

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
“ВОРОНЕЖСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ”

На правах рукописи

ШИЛОВА ЕЛЕНА ВАСИЛЬЕВНА

Исследование и разработка магнитоиммунолипосом и нейтрофильных  
внеклеточных ловушек в качестве средств адресной доставки лекарственных  
веществ

Специальность 1.5.2. - биофизика

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук,  
профессор  
Артюхов Валерий Григорьевич

Воронеж 2022

## СОДЕРЖАНИЕ

## ВВЕДЕНИЕ

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Структурно-функциональная характеристика нейтрофилов крови человека	14
1.1.1. Нейтрофилы: происхождение, развитие, структура	14
1.1.2. Функции нейтрофилов в норме и при патологиях	16
1.1.3. Нетоз. Механизмы и функциональное значение нетоза. Теоретические аспекты возможного применения НВЛ в качестве средства адресной доставки лекарственных веществ	20
1.2. Технологии адресной доставки лекарственных средств	28
1.2.1. Проблемы и перспективы адресной доставки лекарств	28
1.2.2. Наночастицы для доставки лекарственных препаратов	31
1.2.3. Наночастицы на основе оксидов металлов переменной валентности	33
1.3. Липосомальные наночастицы в доставке лекарственных препаратов	35
1.3.1. Структура и типы липосом	35
1.3.2. Магнитолипосомы. Преимущества и проблемы использования	36
Глава 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	40
2.1. Объекты исследования	40
2.2. Методы исследования	40
2.2.1. Выделение нейтрофилов из периферической крови доноров	40
2.2.2. Определение жизнеспособности нейтрофилов	41
2.2.3. Определение чистоты клеточных суспензий	41
2.2.4. Стимуляция нейтрофилов к образованию ловушек	42
2.2.5. Приготовление препаратов для флуоресцентной микроскопии	42
2.2.6. Выделение ДНК	43
2.2.7. Изучение структуры выделенных нейтрофилами нуклеиновых кислот методом электрофореза в агарозном геле	44

2.2.8. Выявление наличия мтДНК в составе НВЛ	45
2.2.9. Выявление наличия гистона H3 в составе НВЛ	45
2.2.10. Получение липосомальных частиц из ФХ	46
2.2.11. Изучение размеров синтезированных наночастиц методом динамического светорассеяния	47
2.2.12. Изучение включения инсулина и гемоглобина в состав липосом	47
2.2.13. Определение уровня ПОЛ в липосомах из ФХ	48
2.2.14. Приготовление парамагнитных наночастиц на основе оксидов металлов переменной валентности	48
2.2.15. Подготовка образцов наночастиц для просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ)	49
2.2.16. Исследование состава получаемых наночастиц магнетита и марганцевого феррита	49
2.2.17. Изучение включения наночастиц магнетита в липосомы	50
2.2.18. Получение иммуномагнитолипосом	51
2.2.19. Оценка цитотоксичности получаемых наночастиц	51
2.2.20. Оценка взаимодействия иммуномагнитолипосом со структурами НВЛ	53
2.2.21. Статистическая обработка полученных данных	54
Глава 3. ИЗУЧЕНИЕ УСЛОВИЙ ОБРАЗОВАНИЯ И СТРУКТУРЫ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК ЧЕЛОВЕКА	55
3.1. Подбор условий образования внеклеточных ловушек нейтрофилами крови человека	55
3.2. Изучение физико-химических свойств и структуры нуклеиновых кислот, выделяемых нейтрофилами крови человека при их стимуляции латексом. Поиск возможных мишеней в структуре НВЛ для адресной доставки липосом	57
3.3. Изучение способности нейтрофилов образовывать внеклеточные ловушки в условиях воздействия УФ-облучения	61

3.4. Изучение изменений метаболической активности нейтрофилов, стимулированных к образованию внеклеточных ловушек после УФ-облучения	63
3.5. Изучение степени фрагментации нуклеиновых кислот, выделенных во внеклеточную среду нейтрофилами, стимулированными к образованию внеклеточных ловушек после воздействия УФ-излучения	65
ГЛАВА 4. СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТА И МАРГАНЦЕВОГО ФЕРРИТА	67
4.1. Подбор концентраций исходных веществ	67
4.2. Изучение размеров наночастиц магнетита и марганцевого феррита	72
4.3. Влияние некоторых факторов (рН, химических агентов) на стабильность наночастиц магнетита	73
ГЛАВА 5. ПОЛУЧЕНИЕ МАГНИТОУПРАВЛЯЕМЫХ ЛИПОСОМ	77
5. 1. Определение размеров полученных липосом	77
5.2. Определение степени включения белков во внутреннюю полость липосомальных наночастиц	78
5.3. Определение уровня ПОЛ в липосомах	79
5.4. Динамика изменения размера липосомальных наночастиц из соевого лецитина в процессе лиофилизации с сахарозой различной концентрации	81
5.5. Изучение встраивания наночастиц магнетита в липосомы	82
5.6. Получение иммуномагнитолипосом и их размерные характеристики	84
5.7. Оценка цитотоксичности получаемых наночастиц липосом	86
5.8. Оценка взаимодействия получаемых магнитоуправляемых иммунолипосом со структурами НВЛ	92

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	96
ВЫВОДЫ	99
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	101

## Список условных сокращений

АТ – антитела

АФК – активные формы кислорода

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДРС – динамическое рассеяние света

МНЧ – магнитные наночастицы

ММП-9 – матриксная металлопротеиназа – 9

МПО - миелопероксидаза

МРТ – магнитно-резонансная томография

НВЛ – нейтрофильная внеклеточная ловушка

НЭ – нейтрофильная эластаза

ПМЯЛ – полиморфно-ядерные лейкоциты

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

ФМА – форбол-меристацетат

ФХ – фосфатидилхолин

ХЛ - холестерин

ЦОК – циркулирующие опухолевые клетки

ЦТАБ – цетилтриметиламмония бромид

ЭЦМ- экстрацеллюлярный матрикс

DSPE-PEG -1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[amino(polyethyleneglycol)]

IFN- $\gamma$  – гамма-интерферон

IL-8 – интерлейкин-8

PAD4 – Peptidyl arginine deiminase type 4

PKC – протеинкиназаС

TLR-4 – Toll-like receptor -4

## ВВЕДЕНИЕ

### *Актуальность темы исследования*

На сегодняшний день нанотехнологии широко применяются в различных сферах жизни человека и, в особенности, в медицине. Одно из самых бурно развиваемых направлений – тераностика, т.е. использование одного препарата одновременно как в диагностических, так и в терапевтических целях. В частности, перспективным средством в тераностике являются липосомы, содержащие в своём составе наночастицы оксидов металлов (магнитолипосомы). Они позволяют комбинировать диагностику и лечение, инкапсулируя контрастные агенты для магнитно-резонансной томографии (МРТ) вместе с терапевтическими средствами.

Тем не менее, существует ряд проблем при производстве магнитоуправляемых липосом. Магнитные наночастицы, поверхность которых не стабилизирована поверхностно-активными веществами, вызывают утечку лекарственных препаратов из липосом. Для того чтобы избежать данных эффектов, поверхность магнитных наночастиц покрывают веществами различных классов: неорганическими веществами, органическими соединениями, синтетическими полимерами нейтрального, катионного, анионного характера, природными полимерами [14]. Размер включаемых в липосомы магнитных частиц является важным параметром, определяющим свойства синтезируемых магнитолипосом. Наночастицы размером несколько нанометров могут быть помещены в липидный бислой, но они обладают меньшим магнитным моментом. Наночастицы, имеющие размер более 5 нм, могут образовывать агрегаты. Поэтому оптимальная методика синтеза магнитных липосом направлена на высокую загрузку магнитных наночастиц, для чего требуется плотное и стабильное гидрофобное покрытие. Также остаётся не до конца решённым ряд вопросов, главными из которых являются: высокая склонность к агрегации магнитных

наночастиц, окисление липосом, высокая гетерогенность размеров наночастиц, невысокая степень включения лекарственных веществ.

Перспективными являются исследования по выявлению новых потенциальных молекулярных мишеней для адресной доставки лекарственных средств, позволяющих более точно и эффективно доставлять препараты.

В 2004 г. Brinkmann V. были открыты структуры, названные нейтрофильными внеклеточными ловушками, которые являются важным звеном в реализации иммунного ответа и в развитии онкопроцессов в организме. Данные структуры являются одним из главных механизмов неспецифического иммунного ответа, образуясь в организме при попадании в него патогенных микроорганизмов. Однако J. Cools-Lartigue с соавторами (2013 г.) было показано, что НВЛ способны адсорбировать на своей поверхности и раковые клетки, но не уничтожая их, а активируя и перенося по кровеносному руслу. Показано, что это является одним из механизмов метастазирования.

Следовательно, НВЛ открывают широкие перспективы для их использования в качестве средства адресной доставки противоопухолевых препаратов.

### ***Цель и задачи исследования***

**Целью** исследований является разработка способов адресной доставки лекарственных препаратов с использованием иммуномагнитолипосом и нейтрофильных внеклеточных ловушек и исследование их токсикологических свойств на объектах животного и растительного происхождения.

В связи с вышесказанным в ходе исследования были поставлены следующие **задачи**:

1. Подобрать условия образования НВЛ и изучить их структуру

2. Выявить потенциальные мишени в структуре НВЛ для адресной доставки лекарственных препаратов с помощью наночастиц
3. Выявить режим ультразвуковой обработки при синтезе липосом, а также соотношение концентраций исходных веществ и влияние ионного состава буферов при синтезе наночастиц магнетита и марганцевого феррита, позволяющие получать наночастицы с минимальным значением агрегации
4. Синтезировать магнитолипосомы с включением магнитных наночастиц в липидный бислой
5. Получить липосомы, способные к взаимодействию с нейтрофильными внеклеточными ловушками, и изучить уровень их цитотоксичности

### ***Научная новизна***

Оптимизирован процесс синтеза магнитных наночастиц магнетита и марганцевого феррита. Установлены оптимальные концентрации исходных веществ, а также влияние буферных сред различного ионного состава и значения рН на  $\zeta$ - потенциал синтезированных магнитных наночастиц.

Подобран режим ультразвуковой обработки, позволяющий получать стандартизированные по размеру липосомы. По полученным данным был получен патент РФ «Способ получения липосом» (2017г.).

Изучены временные условия образования НВЛ при стимуляции нейтрофилов частицами латекса, их структура. Показана возможность создания липосом, содержащих в качестве вектора антитела к гистону НЗ (ФХ / ХЛ / ДСФЭ-ПЭГ / АТ-гистон НЗ /  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -ЦТАБ) и взаимодействующих с молекулами гистона НЗ в структуре НВЛ. Исследованы цитотоксические свойства синтезированных иммуномагнитолипосом. Исследования цитотоксичности показали, что синтезированные иммуномагнитолипосомы в концентрациях 1-1000 липосом на клетку не оказывают токсического воздействия на клетки крови человека (эритроциты и лимфоциты), а также на

клетки микроводоросли *Chlorella vulgaris*. При включении в липосомы азида натрия (0,03%) происходит нарушение структурной целостности эритроцитов при концентрации 100-1000 липосом на 1 клетку. При увеличении концентрации до 1000 наночастиц на клетку выявляется активация роста количества клеток хлореллы.

### ***Практическая значимость***

В результате исследований разработан усовершенствованный способ синтеза липосом. Установленные условия получения суспензии липосом и режимы последующей её обработки ультразвуком позволяют получать стандартизированные по размерам наночастицы, которые могут быть применены в медицинской практике.

Синтезированные магнитные наночастицы магнетита обладают необходимыми размерными характеристиками для встраивания в липидный бислой липосом. Интегрирование магнитных наночастиц в структуру липидного бислоя при получении магнитоуправляемых липосом позволит снизить риск взаимодействия вводимого в них препарата с материалом самих наночастиц, а рост свободного объема внутренней полости, вследствие ее освобождения от включенного наноматериала, даёт возможность увеличить удельное содержание доставляемого к клеткам-мишеням лекарственного препарата с одновременным снижением количества вводимых в организм липосом.

