимерные матрицы. Такой метод применяется еще в том случае, если необходимо сохранить коллективные свойства НЧ и чаще используется для синтеза наноматериалов.

В литературе приведено множество примеров получения магнитных наночастиц. Некоторые полупроводниковые частицы подверженные термическому воздействию в присутствии координирующих растворителей, приобретали новые магнитные свойства. Данный метод впервые разработанный командой Mounji Bawendi [29], изначально не предполагался для синтеза МНЧ, но в дальнейшем был изменен и до сих пор остаётся актуальным. В расплавленный триоктилфосфиноксид при 150°С добавляли мелкодисперсный толуольный раствор кобальта ($\text{CO}_2(\text{CO})_8$). Таким образом получали МНЧ кубической формы. Варьируя растворитель и растворы с частицами, можно изменять конечную форму продукта. Например, удалось получить МНЧ сферической формы и в виде пластинок, заменив толуольный раствор на карбонильный, а растворитель на кипящий о-дихлорбензол. При использовании данного метода важно обеспечить высокую реактивную площадь для наночастиц. Для этого раствор с наночастицами впрыскивается в разогретый или, еще лучше, кипящий растворитель. По технологии M. Bawendi были получены наночастицы никеля [30], железа [31], и других магнитных сплавов.

МНЧ могут быть синтезированы и в водных средах при комнатной температуре или при незначительном нагреве. При таких условиях

используются метод гидролиза и микроэмульсий. При гидролизе или дегидратационном соосаждении, в водных растворах происходит синтез и стабилизация частиц оксидов железа (магнетита) [32]. Впервые метод был введен Рене Массартом и изначально предполагал гидролиз смеси хлоридов железа (II) и (III) в соотношении 1:2 в присутствии раствора гидроксида аммония, с целью получить коллоидный раствор магнетита. Метод Массарта так же обладает возможностями для выбора формы, размера, а следовательно и свойств. Как правило для контроля над этими характеристиками МНЧ изменяют рН среды. Благодаря относительной простоте и возможности влиять на некоторые параметры, данный метод с небольшими модификациями используется и сегодня.

Метод микроэмульсий основан на образовании в водных растворах мелкодисперсных областей внутри которых и будет происходить синтез наночастиц. Такие области называют обратными мицеллами. Они образуются при добавлении и интенсивном перемешивании ПАВ в водных растворах с избытком неполярного растворителя, гексана или толуола. Изменяя концентрацию растворителя, можно регулировать размер мицелл в диапазоне от 2 до 18 нм. Для образования мицелл вокруг будущих наночастиц, в среду вода/углеводород добавляют раствор водорастворимой соли металла в присутствии ПАВ. Полученная смесь интенсивно перемешивается до состояния эмульсии. Затем для получения водного раствора со взвешенными наночастицами постепенно добавляют восстановитель [33].

1.1.3 Применение магнитных наночастиц в медицине

Одним из перспективных направлений в области структурирования магнитных наноматериалов является использование полисахаридов в качестве стабилизирующих и восстанавливающих агентов, при изготовлении магнитных наночастиц. Создаваемые на основе полисахаридов магнитные нанокомпозиты (МНК) обладают синергизмом свойств стабилизирующей

полисахаридной матрицы и магнитной сердцевины, а также высокой сорбционной ёмкостью. Полисахаридная матрица служит защитой от токсического действия МНЧ при взаимодействии с живыми организмами, а также препятствует образованию конгломератов, увеличивая тем самым реакционную площадь. Благодаря этому МНК могут использоваться как носитель-основа при создании высокоспецифичных и высокочувствительных биосенсоров и аффинных сорбентов для детекции или выделения биомолекул из биологических жидкостей и при сепарации клеток.

В медицине магнитные наноконпозиты активно используются для решения различных биомедицинских задач. Они применяются в качестве контрастных агентов в магнитно-резонансной томографии (МРТ) [34-36], для усиления контраста клеток специфического типа. Чаще всего используются наночастицы магнетита Fe_3O_4 [35], модифицированные биовеществами повышающими контраст. Такая модификация предохраняет наночастицы от быстрого фагоцитоза, что позволяет существенно снизить количество вводимых в организм наночастиц. Существует несколько групп МНК на основе оксидов железа, одобренные FDA к клиническому применению: суперпарамагнитные частицы оксида железа (SPIO), такие как ферумоксиды (например, Feridex IV[®], Berlex, Inc., Wayne, NJ); ультрадисперсные суперпарамагнитные частицы оксида железа (USPIO), такие как ферумоксотран либо ферумокситол; микрочастицы оксида железа (MPIO) (Ferrotrak 1.0[®], BioPAL; BioMagic 1.0[®], BioPAL) [16].

Стоит отметить, что данные препараты показывают высокую эффективность контрастирования. При небольшом безопасном увеличении концентрации МНЧ наблюдаются сильные изменения в контрасте изображений, превышающие эффекты равных доз препаратов гадолиния [37].

Более того, такие препараты основанные на МНЧ, характеризуются низкой токсичностью и способностью проникать в ткань опухоли, минуя гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Доступность препаратов для организма можно увеличить, модифицировав МНЧ биолигандами. Так, присоединение

трансферрина существенно повышает прохождение наночастиц через ГЭБ [38]. Наночастицы SPIONs активно захватываются опухолевыми клетками в процессе эндоцитоза [39]. Характерно, что наночастицы преимущественно захватываются воспалительными клетками по периферии опухоли; это часто наблюдается при глиомах, лимфомах и метастазах в центральной нервной системе (ЦНС) [37, 40]. Более того, МНЧ можно модифицировать различными лигандами, которые будут специфичны к определенному типу клеток. Таким образом, возможно осуществление направленной доставки МНЧ в необходимые области организма.

Доставленные в клетки раковой опухоли МНЧ, могут быть использованы не только в качестве контрастного агента, но и в качестве тепловых локальных возбудителей в заданных областях (гипертермия) [36, 41-43]. Этот эффект достигается за счёт воздействия на МНЧ переменного электромагнитного поля. Каждый полный цикл петли гистерезиса в любом магнитном материале сопровождается выделением энергии, в виде тепла, пропорциональной площади петли. Таким образом, подобрав магнитные наночастицы с определённой коэрцитивностью и введя их в нужную область организма и затем приложив внешнее переменное магнитное поле, можно вызвать локальный разогрев, который либо уничтожит опасные для организма клетки напрямую или, при небольшом нагревании, локально повысит эффективность химио- или радиотерапии.

Магнитные наночастицы используют также для направленного переноса лекарственных препаратов и генов [44-48]. Это возможно, благодаря тому, что МНЧ не сложно модифицировать для дальнейшего образования комплекса «МНЧ + препарат». Данный комплекс доставляется в необходимую точку с помощью постоянного магнитного поля. Для того, чтобы отделить препарат от частиц, используют переменное электромагнитное поле определённой, когерентной по отношению к МНЧ частоты. В результате такого воздействия, собственный вектор

намагниченности магнитных частиц начинает прецессировать, что вызывает колебание МНЧ и разрыв связей между частицами и препаратом.

Подобным образом с помощью МНЧ возможна сепарация биологических объектов и веществ загрязняющих окружающую среду. За счёт возможности легко модифицировать магнитные наночастицы, они могут выступать в качестве адсорбентов, сепарируемых носителей и катализаторов.

Новым направлением в онкологии может стать поглощение макрофагами клеток раковой опухоли. Макрофаги, ключевая популяция фагоцитарных клеток, широко распространены во всех тканях и играют важную роль во врожденном иммунитете организма. В массе опухоли макрофаги составляют 30% -50% от общего числа клеток [49], но при этом макрофаги показывают низкую активность при фагоцитозе клеток раковой опухоли. Основная причина заключается в том, что опухолевые клетки модифицируют свои собственные поверхностные антигены, чтобы избежать распознавания и атаки макрофагов. В частности, CD47 - трансмембранный гликопротеин, сверхэкспрессируемый в большинстве злокачественных новообразований [50-56], выступает в качестве метки «свои клетки» для макрофагов. Происходит ингибирование фагоцитоза путем взаимодействия с белком альфа, регулируемым сигналом макрофагов (SIRP α) [57]. Таким образом, блокада CD47 в опухолевых клетках может быть особенно ценной для основанной на макрофагах терапии против рака. В настоящее время некоторые антагонисты CD47 изучаются в клинических испытаниях, но возникают серьезные побочные эффекты, такие как анемия и тромбоцитопения из-за системного введения этих антагонистов [58].

Однако магнитные наночастицы могут выступать здесь в качестве наноагента, нацеленного на CD47. Как было сказано выше МНЧ имеют полезное свойство накапливаться в опухолевой ткани. Таким образом, введение модифицированных МНЧ может не только облегчить фагоцитоз раковых клеток макрофагами путем блокирования взаимодействия между CD47 и SIRP α , но и уменьшить серьезное повреждение нормальной ткани.

Zhaoming Guo и соавторы [11], предложили частицы селенида висмута (Bi_2Se_3) модифицированные PEG и антителом белка CD47. Селенид висмута, как фототермический переносимый наноагент, может эффективно преобразовывать световую энергию в тепло для абляции опухолевых клеток после облучения инфракрасным светом. Из-за остаточной массы опухоли на краях облучения частота рецидивов опухоли или метастазирования все еще очень высока. Недавние исследования показывают, что гипертермия может побудить умирающие опухолевые клетки выделять большое количество цитокинов, таких как $\text{IL-1}\beta$ и $\text{TNF-}\alpha$ [59-61], стимулируя иммунные эффекты макрофагов, NK-клеток и T-лимфоцитов.

Однако, как уже упоминалось выше, функция макрофагов в опухолевых тканях ограничена взаимодействием CD47-SIRP α [62]. Таким образом, предполагается, что усиление макрофагального фагоцитоза опухолевых клеток может улучшить общие терапевтические результаты.

Итак, после того как, наноккомпозит ($\text{Ab-PEG-Bi}_2\text{Se}_3$) введен внутривенно в организм, он начинает накапливаться в опухолевой ткани благодаря особенности солидных опухолей, обусловленной их анатомическими отличиями от нормальных тканей организма [63]. Затем, в месте опухоли наночастицы преобразуют энергию света в тепловую энергию для абляции опухолевых клеток; внешняя фототермическая стимуляция и многочисленная гибель опухоли вызовут высвобождение большого количества цитокинов, что способствует иммунной активации макрофагов. С помощью антитела против CD47 наноккомпозит $\text{Ab-PEG-Bi}_2\text{Se}_3$, который связывается с молекулой CD47, блокируя механизм защиты клеток раковой опухоли против макрофагов. Макрофаги, стимулированные выделившимися цитокинами, начинают фагоцитировать остаточные образования опухоли.

Таким образом, МНЧ и сконструированные на их основе магнитные наноккомпозиты, могут эффективно применяться в медицине, при этом оказывая больший эффект, чем их эквиваленты. Кроме того, МНЧ обладают большой универсальностью, в плане задаваемых им свойств при синтезе и

дальнейшей модификации. Но при этом МНЧ все еще, не достаточно активно применяются на практике, так как необходимо понимать все риски их применения и биологические эффекты которые они могут оказать при введении в организм.

1.2 Проблемы связанные с использованием магнитных наночастиц

1.2.1 Биологические эффекты магнитных наночастиц и риски их применения

Прежде всего стоит заметить, что магнитные наночастицы присутствуют в живых организмах, они являются необходимым компонентом для существования некоторых организмов и для полноценного функционирования биологических систем. Самыми распространенными МНЧ в природе являются ферригидрит и магнетит. Бактерии *Magnetotactic spirillum* используют МНЧ оксидов железа для пространственной ориентации в магнитном поле Земли [64]. Однако не только бактерии используют МНЧ в качестве «компаса». Считается, что наночастицы магнетита которые содержатся в клетках высших организмов могут взаимодействовать с магнитным полем Земли и передавать отклик на специфические биорецепторы. Предполагается, что при помощи такого механизма происходит сезонная миграция птиц и рыб.

Магнитные ядра могут содержаться в специальных белках или цитокинах. Как правило это ядра железа, которые могут выполнять как строительную функцию, так и принимать участие в метаболизме. Наиболее распространённой формой негемового железа в живых организмах является ферритин. Своим строением он напоминает современные модифицированные МНЧ – упакованный в водорастворимую белковую оболочку гидратированный оксид железа (III). В такой форме ферритин эффективно депонирует ионы железа, которые так важны для метаболизма животных и функционирования различных клеток.