Материалы диссертационных исследований используются при проведении на кафедре биофизики и биотехнологии Воронежского государственного университета спецкурсов «Основы бионанотехнологии», «Нанобиотехнологии в медицине».

### ***Апробация работы***

Результаты диссертационного исследования прошли апробацию на общероссийских и международных конференциях: международная конференция молодых учёных «Экспериментальная и теоретическая биофизика» (Пушино-на-Оке, 22-24 окт. 2012), Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы. Международная научно-методическая конференция; 95-летию Воронежского госуниверситета и 50-летию кафедры биофизики и биотехнологии посвящается. (Воронеж, 2013), I всероссийская XIII межрегиональная научная сессия молодых учёных с международным участием «Современные решения актуальных научных проблем в медицине» (Нижний Новгород, 18-19 марта 2015), Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ: материалы 6-й Международной научно-методической конференции «Фармообразование 2016» (Воронеж, 21-23 апреля 2016 г.), XVI Всероссийская конференция молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика» (Пушино, 2-3 ноября 2016г.), Материалы XXIII съезда физиологического общества им. И.П.Павлова. (Воронеж, 18-22 сентября 2017 г.), VI съезд биофизиков России (Сочи, 16-21 сентября 2019г.), «Актуальные вопросы биологической физики и химии. БФФХ-2019». (Москва, 2019г.), XI Всероссийская научно-практическая конференция «Нанотехнологии: образование, наука, инновации» (Курск, 2020).

### ***Публикации***

По теме диссертации имеется 17 публикаций:

1 патент РФ, 4 статьи ВАК РФ (Российские нанотехнологии – «Изучение цитотоксичности иммуномагнитолипосом на примере культуры

микроводоросли *Chlorella vulgaris*»; Opera medica et physiologica- «Study of the immunomagnetoliposomes cytotoxicity to leucocytes and erythrocytes of human blood», Нанотехнологии: разработка, применение: XXI век- «О создании магнитоуправляемых липосом для адресной доставки лекарственных средств»; Вестник Воронежского государственного университета. Серия : Химия. Биология. Фармация- «Изучение стабильности наночастиц марганцевого феррита и магнетита в различных буферных системах», 1 статья РИНЦ (Eurasian Union of Scientists), 11 тезисов

***На защиту выносятся следующие научные положения:***

1. При стимуляции нейтрофилов крови человека при 37°С в течение 30 минут частицами латекса ( $d = 1,5$  мкм) наблюдается образование нейтрофильных внеклеточных ловушек, содержащих в своём составе митохондриальную ДНК и гистон H3.

2. УФ-свет (240-390 нм) в дозах 151-906 Дж/м<sup>2</sup> блокирует образование нейтрофилами внеклеточных ловушек.

3. Определены условия ультразвуковой обработки, позволяющие получать липосомальные наночастицы, имеющие стандартизированный размер (130-180 нм в зависимости от их липидного состава), способные включать в свой состав 57% инсулина и 33 % гемоглобина.

4. Установлены диапазоны концентрации исходных солей ( $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{FeSO}_4$ ,  $\text{MnCl}_3$ ) и диапазон pH буферов, при которых синтезируемые наночастицы магнетита и марганцевого феррита обладают минимальными агрегационными свойствами.

5. Получены иммуномагнитолипосомы с включенными в состав их липидного бислоя наночастицами магнетита, способные к взаимодействию с нейтрофильными внеклеточными ловушками.

6. Показано, что липосомы (ФХ / ХЛ / ДСФЭ-ПЭГ / АТ-гистон H3 /  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -ЦТАБ) не оказывают токсического воздействия на клетки крови человека

(эритроциты и лимфоциты) и микроводоросли *Chlorella vulgaris* (при концентрациях 1-1000 липосом на 1 клетку).

### ***Личный вклад диссертанта***

Личный вклад автора (85%) состоял в: проведении экспериментов по поиску оптимальных условий синтеза парамагнитных наночастиц и липосом, исследованию образцов методами динамического рассеяния света, просвечивающей электронной микроскопии, изучению условий образования НВЛ и их структуры, поиску возможных мишеней в структуре НВЛ для адресной доставки липосом, оценке цитотоксичности синтезируемых наночастиц и их взаимодействия со структурами НВЛ; также автором проводилась статистическая обработка полученных данных, написание и подготовка статей к публикации.

### ***Объём и структура работы***

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов и материалов, двух глав, содержащих результаты и обсуждение, заключения, выводов и списка использованной литературы. Текст работы занимает 120 страниц. Работа содержит 31 рисунок. Список литературы состоит из 162 наименований.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Структурно-функциональная характеристика нейтрофилов крови человека.

#### 1.1.1. Нейтрофилы: происхождение, развитие, структура.

Нейтрофилы – иммунокомпетентные клетки с диаметром около 10 мкм, содержащие в цитоплазме зернистые гранулы. Гранулы имеют в своём составе особые антибактериальные ферменты, способные разрушать оболочку бактерий. При окрашивании по Романовскому – Гимзе в ходе лабораторных исследований мелкие зерна окрашиваются в фиолетово-розовый цвет. [10]

Зрелые нейтрофилы – большая группа, составляющая 2/3 от количества всех клеток лейкоцитов. При этом основной пул нейтрофилов находится в костном мозге, остальные распределяются по организму, при этом только небольшая часть (1%), достигая периферической крови, через несколько часов проникает в ткани. Продолжительность их жизни зависит от количества микроорганизмов в очаге воспаления [125].

Процесс образования нейтрофильных клеток лейкоцитов в костном мозге составляет примерно 5 суток. Время их перемещения по сосудистому руслу составляет 8–10 часов. За это время клетки, при столкновении с чужеродным агентом, уничтожают вредоносные частицы в очаге поражения.

По форме ядра нейтрофилы можно разделить на три вида гранулоцитарных клеток: сегментоядерные, палочкоядерные и юные. В костном мозге всегда есть некоторое количество нейтрофилов. При патологических изменениях и по требованию организма происходит их выброс в кровь.

Начиная с зарождения и до полного созревания, нейтрофилы проходят шесть стадий развития. (Рис.1) Одновременно организм может иметь клетки разных стадий созревания. По степени зрелости можно назвать следующие

группы: миелобласты → промиелоциты → миелоциты → метамиелоциты → палочкоядерные → сегментоядерные.



Рис 1. Стадии развития нейтрофилов.

Нейтрофилы содержат в своём составе гранулы следующих типов: специфические, азурофильные, желатиновые и секреторные везикулы. (Табл.1.) [33,40]

Табл.1. Состав и свойства гранул нейтрофилов (Ярилин, 2010)

Разновидность гранул	Состав гранул	Функциональное значение
Специфические	НАДФН-оксидаза, лактоферрин, щелочная фосфатаза, лизоцим, фосфолипаза А2, липокартин	Быстрая фаза бактериолиза. Восстановление цитоплазматической мембраны клетки. Бактерицидный эффект
Азурофильные	Миелопероксидаза, кислые гидролазы, лизоцим, дефензимы, нейтральные гидролазы, миелопероксидаза, катепсин G, эластаза	Медленная фаза бактериолиза. Образование АФК
Желатиновые	Желатиназа	Обеспечение миграции
Секреторные	Щелочная фосфатаза	Взаимодействие с микроокружением

### 1.1.2. Функции нейтрофилов в норме и при патологиях

Выделяют несколько основных функций нейтрофилов:

- 1) фагоцитоз;
- 2) цитотоксическое действие;
- 3) дегрануляция с выделением лизосомальных ферментов.

В основе этих функций лежат такие свойства, как адгезия (прилипание), агрегация (скупивание), двигательная активность. При этом происходят изменения физико-химических свойств, метаболизма и

структуры клеток по мере их созревания. Так, на поверхности нейтрофилов увеличивается количество активных групп, несущих отрицательный заряд, образуется слой, состоящий из сиаловых кислот, а также рецепторной системы, обеспечивающей хемотаксис [127].

Высокая подвижность нейтрофилов возможна благодаря увеличению объема цитоплазмы, изменению ее состава и физико-химических свойств, структуры ядра.

Для нейтрофилов характерны следующие виды движения:

1 – внутриклеточные – текучесть цитоплазмы, или циклоз, осцилляция центросом, ротация ядра, вращение клетки вокруг центросомы, сокращение вакуолей;

2 – движение клеточной поверхности (непрерывное, волнообразное);

3 – спонтанное распластывание на поверхности;

4 – цитоплазматическая экспансия – образование выростов, псевдоподий;

5 – хемотаксис – целенаправленное движение к объекту фагоцитирования;

6 – движения, связанные с экзоцитозом и эндоцитозом. [28, 56]

Нейтрофилы подвергаются процессу, называемому хемотаксисом, посредством амебоидного движения, которое позволяет им мигрировать к участкам инфекции или воспаления. Рецепторы клеточной поверхности позволяют нейтрофилам обнаруживать химические градиенты молекул, таких как интерлейкин-8 (IL-8), гамма-интерферон (IFN- $\gamma$ ), C3a, C5a и лейкотриен B<sub>4</sub>, которые эти клетки используют для определения пути их миграции [39,80].

Нейтрофилы имеют множество специфических рецепторов, включая рецепторы для комплемента, цитокины, такие как интерлейкины и IFN- $\gamma$ , хемокины, лектины и другие белки. Они также экспрессируют рецепторы для обнаружения и прилипания к эндотелию и рецепторам Fc опсонина [28,39].

В лейкоцитах, реагирующих на хемоаттрактант, клеточная полярность регулируется активностями малых Rho-гуанозинтрифосфатаз (Rho GTPases) и фосфоинозитид-3-киназ (PI3Ks). У нейтрофилов липидные продукты PI3Ks регулируют активацию Rho GTPases и необходимы для подвижности клеток. Они накапливаются асимметрично с плазматической мембраной на переднем крае поляризованных клеток. Пространственно регулируя Rho GTPases и организуя передний край клетки, PI3Ks и их липидные продукты могут играть ключевую роль в установлении полярности лейкоцитов, как молекулы компаса, которые сообщают клетке, куда ползти.

Являясь высокоподвижными, нейтрофилы быстро собираются в очаге инфекции, привлекаются цитокинами, экспрессируемыми активированным эндотелием, тучными клетками и макрофагами. Нейтрофилы экспрессируют и выделяют цитокины, которые, в свою очередь, усиливают воспалительные реакции у некоторых других типов клеток. [63]

Помимо рекрутирования и активации других клеток иммунной системы, нейтрофилы принимают непосредственное участие в защите организма от вторжения патогенных микроорганизмов. Нейтрофилы имеют три способа прямого воздействия на микроорганизмы: фагоцитоз (поглощение), дегрануляция (высвобождение растворимых антимикробных препаратов) и генерация нейтрофильных внеклеточных ловушек (НВЛ).

Нейтрофилы - это фагоциты, способные поглощать микроорганизмы или частицы. [111] Для распознавания мишеней они должны быть покрыты опсонинами - процесс, известный как опсонизация антител. Они могут усваивать и убивать много микробов, каждое фагоцитарное событие приводит к образованию фагосомы, в которую выделяются активные формы кислорода и гидролитические ферменты. Потребление  $O_2$  во время генерации активных форм кислорода было названо «дыхательным взрывом», хотя и не связано с дыханием или производством энергии.