Как уже говорилось ранее, наноматериалы активно используются в медицине. Благодаря своим уникальным свойствам и большому отношению площади поверхности к объему, наночастицы обладают высокой реакционной способностью. Она потенциально может привести к токсичности взаимодействия наноматериалов с биологическими системами [65]. Также, увеличение площади поверхности определяет потенциальное число реакционноспособных групп на поверхности частицы. Было показано, что форма наночастиц оказывает выраженное влияние на их биологическую активность. Например, показано, что взаимодействие наночастиц серебра с *E. coli* зависит от формы используемых НЧ [66], также сферические частицы золота лучше проникают в клетки HeLa по сравнению с НЧ золота в форме стержней [67].

Таким образом, в связи с ростом количества и разнообразия наноматериалов, становится необходимой их проверка на токсичность, по отношению к живым организмам. В настоящее время тестирование цитотоксичности наночастиц основано на методах *in vitro*, разработанных для определения опасности химических веществ [68]. Но, как правило, наночастицы в значительной степени отличаются от этих материалов и могут мешать обычно используемым тест-системам. Несмотря на то, что нанотоксикология активно работает в данном направлении, большинство механизмов воздействия различных наноматериалов на живые организмы остаются не ясны [69].

1.2.2 Транспорт магнитных наночастиц в клетки и их влияние на фагоцитарную активность и метаболизм во время фагоцитоза

При введении наночастиц в организм, стоит учитывать, что они могут пересекать клеточные мембраны и не всегда всецело двигаться к нужной нам области «назначения». В большей степени это сказывается на иммунных клетках организма. Показано, что магнитные наночастицы оказывают значительное влияние на фагоцитарную активность и жизнедеятельность

макрофагов [11, 12], нейтрофилов [13], лейкоцитов [14] и других иммунных клеток, особенно при фагоцитозе самих наночастиц [13-16].

Макрофаги имеют поверхностный рецепторный механизм, который не позволяет им фагоцитировать клетки собственного организма. Во время первого взаимодействия макрофаги распознают чужеродные и собственные клетки, так как те и другие имеют антитела или белки комплемента плазмы на своей поверхности. Однако, для запуска фагоцитоза, поглощаемые клетки или частицы проверяются на наличие поверхностного белка CD47, который будет связываться с рецептором макрофагов SIRP α (CD172), и посредством данной связи предотвращать фагоцитоз. Показано, что добавление наночастиц модифицированных белком CD47 снижает фагоцитарную активность макрофагов по отношению к другим клеткам или частицам, тем самым снижается иммунный ответ организма [12]. Так же показано, что наночастицы селенида висмута, модифицированные CD47, напротив, усиливают фагоцитоз раковых клеток макрофагами [11]. При этом концентрации наночастиц в первом и во втором случае не отличались более чем на порядок. Это говорит о том, что подавляющее влияние на фагоцитарную активность оказывает природа наночастиц, а не количество связанных рецепторов макрофага.

Нейтрофилы так же способны фагоцитировать наночастицы [13], причем в данном случае процесс облегчался тем, что наночастицы образуют агрегаты различных размеров. В эксперименте использовались не модифицированные наночастицы CdSe и CdZnS, и наночастицы ZnS модифицированные биополимером.

После 15 минут инкубации нейтрофилов с «чистыми» - не модифицированными наночастицами, наблюдается заметная поляризация клеток и образование крупных агрегатов наночастиц в областях ядра (рис. 1г). Через 30 минут после инкубации часть клеток демонстрирует выраженное изменение, которое может проявляться в разрушении мембраны

(рис. 1д) или разрушении мембраны вместе с цитоплазматической частью (рис. 1е), что указывает на гибель клеток от некроза.

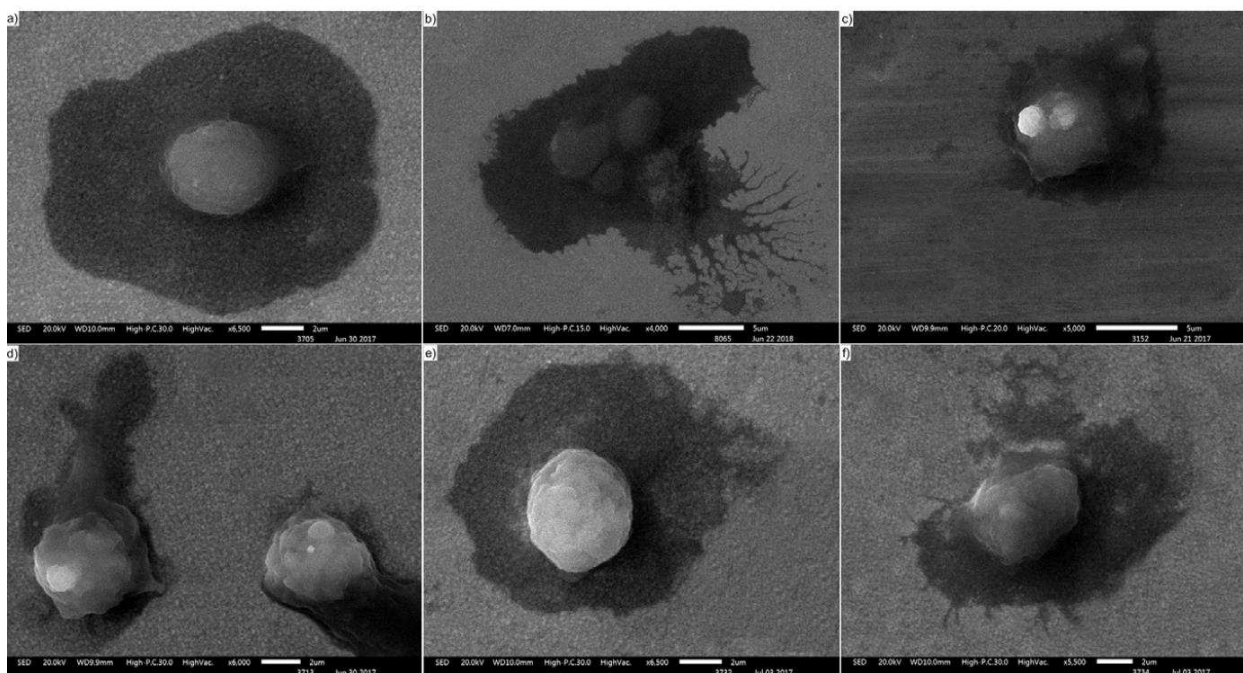


Рисунок 1 – изображения нейтрофилов, полученные сканирующей электронной микроскопией: (а) контроль; (б) образование «расплавленных» псевдоподий с нейтрофильными гранулоцитами через 15 мин после взаимодействия с CdSe / ZnS-MPA; (в) поляризация клеток и образование крупных агрегатов наночастиц в области ядра через 30 мин после взаимодействия с CdSe / ZnS-MPA; (г) поляризация клеток и образование крупных агрегатов наночастиц в области ядра через 15 мин после взаимодействия с CdSe / CdZnS; (д), (е) зоны «истончения мембраны» и частичного разрушения клеток через 30 мин после взаимодействия с наночастицами (цитировано по: [13])

Очевидно, что истончение мембраны происходит из-за перераспределения цитоплазматического содержимого, во время накопления вокруг ядра наночастиц. В этот момент мембрана клетки подвержена разрушению и чувствительна к любым механическим воздействиям. В результате происходят крупные разрывы мембран. Уменьшается как объем, так и площадь клетки. В целом, объем клетки уменьшается на 62%, объем ядра на 71%, площадь клетки на 38% и площадь ядра на 70% по сравнению с контролем. В конечном счете, объем клетки определяется только ядром, что

доказывает быструю потерю жидкости клеткой. Стоит отметить, что наличие сложного полимера на поверхности наночастиц (ZnS-PTVP) значительно снижает как фагоцитоз, так и поверхностное связывание с мембранами нейтрофилов. Скорее всего, причина кроется в стерических особенностях длинных полимерных структур, которые затрудняют первоначальный контакт нейтрофилов с наночастицами.

Энтероциты так же способны фагоцитировать наночастицы. В частности, Пауэлл и его коллеги [70-72] исследовали фагоцитоз магнитных наночастиц железа таких как ферритин. Наночастицы ферритина достигали цитоплазмы путем лизосомального выхода.

Однако, фагоцитоз не является единственным путем проникновения наночастиц в клетки организма. В работах [73,74] было высказано предположение, что некоторые металлические МНЧ могут пересекать плазматическую мембрану неэндоцитотическим путем. Удалось подтвердить данный путь для наночастиц оксида кобальта. Процесс перехода сопровождается перфорацией липидного бислоя и ставит под сомнение идею непроницаемости мембран для гидрофильных молекул или надмолекулярных структур. Для подтверждения возможности такого транспорта Daniele Zanella и коллеги [14] использовали коммерчески доступные МНЧ на основе железа, двух видов: нулевой валентности (Fe) и оксида (Fe_3O_4), которые не содержат диспергирующий внешний слой. Объектом исследования были ооциты, взятые у *Xenopus laevis*. В ходе эксперимента наблюдали неэндоцитотический переход магнитных наночастиц оксида железа, который подтверждался кратковременной токопроводимостью мембраны ооцитов и взаимодействием наночастиц Fe_3O_4 с цитоплазмой. Предполагается, что наночастицы оксида железа, попав в цитоплазму, растворяются, вызывая гашение кальцеина. При этом наночастицы железа с нулевой валентностью не вызывали снижения флуоресценции. Следовательно, через мембрану ооцитов проникали только наночастицы оксида железа. Так же переход через мембрану не происходил, когда МНЧ модифицировали белковой оболочкой.

Таким образом наночастицы могут проникать в клетки организма путем фагоцитоза. Механизм фагоцитоза при этом схож с клеточным фагоцитозом, однако ответные реакции клеток могут сильно отличаться в зависимости от вида наночастиц и природы самих клеток. Так же рассмотрен альтернативный путь наночастиц внутрь клеток. Механизмы данного перехода до конца не ясны.

1.2.3 Активные формы кислорода

подавляющее большинство живых организмов продуцирует активные формы кислорода АФК в ходе своей обычной жизнедеятельности. Патогенные бактерии и грибы генерируют АФК для разрушения чужеродных тканей. Миксомицеты экскретируют АФК для специального межклеточного сигнала, подаваемого в период образования плодовых тел. Высшие животные и растения производят АФК в ходе стимуляции патогенами или факторами роста. АФК обладают бактерицидным действием по отношению к патогенным микроорганизмам, вступают в активные реакции с инфицированными или злокачественными клетками, регулируют ионный транспорт и морфогенез. Существует целый ряд жестко регулируемых антиоксидантных систем, обеспечивающих гомеостаз АФК в живых организмах [75, 76]. Активные формы кислорода участвуют в регуляции синтеза простагландинов, тромбоксанов и лейкотриенов, производят окислительное разрушение чужеродных экзогенных веществ. Регуляция роста, пролиферации и дифференцировки клеток, обновление и модификация клеточных мембран и регуляция апоптоза, так же происходят с участием АФК. Основными «поставщиками» АФК являются митохондрии. При нормальных условиях, наибольшее выделение происходит при переносе электронов в митохондриальной дыхательной цепи. Активные формы кислорода так же, образуются при фагоцитозе иммунными клетками организма, и в реакциях микросомального окисления при нейтрализации веществ с участием цитохрома P-450.

Однако, активные формы кислорода в избыточном количестве могут нанести серьезный вред организму. Несмотря на то, что существует многоуровневая система регуляции и контроля за цитотоксическим действием АФК, направляющая токсический эффект в первую очередь против чужеродных бактерий и в меньшей степени затрагивая клетки собственного организма [77]. Как уже говорилось ранее, магнитные наночастицы без необходимой обработки могут активно фагоцитироваться иммунными клетками организма. Так же, например, МНЧ модифицированные CD47, не поглощаются макрофагами, но при этом могут усиливать фагоцитоз других чужеродных тел. В таком случае АФК могут синтезироваться в избыточных дозах, что необходимо учитывать при введении МНЧ в организм.