«Респираторный взрыв» включает в себя активацию фермента NADPH

оксидазы, который производит большие количества супероксида, активных форм кислорода [89]. Супероксид распадается самопроизвольно или расщепляется через ферменты, известные как супероксиддисмутазы (Cu / ZnSOD и MnSOD), до пероксида водорода, который затем превращается в хлорноватистую кислоту (HClO) с помощью миелопероксидазы - фермента зеленого гема. Считается, что бактерицидные свойства HClO достаточны для уничтожения бактерий, фагоцитируемых нейтрофилами, но вместо этого данный факт может быть шагом, необходимым для активации протеаз. [16]

Механизм ответной реакции нейтрофила на его взаимодействие с микробами и молекулами, продуцируемыми микробами, зависит от вида микробов и варьируется от продления срока жизни нейтрофилов до быстрого лизиса нейтрофилов после фагоцитоза. Сообщалось, что *Chlamydia pneumoniae* и *Neisseria gonorrhoeae* задерживают апоптоз нейтрофилов. Таким образом, некоторые бактерии - и те, которые являются преимущественно внутриклеточными патогенами - могут продлить продолжительность жизни нейтрофилов, нарушая нормальный процесс спонтанного апоптоза и / или PICD (гибель клеток, вызванную фагоцитозом). Обратным действием обладают некоторые патогены, такие как *Streptococcus pyogenes*, они способны изменять судьбу нейтрофилов после фагоцитоза, способствуя быстрому лизису клеток и / или ускорению апоптоза до точки вторичного некроза. [50,60]

Нейтрофилы также выделяют ассортимент белков в трех типах гранул с помощью процесса, называемого дегрануляцией. Содержимое этих гранул обладает антимикробными свойствами и помогает бороться с инфекцией. Данный процесс гибели нейтрофилов получил название «нетоз» (от англ. NETosis, где NET - аббревиатура от neutrophil extracellular traps, нейтрофильная внеклеточная ловушка)

### 1.1.3. Нетоз. Механизмы и функциональное значение нетоза.

Теоретические аспекты возможного применения НВЛ в качестве средства адресной доставки лекарственных веществ

В 2004 году учёные Института инфекционной биологии имени Макса Планка (Берлин, Германия) открыли и расшифровали ещё один используемый нейтрофилами механизм уничтожения патогенов. Выяснилось, что эти клетки могут формировать во внеклеточном пространстве сетеподобные структуры, состоящие из нуклеиновых кислот и ферментов – нейтрофильные внеклеточные ловушки (Neutrophil Extracellular Traps, NETs). [57]. Было показано, что в данных структурах могут адсорбироваться различные микроорганизмы и погибать в них. Механизм формирования этих сетей удалось расшифровать только в результате длительной работы по визуализации клеток и биохимических исследований. На сегодняшний день известно несколько путей образования НВЛ. Первый из них был описан Fuchs [74] в 2007 году. Согласно его исследованиям, образование НВЛ происходит через 4 часа после модификации нейтрофилов. Этот процесс сопровождается окислительным стрессом и выходом кальция из клеточных депо. Согласно второй гипотезе, при образовании внеклеточных сетей нейтрофил не погибает, а выделяет во внеклеточную среду часть ядерных нуклеиновых кислот, митохондриальную ДНК и содержимое гранул в виде везикул. Сборка НВЛ происходит во внеклеточном пространстве и занимает от 5 до 60 минут. [18,19]

Механизм образования НВЛ, описанный Fuchs, выглядит следующим образом. Процесс формирования НВЛ сопровождается характерными морфологическими изменениями. Первоначально нейтрофилы уплощаются и образуют многочисленные вакуоли. Одновременно теряется характерная дольчатая форма ядер. В этот момент ядерная мембрана начинает растворяться, но морфология органелл сохраняется. Позднее оболочка ядра

распадается на везикулы, затем разрушается, и хроматин занимает всю клетку, гранулы растворяются, и компоненты будущей ловушки распределяются по всему объёму клетки. При этом нейтрофил сохраняет свою жизнеспособность. Далее клетка сокращается до тех пор, пока её мембрана не лопнет, и быстро выбрасывает смесь высокоактивных веществ наружу, после чего нейтрофил погибает. Попав во внеклеточное пространство, содержимое клетки формирует своеобразную сеть, в которую благодаря «липкости», вызванной за счёт избыточного отрицательного заряда входящих в её состав молекул ДНК, попадают микроорганизмы и погибают за счёт воздействия компонентов секреторных гранул, адсорбированных на её поверхности. [13, 113].

Описанный механизм гибели нейтрофила относят к так называемому «классическому» нетозу. Он часто инициируется связыванием лиганда с нейтрофильными Toll-like рецепторами и рецепторами IgG-Fc. При активации этих рецепторов накопленный кальций из эндоплазматической сети высвобождаются в цитоплазму. Повышенные уровни цитоплазматического кальция увеличивают активность протеинкиназы C (PKC) и фосфорилирование gp91phox. Это вызывает сборку цитозольных и мембраносвязанных субъединиц NADPH-оксидазы в функциональные комплексы на цитоплазматических или фагосомных мембранах (также называемых фагоцитарной оксидазой, РНОХ) и последующее образование АФК. Под воздействием АФК разрываются гранулы и ядерная оболочка. Впоследствии высвобождается ядерное, гранулярное и цитоплазматическое содержимое. НЭ и МПО, обычно хранящиеся в азурофильных гранулах, мигрируют в ядро. Здесь НЭ разлагает линкерный гистон H1 и обрабатывает коровые гистоны, а МПО усиливает деконденсацию хроматина. Удаление гистонов пептидил-аргинин-деиминазой 4 (PAD4) и протеолитическое расщепление гистонов, инициированное до ядерного распада, дополнительно вносят вклад в деконденсацию хроматина. Разрыв плазматической мембраны

способствует высвобождению НВЛ и приводит к гибели клеток и потере жизнеспособных функций клеток, таких как миграция и фагоцитоз.

В отличие от предыдущих исследований, описывающих канонические пути нетоза как процесса, требующего нескольких часов, Clark et al. в 2007 году сообщили, что вызванный липополисахаридом (LPS) нетоз происходит в течение 30 минут с участием TLR4 на тромбоцитах. [65] Было продемонстрировано, что нейтрофилы, которые освобождали НВЛ, оставались непроницаемыми для SYTOX Green, указывая на то, что они оставались структурно неповрежденными. Поэтому авторы позже придумали термин «витальный нетоз». Электронная микроскопия показала, что высвобождение НВЛ, вызванное золотистым стафилококком, происходит посредством блеббинга ядерной оболочки и везикулярного экспорта *in vitro* и *in vivo*. В результате этот путь сохранил целостность плазматических мембран нейтрофилов. До сих пор остается спорным, сосуществуют ли самоубийственные и витальные типы нетоза. Кроме того, неясно, следует ли называть нейтрофил, который выбрасывал части своей ДНК, «жизнеспособным».

Исследование эффекторных функций нейтрофильных гранулоцитов показало их функциональную гетерогенность по отношению к активирующим объектам. Можно констатировать, что в ответ на действие бактериальных агентов нейтрофил реагирует по-разному: либо фагоцитируя бактерию-активатор, либо секретируя в окружающее пространство бактерицидные компоненты своих гранул, либо формируя внеклеточные сети. [58].

Нейтрофильные внеклеточные ловушки играют большую роль в реализации иммунного ответа. Показана их эффективность в удалении как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий, а также грибных инфекций и простейших. [13] Антивирусная активность НВЛ пока еще недостаточно изучена, хотя имеются данные о противодействии ловушек

вирусу гриппа и ВИЧ. Последний способен развить механизм защиты от НВЛ, опосредованный IL-10.

НВЛ играют ключевую роль в патогенезе некоторых заболеваний. Среди таких заболеваний - фиброз цисты, преэклампсия, васкулит, псориаз, системная красная волчанка и другие.

**Фиброз цисты** — достаточно распространенное заболевание среди европейского населения. У людей с данным заболеванием выделяется большое количество вязкой слизи, в которой развиваются такие бактерии, как *Haemophilus influenzae* и *Pseudomonas aeruginosa*. Больные страдают от воспаления, разрушающего их легкие. Показано, что в слизи присутствует огромное количество НВЛ, обеспечивающих ее вязкость [91]. Лечение ДНазой вызывает разжижение слизи, однако при этом из ДНК-каркаса ловушек высвобождается нейтрофильная эластаза, которая может повредить ткани.

**Преэклампсия** — расстройство, возникающее у 5-7% беременных женщин на поздних стадиях беременности. Характеризуется повышенным давлением и протеинурией. Нередко возникают острая почечная и печеночная недостаточность, а также гемолиз, что опасно для жизни матери. Плод, как правило, страдает от гипоксии.

Внешний слой плаценты — трофобласт — представляет собой многоядерный синцитий, покрытый множеством микроворсинок. Они содержат мембранные частицы различных размеров, которые образуют НВЛ *in vitro*. У больных преэклампсией НВЛ находятся в непосредственной близости к синцитиотрофобласту, и могут заполнять пространство между ворсинками, блокировать кровоток и вызывать гипоксию плода [100].

Другой механизм патогенеза может заключаться в индукции нетоза активированными клетками эндотелия, что приводит к разрушению

эндотелия нейтрофильными внеклеточными ловушками и утяжелению преэклампсии.

**Васкулит** — системное аутоиммунное заболевание, характеризующееся воспалением малых кровеносных сосудов. Нередко у больных развиваются антитела на собственную протеиназу 3 и миелопероксидазу. Антитела вызывают секрецию НВЛ, в составе которых, в свою очередь, содержатся данные антигены, что усиливает реакцию. Таким образом, иммунная система борется с собой, параллельно повреждая близлежащие ткани [92].

**Псориаз** — воспалительное расстройство кожи и других органов, ключевую роль в котором играет ИЛ-17. В силу того, что нейтрофилы и тучные клетки считаются основными типами клеток, выделяющими ИЛ-17, и этот интерлейкин активно выделяется при нетозе, нейтрофилы и тучные клетки могут играть ключевую роль в патогенезе данного заболевания.

**Системная красная волчанка** — аутоиммунное заболевание, характерной особенностью которого является выработка антител против ДНК, хроматина и ДНК-ассоциированных белков. Показано, что ключевую роль в патогенезе данного заболевания играет дисбаланс между секрецией НВЛ и их деградацией нуклеазами. Повышение концентрации НВЛ вызывает повреждение тканей и органов. Кроме того, ядерное вещество, представленное нейтрофильными внеклеточными ловушками, способствует секреции аутоантител [79].

**Синдром Фелти** — ревматоидный артрит со спленомегалией и нейтропенией. Обнаружено, что при данном заболевании нетоз вызывают антитела против деиминированных гистонов [162].

**Подагра** — заболевание, характеризующееся острой воспалительной реакцией на кристаллы мочевой кислоты. Показано, что в очаге воспаления

выделяется большое количество  $\text{IL-1}\beta$ , который обуславливает скопление нейтрофилов и массовое образование НВЛ [106].

**Коагуляция** — это способ защиты организма от потери большого количества крови при ранении. Также он представляет собой примитивный путь иммунной защиты от заражения микроорганизмами .

Нейтрофильные внеклеточные ловушки играют важную роль в коагуляции, однако если их образуется слишком много, они вызывают появление тромбов, которые блокируют кровоснабжение различных органов и вызывают ишемию [112].

Артериальные тромбы возникают при повреждении эндотелия, венозные — при застое крови в течении нескольких часов. В обоих случаях накапливаются нейтрофилы, где они образуют внеклеточные ловушки. Содержащиеся в НВЛ нейтрофильная эластаза и катепсин G расщепляют ингибиторы коагуляции. У мышей, лишенных данных ферментов, тромбы не образуются, как и мышей, которых лечили антителами к НВЛ.

Имеются данные, что в крови животных с антителами на НВЛ содержится меньше бактерий *E. coli* по сравнению с нормальными животными. Это наводит на мысль, что коагуляция предотвращает распространение бактерий к другим органам.

Однако, интенсивное образование ловушек нейтрофилами и макрофагами приводит образованию тромбов и закупорке сосудов.

**Пародонтит** — воспалительное заболевание тканей, поддерживающих зубы. Вызывается бактериями (в частности *Porphyromonas gingivalis*), которые стимулируют накопление нейтрофилов в десенной щели, где нейтрофилы массово образуют НВЛ . Хронический пародонтит и гиперкоагуляция ассоциированы с атеротромбозом, который может вызывать

брюшные аневризмы. Так, у крыс с брюшным аневризмом наблюдались тромбы с большим содержанием нейтрофильных внеклеточных ловушек, способных повреждать близлежащий эндотелий.

Исследования последнего времени показывают, что нейтрофилы оказывают значительное воздействие на пролиферацию, рост и отдаленные метастазы злокачественной опухоли различными способами. Процесс метастазирования сложный и включает в себя следующие шаги: интравазация, диссеминация, эмболия, экстравазация. Есть мнение, что нейтрофилы и связанные с ними компоненты участвуют практически в каждом процессе прогрессирования опухоли и метастазирования, они могут выделять различные вещества в организме, которые влияют на микроокружение опухоли. Кроме того, с прогрессированием и метастазированием опухоли, НВЛ могут принимать участие в инвазивном метастазирующем процессе опухоли с помощью различных механизмов. [53]

Исследования показали, что уровень НВЛ у пациентов с раком толстой кишки значительно выше, чем у здоровых добровольцев [107]

При саркоме Юинга пациенты с высоким уровнем НВЛ склонны к метастазам и раннему возобновлению опухолевых процессов после интенсивной химиотерапии. Эти результаты свидетельствуют о том, что НВЛ могут выступать в качестве потенциального прогностического маркера и способствовать прогрессированию опухоли определенным образом.

Метастазированию опухоли может эффективно способствовать снижение защитной роли внеклеточного матрикса. Исследования показывают, что ферменты, содержащиеся в НВЛ и разрушающие белки, могут быть образованы путем растворения внеклеточного матрикса. Многочисленные исследования показали, что матриксная металлопротеиназа – 9 (ММП-9), которая является важным компонентом НВЛ, участвует не только в пролиферации клеток и апоптозе, она играет важную роль в

деградации компонентов внеклеточного матрикса, а также в процессе миграции опухолевых клеток. [51,73]

Таким образом, НВЛ могут участвовать в метастазировании опухоли путем деградации внеклеточного матрикса при помощи ММП-9. Wislez et al. [117] показана роль нейтрофилов в метастазах аденокарциномы легких. Установлено, что нейтрофильная эластаза (НЭ) может служить мелкими центрами связывания молекулы клеточной мембраны нейтрофилов с раковыми клетками, что ускоряет пролиферацию опухолевых клеток [113].

Волокнистая сеть ДНК может эффективно захватывать опухолевые клетки в кровообращении и помогать циркулирующим опухолевым клеткам закрепиться в ткани. [71,72,75, 84, 115, 117]

Исследование Cools-Lartigue et al. [67,68] показало, что при стимуляции ФМА нейтрофилы производят ретикулярную структуру ДНК вокруг клеток рака легких A549. Компоненты структуры ретикулярной ДНК НВЛ непосредственно связываются с клеточной мембраной клеток рака легких a549. Контакт способствует адгезии опухолевых клеток к ткани, что приводит к метастазированию опухоли, и эта адгезия может быть устранена под действием ДНКазы.

Последние исследования показали, что  $\beta 1$ -интегрин является важным фактором, обеспечивающим взаимодействие между циркулирующими опухолевыми клетками и внеклеточными сетями. Было показано, что экспрессия  $\beta 1$ -интегрина как для раковых клеток, так и для НВЛ важна для адгезии циркулирующих опухолевых клеток к сетям как *in vitro*, так и *in vivo*. [110]

Таким образом, НВЛ могут быть рассмотрены в качестве средства адресной доставки препаратов к очагам воспалительных и аутоиммунных реакций при проведении терапии в лечении вышеописанных заболеваний, в которых НВЛ играют значительную роль. Создание средств доставки

лекарственных препаратов, взаимодействующих со структурами НВЛ, позволит оказывать цитотоксическое воздействие в отношении отдельных метастазирующих клеток.

## 1.2. Технологии адресной доставки лекарственных средств

### 1.2.1. Проблемы и перспективы адресной доставки лекарств

Одной из проблем большинства современных препаратов является то, что после введения в организм их распределение происходит относительно неравномерно, они проникают не только в органы-мишени, где должен проявиться терапевтический эффект, но и в другие органы, где препарат может оказывать цитотоксическое действие. Также, при традиционном введении, доза препарата, достигающая клеток-мишеней, значительно меньше терапевтической, что вынуждает вводить большие дозы препарата, усиливая возможный негативный эффект на соседние ткани.[22]

Вышеуказанных проблем классической системы использования фармацевтических веществ можно избежать при использовании адресной системы доставки лекарств.

Одним из первых путей, созданных в данном направлении, было регионарное введение препарата. Например, внутрисуставное введение гормональных препаратов при лечении ревматоидного артрита; введение цитостатиков непосредственно в сосуд, питающий опухоль; внутрикоронарное введение тромболитических ферментов при терапии вызванного тромбозом инфаркта миокарда.

Но с точки зрения биотехнологии большой интерес представляет векторный метод доставки лекарственных препаратов. Вектором, в данном случае, называется молекула, имеющая на своей поверхности участок, способный специфически связываться с рецепторами на поверхности клетки – мишени. В качестве вектора могут использоваться: гормоны, ферменты,

пептиды, антитела, гликопротеиды, гликолипиды, вирусы. Реализация работы данной системы происходит путем привязки (конъюгации) лекарственного вещества с вектором, затем этот комплекс с помощью специфического участка на поверхности вектора связывается с лигандом.[31]

После прикрепления к клетке-мишени вектор с лекарством эндоцитируется или происходит слияние мембраны вектора или липосомы с мембраной клетки. Лекарство доставляется внутрь клетки и, в принципе, с помощью специальных приёмов может быть направлено в ядро, митохондрии, эндоплазматический ретикулум и другие органеллы. Концепция внутриклеточной доставки лекарств находится в стадии активной разработки. Для её практической реализации важное значение имеют знания о сигнальных последовательностях белков, с помощью которых белки направляются в различные клеточные структуры. Не менее важны знания о моторных белках клетки, которые направленно перемещают «грузы» на большие расстояния внутри клеток и могут быть использованы для доставки лекарственных веществ, генов и терапевтических наночастиц. [35]

Почти все десятилетие 2000-х годов было направлено на разработку различных наночастиц для адресной доставки лекарств в опухоли, однако, в этой области существует ряд проблем. Необходимо четко понимать, почему системы доставки наночастиц не смогли оправдать наши ожидания в полной мере. Только при таком понимании мы сможем разработать наночастицы для точной доставки лекарственных препаратов.

Разработка действительно адресных систем доставки лекарств должна основываться на четком понимании проблем, которые необходимо решить. Лечение опухолей требует доставки терапевтических агентов в оптимальных количествах к опухолям. Агент, вводимый внутривенно, должен циркулировать в кровотоке, экстравазировать (т.е. пересекать стенки

сосудов) и проникать в опухоли. Фактическое накопление введенной дозы варьируется в зависимости от состава наночастиц, лекарственного средства, метода анализа лекарственного средства и других экспериментальных параметров, но обычно оно составляет менее 5%. Иногда более высокие значения наблюдаются в зависимости от метода анализа или типа наночастиц. Для внутривенного введения наночастиц, чтобы достичь цели, они должны циркулировать в крови. Поскольку наночастицы не имеют средств самодвижения, достижение цели основано исключительно на движении крови, проходящей через цель, где бы она ни находилась. Наличие лигандов на поверхности наночастиц, так называемое «активное нацеливание», не меняет шансов наночастиц достичь мишени. Во время кровообращения значительная часть наночастиц поглощается ретикулоэндотелиальной системой (или системой мононуклеарных фагоцитов) селезенки, печени и легких. Общепринятая идея заключается в том, что шансы на достижение цели увеличатся за счет увеличения времени кровообращения, например, за счет ПЭГилирования. Считается также, что пегилирование предотвращает или уменьшает накопление ретикулоэндотелиальной системой [54,59].

Наночастицы, используемые для доставки лекарств, обычно имеют размер более 100 нм. Поскольку пороговый размер для эффективного почечного клиренса известен по кинетике поглощения 70 нм, почечный клиренс наночастиц может не быть доминирующим механизмом удаления наночастиц из крови. Предполагаемые пороговые размеры, однако, нуждаются в подтверждении большим количеством данных. Можно ожидать, что лекарство остается внутри наночастиц и высвобождается только в целевом месте, но в действительности лекарство высвобождается во время кровообращения. В зависимости от своей природы наночастицы могут не оставаться интактными в крови, что приводит к преждевременному выбросу инкапсулированных лекарств.

Считается, что экстравазация наночастиц из кровеносных сосудов в интерстиций опухолей достигается благодаря усиленному эффекту проникновения и удержания (эффект ЭПР). Термин «эффект ЭПР», однако, использовался повсеместно, как если бы все введенные внутривенно наночастицы попадали только в опухоли. Согласно оригинальной статье Maeda, белки лучше накапливаются в опухолях, чем наночастицы. Даже если наночастицы достигают места опухоли, они должны проникать в микроокружение опухоли, которое, как известно, значительно отличается от такового в нормальных тканях. Плотный внеклеточный матрикс и повышенное внутриклеточное жидкостное давление опухолей затрудняет проникновение лекарственного средства, по сравнению с нормальными тканями. [62,66]

#### 1.2.2. Наночастицы для доставки лекарственных препаратов

Использование нанотехнологий в медицине и, в частности, в доставке лекарственных средств, в настоящее время быстро распространяется. На сегодняшний день исследуется множество возможных основ наночастиц для доставки лекарств, которые варьируются от биологических веществ, таких как альбумин, желатин и фосфолипиды для липосом, и синтетических веществ, таких как различные полимеры и наночастицы, содержащие твердые металлы. Очевидно, что потенциальное взаимодействие с тканями и клетками, а также потенциальная токсичность в значительной степени зависят от фактического состава композиции наночастиц [2, 6,61].

Основные задачи исследователей нанобиотехнологий в доставке лекарств включают:

- более конкретный таргетинг и доставка лекарств,
- снижение токсичности при сохранении терапевтического эффекта,
- большая безопасность и биосовместимость,

– ускоренная разработка новых безопасных лекарств [1].

Целями использования наночастиц в адресной доставке лекарств являются либо увеличение количества препарата, доставляемого к клеткам-мишеням и / или снижение токсичности свободного лекарства для нецелевых органов. Обеситуации приведут к увеличению терапевтического индекса [24]. Самые перспективные и исследуемые наночастицы показаны в таблице 2.

Таблица 2. Обзор наночастиц и их применения в жизни науки (W.H.DeJong, P.J.A. Borm, 2008)

Класс частиц	Материалы	Применение
Натуральные материалы и их производные	Липосомы Хитозан Декстран Желатин Альгинаты Крахмал	Доставка лекарств / генов
Дендримеры	Разветвлённые полимеры	Доставка лекарств
Фуллерены	Углеродная основа	Фотодинамика Доставка лекарств
Полимеры	Полимолочная кислота Поли(циано)акрилаты Полиэтиленэмин Блок-сополимеры Поликапролактон	Доставка лекарств / генов
Феррожидкости	Наночастицы из оксидов железа	Картирование (МРТ)
Квантовые точки	Cd/Zn-селениды	Картирование Диагностика <i>in vitro</i>

Большинство соединений являются биоразлагаемыми полимерами, приводящие к высвобождению лекарственного средства после их разложения. [30]

### 1.2.3. Наночастицы на основе оксидов металлов переменной валентности

Наночастицы оксидов металлов имеют уникальную структуру, необычные окислительно-восстановительные и каталитические свойства, высокую площадь поверхности, хорошую механическую стабильность и являются биосовместимыми. [23,132] По этим причинам наночастицы оксидов металлов вызвали значительный интерес в области биомедицинской терапии, получения биоизображений и биосенсирования. [9,119,121,126] Например, диоксид титана является материалом в медицинских имплантатах; он обеспечивает превосходную биосовместимую поверхность для прикрепления и пролиферации клеток. С другой стороны, наночастицам на основе церия в последнее время уделяется большое внимание из-за их окислительно-восстановительных, автокаталитических и антиоксидантных свойств. Некоторые другие оксиды металлов были использованы в качестве газочувствительных нанозондов для маркировки и разделения клеток, в качестве контрастных веществ для магнитно-резонансной томографии (МРТ) и в качестве носителей для целевой доставки лекарств. [109] В биомедицинской области появляются новые и новые применения наночерия в качестве нейропротекторных агентов, обладающих антиоксидантными свойствами, Вопросы, связанные с биосовместимостью и токсичностью этих наночастиц для биомедицинских применений *in vivo*, еще предстоит полностью изучить. [42,44,48]

Магнитные оксиды железа ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$  и  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) привлекают значительный интерес в биомедицинской области для маркировки и разделения клеток, магнитно-резонансной томографии (МРТ), адресной доставки лекарств,

биоизображения, гипертермии и биосенсинга. Такие применения требуют хорошо диспергированных, химически стабильных, однородных частиц с высокими значениями намагниченности и размерами менее 100 нм. [47,87]

На магнетизм также может влиять добавление легирующих примесей ( $Fe_2+$  заменяется переходными металлами  $M_2 + (M = Mn, Ni, Co)$ ). Однако расширенные возможности МР легированных структур могут быть связаны с повышенной токсичностью *in vivo* в отношении высвобождения легирующей примеси (токсичных видов, таких как Ni, Co и т. д.).