Caо Nguyen Duong и Jae Young Kim [78] предложили механизм уменьшения выделения АФК для борьбы с гипоксической ишемией. Считается, что нейротоксические эффекты гипоксической ишемии в основном вызваны повышенной продукцией АФК и переизбытком кальция. Показано, что выживаемость клеток, культивируемых в условиях избытка АФК, снижается примерно на 40% по сравнению с контролем. При прочих равных условиях и воздействии на клетки магнитного поля (МП) частотой 50 Гц и мощностью 1 мТл, выживаемость возрастала на 11%. Наиболее выраженный защитный эффект в ряде экспериментов сохранялся при данной мощности и частоте. Отмечалось что в контроле активные формы кислорода превышали норму концентрации на 90%, в то время как внутриклеточная концентрация образцов подвергавшихся воздействию МП не превышала норму более чем на 40%. Авторы предполагают, что такие защитные эффекты МП могут быть связаны с гормезисом. К тому же, селективность по частоте и интенсивности может быть объяснена моделью ионного циклотронного резонанса. Эта модель предполагает, что, если резонанс возникает в некоторых физиологически важных ионах в магнитном поле, эти ионы специфически активируются, тем самым изменяя сигнальные

механизмы и функцию клетки. Однако точные механизмы этой защиты в настоящее время неясны. К тому же, возможно применение МНЧ вместе с МП данной частоты и интенсивности, что потенциально может снизить уровень возрастания АФК в организме.

1.2.4 Оксид азота

1.2.4.1 Роль оксида азота

Оксид азота является незаменимым компонентом для существования животных и клеток. Во-первых, NO обладает сильным вазодилатирующим и спазмолитическим действиями – отвечает за расширение сосудов, расслабления гладкой мускулатуры. За счет этого и других механизмов, выступает в качестве ингибирующего фактора-регулятора тромбообразования. NO участвует в работе желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы, в функционировании секреторных клеток, в жизнедеятельности кожных покровов, в работе органов дыхания [1-4].

Во-вторых, оксид азота является важным компонентом при его генерации в нервных окончаниях органов вегетативной нервной системы. В ЦНС обеспечивает выделение нейромедиаторов, отвечает за формирование длительных связей между нейронами [1-4].

В-третьих, при повышенных концентрациях, NO как свободный радикал проявляет цитотоксические свойства. В частности при работе клеточного иммунитета макрофагами, Т-лимфоцитами и нейтрофилами. Ингибирует репликацию патогенов, регламентирует апоптоз, и пролиферацию клеток [3, 79, 80]. Молекулы оксида азота способны легко диффундировать в клетки – мишени, способствовать накоплению токсичных продуктов, и воздействовать на клетки извне, нарушая структурную целостность мембран [1]. Такое воздействие наблюдается при развитии тяжелых патологических состояний, например при развитии онкологических заболеваний.

Однако у некоторых опухолевых клеток существуют различные механизмы защиты от цитотоксического действия оксида азота. Одним из таких механизмов является образование парамагнитных динитрозильных комплексов железа (ДНКЖ) в присутствии NO [4, 9, 10]. Предполагается, что механизмы схожи с защитой макрофагов от продуцируемого ими оксида азота. Образование ДНКЖ обусловлено высокой способностью свободных форм железа восстанавливать оксид азота, образуя FeNO с дальнейшим образованием ДНКЖ. Так же, ДНКЖ обладают антиоксидантным свойством по отношению к АФК, что повышает защиту от окислительного стресса. Авторами [4], показано, что NO снижает скорость клеточного метаболизма H_2O_2 . Это может быть обусловлено потреблением части H_2O_2 в результате реакций с клеточным железом. Но у данного механизма существует и обратная сторона. Когда свободный пул железа истощается, оксид азота начинает связываться с железом опухолевых клеток, что отрицательно сказывается на их жизнеспособности.

Еще одним механизмом защиты от цитотоксического воздействия NO, является возможность продукции оксида азота некоторыми опухолевыми клетками. В частности такой способностью обладают клетки асцитной карциномы Эрлиха [7, 8]. NO может стимулировать синтез ряда агентов: интерлейкина-10 (IL-10), факторов роста TGF- β и TGF- β 1, простагландина E2 (PGE 2), которые подавляют защитную активность макрофагов и увеличивают проницаемость капилляров брюшной полости для транспорта питательных веществ, что положительно сказывается на росте опухолевых клеток [5, 6].

Таким образом, важной задачей является контроль концентрации оксида азота, особенно при онкологических заболеваниях. Известно, что МНЧ могут влиять на фагоцитарную активность макрофагов, выход оксида азота и активных форм кислорода [81]. Введенные в суспензию с АКЭ магнитных наночастиц оксида железа, может увеличить продукцию NO макрофагами и облегчить его доставку в опухолевые клетки. Таким образом,

МНЧ могут выступать как агент снижающий защиту опухолевых клеток, и активирующий иммунный ответ макрофагов. Свободный выход оксида азота и его соединения ДНКЖ, надежно регистрируются методом электронного парамагнитного резонанса [82].

1.2.4.2 Синтез оксида азота

В нормальных физиологических условиях NO в клетках млекопитающих синтезируется в результате превращения аминокислоты L-аргинина в L-цитруллин под воздействием синтаз оксида азота (NOS) [2, 3]. Существует три изоформы NO синтазы: нейрональная (nNOS или NOS1), индуцибельная (iNOS или NOS2) и эндотелиальная (eNOS или NOS3).

Нейрональная и эндотелиальная синтазы являются конститутивными кальций-зависимыми формами фермента, которые регулируют нервную и сосудистую функции соответственно. Конститутивные формы продуцируют оксид азота, который необходим для метаболизма в небольших количествах, порядка нескольких наномоль.

iNOS не зависит от кальция и синтезируется в основном клетками иммунной системы, а так же может продуцироваться многими опухолевыми клетками. За равные промежутки времени индуцибельная NO синтаза продуцирует на три порядка больше оксида азота в сравнении с nNOS и eNOS. Кроме того, поскольку синтез не зависит от концентрации кальция, он может продолжаться значительно дольше [83]. Роль iNOS во время развития опухоли очень сложна и вызывает затруднения, поскольку описаны как стимулирующие, так и ингибирующие действия.

Сигнальные механизмы оксида азота включают в себя циклический гуанозинмонофосфат (цГМФ) - зависимый и окислительный пути. В первом случае, в кровеносных сосудах L-аргинин преобразуется в NO синтазу с образованием оксида азота, который позволяет ферментам дифундировать в просвет и стенки сосудов. Когда оксид азота оказывается в лейкоцитах, он проходит через плазматическую мембрану и цитоплазму, реагируя с

активным центром растворимой гуанилатциклазы (ГЦ). В результате продуцируется цГМФ, активирующий протеинкиназу, которая способна фосфорилировать множество субстратов. Вместе с этим могут быть активированы цГМФ-зависимые ионные каналы и фосфодиэстераза [84]. Также, цГМФ-зависимая киназа фосфорилирует множество субстратов и участвует в адгезии и агрегации тромбоцитов.

1.2.5 Выведение магнитных наночастиц из организма

Благодаря своим размерам и высокой поверхностной активности наночастицы способны легко преодолевать различные барьеры внутри живых организмов. Они могут проникать в клетки, в систему кровообращения, лимфатическую систему и центральную нервную систему. В результате таких переходов, они накапливаются в печени и почках, достигают чувствительных районов организма, таких как: костный мозг, лимфоузлы, селезенка и сердце [85]. Долгое пребывание НЧ в организме, может вызвать ряд проблем, связанных с их активным взаимодействием с клетками организма. Эффекты будут зависеть от природы наночастиц. Например, МНЧ способны образовывать конгломераты в системе кровообращения и способствовать образованию тромбов. Нанотрубки и углеродные наночастицы, введенные внутривенно, так же приводят к агрегации тромбоцитов и к ускорению тромбообразования в сонной артерии у крыс [85]. Наночастицы серебра, размером 20-65 нм, накапливаются в печени грызунов, растворяясь способны оказывать цитотоксическое действие. [86]. Как уже упоминалось ранее, НЧ подвергаются фагоцитозу макрофагами и нейтрофилами. При этом фагоцитоз не приводит к утилизации наночастиц, а наночастицы в свою очередь могут препятствовать работе иммунных клеток, подавляя иммунитет.

Таким образом, при синтезе наночастиц, необходимо учитывать их способность к выведению или подбирать материалы, которые не принесут вред организму в период растворения НЧ. В работе [87], продемонстрирована

возможность выведения магнитных наночастиц через почки. Ранее сообщалось, что НЧ могут выводиться исключительно через фильтрующий клубочек почки, для этого их размер не должен превышать 6 нм. Однако Виктор Науменко и другие [87] показали, что наночастицы оксида железа и их кластеры размером до 140 нм могут преодолевать эндотелиальный барьер через почечный каналец и выводиться с мочой. Атомно-эмиссионная спектроскопия, флуоресцентная микроскопия и магнитно-резонансная томография выявили быстрое и преходящее накопление МНЧ в почках. Трансмиссионная электронная микроскопия показала, что МНЧ сохраняют полноразмерное состояние и полностью выводятся с мочой через 2 часа после введения. Результаты предполагают, что транслокация через перитубулярный эндотелий к клеточным канальцам эпителия является альтернативным механизмом почечного клиренса, позволяющим выводить наночастицы размером более 6 нм.

1.3 Клетки асцитной карциномы Эрлиха, как объект исследования

Асцитная карцинома Эрлиха является самым распространенным объектом исследования при изучении онкологии и поведения раковых клеток. Это обусловлено небольшим временем культивации, относительной простотой в содержания. К тому же, асцитная форма позволяет легко разводить клетки до необходимых концентраций, получая вязкую взвесь с равномерно распределенными по объему клетками. Клетки не подвергаются спонтанному рассасыванию и имеют 100% прививаемость [88].

При работе с АКЭ необходимо учитывать особенности её деления, а именно, не стандартный цикл деления клетки по сравнению с другим опухолевыми клетками и с некоторыми клетками раковых опухолей, например асцитная опухоль JB-1. Нарушение цикла выражается в увеличенном периоде G1 (синтетический - наращивание различных РНК увеличение ДНК), фазы роста клетки, периоде G2 (постсинтетический – наработка материала для деления) и ускоренной фазой митоза (8-10 часов, в

то время как для не опухолевых клеток в среднем это время составляет 20-24 часов) [89].

Для культивирования карциномы Эрлиха используют беспородных лабораторных мышей, поскольку кинетика опухолевого роста у мышей различных линий может иметь свои особенности [90-92]. Рост колонии АКЭ так же происходит неравномерно. В течение первых 4-6 суток длится латентный период, затем на протяжении 4-5 суток происходит логарифмическое увеличение числа клеток (лог-фаза). На 13-16е сутки происходит гибель организма (терминальный период). Средняя продолжительность жизни мышей с АКЭ составляет от 14 до 18 суток после прививки опухоли [90, 91].

Такое специфическое деление АКЭ при исследованиях, скорее является плюсом нежели минусом. При работе с данным видом опухолевых клеток можно достоверно проследить влияние эффектов, предполагаемых экспериментом, за достаточно небольшой период времени.

Магнитные наночастицы активно внедряются в медицину, особенно активно их используют при лечении онкологии. Как правило их применяют совместно с переменными магнитными полями различных частот и мощностей.

Отсюда, целью моего дальнейшего исследования является изучение влияния МНЧ оксидов железа на клетки раковой опухоли асцитной карциномы Эрлиха, в том числе и в присутствии переменного магнитного поля низкой интенсивности (2,7 мТл 100Гц). Предполагается, что низкочастотный диапазон не будет вызывать резонансные эффекты как в случае высокочастотных магнитных и электромагнитных полей (около 900 МГц). Таким образом проверяется возможность специфического действия МП низкой интенсивности и возможные взаимодействия с МНЧ. Кроме того, известно, что МП данной частоты снижает выход АФК при захвате клетками МНЧ (См. гл. 1.2.3). Выбор мощности обусловлен тем, что ее изменение не значительно влияет на механизмы воздействия МП на объект, при данных

частотах. Более высокие мощности требуют больших затрат энергии, более массивной аппаратуры и могут оказать негативное влияние на ткани живого организма, за счет чего может нивелироваться основное преимущество применения МНЧ.

Совместное применение магнитных наночастиц оксида железа и магнитного поля низкой частоты и интенсивности является наиболее благоприятной комбинацией для использования МНЧ при лечении онкологии на сегодняшний день. Однако механизмы воздействия магнитных наночастиц и совместного воздействия (МНЧ+МП) до сих пор до конца не ясны.

1.4 Электронный парамагнитный резонанс

Метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) используется для изучения материалов, в состав которых могут входить парамагнитные соединения. В последнее время ЭПР все чаще применяют для изучения тканей живых организмов, однако данный метод позиционируется как второстепенный, используемый для получения дополнительной информации.

Метод ЭПР состоит в измерении поглощения сверхвысокочастотного (СВЧ) микроволнового излучения неспаренным электронным спином в присутствии внешнего магнитного поля. Вырождение неспаренного электрона снимается, что приводит к расщеплению энергетического состояния электрона. Разность энергий этих состояний можно описать следующим выражением:

$$\Delta E = g_e \times \beta_e \times B_0 \quad (1)$$

где B_0 - магнитное поле;

g_e - g-фактор электрона, который изменяется в зависимости от электронной конфигурации;

β_e - электронный магнетон Бора.

Резонанс происходит, в тот момент когда энергия СВЧ поля начинает совпадать с энергией расщепления энергетического состояния электрона:

$$\Delta E = h\nu = g_e \times \beta_e \times B_0 \quad (2)$$

где h - постоянная Планка;

ν - частота микроволнового излучения [93].

Чаще всего измерение происходит в «X диапазоне», при постоянной частоте СВЧ сигнала 9 ГГц.

Электронный парамагнитный резонанс является перспективным методом, при исследований в области биофизики и медицины, при изучении отклика организма на воздействие электромагнитных волн и магнитных наночастиц [94].

2 Материалы и методы

2.1 Ход эксперимента

Эксперимент включал в себя два этапа. Первый этап (рис. 2) состоял в анализе сигнала металлсодержащих белков и свободно-радикальных форм в зависимости от фазы роста АКЭ, с целью определения оптимального периода для исследования влияния МНЧ. Второй этап (рис. 3) включал в себя анализ состояния АКЭ при воздействии на них магнитного поля, МНЧ оксида железа с хитозаном и совместного воздействия данных факторов.

В эксперименте суммарно использовали 60 мышей, полученных в питомнике Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор». Асцитную карциному Эрлиха инокулировали в брюшную полость мышей в концентрации 3×10^6 кл. в 0,2 мл.

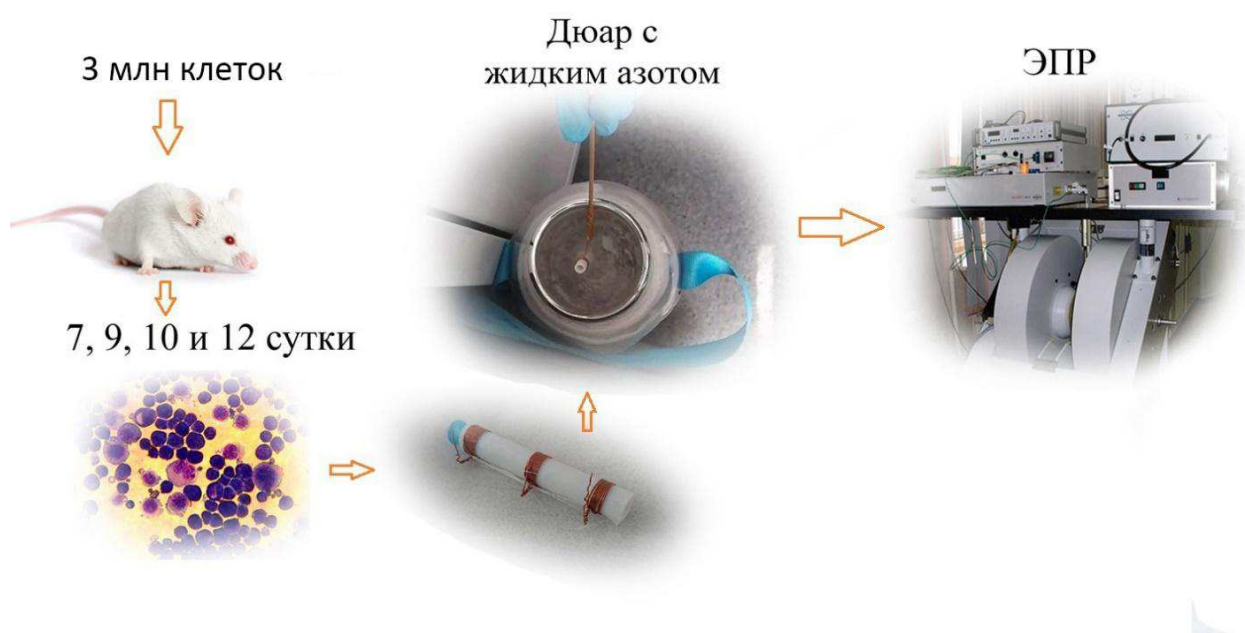


Рисунок 2 – схема первого этапа эксперимента

На первом этапе суспензию извлекали из перитонеальной полости лабораторных животных на 7, 9, 10 и 12 сутки после инокуляции. Затем 800 мкл суспензии замораживали в жидком азоте для фиксации и последующего анализа методом электронного парамагнитного резонанса. Для оценки

концентрации образцов проводили подсчет клеток в пробе с помощью камеры Горяева.

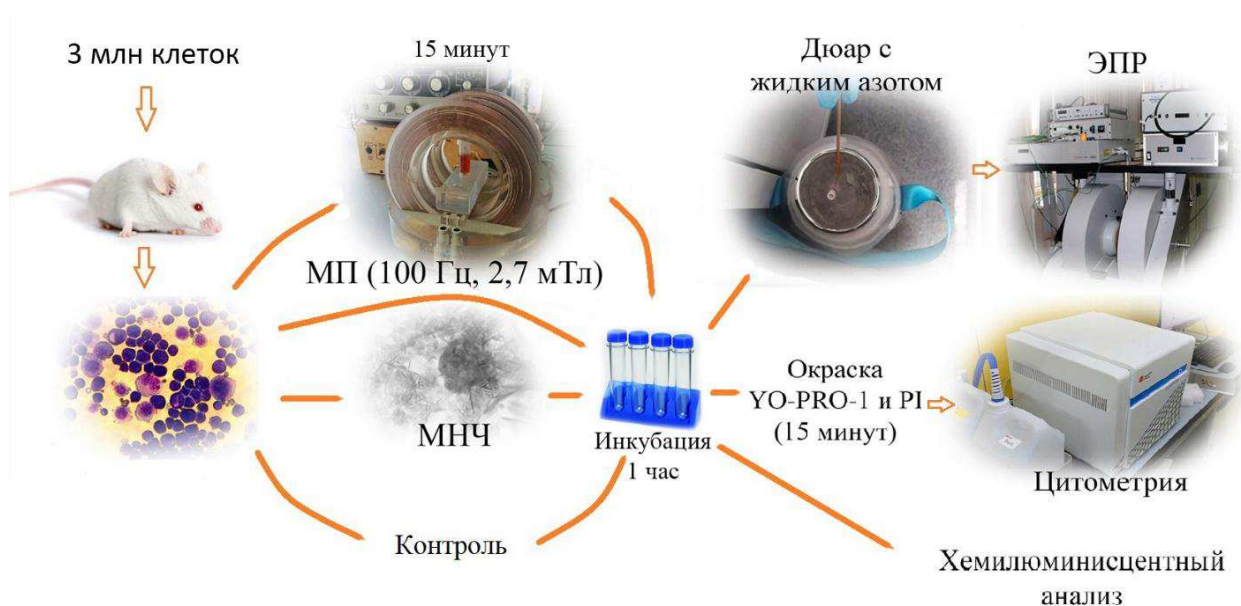


Рисунок 3 – схема второго этапа эксперимента

На втором этапе суспензию АКЭ извлекали из перитонеальной полости животного и делили на 4 группы: 1) контроль – суспензию инкубировали при комнатной температуре на протяжении часа; 2) инкубация на протяжении часа с наночастицами оксида железа модифицированными хитозаном; 3) после инкубации на суспензию воздействовали магнитным полем (100 Гц, 2,7 мТл) на протяжении 15 минут; 4) образец инкубировали с МНЧ на протяжении часа. После инкубации выдерживали 15 минут в магнитном поле.

После инкубации суспензию АКЭ каждой экспериментальной группы, делили на 3 части для анализа методом ЭПР, проведения хемиллюминисцентного анализа (хемиллюминометра CL-3604-ПЭВМ) и цитометрии (цитометра CytoFLEX).

2.2 Магнитные наночастицы оксида железа с хитозаном

Наночастицы магнетита получали методом химического осаждения. К $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ добавляли хитозан, в соотношении 3 к 1. Полученный порошок растворяли в 100 мл дистиллированной воды, при температуре 80°C . Далее производили ультразвуковую кавитацию раствора. В процессе доводили раствор до нейтрального pH добавлением NaOH (0,1 М). Необходимая температура поддерживалась с помощью водного термостата ТЖ-ТС-01. Покрытые наночастицы магнетита многократно промывали дистиллированной водой для удаления ионов железа.

Частицы представляют собой нанопластины округлой формы, с диаметром на порядок превышающем толщину. Средний размер частиц составил 52 нм. Синтезированные частицы являются магнетитом с хитозаном [95].

2.3 Фурье-спектрометр Elexsys E580

Для получения спектров электронного парамагнитного резонанса использовали ЭПР Фурье-спектрометр Elexsys E580 (Bruker) Красноярского регионального центра коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН, г. Красноярск.



Рисунок 4 – шкаф анализа данных системы Elexsys E580

ЭПР спектрометр EleXsys E500 CW фирмы Bruker Biospin изготовителя FRG, является частью системы (Elexys E580), которая так же включает в себя специализированное программное обеспечение Херг.



Рисунок 5 – ЭПР спектрометр EleXsys E500 CW

Прибор обладает следующими основными блоками:

Магнит с зазором 160 мм, охлаждаемый проточной водой. Катушки быстрой развертки с амплитудой до 200 Э. Максимальная амплитуда развертки магнитного поля – 16 кЭ, стабильность поля – не хуже 1мЭ, максимальное поле – 20 кЭ.

Высокодобротный резонатор ER 4123SHQE. Совместное использование с двойным микроволновым мостом, обеспечивает высокое отношение сигнал/шум. Диаметр входного отверстия для образца – до 8 мм.

Спектрометр адаптирован для измерений при низких температурах образца, содержит в себе два типа датчиков: азотный, продувной для температур датчика от 100 до 300 Кс входным диаметром до 5 мм, и

высокодобротный гелиевый, продувной с диапазоном температур от 3,8 до 300 К с входным диаметром до 5 мм. В систему встроен автоматический контроллер температуры, который поддерживает её с точностью не хуже 0,5 К.

2.4 Подготовка образцов для получения спектров электронного парамагнитного резонанса

Для подготовки суспензии асцитной карциномы Эрлиха к ЭПР использовали пробирки скрученные из фторопласта (рис. 6). Далее, пробирки с суспензией помещались в Дюар с жидким азотом, где хранились до проведения эксперимента. Непосредственно перед анализом, пробирки раскручивали по одной и извлекали конусовидный образец с леской в центральной части.