Сильно намагниченные НЧ используются в качестве контрастных веществ для молекулярной и клеточной визуализации в МРТ. Такие применения требуют транспортировки и накопления контрастного вещества в месте назначения для обнаружения заболевания. Широкий спектр металлооксидных наночастиц был исследован в биомедицинской области. [29, 143] Необходимы дальнейшие исследования, чтобы спроектировать поверхность и морфологию наночастиц, чтобы адаптировать их физико-химические свойства к конкретным применениям. Синтез и модификация наночастиц должны улучшить биосовместимость и доступ к клеткам-мишеням и местам расположения тканей при сохранении их биологически полезных свойств. [81] Для любого конкретного биомедицинского применения необходимо сначала охарактеризовать частицы и определить их физико-химические свойства (состав поверхности, заряд, характер покрытия, гидрофильность и т. д.). Оптимизация процедуры синтеза и систематическое исследование инженерных переменных, которые влияют на размерные, физические и химические свойства, важны для рационального проектирования НЧ с контролируемой структурой и поверхностными свойствами. Тем не менее, получение НЧ с предсказуемой структурой, размером, составом и функциональностью, а также четко определенным биологическим ответом, биораспределением и фармакокинетическими характеристиками является довольно сложной задачей. [11,41,84, 140]

### 1.3. Липосомальные наночастицы в доставке лекарственных препаратов

#### 1.3.1. Структура и типы липосом

Липосома представляет собой сферической формы частицу, имеющую по меньшей мере один липидный бислой. Липосома может быть использована в качестве средства для введения питательных веществ и фармацевтических препаратов в различные системы живых организмов [21,36]

Липосомы чаще всего состоят из фосфолипидов, особенно фосфатидилхолина, но могут также включать другие липиды, такие как яичный фосфатидилэтаноламин, при условии, что они совместимы со структурой липидного бислоя. При получении липосом возможно использовать поверхностные лиганды для прикрепления к нездоровой ткани. Основными типами липосом являются многослойные везикулы (с несколькими липидными бислоями в ламеллярной фазе), небольшие однослойные липосомные везикулы (с одним липидным бислоем), большие однослойные везикулы и кохлеатные везикулы (Рис.2.)

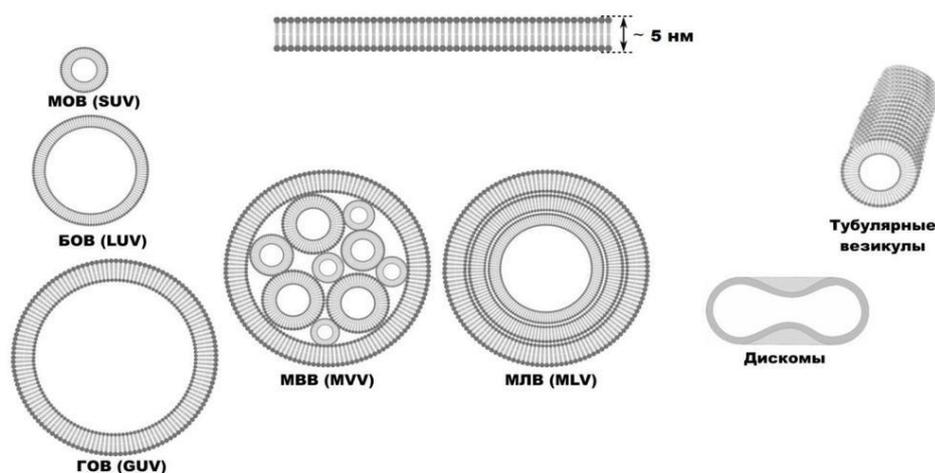


Рис.2. Структура различных типов липосом

МОВ – малая однослойная везикула, БОВ – большая однослойная везикула,  
ГОВ – гигантская однослойная везикула, МВВ- мультивезикулярная  
везикула, МЛВ – мультиламеллярная везикула

Менее желательной формой являются мультивезикулярные липосомы, в которых одна везикула содержит одну или несколько везикул меньшего размера. [26]

Липосомы не следует путать с мицеллами и обратными мицеллами, состоящими из монослоев. Слово липосома происходит от двух греческих слов: липо («жир») и сома («тело»). Липосомы были впервые описаны британским гематологом Алеком Д. Бэнгэмом в 1961 году (опубликовано в 1964 году) в Институте Бабрахама в Кембридже. Они были обнаружены, когда Бэнгэм и Хорн тестировали новый электронный микроскоп института. Сходство с плазмалеммой было очевидным, и изображения под микроскопом послужили первым доказательством того, что клеточная мембрана является двухслойной липидной структурой. Их целостность в виде замкнутой двухслойной структуры, которая может выделять свое содержимое после обработки моющим средством (латентность, связанная со структурой), была установлена Бэнгхэмом и соавторами в следующем году. Вайсманн сначала назвал структуры «липосомы» в честь лизосомы, которую изучала его лаборатория: простая органелла, латентность которой связана со структурой, которая может быть нарушена детергентами и стрептолизинами. Липосомы можно легко отличить от мицелл и гексагональных липидных фаз с помощью просвечивающей электронной микроскопии с отрицательным окрашиванием. Алек Дуглас Бангхэм с коллегами Джеффом Уоткинсом и Малкольмом Стэндишем написал в 1965 году статью, которая эффективно запустила липосомную «индустрию».

### 1.3.2. Магнитолипосомы. Преимущества и проблемы использования

Магнитные наночастицы с суперпарамагнитными свойствами привлекают повышенное внимание к применениям в биомедицине, поскольку они проявляют сильную намагниченность только при приложении внешнего магнитного поля. [64] Магнитолипосомы (липосомы, улавливающие магнитные наночастицы) являются перспективными терапевтическими системами, которые можно направлять и локализовать в определенных местах с помощью градиентов внешнего магнитного поля и использовать в качестве альтернативы обычной химиотерапии с помощью магнитно-контролируемой доставки лекарств и гипертермии. [76] Исследования Гуляева Ю.В. и др. [12] показали возможность создания нанокompозитных гибридных липосом и везикул на основе комплексов липидов, полимеров и магнитных наночастиц, структура и проницаемость оболочек которых может изменяться контролируемым образом с помощью нетеплового импульсного электрического воздействия. Наносистемы могут являться основой для создания новых эффективных средств инкапсулирования, адресной доставки и управляемого высвобождения различных веществ в водных средах, перспективных для биомедицинских и других применений [55,145].

Впервые описанные De Cuiper и Joniau в 1988 г., [70]. магнитолипосомы стали широко исследовать благодаря многовалентным свойствам как носителей лекарств, так и триггеров. Липосомы могут быть сконструированы так, чтобы быть термочувствительными, то есть подвергаться фазовому переходу из непроницаемого гелевого состояния в проницаемое жидкокристаллическое состояние, когда достигается определенный температурный барьер. Физико-химическая характеристика магнитолипосом дает универсальную наноплатформу, которая может обеспечить комбинированную доставку лекарств и лечение гипертермии в

определенном целевом месте при одновременном отслеживании с помощью МРТ [75]. Строго говоря, это охватывает практически всю область применения, которая желательна для наноносителей третьего поколения. Несмотря на то что эти системы все еще далеки от прямого клинического применения, за последнее десятилетие был достигнут значительный прогресс в развитии и понимании перспектив их использования.

Центральным элементом магнитолипосомы является тип магнитоуправляемых наночастиц. Магнетит является наиболее перспективным кандидатом. Для его получения существует множество установленных влажно-химических методов, включая микроэмульсии или гидротермальные синтезы в дополнение к газофазным методам, таким как термическое разложение в реакторах с горячей стенкой или синтез пламени. Наиболее доминирующим и широко используемым методом в биомедицинской области является метод соосаждения водных растворов солей  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  путем добавления основания. Регулирование размера и распределения частиц по размеру является чрезвычайно сложной задачей в этом процессе, и контроль pH, ионной силы и концентрации исходных веществ имеет решающее значение. Тем не менее, этот метод является, пожалуй, самым популярным источником магнетита для магнитолипосом, так как большие количества могут быть синтезированы одновременно.

Поверхностная химия определяет не только коллоидную стабильность НЧ, но и их связь с липосомой, т. е. будут ли они внедряться в гидрофобный бислой или в гидрофильный просвет. [52] Известно, что изменение состава липосомального бислоя, например, за счет включения холестерина, уменьшает утечку молекул лекарственного средства из липосом путем «сжимания» бислоя [27].

Таким образом, использование магнитолипосом в наномедицине - одно из главных направлений исследований в области нанотехнологий. Магнитолипосомы могут предоставить платформы для одновременного

проведения терапии и диагностики. Благодаря своим оптическим свойствам магнитные наночастицы могут служить контрастными веществами для МРТ, позволяя проводить мониторинг их распространения *in vivo* неинвазивным способом. Магнитные частицы могут достигать глубины до 15 см в теле при наличии постоянного магнита.

Быстро растущее количество публикаций и патентов по разработке магнитолипосом указывает на то, что такие технологии сейчас бурно развиваются. Существует много исследований, изучающих загрузочную способность липосом [38] и специфичность таргетинга в зависимости от липидного состава, но относительно немного исследований, в которых рассматриваются всесторонние проблемы, такие как стабильность во времени в физиологически релевантных средах (например, с использованием гидрофильных маркеров, таких как кальцеин), смешиваемость с липидами (например, с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии и электронографического анализа) и другие проблемы.

## Глава 2. Объекты и методы исследования

### 2.1. Объект исследования

Объектами исследования служили нейтрофилы – полиморфно-ядерные лейкоциты, эритроциты и лимфоциты, выделенные из периферической крови здоровых добровольцев, наночастицы липосом и парамагнитные наночастицы магнетита и марганцевого феррита.

### 2.2. Методы исследования

#### 2.2.1. Выделение нейтрофилов из периферической крови доноров

Выделение нейтрофилов из гепаринизированной донорской крови осуществляли методом седиментации на двойном градиенте плотности фиколл-урографина ( $\rho_1=1,119\text{г/см}^3$ ,  $\rho_2=1,077\text{г/см}^3$ ).

Осаждение клеток проводили с помощью центрифуги типа Eppendorf 5702 с установленным бакет-ротором в течение 45 мин при 4000 об/мин. В процессе центрифугирования происходило разделение цельной крови на отдельные клеточные фракции в зависимости от их плавучей плотности: лимфоциты оседали на границе раздела первого градиента и плазмы крови, а нейтрофилы - на границе раздела первого и второго градиента. Эритроциты и остальные клетки проходили через слои градиента плотности, не задерживаясь, и оседали на дне пробирки. (Рис.3)

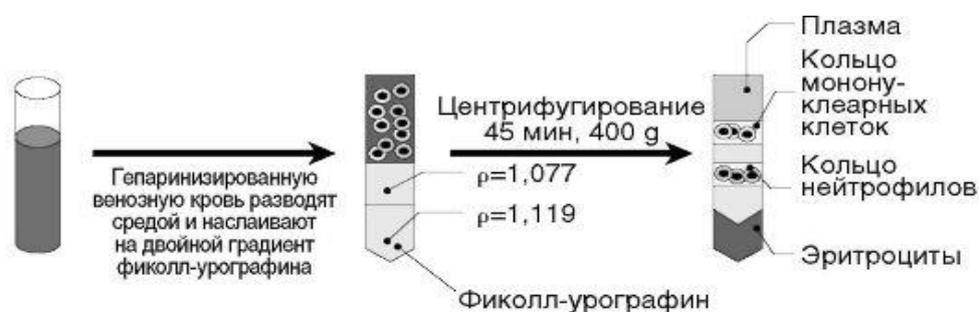


Рис.3. Выделение нейтрофилов из методом седиментации на двойном градиенте плотности фиколл-урографина

Слой нейтрофилов собирали по всей площади сечения пробирки и переносили в чистую, сухую центрифужную пробирку, после чего разбавляли раствором Хенкса в соотношении 1:4 и проводили двукратную отмывку целевой суспензии клеток центрифугированием в течение 10 мин при 1000 об/мин. Надосадочную жидкость удаляли, а полученный осадок нейтрофилов ресуспендировали в растворе Хенкса, доводя концентрацию до  $2,5 \cdot 10^5$  клеток/мл. Подсчёт количества клеток проводили с помощью камеры Горяева.

### 2.2.2 Определение жизнеспособности нейтрофилов

Жизнеспособность нейтрофилов определяли методом эксклюзии трипанового синего. Принцип данного метода основан на том, что краситель не способен проникать через мембраны живых клеток, однако при наличии в них повреждений способен окрашивать клеточное ядро. Для определения жизнеспособности нейтрофилов использовали 0,2 % раствор трипанового синего в изотоническом растворе Хенкса без глюкозы. Краситель смешивали в равных объемах с клеточными суспензиями и в камере Горяева осуществляли подсчет не менее 100 клеток, отмечая голубые (погибшие) и неокрашенные (живые). Долю жизнеспособных клеток (N) определяли по формуле (1):

$$N = (\text{количество живых клеток} / \text{общее число клеток}) \times 100\% \quad (1)$$

В работе использовались суспензии клеток с жизнеспособностью не менее 95%.

### 2.2.3. Определение чистоты клеточных суспензий

Чистоту клеточных суспензий проверяли методом окрашивания мазков клеточных суспензий по Романовскому. В основе метода лежит способность смеси основных (азур II) и кислых (водорастворимый жёлтый эозин)

красителей окрашивать различные элементы клеток в разные цвета и оттенки.

Для окрашивания мазков использовали раствор краски Романовского. Предварительно клеточную суспензию фиксировали в пробирке 3% глутаровым альдегидом. Мазки наносили на предметные стёкла, которые укладывали на стеклянный мостик. После этого их заливали краской в разведении 1-2 капли краски на 1 мл дистиллированной воды. Красящий раствор наливали на препарат и выдерживали его в таком положении 1-2 мин. Затем краску смывали струёй воды, а предметные стёкла с мазками устанавливали в штатив вертикально для просушки. Морфологическую идентификацию клеток крови осуществляли методом иммерсионной микроскопии, базируясь на литературных данных.

#### 2.2.4. Стимуляция нейтрофилов к образованию ловушек

Инициацию образования нейтрофильных внеклеточных ловушек полиморфно-ядерными лейкоцитами запускали, инкубируя суспензию клеток с латексом в течение 5-45 мин. при  $t=37^{\circ}\text{C}$ .

Нами была использована концентрация активатора -  $5 \cdot 10^6$  частиц в мл, что соответствовало соотношению латекс : клетки – 20:1.

#### 2.2.5. Приготовление препаратов для флуоресцентной микроскопии

Мазки для микроскопии готовили из осадка диагностического материала, полученного после центрифугирования образцов при 1000 g. Чистое обезжиренное предметное стекло маркировали с одного края тем же номером, что и пробирку с образцом (лабораторный номер, присвоенный данному образцу). Требуемое количество исследуемого материала (100 мкл) переносили на предметное стекло автоматической пипеткой соответствующего объема. Полученная капля равномерно распределилась по

предметному стеклу по площади примерно 2×1 см, после чего препараты оставляли на воздухе для высыхания.

Мазок, высохший на воздухе, помещали в ёмкость Шиффердекера и заливали фиксирующим раствором, в качестве которого использовали смесь карбинол-ЛУК 3:1.

Для окраски мазков клеток акридиновым оранжевым готовили 0,1% матричный раствор красителя в дистиллированной воде.

Предварительно зафиксированные препараты провели по серии спиртов понижающейся концентрации (96%; 70% и 50% этанола), после чего помещали на 5 минут в ацетатный буфер pH 4,2.

Мазки окрашивали свежеприготовленным рабочим раствором акридинового оранжевого в ацетатном буфере с pH 4,2 в соотношении 1:9 в течение 15 минут, после чего дважды промывали в течение 2 мин. ацетатным буфером pH 4,2. Окрашенные таким образом препараты подсушивали и заключали в фотозащитную среду на основе двукратного SSC буфера с добавлением 50% глицерина и 1,2% DABCO. [15, 34]

#### 2.2.6. Выделение ДНК

Выделение нуклеиновых кислот проводили с помощью комплекта для выделения ДНК из клинического материала «ДНК ПРОБА-ГС» в соответствии с инструкцией к данному набору.

Комплект реагентов включал в себя: лизирующий раствор (содержит хаотропный агент – вещество, разрушающее трехмерную структуру клеточных макромолекул); Раствор для отмывки 1 (содержит хаотропный агент и этиловый спирт); Раствор для отмывки 2 (содержит этиловый спирт); Сорбент универсальный (суспензия частиц силики); ТЕ-буфер для элюции ДНК (буферный раствор для элюции ДНК). Принцип метода основан на следующем. После стимуляции нейтрофилов к фагоцитозу на суспензию добавляли сорбент. ДНК связывается с частицами сорбента, в свою очередь

другие компоненты материала присутствуют в растворе и удаляются центрифугированием с последующей отмывкой. При прибавлении раствора для элюции ДНК к сорбенту осуществляется переход ДНК с поверхности силики в раствор, который отделяется центрифугированием. Используя данный метод, получают высокоочищенный препарат ДНК, который свободен от ингибиторов реакции амплификации.

#### 2.2.7. Изучение структуры выделенных нейтрофилами нуклеиновых кислот методом электрофореза в агарозном геле

Гель (1%) готовили следующим образом: 600 мг агарозы нагревали в 10 мл 1М ТАЕ буфера и довели до 50 мл дистиллированной водой до полного растворения агарозы. Остудив раствор до температуры 50-60°C, выливали его в форму, поместив в нее гребенку для образования лунок. Толщина геля составляла примерно 3 мм. После застывания геля гребенку удаляли, а форму с гелем помещали в электрофоретическую камеру для горизонтального электрофореза. Камеру заполняли ТАЕ-буфером так, чтобы гель находился под слоем буфера толщиной 1-2 мм.

Пробы ДНК получали, смешивая 5 мкл исследуемой ДНК с 5 мкл глицерина. Вносили подготовленные пробы в лунки геля, проводили электрофорез при постоянном напряжении, не превышающем 6,4 В/см, в течение 80 мин. По окончании электрофореза гель помещали на 1 мин в раствор, содержащий 0,5 мг/мл бромида этидия, после чего промывали гель в дистиллированной воде и детектировали изображение с помощью транслюминатора. Размеры исследуемых ДНК определяли с помощью маркера молекулярных весов (ДНК-технология, Россия)

### 2.2.8. Выявление наличия мтДНК в составе НВЛ

Для выделения митохондрий нейтрофилы ресуспензировали в среде выделения (250 ммоль/л сахараза, 20 ммоль/л  $\text{Hepes Na-Cl}$ , pH 7,5; 10 ммоль/л  $\text{KCl}$ , 1,5 ммоль  $\text{MgCl}_2$ , 1 ммоль/л EGTA, 1 ммоль/л EDTA, 1 ммоль/л DTT , 1 ммоль/л PMSF). Клетки разрушали при помощи ультразвукового гомогенизатора Qsonica sonicators Q500 при частоте 22 кГц в течение 1 мин. Митохондрии выделяли методом дифференциального центрифугирования. Ядерную фракцию и клеточные мембраны осаждали при 800 об/мин в течение 10 мин, из надосадочной жидкости осаждали митохондрии при 13000 об/мин в течение 20 мин. Центрифугирование проводили на центрифуге MiniSpin (Германия). Митохондрии ресуспензировали в среде выделения.

Для разрушения мембран митохондрий использовали Triton X-100. К 0,5 мл суспензии митохондрий добавляли 0,1 мл Triton X-100 с концентрацией 0,1%. Затем смесь инкубировали при 5°C в течение 30 мин.

Выделение ДНК из митохондрий и ДНК нейтрофильных внеклеточных ловушек проводили с помощью набора ДНК-СОРБ ГС.

### 2.2.9. Выявление наличия гистона H3 в составе НВЛ

Для выявления наличия гистона H3 в структуре НВЛ инициировали образование внеклеточных сетей нейтрофилами добавлением к суспензии нейтрофилов частиц латекса в соотношении латекс/клетки = 20/1. Выделение нуклеиновых кислот из внеклеточной среды проводили с помощью комплекта для выделения ДНК из клинического материала «ДНК ПРОБА-

ГС» в соответствии с инструкцией к данному набору. Выделенные образцы нуклеиновых кислот анализировали с помощью метода иммуноферментного анализа с использованием набора для определения содержания гистона H3 (*Cloud-Clone corp.*)

#### 2.2.10. Получение липосомальных частиц из ФХ

Для получения липосом использовали соевый лецитин (Sigma). В состав соевого лецитина входят: фосфатидилхолин (мин. 90%), эндотоксин (макс. 6 EU/гр), свободные жирные кислоты (макс. 0,5%).

Липосомальные везикулы получали методом дегидратации/регидратации по следующей схеме.

Раствор лецитина в этиловом спирте (1%) испаряли в роторном испарителе IKARV10 control, при температуре водяной бани 60°C. В результате на стенке испарительной колбы получали плёнку липидов. Затем добавляли сантимолярный натрий-фосфатный буфер (pH=7,4) в объёме, равном объёму раствора лецитина в этиловом спирте, перемешивали в течение 1 минуты.

Следующим этапом стала диспергенция получаемых липосом, для чего растворы были подвержены воздействию ультразвуком. Облучение проводили на ультразвуком дезинтеграторе Qsonica Sonicators в течение 15 минут (20кГц, 10 секундный импульс с перерывом 3сек).

Для получения однослойных липосом суспензию подвергали продавливанию через мембранные фильтры с определённым размером пор. В работе использовали липосомальный экструдер LP-50 (LipoFast), размер пор мембранного фильтра-100 нм.

### 2.2.11. Изучение размеров синтезированных наночастиц методом динамического светорассеяния

Размер полученных липосом измеряли с помощью спектрометра динамического светорассеяния ZetasizerNanoZSP (Malvern, Великобритания). Измерения проводили в кювете с длиной оптического пути 1 см, при температуре 37° С.

### 2.2.12. Изучение процессов включения инсулина и гемоглобина в состав липосом

В качестве изучаемых агентов, включаемых в липосомы, нами были выбраны инсулин и гемоглобин.

Инсулин в концентрации 0,049 мг/мл вносили в натрий-фосфатный буфер перед добавлением к липидной плёнке. Соотношение белок/липид составило  $4,9 \cdot 10^{-3}$ .