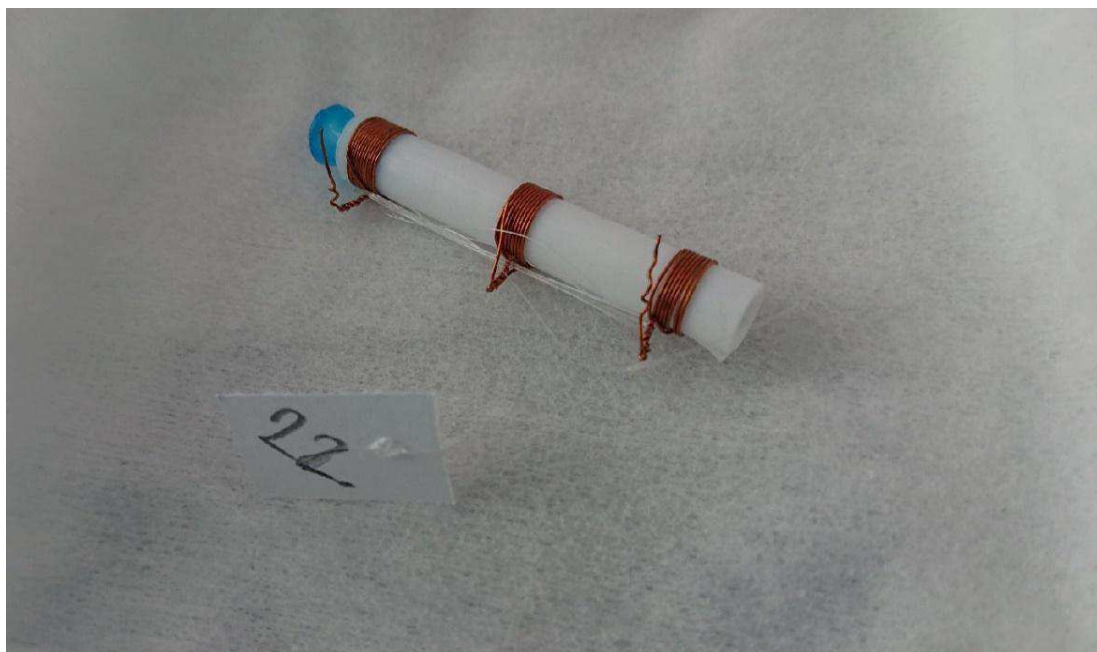


Рисунок 6 – пробирка для хранения и подготовки образцов к электронному парамагнитному резонансу

Образец в твердой форме крепился за специальный держатель (рис. 7) так, чтобы пары жидкого азота поддерживали постоянную температуру ($t = 85\text{K}$).



Рисунок 7 – устройство для удержания образца в активной зоне ЭПР спектрометра

2.5 Анализ данных электронного парамагнитного резонанса

Анализ проводили в диапазоне от 650 до 4350 Гс с разрешением 2043 точки. Затем, выбирали интересующую нас область в диапазоне от 3150 до 3650 Гс, с разрешением 2048 точек. На протяжении всех измерений температура образцов не поднималась выше 85К. Данные анализировали с помощью специального программного обеспечения (Aerpr, FDepr, Xerpr), которое является частью системы Bruker. Так же, для анализа данных использовали программы MagicPlot и Excel.

На рисунке 8 приведен пример типичной интегральной кривой электронного парамагнитного резонанса суспензии АКЭ.

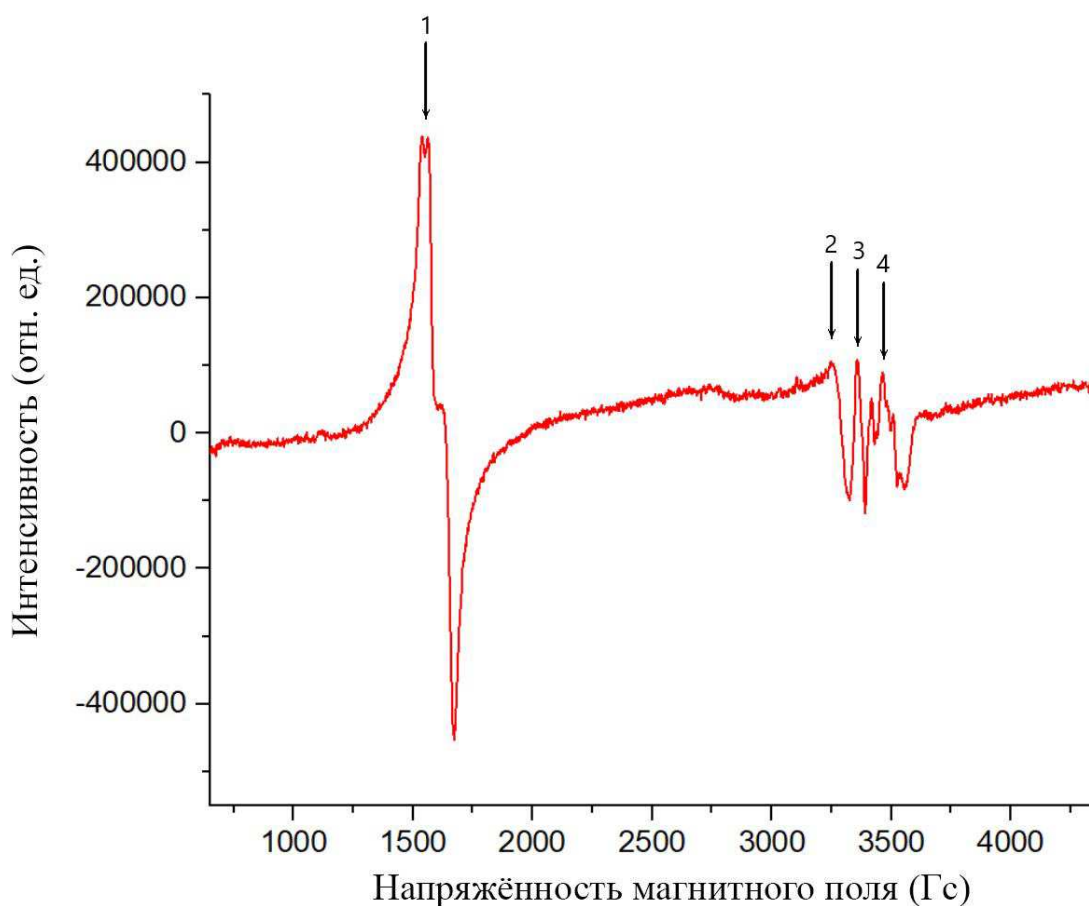


Рисунок 8 – кривая резонансного поглощения суспензии АКЭ. Пики: 1- трансферрин; 2 - церулоплазмин; 3 - ДНКЖ -; 4- Mo^{2+} -содержащие молекулы

2.6 Установка генерации магнитного поля

Установка генерации переменного магнитного поля (рис. 9) состоит из трех основных блоков. Первый блок – генератор сигналов низкочастотный ГЗ-118, работающий в диапазоне частот от 1 Гц до 200 кГц. Вторым блоком – усилитель мощности низкочастотный. Третьим блоком – катушки Гельмгольца, состоящие из двух идентичных параллельных электромагнитных катушек, центры которых зеркально расположены на одной оси. Благодаря такой конструкции между катушками, в центре, создается магнитное поле с высокой степенью однородности.



Рисунок 9 – установка генерации переменного магнитного поля

Работа установки происходила следующим образом – генератор задает частоту, передавая сигнал в усилитель. Усилитель низкочастотный усиливает сигнал, поступающий с генератора, с заданным коэффициентом, и затем передает его на катушки Гельмгольца, создавая таким образом переменное магнитное поле. Образцы располагали по центру, между катушками. В эксперименте использовали частоту 100 Гц, с индукцией магнитного поля 2,7 мТл.

2.7 Хемилюминесцентный анализ активных форм кислорода

Метод регистрации интенсивности спонтанной хемилюминесценции биологических тканей, жидкостей и клеточных суспензий обладает высокой чувствительностью, не инвазивен и отражает быстропротекающие сдвиги равновесия про- и антиоксидантной систем, позволяет оценивать их ориентацию и выраженность даже без учета поведения компонентов равновесия.

Для определения концентрации активных форм кислорода в суспензии использовали люминесцентные зонды – люминол и люцигенин. Данные маркеры легко окисляются свободно-радикальными формами кислорода с

3% квантовым выходом люминесценции в диапазоне от 300 до 600 нм. Максимальная интенсивность достигается при длине волны равной 425 нм. Данные люминесцентные зонды образуют электрон-возбуждённые продукты, (химические активаторы), и увеличивают квантовый выход эмиссии фотонов в результате переноса энергии электронного возбуждения на активатор [96].

Люцигенин избирательно реагирует на образование супероксида (O_2^-), тогда как люминол дает свечение под действием ряда окислителей (OH^- , H_2O_2 др.).

Для проведения хемилюминесцентного анализа в кюветы набирали по 100 мкл суспензии АКЭ (1×10^6 кл./мл) и 200 мкл $2,2 \times 10^{-4}$ М люминола (Sigma, USA) или люцигенина (Sigma–Aldrich, Switzelend) в растворе Хенкса.

Регистрацию активных форм кислорода *in vitro* проводили в течение 90 мин при температуре $37^\circ C$ на аппаратно-программном комплексе «Хемилюминометр CL–3604–ПЭВМ» (рис. 10), предназначенном для измерения сверхслабых свечений биологической и физико-химической природы [97].



Рисунок 10 – Хемилюминометр CL–3604М

Продукцию активных форм кислорода оценивали по максимальной интенсивности хемилюминесцентной реакции (I_{\max} , имп./с) и общему количеству образовавшихся АФК (S = кол-во импульсов за 90 мин).

2.8 Проточная цитофлуориметрия

2.8.1 Проточный цитометр CytoFLEX

Проточный цитометр CytoFLEX производства «Beckman Coulter», США (рис 11), используется для количественного и качественного анализа, определения биологических и физических свойств клеток и частиц. Данные характеристики возможно определить за счет комбинированного и отдельного действия лазерных пучков. Проточный канал устроен таким образом, что клетки проходят по нему одна за другой. При этом прибор фиксирует количество событий, размеры объектов, интенсивность проходящего света. Для получения дополнительной информации используют цветовые маркеры. Проточный цитометр CytoFLEX позволяет анализировать до 13 цветовых маркеров на клетках одновременно, что позволяет получить сразу несколько дополнительных характеристик при исследовании.

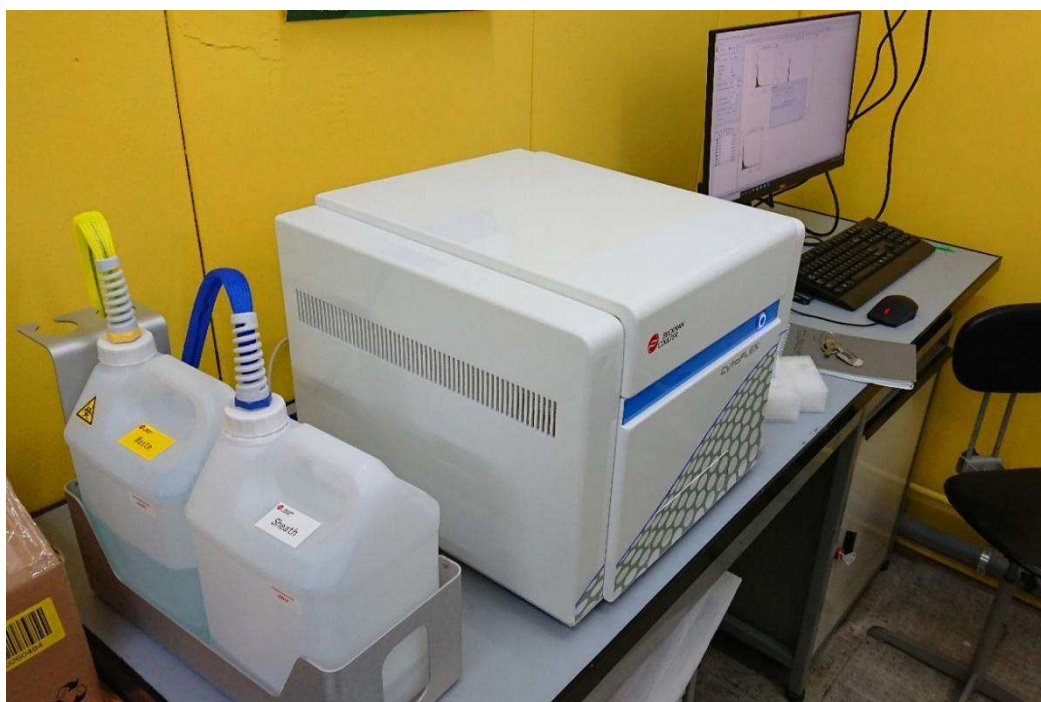


Рисунок 11 – цитометр CytoFLEX

2.8.2 Оценка жизнеспособности клеток при помощи ДНК-связывающих красителей - YO-PRO-1 и PI

Метод основан на одновременном применении двух флуоресцентных красителей: YO-PRO-1 («ThermoFisher», США) и йодистого пропидия (PI) («ThermoFisher», США). Данные вещества обладают относительно низкой молекулярной массой (629,3 и 668,4 Да, соответственно), и способностью стехиометрическим образом связываться с нуклеиновыми кислотами клеток. Они проникают в цитоплазму и в ядра клеток, где связываются с РНК и ДНК, изменяя таким образом флуоресценцию при возбуждении источником света с длиной волны 488 нм. Максимум эмиссии YO-PRO-1 приходится на зеленую (около 509 нм), а PI – на красную (около 617 нм) части спектра.

Флуоресцентная метка YO-PRO – не накапливается в живых клетках, поскольку данный краситель способен проникать через мембрану только посредством специфических каналов, которые закрыты при нормальном функционировании клеток. Когда клетка находится в состоянии апоптоза, нарушается асимметрия липидного состава поверхностной мембраны. Чтобы определить на какой стадии апоптоза находятся наблюдаемые клетки, вместе с красителем YO-PRO используют PI. Йодистый пропидий проникает через мембрану клетки только в том случае, если она достаточно повреждена, что характерно для поздних стадий апоптоза, при формировании апоптотических телец или при некрозе [98].

Окраску клеток проводили в пробирках для цитометрического учета 12×75 мм («Beckman Coulter», США). К 100 мкл клеточной суспензии, с концентрацией $1-3 \times 10^6$ клеток/мл, добавляли по 5 мкл рабочего раствора YO-PRO-1.

Далее в образцы вносили по 10 мкл раствора PI. Для эффективного взаимодействия клеток с красителем, образцы помещали в защищенное от света место на 15 минут при комнатной температуре. По завершении инкубации анализировали на проточном цитофлуориметре. Для каждого из

образцов фиксировали не менее 10000 событий. На рисунке 12 приведен пример отображения данных цитометрии для клеток АКЭ.

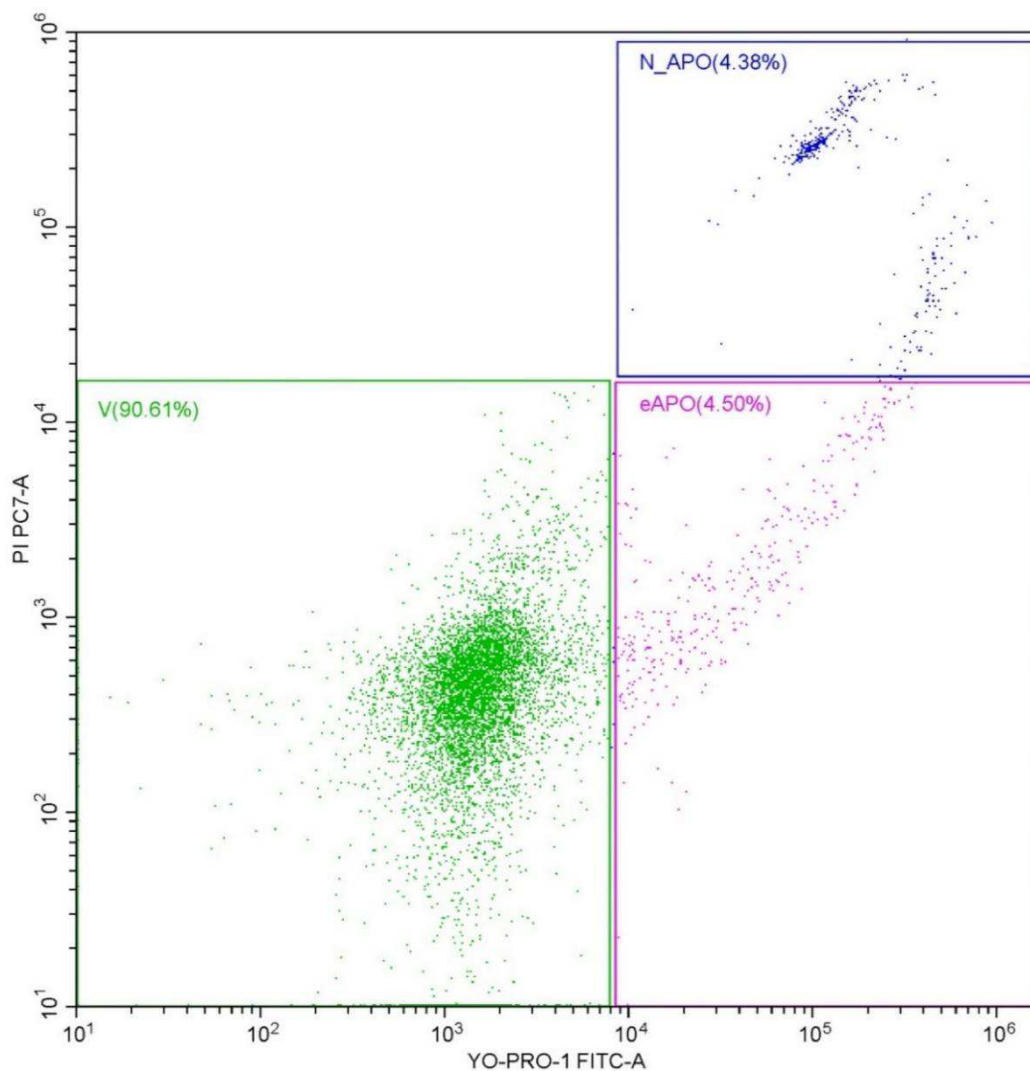


Рисунок 12– пример окрашивания клеток асцитной карциномы Эрлиха ДНК-связывающими красителями YO-PRO-1 и PI. По оси абсцисс: интенсивность флуоресценции YO-PRO-1; по оси ординат: интенсивность флуоресценции PI. Область V – живые клетки, область eAPO – клетки на ранних стадиях апоптоза, область N_APO – клетки на поздних стадиях апоптоза/некроза

Чтобы отличить одиночные клетки от агрегатов и в последующем дискриминировать агрегаты из анализа, использовали сочетания сигналов по прямому (величина, пропорциональная размеру клеток) и боковому (величина, характеризующая структуру клеток) светорассеянию – интенсивность пикового против интенсивности интегрального сигналов по

прямому или боковому светорассеянию, а также время полета против интенсивности этих сигналов.

Анализ полученных результатов проводили при помощи программного обеспечения SytExpert («Beckman Coulter», США).

2.9 Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку для всех полученных данных проводили используя программу Excel. Использовали описательные статистики анализа данных для получения значений относительной погрешностей и относительной ошибки.

Так же, данные, не подчиняющиеся нормальному распределению, сравнивали с помощью критерия Манна-Уитни (U-критерий). Различия считали статистически значимыми при $U_{0,95} < 659$.

С 43 по 55 страницы были изъяты в связи с авторскими правами.

ВЫВОДЫ

1. Выявлены закономерности изменения содержания металлсодержащих белков и свободно радикальных форм в процессе роста опухоли методом ЭПР. Для оценки влияния магнитных наночастиц на суспензию асцитной карциномы Эрлиха методом электронного парамагнитного резонанса выбран период 10 сутки - стационарная фаза роста опухоли.
2. Для регистрации содержания свободно-радикальных форм и металлсодержащих белков на различных этапах роста асцитной карциномы Эрлиха можно использовать метод электронного парамагнитного резонанса. Для оценки содержания металлсодержащих белков и нитрозоформ методом электронного парамагнитного резонанса необходимо учитывать магнитные свойства используемых наночастиц.
3. Магнитные наночастицы с хитозаном проявляют антиоксидантные свойства при инкубации в суспензии.
4. Полученные в ходе экспериментов данные показали, что магнитные наночастицы железа с хитозаном оказывают цитотоксический эффект на клетки асцитной карциномы Эрлиха.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- МНЧ – магнитные наночастицы;
- МП – магнитное поле;
- NO – оксид азота;
- АФК – активные формы кислорода;
- АКЭ – асцитная карцинома Эрлиха;
- ЭПР – электронный парамагнитный резонанс;
- НЧ – наночастицы;
- ПАВ – поверхностно-активные вещества;
- МНК – магнитные нанокompозиты;
- МРТ – магнитно-резонансная томография;
- ГЭБ – гематоэнцефалический барьер;
- ЦНС – центральная нервная система;
- ДНКЖ – динитрозильные комплексы железа;
- цГМФ –циклический гуанозинмонофосфат;
- ГЦ – гуанилатциклаза;
- СВЧ – сверхвысокие частоты;
- PI – йодистый пропидий;
- АТФ – аденозинтрифосфат;

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Матвеева И.И. Оксид азота и эндогенная интоксикация у онкологических больных. / И.И. Матвеева, Г.Н. Зубрихина, Э.Г. Горожанская, М.М. Добровольская // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, т. 19, №4, 2008 стр. 55–60.
2. Ванин А. Ф. Оксид азота – регулятор клеточного метаболизма // Институт химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук, Москва. 2001. Стр. 7–12.
3. Vannini F. The dual role of iNOS in cancer / Federica Vannini, Khosrow Kashfi, Niharika Nath // Redox Biology. 2015. Pp. 334–343.
4. Sumit Sahnia Nitric oxide reduces oxidative stress in cancer cells by forming dinitrosyliron complexes. / Sahnia Sumit, Jason R. Hickok, Douglas D. Thomas. // Nitric Oxide. Volume 76, 2018. Pp. 37–44.
5. Ванин. А.Ф. Парамагнитные нитрозильные комплексы гемового и негемового железа / А.Ф. Ванин, А.Г. Четвериков // Биофизика. 1968. Стр. 608–615.
6. Jaiswal M. Inflammatory cytokines induce DNA damage and inhibit DNA repair in cholangiocarcinoma cells by a nitric oxide-dependent mechanism. / M. Jaiswal, NF. LaRusso, LJ. Burgart, GJ. Gores. // Cancer Res. 2000. Pp. 184–190.
7. Бельский. Ю.П. Клетки опухоли Эрлих стимулируют продукцию интерферона- γ Т-клетками и не чувствительны к аутокринному оксиду азота / Ю. П. Бельский, Н.В. Бельская, М.Г. Данилец и др // Вопр. онкол. 2004. Т.50, №6. Стр. 689–692.
8. Патрушев В. К. Роль оксида азота в иммуносупрессорной и противоопухолевой активностях естественных супрессорных клеток (экспериментальное исследование): Автореф. дис. ... канд. мед. наук / В. К. Патрушев. – Томск, 2004. Стр. 22.
9. Kovacevic Z. Regulation and control of nitric oxide (NO) in macrophages: Protecting the “professional killer cell” from its own cytotoxic

arsenal via MRP1 and GSTP1 / Z. Kovacevic, S. Sahni, H. Lok, M.J. Davies, D.A. Wink, D.R. Richardson // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2017. Pp 995–999.

10. Ванин А. Ф. Парамагнитные нитрозильные комплексы гемового и негемового железа / А. Ф. Ванин, А. Г. Четвериков // *Биофизика*. – 1967. – т. 13, № 7. – С. 608 – 615.

11. Zhaoming Guo. CD47-targeted bismuth selenide nanoparticles actualize improved photothermal therapy by increasing macrophage phagocytosis of cancer cells. Guo Zhaoming, Ye Liu, Hao Zhou, Kun Zheng, Dong Wang, Mingli Jia, Pengcheng Xu, Kun Ma, Changhao Cui, Li Wang. // *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2019. Pp. 1–36.

12. Rodriguez Pia L. Nanoparticles Masquerade as “Self” to Inhibit Phagocytosis. / Pia L. Rodriguez, Takamasa Harada, Dennis E. Discher. // *Biophysical Journal* 100(3), 2011.

13. Pleskova S. N. Characteristics of quantum dots phagocytosis by neutrophil granulocytes. / S. N. Pleskova, R. N. Kriukov, E. N. Gorshkova, A. V. Boryakov, // *Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russia*. 2019. Pp. 1–20.

14. Daniele Zanella. Iron oxide nanoparticles can cross plasma membranes / Zanella Daniele, Bossi Elena, Gornati Rosalba, Bastos Carlos, Faria Nuno, Bernardini Giovanni // *Scientific reports*. 2017. Pp. 1–10.