Отделение липосом от свободного белка проводили методом центрифугирования при 45 000 об/мин в течение 15 мин. Отделившиеся липосомы отбирали, ресуспензировали в требуемом объёме натрий-фосфатного буфера. Производили разрушение липосомальных частиц 1%-м раствором TritonX100.

Концентрацию белка определяли методом Лоури.

Процент включённого инсулина (В) определяли по формуле:

$$B = (C \times 100\%) / C_{исх}$$

где С - концентрация белка, определенная после разрушения липосом;  
C<sub>исх</sub> - концентрация белка при включении в липосомы

### 2.2.13 Определение уровня ПОЛ в липосомах из ФХ

Уровень ПОЛ в липидном бислое липосом определяли по содержанию диеновых и триеновых конъюгатов.

К 0,05 мл липосомальных частиц добавляли 4 мл гептан-изопропанольной смеси в соотношении 1:1, встряхивали в течение 15 мин и центрифугировали при 6000 об/мин в течение 10 минут. (Minispin, Германия) Далее липидный экстракт переносили в чистую пробирку и измеряли оптическую плотность.

Рассчитывали содержание диеновых и триеновых конъюгатов по отношению к уровню ненасыщенных липидов (D232/D220 и D276/D220).

### 2.2.14. Приготовление парамагнитных наночастиц на основе оксидов металлов переменной валентности

Для приготовления наночастиц магнетита в 50 мл дистиллированной воды растворяли хлорид железа (III) и сульфат железа (II) в соотношении 2/1 в концентрациях от 5 ммоль/л до 50 ммоль/л по железу. После растворения компонентов добавляли в раствор 1% раствора аммиака в соотношении объёмов 2/1, после чего реакцию смесь перемешивали в течение 1 минуты и осаждали частицы в постоянном магнитном поле. Собранные наночастицы промывали трижды дистиллированной водой.

Подготовка образцов марганцевого феррита осуществлялась следующим образом: в 10 мл дистиллированной воды растворяли 540 мг  $\text{FeCl}_3$  и 190 мг  $\text{MnCl}_2$ . К 200 мкл полученного раствора добавляли 0.5 М раствор  $\text{NaOH}$  объёмом 50 мкл. Образцы инкубировали в твердотельном термостате «Биосан» в течение 120 минут при 50°C. Полученные наночастицы осаждали методом центрифугирования при 10 000 об/мин в течение 15 минут на центрифуге Minispin. Надосадочную жидкость удаляли,

осадок наночастиц ресуспендировали в 1 мл 0.1 М натрий-фосфатного буфера.

#### 2.2.15. Подготовка образцов наночастиц для просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ)

Приготовление препаратов для ПЭМ-исследования образцов порошков магнетита осуществляли следующим образом: предметные сетки с тонкой плёнкой аморфного углерода погружали в водно-желатиновую суспензию порошка, измельчённого в агатовой ступке. Исследование структуры и субструктуры образцов проводили на просвечивающем электронной микроскопе Libra 120 (ZEISS) с использованием методики получения светопольных изображений.<sup>1</sup>

Препараты липосом для исследования методом просвечивающей электронной микроскопии были подготовлены согласно публикации *Asami*. [45] В качестве контрастирующего вещества использовали 2% OsO<sub>4</sub>. Изображения получали с помощью микроскопа JEOL JEM-100C. (Япония)<sup>2</sup>

#### 2.2.16. Исследование состава получаемых наночастиц магнетита

Состав полученного магнетита контролировали при помощи рентгеновского дифрактометра ARL X'TRA (Thermo Scientific). Для регистрации рентгеновского спектра полученную взвесь магнетита высушивали в лиофильной осушительной системе FreeZoneTriad (Labconco) (P = 1,51 mBar; t = 12 ч.)<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Исследования выполнены на базе Центра коллективного пользования научным оборудованием Воронежского государственного университета

<sup>2</sup> Исследования выполнены на базе Центра коллективного пользования «Объединенный Пушинский центр электронной микроскопии» ИБК РАН

### 2.2.17. Изучение включения наночастиц магнетита в липосомы

Оценку встраивания магнетита в липосомы производили спектрофотометрическим методом. Синтезированные липосомы осаждали с помощью центрифугирования при 50000 об/мин в течение 20 минут на микро-ультрацентрифуге Sorvall MTX 150 (ThermoScientific, Япония) с использованием ротора S120-AT2, после чего отбирали супернатант и регистрировали оптическую плотность (магнетит, не вошедший в липосомы,  $D_1$ ). Осаждённые липосомы ресуспензировали в объёме натрий-фосфатного буфера, равный изначальному и разрушали путём инкубации в 1% Triton-X100 в течение 1ч. При использовании этого детергента происходит солюбилизация фосфолипидов с образованием смешанных мицелл, либо червеобразных везикул [18]. Магнетит, находившийся изначально внутри липосом, при этом выходил в раствор. Затем опять производили осаждение образовавшихся структур при аналогичных условиях и отбирали супернатант (магнетит, находящийся во внутренней полости липосом,  $D_2$ ). Оптическую плотность регистрировали с помощью спектрофотометра Shimadzu UV 2401-PC (Япония) в кварцевой кювете с длиной оптического пути 1см при длине волны 412 нм.

Процент встраивания наночастиц магнетита в мембрану липосом оценивали по формуле:

$$Hв = (1 - D^{412}_1 / D^{412}_{исх} + D^{412}_2 / D^{412}_{исх}) \times 100 \%,$$

где  $Hв$ -количество включённого в мембрану липосом магнетита, в процентах;  $D^{412}_1$  - оптическая плотность раствора после центрифугирования липосом,  $D^{412}_2$ - оптическая плотность раствора после разрушения и центрифугирования липосом  $D^{412}_{исх}$ - оптическая плотность исходного раствора магнетита в буфере.

### 2.2.18. Получение иммуномагнитолипосом

Липосомы синтезировали методом гидратации/регидратации. Раствор фосфатидилхолина (0,5%) (Sigma, США), холестерина (0,5%) (Sigma, США) и дистероилфосфоэтаноламин–полиэтиленгликоля (2000) (0,1%) (Avanti Polar lipids, США) в этиловом спирте испаряли в роторном испарителе RV10 control (ИКА, Германия) при температуре водяной бани 60°C. К полученной липидной пленке добавляли 0,1 М натрий-фосфатный буфер с наночастицами магнетита, покрытого ЦТАБ (1 мг/мл), и перемешивали в течение одной минуты. Антитела к гистону H3 (Cloud-Clone corp., США) инкубировали с реагентом Траута (Sigma, США) 1ч. Тиолированное антитело добавляли к синтезированным липосомам и инкубировали в течение 12 ч при  $t = 4^{\circ}\text{C}$ . [152].

Следующим этапом стала диспергенция получаемых липосом, для чего растворы были подвержены воздействию ультразвука. Облучение проводили на ультразвуком дезинтеграторе Qsonica Sonicators (США) в течение 15 мин (20 кГц, 10 секундный импульс с перерывом 3 с).

### 2.2.19. Оценка цитотоксичности получаемых наночастиц

*Определение токсических свойств наночастиц на эритроцитах крови человека.*

В качестве объекта исследования использовали суспензии эритроцитов, полученные из крови доноров в день взятия пробы. Операцию отмывки эритроцитов физиологическим раствором проводили трижды методом центрифугирования при 1500 об/мин в течение 10 минут. Полученную суспензию эритроцитарных клеток доводили до величины оптической плотности (D412) равной 0,8, а затем использовали в экспериментах.

Суспензии эритроцитарных клеток предварительно инкубировали в течение 1 ч с «пустыми» липосомами и липосомами, содержащими 0,03% азид натрия, в соотношениях эритроциты / липосомы: 1/1, 1/10, 1/100, 1/1000. Затем эритроциты осаждали центрифугированием при 3 000 об/мин на центрифуге MPV-340. О разрушении эритроцитов судили по выходу лактадегидрогеназы (ЛДГ), определяя её активность в надосадочной жидкости. [Биологические мембраны, Артюхов В.Г., Наквасина М.А., 2000].

В кварцевую кювету для спектрофотометра помещали 2,8 мл надосадочной жидкости и 0,1 мл NADH до конечной концентрации  $5,4 \cdot 10^{-5}$  моль/л. На спектрофотометре ShimadzuUV-2401 при длине волны 340 нм измеряли оптическую плотность D1. Затем в кювету приливали 0,1 мл пирувата натрия до конечной его концентрации в смеси  $1,5 \cdot 10^{-3}$  моль/л и через 30 секунд регистрировали оптическую плотность D2. Каталитическую активность ЛДГ оценивали по формуле:

$$A = (D1 - D2) \cdot V_{\text{пр}} / (\varepsilon \cdot l \cdot t),$$

где  $\varepsilon$  – молярный коэффициент поглощающего соединения (NADH), равный  $6,22 \cdot 10^3$  моль<sup>-1</sup> см<sup>-1</sup>, l – длина оптического пути, t – время инкубации (30 с), V пр – конечный объём реакционной смеси (3 мл).

*Определение токсических свойств наночастиц на лимфоциты крови человека.*

Лимфоциты крови человека выделяли центрифугированием на градиенте плотности фиколл-верографина ( $\rho = 1.077$  г/см<sup>3</sup>). К лимфоцитам добавляли наночастицы в тех же соотношениях, что и в эксперименте с эритроцитами.

Определение жизнеспособности полученной клеточной фракции осуществляли на проточном цитофлуориметре Guava easyCyte 8 HT

(MerkMillipore Group, USA) согласно протоколу коммерческого набора GUAVA VIA COUNT. В работе использовали образцы клеток с жизнеспособностью не менее 98%. [16]

Ещё одним методом определения жизнеспособности полученной клеточной фракции служил метод окраски клеток трипановым синим. Подсчет концентрации клеток проводили с помощью камеры Горяева на микроскопе Микмед-2 (Ломо, Россия). Для определения жизнеспособности лимфоцитов использовали 0,2 % раствор трипанового синего в изотоническом растворе Хенкса без глюкозы. Краситель смешивали в равных объемах с клеточными суспензиями и в камере Горяева осуществляли подсчет не менее 100 клеток, отмечая голубые (погибшие) и неокрашенные (живые). Долю жизнеспособных клеток (N) определяли по формуле :

$$N = (\text{количество живых клеток} / \text{общее число клеток}) \times 100\%$$

В работе использовались суспензии клеток с жизнеспособностью не менее 95%.

### *Определение токсических свойств наночастиц на водоросли *Chlorella vulgaris**

Методика основана на регистрации различий в оптической плотности тест-культуры водоросли хлорелла, выращенной в водной среде, не содержащей искусственных наночастиц (контроль) и в водных дисперсных системах, содержащих тестируемые наночастицы (опыт). Критерием токсичности наночастиц является снижение на 20 % и более величины оптической плотности культуры водоросли, выращиваемой в течение 22 часов в дисперсной системе наночастиц (ДС НЧ), по сравнению с ее ростом на контрольной среде, приготовленной на дистиллированной воде. Количественная характеристика токсичности при этом определяется общепринятым показателем: индексом токсичности (I) – относительной (в %)

величиной прироста оптической плотности для ДС по сравнению с контролем:

$$I = (\Delta D_k - \Delta D_{дс}) / \Delta D_k \times 100 \%,$$

где  $\Delta D_k$  и  $\Delta D_{дс}$  – средние значения прироста оптической плотности в контроле и в дисперсной системе, соответственно [25].

#### 2.2.20. Оценка взаимодействия иммуномагнитолипосом со структурами НВЛ

Для оценивания взаимодействия липосом со структурами НВЛ использовали метод флуоресцентной микроскопии. Нейтрофилы стимулировали частицами латекса, как описано в пункте 2.2.4. Далее добавляли суспензию липосом к нейтрофилам в соотношении клетка/липосома=1/ 10. Затем инкубировали нейтрофилы с липосомами 1 ч при температуре 37°C и готовили препараты для флуоресцентной микроскопии.