15. Истомина Т. Ю. Влияние магнитных наночастиц железа на фагоцитарную активность лейкоцитов периферической крови человека / Т.Ю. Истомина, В.Ю. Науменко, Н.Ф. Хомяков, Н.А. Константинова // *Медицинская физика*. 2015. Стр. 40–47.

16. Chen Qun. TiO₂ nanoparticles cause mitochondrial dysfunction, activate inflammatory responses, and attenuate phagocytosis in macrophages: A proteomic and metabolomic insight. Qun Chen, Ningning Wang, Mingjiang Zhu, Jianhong Lu, Huiqin Zhong, Xinli Xue, Shuoyuan Guo, Min Li, Xinben Wei, Yongzhen Tao, Huiyong Yin // *Redox Biology*. 2018. Pp. 266–276.

17. Sahu I. D. Electron Paramagnetic Resonance as a Tool for Studying Membrane Proteins. / I. D. Sahu, G. A. Lorigan // *Biomolecules*. 2020. vol.10 (5), pp. 763.
18. Lancaster J.R. Jr. EPR demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages. / J.R. Lancaster Jr, J.B. Hibbs Jr // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990. Pp.1223–1227.
19. Crook M. A. *Clinical Biochemistry and Metabolic Medicine* / M. A. Crook. – Boca Raton: CRC Press. 2012. – Pp. 232.
20. Vanin A.F. Paramagnetic nitrosyl complexes of heme and non-heme iron. / A. F. Vanin, A.G Chetverikov. // *Biofizika*. 1968. 13(4) Pp. 608–615.
21. 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. – том 74, № 6. – С. 539–574.
22. Баранов Д.А. Магнитные наночастицы: проблемы и достижения химического синтеза / Д. А. Баранов, С. П. Губин // *Наносистемы*. – 2009. – Том 1, № 1-2. – С. 129–147.
23. Егунова О.Р. Магнитные наночастицы магнетитов разделения и концентрировании / О. Р. Егунова, Т. А. Константинова, С. Н. Штыков // . – 2014. – том 14, № 4. – С. 27–35.
24. Ashoori R.C. Electrons in Artificial Atoms / R.C. Ashoori // *Nature*. – 1996. – 379. – P. 413–419.
25. Leeuwen D.A. Quenching of Magnetic Moments by Ligand-Metal Interactions in Nanosized Magnetic Metal Clusters / D.A. Leeuwen, J.M. Ruitenbeek, L.J. Jongh, A. Ceriotti, G. Pacchioni, O.D. Haberlen, N. Rosch // *Phys. Rev. Lett.* – 1994. – 73, 10. – P. 1432–1436.
26. Leslie-Pelecky D.L. Magnetic Properties of Nanostructured Materials / D.L. Leslie-Pelecky, R.D. Rieke // *Chem. Mater.* –1996. – 8. – P 1770–1783.
27. Meiklejohn W.H. New Magnetic Anisotropy / W.H. Meiklejohn, C.P. Bean // *Phys. Rev.* – 1957. – 105. – P. 904–913.

28. Murray C.B. Monodisperse 3d Transition Metal (Co, Ni, Fe) Nanoparticles and Their Assembly into Nanoparticle Superlattices / C.B. Murray, S. Sun, H. Doyle, T. Betley // *MRS Bulletin*. – 2001. – 26. – P. 985–991.
29. Ding J. Ultrafine SrFe₁₂O₁₉ powder synthesised by mechanochemical processing / J. Ding, T. Tsuzuki, P.G. McCormick // *J. Magn. Mater.* – 1998. – P.931–932.
30. Tishin A.M. Magnetocaloric effect and its applications / A.M. Tishin, Yu. I. Spichkin // *Springer*. – 2003. – P. 451– 469.
31. Губин С.П. Что такое наночастица? Тенденции развития нанохимии и нанотехнологии / С.П. Губин // *Росс. Хим. Журнал*. – 2000. – XLIV, № 6. – С. 23–31.
32. Суздаев И.П. Нанокластеры и нанокластерные системы. Организация, взаимодействие, свойства / И.П. Суздаев // *Успехи химии*. – 2001. – 70. – С. 203–249.
33. Hu J.T. Chemistry and physics in one dimension: synthesis and properties of nanowires and nanotubes / J. Hu, T.W. Odom, C.M. Lieber // *Acc. Chem. Res.* – 1999. – 32 (5). – P. 435–445.
34. Qin. J. A high-performance Magnetic Resonance Imaging T2 contrast agent / J. Qin, S. Laurent, Y.S. Lo, A. Roch, M. Mikhaylova, Z.M. Bhujwalla, R.N. Muller, M. Muhammed // *Advanced Materials*. – 2007. – № 19. – Pp. 1874–1878.
35. Brahler M. Magnetite-loaded carrier erythrocytes as contrast agents for magnetic resonance imaging / M. Brahler, R. Georgieva, N. Buske, J. Pinkernelle, U. Teichgraber, A. Voigt, H. Baumler // *Nano Lett.* – 2006. – 6. – P. 2505–2509.
36. Шевцов М.А. Магнитные наночастицы в диагностике и терапии злокачественных опухолей головного мозга. / М. А. Шевцов, Л. Ю. Яковлева, Б. П. Николаев // *лучевая диагностика и терапия* 2013 стр. 29-39.
37. Neuwelt E. A. Imaging of iron oxide nanoparticles by MR and light microscopy in patients with malignant brain tumours / E. A. Neuwelt, P. Varallyay,

A. G. Bago et al. // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* – 2004. – Vol. 30. – P. 456–471.

38. Jiang W. Conjugation of functionalized SPIONs with transferrin for targeting and imaging brain glial tumors in rat model / W. Jiang, H. Xie, D. Ghoorah et al. // *PLoS One.* – 2012. – Vol. 7. – e37376.

39. Shevtsov M.A. Magnetic nanoparticles Hsp70 conjugate for targeted delivery to brain tumor in rat intracranial model of C6 glioma / M. A. Shevtsov, L. Y. Yakovleva, B. P. Nikolaev et al. // *EORTCEANOESMO Conference 2013 "Trends in Central Nervous System Malignancies"*, Prague, Czech Republic, 2013, 22–23 March. Programme book. – P. 31.

40. Taschner C. A. Characteristics of ultrasmall Superparamagnetic iron oxides in patients with brain tumors / C. A. Taschner, S. G. Wetzel, M. Tolnay et al. // *Am. J. Roentgenol.* – 2005. – Vol. 185. – P. 1477–1486.

41. Sanhaji M. The phenotype of target pancreatic cancer cells influences cell death by magnetic hyperthermia with nanoparticles carrying gemcitabine and the pseudo-peptide NucAnt. / Mourad Sanhaji, Julia Göring, Pierre Couleaud, Antonio Aires, Aitziber L. Cortajarena, José Courty, Adriele Prina-Mello, Marcus Stapf, Robert Ludwig, Yuri Volkov, Alfonso Latorre, Álvaro Somoza, Rodolfo Miranda, Ingrid Hilger. // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.* 2019. Pp. 2–15.

42. Fortin J-P. Size-Sorted Iron Oxide Nanomagnets as Colloidal Mediators for Magnetic Hyperthermia / J-P. Fortin, C. Wilhelm, J. Servais, C. Menager, J-C. Bacri, F. Gazeau // *J. Am. Chem. Soc.* – 2007. – 129. – P. 2628–2635.

43. Drake P. Gd-doped iron-oxide nanoparticles for tumor therapy via magnetic field hyperthermia / P. Drake, H-J. Cho, P-S. Shih, C-H. Kao, K-F. Lee, C-H. Kuo, X-Z. Lin, Y-J. Lin // *Mater. Chem.* – 2007. – 17. – P. 4914–4918.

44. Mohapatra S. Synthesis of highly stable folic acid conjugated magnetite nanoparticles for targeting cancer cells / S. Mohapatra, S.K. Mallick, T.K. Maiti, S.K. Ghosh, P. Pramanik. // *Nanotechnology.* – 2007. – 18. – P. 385102–385111.

45. Hild W.A. Quantum dots – Nano-sized probes for the exploration of cellular and intracellular targeting / W.A. Hild, M. Breunig, A. Goepferich // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2008. – P. 153–168.

46. Никифоров В.Н. Медицинские применения магнитных наночастиц / В.Н. Никифоров // *Известия академии инженерных наук им. А.М. Прохорова*. – 2013. – С. 23– 34.

47. Добрецов К.Г. Изучение свойств магнитных наночастиц в оториноларингологии / К. Г. Добрецов, В. Ю. Афонькин, С. В. Столяр, В. П. Ладыгина А. В. Сипкин, К. В. Пуртов, О. А. Баюков, А. С. Лопатин // *Научные статьи*. – 2009. – С. 51– 56.

48. Добрецов К.Г. Новый способ лечения хронического риносинусита / Добрецов К.Г., Лопатин А.С., Столяр С.В., Сипкин А.В., Ладыгина В.П., Пронина Ю.В. // *Оригинальные статьи*. – 2010. – т 5, № 4. – стр. 84–88.

49. Solinas G. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation / G. Solinas, G. Germano, A. Mantovani, P. Allavena. // *J Leukoc Biol* 86(5), 2009. Pp. 1065-1073.

50. Chao M.P. Therapeutic Antibody Targeting of CD47 Eliminates Human Acute Lymphoblastic Leukemia, *Cancer Research* / M.P. Chao, A.A. Alizadeh, C. Tang, M. Jan, R. Weissman-Tsukamoto, F. Zhao, C.Y. Park, I.L. Weissman, R. Majeti // *Cancer Res*. 2011. 71(4), pp. 1374–1384.

51. Chao M.P. Extranodal dissemination of non-Hodgkin lymphoma requires CD47 and is inhibited by anti-CD47 antibody therapy M.P. Chao, C. Tang, R.K. Pachynski, R. Chin, R. Majeti, I.L. Weissman // *Blood*. 118(18), 2011. pp 4890–4901.

52. Kim D. Anti-CD47 antibodies promote phagocytosis and inhibit the growth of human myeloma cells. / D. Kim, J. Wang, S.B. Willingham, R. Martin, G. Wernig, I.L. Weissman, Anti-CD47. // *Leukemia* 26(12) 2012. Pp. 2538–2545.

53. Zhang H. HIF-1 regulates CD47 expression in breast cancer cells to promote evasion of phagocytosis and maintenance of cancer stem cells. / H. Zhang, H. Lu, L. Xiang, J.W. Bullen, C. Zhang, D. Samanta, D.M. Gilkes, J. He, G.L.

Semenza. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 112(45), 2015. Pp. E6215–E6223.

54. Steinert G. Immune Escape and Survival Mechanisms in Circulating Tumor Cells of Colorectal Cancer / G. Steinert, S. Schoelch, T. Niemiets, N. Iwata, S.A. Garcia, B. Behrens, A. Voigt, M. Kloor, A. Benner, U. Bork, N.N. Rahbari, M.W. Buechler, N.H. Stoecklein, J. Weitz, M. Koch. // Cancer Research 74(6), 2014. Pp. 1694–1704.

55. Lee T.K.-W. Blockade of CD47-Mediated Cathepsin S/Protease Activated Receptor 2 Signaling Provides a Therapeutic Target for Hepatocellular Carcinoma. / T.K.-W. Lee, V.C.-H. Cheung, P. Lu, E.Y.T. Lau, S. Ma, K.H. Tang, M. Tong, J. Lo, I.O.L. Ng. // Hepatology 60(1), (2014). Pp. 179–191.

56. Wang Y. Intravenous Delivery of siRNA Targeting CD47 Effectively Inhibits Melanoma Tumor Growth and Lung Metastasis. / Y. Wang, Z. Xu, S. Guo, L. Zhang, A. Sharma, G.P. Robertson, L. Huang. // Molecular Therapy. 21(10), 2013. pp. 1919–1929.

57. Baccelli I. Identification of a population of blood circulating tumor cells from breast cancer patients that initiates metastasis in a xenograft assay / I. Baccelli, A. Schneeweiss, S. Riethdorf, A. Stenzinger, A. Schillert, V. Vogel, C. Klein, M. Saini, T. Baeuerle, M. Wallwiener, T. Holland-Letz, T. Hoefner, M. Sprick, M. Scharpff, F. Marme, H.P. Sinn, K. Pantel, W. Weichert, A. Trumpp. // Nature Biotechnology. 31(6), 2013. Pp. 539–U143.

58. Chen Q. In situ sprayed bioresponsive immunotherapeutic gel for post-surgical cancer treatment. / Q. Chen, C. Wang, X.D. Zhang, G.J. Chen, Q.Y. Hu, H.J. Li, J.Q. Wang, D. Wen, Y.Q. Zhang, Y.F. Journal Pre-proof Lu, G. Yang, C. Jiang, J. Wang, G. Dotti, Z. Gu. // Nat Nanotechnol. 14(1), 2019. Pp. 89-+.

59. Sica A. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. / A. Sica, T. Schioppa, A. Mantovani, P. Allavena. // Eur J Cancer. 42(6), 2006. Pp. 717–727.

60. Mantovani A. Role of tumor associated macrophages in tumor progression and invasion / A. Mantovani, T. Schioppa, C. Porta, P. Allavena, A. Sica. // *Cancer Metastasis Rev.* 25(3), 2006. Pp. 315–322.

61. Chen W.R. Antitumor immunity induced by laser immunotherapy and its adoptive transfe / W.R. Chen, A.K. Singhal, H. Liu, R.E. Nordquist. // *Cancer Research.* 61(2), 2001. Pp. 459–461.

62. Tsai R.K. Inhibition of "self" engulfment through deactivation of myosin-II at the phagocytic synapse between human cells. / R.K. Tsai, D.E. Discher. // *Journal of Cell Biology.* 180(5), 2008. Pp. 989–1003.

63. Fang J. The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect. / J. Fang, H. Nakamura, H. Maeda. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 63(3), 2011. Pp. 136–151.

64. Philip Moriarty. Nanostructured materials / P. Moriarty // *Reports on Progress in Physics.* – 2001. – № 3. – P. 64.

65. Oberdorster G. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles *Environ. Health Perspect* / G. Oberdorster, E. Oberdorster, J. Oberdorster – 2005. – 113. – P. 823–839.

66. Pal S. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli* / S. Pal, Y.K. Tak, J.M. Song // *Appl. Environ. Microbiol.* –2007. – 73. – P. 1712–1720.

67. Chithrani B.D. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells / B.D. Chithrani, A.A. Ghazani, W.C.W. Chan // *Nano Lett.* – 2006. – 4 – P. 662–668.

68. Alexandra Kroll. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges / Kroll Alexandra, Mike H. Pillukat, Daniela Hahn, Jürgen Schnekenburger // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* – 2009. –V. 72 – P. 370–377.

69. Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour / Sumit Arora, Jyutika M. Rajwade, Kishore M. Paknikar // Toxicology and Applied Pharmacology. – 2012. V. 258, 2. –P. 151–165.

70. Powell JJ, et al. A nano-disperse ferritin-core mimetic that efficiently corrects anemia without luminal iron redox activity. Nanomedicine: nanotechnology, biology, and medicine. 2014; 10:1529–1538.

71. Latunde-Dada GO, et al. A nanoparticulate ferritin-core mimetic is well taken up by HuTu 80 duodenal cells and its absorption in mice is regulated by body iron. J Nutr. 2014; 144:1896–1902.

72. Pereira DIA, et al. Caco-2 cell acquisition of dietary iron(III) invokes a nanoparticulate endocytic pathway. PloS one. 2013. 8: e81250.

73. S. Li. Deformation and poration of lipid bilayer membranes by cationic nanoparticles. / Li S, Malmstadt N. // Soft Matter. 2013. 9:4969–4976.

74. Zhang H, et al. Cooperative transmembrane penetration of nanoparticles. Sci Rep. 2015. 5:10525.

75. Лабас Ю. А. Регуляторная роль активных форм кислорода: от бактерий до человека / Ю. А. Лабас, А. В. Гордеева, Ю. И. Дерябина, А. Н. Дерябин, Е. П. Исакова // Успехи современной биологии. 2010. том 130, № 4, с. 323–335.

76. David F. Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production in Excitable Cells: Modulators of Mitochondrial and Cell Function. F. David. Stowe, Amadou K. S. Camara. // Antioxidants & redox signaling Volume 11, Number 6, 2009.1373–1413.

77. Брудастов Ю.А. Активные метаболиты кислорода при фагоцитозе. Ю.А Брудастов, О.С Журлов, Е.В Колинченко, Д.А. Грудинина. // Вестник ОГУ, Экспериментальная и клиническая медицина. 2008. Стр. 148–151.

78. Duong Cao Nguyen. Exposure to electromagnetic field attenuates oxygen-glucose deprivation-induced microglial cell death by reducing intracellular Ca^{2+} and ROS / Cao Nguyen Duong & Jae Young Kim // Int J Radiat Biol. 2016. 92(4), pp. 195–201.

79. Gu Zhengying. Mechanism of Iron Oxide-Induced Macrophage Activation: The Impact of Composition and the Underlying Signaling Pathway. / Zhengying Gu, Tianqing Liu, Jie Tang, Yannan Yang, Hao Song, Zewen K Tuong, Jianye Fu, Chengzhong Yu. // J. Am. Chem. Soc. 2019. Pp. 6122–6126.

80. Лигачёва А. А. Влияние способа получения на состав полисахаридов *Saussurea controversa* и их NO-стимулирующую активность / А.А. Лигачева, Я.Е. Решетов, Е.Ю. Авдеева, М.Г. Данилец, Е.С. Трофимова, Е.Ю. Шерстобоев, М.В. Белоусов. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019. Стр. 32–37.

81. Guo Zhaoming. CD47-targeted bismuth selenide nanoparticles actualize improved photothermal therapy by increasing macrophage phagocytosis of cancer cells. Zhaoming Guo, Ye Liu, Hao Zhou, Kun Zheng, Dong Wang, Mingli Jia, Pengcheng Xu, Kun Ma, Changhao Cui, Li Wang. 2019. Pp.1–36.

82. Раевская Т.А. Доноры оксида азота как модуляторы лекарственной резистентности опухолей / диссертация д-ра био. наук / Раевская Татьяна Анатольевна 2006. – Стр.123.

83. Michel T. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? / T. Michel, O. Feron // J. Clin Invest. 1997; 100(9), 2146–2152.

84. Friebe A. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. / A. Friebe, D. Koesling. // Circ. Res. 93, 2003. Pp 96–105.

85. Экология наноматериалов А.Ю. Годымчук, Г.Г. Савельев, А.П. Зыкова // Нанотехнологии Экология наноматериалов: учебное пособие / А. Ю. Годымчук, Г. Г. Савельев, А. П. Зыкова; под ред. Л. Н. Патрикеева и А. А. Ревинной. – 2-е изд. (эл.). – Электрон. текстовые дан. 275 с. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. – (Нанотехнологии).

86. Sahoo S. K., Parveen S., Panda J. J. The present and future of nanotechnology in human health care // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. – 2007. – № 3. – P. 20–31.

87. Naumenko V. Intravital microscopy reveals a novel mechanism of nanoparticles excretion in kidney / Victor Naumenko, Aleksey Nikitin, Ksenia Kapitanova, Pavel Melnikov, Stepan Vodopyanov, Anastasia Garanina, Marat Valikhov, Artem Ilyasov, Daniil Vishnevskiy, Aleksey Markov, Sergei Golyshev, Dmitry Zhukov, Irina Alieva, Maxim Abakumov, Vladimir Chekhoninc, Alexander Majouga. // *Journal of Controlled Release*. Volume 307, 10 August 2019, Pages 368–378.

88. Химиотерапия злокачественных опухолей [Текст] / Чл.-кор. АМН СССР проф. Л. Ф. Ларионов; Акад. мед. наук СССР. - Москва: Медгиз, 1962. Стр. 460 – 464.

89. Сетков Н.А. Большой энциклопедический словарь медико-биологических терминов ТОМ 1 // Н.А. Сетков, Г.Э. Карапетян. – Красноярск:/ Издательство «Буква Статейнова», 2020. стр. 126. (752С.)

90. Ozaslan Mehmet. Ehrlich ascites carcinoma / Mehmet Ozaslan, IsiK Didem Karagoz, Ibrahim Hali Kilic and Muhammed Guldur // *African Journal of Biotechnology*. Vol. 10(13), 2011. pp. 2375–2378.

91. Панин Л. Е. Молекулярные механизмы регуляции клеточной пролиферации и опухолевого роста. / Л. Е. Панин // *Бюллетень сибирского отделения российской академии медицинских наук*. Т 22, № 2, 2002. Стр. 8–14.

92. Суменкова Д. В. Влияние липопротеинов и стероидных гормонов на биосинтез белка в клетках с асцитной карциномы Эрлиха / Д. В. Суменкова, Р. А. Князев, Л. М. Поляков, Л. Е. Панин. // *Бюллетень сибирского отделения российской академии медицинских наук*. Т 30, № 2, 2010. Стр. 44–48.

93. Sahu I. D. Electron Paramagnetic Resonance as a Tool for Studying Membrane Proteins. / I. D. Sahu, G. A. Lorigan. // *Biomolecules*. 2020. vol.10(5), pp. 763.

94. Burlaka A. P. Rectal Cancer: Redox State of Venous Blood and Tissues of Blood Vessels from Electron Paramagnetic Resonance and Its Correlation with the Five-Year Survival. / A. P. Burlaka, A. V. Vovk, A. A. Burlaka, M. R.

Gafurov, K. B. Iskhakova, S. N. Lukin. // *BioMed Research International*. 2018. Pp. 1–7.

95. Stolyar S. V. Polysaccharide-coated iron oxide nanoparticles: Synthesis, properties, surface modification. S. V. Stolyar V. V. Krasitskaya, L. A. Frank, R. N. Yaroslavtsev, L. A. Chekanova, Y. V. Gerasimov, M. N. Volochaev, M. Sh. Bairmanie, D. A. Velikanov. Vol. 284, Part 1, 2021. P. 128920.

96. Владимиров, Ю. А. Сверхслабые свечения при биохимических реакциях / Ю. А. Владимиров // М.: Наука. – 1966. – 126 с.

97. Макарская Г. В. Особенности функциональной активности клеток периферической крови рыб средней части Красноярского водохранилища в летний период. Г. В. Макарская, С. В. Тарских / *Экологическая физиология и биохимия водных животных* // *Гидробиол. Журн.* – 2011. Т. 47, № 5. Стр. 88–95.

98. Idziorek T. YO-PRO-1 permits cytofluorometric analysis of programmed cell death (apoptosis) without interfering with cell viability / T. Idziorek, J. Estaquier, F. De Bels, J.C. Ameisen. // *J. Immunol. Methods*. – 1995. – Vol. 185(2). – Pp. 249–258.

99. Ozaslan M. Guldur Ehrlich ascites carcinoma. / M. Ozaslan, I.D. Karagoz, I.H. Kilic, M.E // *Afr. J. Biotechnol.* 2011. Pp. 2375–2378.

100. Kovacevic Z. Regulation and control of nitric oxide (NO) in macrophages: Protecting the “professional killer cell” from its own cytotoxic arsenal via MRP1 and GSTP1 / Z. Kovacevic, S. Sahni, H. Lok, M.J. Davies, D.A. Wink, D.R. Richardson. // *Biochimica et Biophysica Acta*. 2017. Pp 995–999.

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

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

 А. Н. Шуваев

подпись

инициалы, фамилия

« 16 » июня 2021 г.


МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Влияние магнитных наночастиц на клетки экспериментальной опухоли в
переменном магнитном поле

03.04.02 Физика

03.04.02.09 Технологическое сопровождение ядерной медицины и
медицинского оборудования

Научный руководитель

 15.06
подпись, дата

профессор, д.ф.-м.н.
должность, ученая степень

С. В. Столяр

Выпускник

 15.06
подпись, дата

Н. В. Латышев

Рецензент

 15.06
подпись, дата

н.с. к.ф.-м.н.
должность, ученая степень

И. Г. Важенина

Научный консультант

 15.06
подпись, дата

с.н.с., к.б.н.
должность, ученая степень

О.В. Крюкова

Красноярск 2021