#### 2.2.21. Статистическая обработка полученных данных

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакетов прикладных программ MicrosoftExcel и Stadia 8.0. Проверку распределения исследуемых показателей на нормальность проводили по критериям Колмогорова,  $\chi^2$ .

Достоверность различий контрольных и опытных величин устанавливали с использованием t-критерия Стьюдента (для признаков, подчиняющихся закону нормального распределения), W-критерия Вилкоксона и X-критерия рангов Ван дер Вардена (для признаков, распределение которых отличалось от нормального).

Использованные в работе методы исследований позволили определить условия образования НВЛ (флуоресцентная микроскопия), целостность нуклеиновых кислот в их структуре (электрофорез в агарозном геле) и наличие в структуре НВЛ митохондриальной ДНК и гистона H3 (RT-ПЦР и ИФА). Характеристики и свойства МНЧ и липосом определяли с помощью метода динамического светорассеяния, рентгеновской дифракции, просвечивающей электронной микроскопии. Цитотоксические свойства синтезированных наночастиц определяли с помощью методов спектрофотометрии, проточной цитофлуориметрии

### Глава 3. ВЫЯВЛЕНИЕ УСЛОВИЙ ОБРАЗОВАНИЯ И СТРУКТУРЫ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ЛОВУШЕК ЧЕЛОВЕКА

#### 3.1. Подбор условий образования внеклеточных ловушек нейтрофилами крови человека

По литературным данным, механизм и время образования НВЛ зависят от природы активирующего агента. Нами был проведён подбор времени, необходимого для спонтанного образования НВЛ и при активации нейтрофилов крови человека частицами латекса.

Первым этапом наших исследований явилось изучение способности нейтрофилов крови человека спонтанно образовывать внеклеточные ловушки. Для этого клетки инкубировали в термостате при 37°C. Было установлено, что при термостатировании в течение 30 минут без дополнительной стимуляции НВЛ образуются не более чем одним процентом изучаемых иммунокомпетентных клеток.

Нами было принято решение изучить образование НВЛ при инкубации нейтрофилов с чужеродными агентами. В качестве такого агента были выбраны частицы латекса. Концентрация активатора образования НВЛ составляла  $5 \times 10^6$  клеток/мл: были выбраны временные интервалы: 5 мин, 10 мин, 30 мин, 1 час. Анализ микроскопических препаратов показал, что 5 и 10 минут недостаточно для формирования ПМЯЛ внеклеточных ловушек. При подсчёте 100 клеток было обнаружено наличие ловушки только у одной клетки (что соответствовало контрольным образцам). В связи с этим время инкубации было увеличено до 30 минут.

Просмотр приготовленных препаратов показал, что при таком времени инкубации образование ловушек происходит у  $80 \pm 2$  % клеток. Дальнейшее увеличение времени инкубации не приводило к статистически значимым изменениям в количестве образованных НВЛ. (Рис.4)

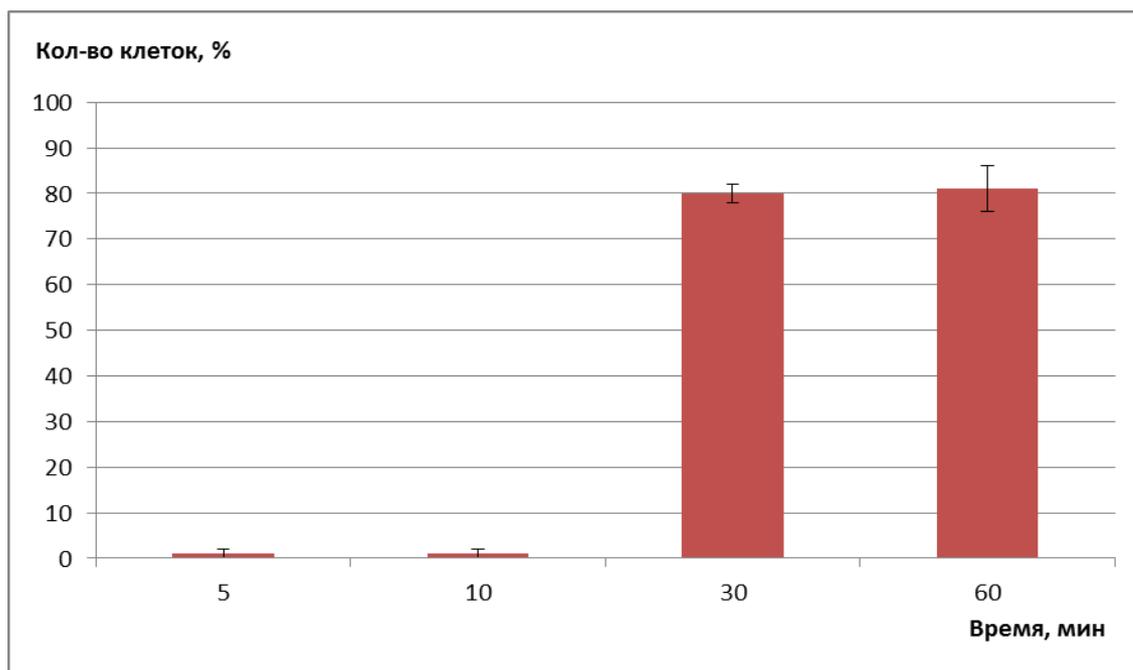


Рис. 4. Динамика образования НВЛ нейтрофилами при стимуляции их к фагоцитозу

Таким образом, нами было установлено, что для обнаружения образования нейтрофильных внеклеточных ловушек необходимо инкубировать суспензию клеток с активатором не менее 30 мин.

Изображение НВЛ, образованных после стимуляции частицами латекса нейтрофилов в течение 30 минут, приведено на рисунке 5.



Рис.5. Нейтрофильные внеклеточные ловушки, образованные стимулированными клетками

### 3.2. Изучение структуры нуклеиновых кислот, выделяемых нейтрофилами крови человека при их стимуляции латексом. Поиск возможных мишеней в структуре НВЛ для адресной доставки липосом

Для того чтобы доказать, что мы имеем дело именно с образованием НВЛ, было проведено изучение молекул ДНК, выделяющихся ПМЯЛ в условиях проводимого нами эксперимента и входящих в состав внеклеточных сетей.

Мы установили, что в контрольных образцах клеточных суспензий ДНК не выделялось во внеклеточную среду. При стимулировании частицами латекса клеток к образованию внеклеточных ловушек в инкубационную среду происходило выделение нуклеиновых кислот, которые двигались в геле одним фронтом, смещаясь от точки нанесения на 2 мм, что соответствует высокомолекулярной ДНК (рис.8). При этом не наблюдалось

ни характерной для апоптоза «апоптотической лестницы», ни наблюдаемой при некрозе «размытой дорожки». Таким образом, мы показали, что при стимуляции нейтрофилов частицами латекса происходит образование нейтрофильных внеклеточных ловушек.



Рис.6. Электрофореграмма нуклеиновых кислот, выделяемых во внеклеточную среду нейтрофилами при стимуляции их к образованию внеклеточных ловушек

Обозначения: 1 – краситель бромтимоловый синий, 2 – ДНК НВЛ, 3 – маркеры длины ДНК, 4 – лунки;

а) дорожка с маркерами длины ДНК, б) дорожка с ДНК НВЛ

Для выявления роли митохондрий в процессах образования нейтрофильных внеклеточных ловушек нами была проведена оценка внедрения фрагментов мтДНК в образующиеся внеклеточные структуры методом RT-PCR. В качестве маркерного участка нами был выбран цитохром *b*, последовательность гена которого не имеет аналогичных

фрагментов в ядерном геноме. Специфическая последовательность гена цитохрома b была взята из литературных источников (Рис.7), после чего она была проверена при помощи генератора праймеров ([www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/))

#### Праймеры к гену цитохрома b

Вид	Праймер	GC содержание	Tm (°C)	Размер, bp
<i>Homo sapiens</i>	f5' - AGGCGTCCTTGCCCTATTAC- 3'	55.00	59.53	104
	r5' - GTGATTGGCTTAGTGGGCG- 3'	55.00	60.39	

Рис.7. Последовательность праймеров к гену цитохром B (Bergsten et al., 2012 ; Pacheco et al., 2018)

В ходе проведения исследований нами было установлено наличие участка гена цитохром b в структуре НВЛ. О его наличии судили по результатам ПЦР в реальном времени с использованием подобранных праймеров. Для образцов, содержащих нуклеиновые кислоты митохондрий (в качестве положительного контроля) и внеклеточных сетей, значение Ср (номер цикла, при котором флуоресценция превышает пороговое значение, без учета первых 10 циклов для исключения ошибки шума) по каналу Fam составило 27,7 и 31,7 соответственно (Рис. 8).

№	Идентификатор	Fam Ср	Hex Ср	Качественный анализ
A1	H2O			-
A2	мтДНК	27,7		+
A3	ДНК_НВЛ	31,7		+

Рис. 8. Обнаружение мтДНК в структуре НВЛ

Таким образом, было показано, что при стимуляции нейтрофилов крови человека латексом происходит образование НВЛ с участием не только ядерного генома, но и митохондриального. В совокупности с данными о времени образования НВЛ при стимуляции нейтрофилов латексом (в течение 30 минут), можно выдвинуть предположение, что латекс-стимулированный нетоз протекает по пути, предложенному *Yousefi S.* и соавторами [141, 142].

Тем не менее, использование участка мтДНК в качестве мишени не представляется высоковероятным, так как по известно, что митохондрии участвуют не при всех возможных путях нетоза [134]. Более универсальной мишенью может служить молекула гистона H3. Для проверки этого предположения нами были проведены исследования по выявлению наличия молекулы гистона H3 в структурах НВЛ. Выделенные НВЛ анализировали методом ИФА. Было установлено, что в образцах НВЛ присутствует гистон H3 (Рис.9). Его концентрация статистически значимо возрастает по сравнению с контролем, в качестве которого служили нейтрофилы крови человека, не стимулированные к образованию НВЛ.

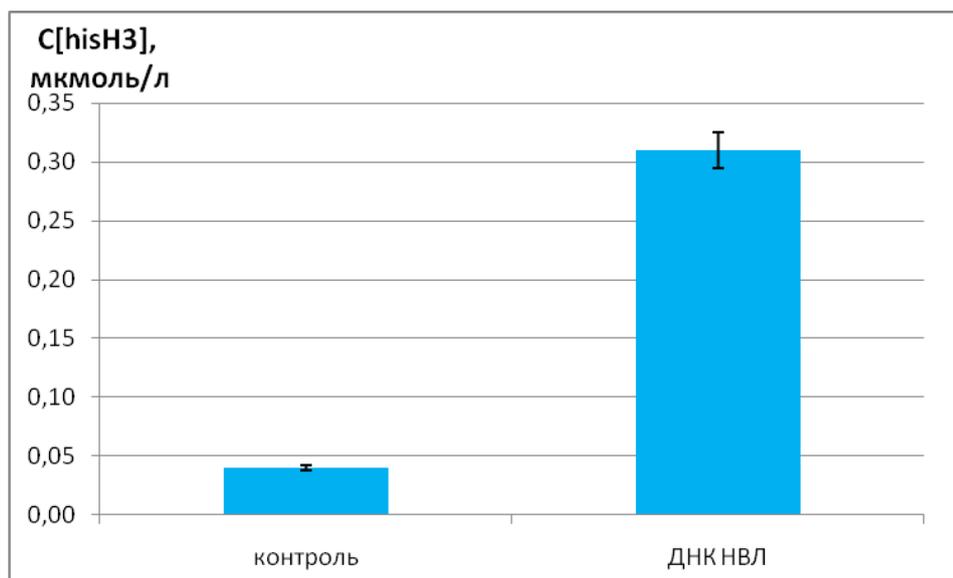


Рис. 9. Выявление содержания гистона H3 в структуре НВЛ методом ИФА

### 3.3. Изучение способности нейтрофилов образовывать внеклеточные ловушки в условиях воздействия УФ-облучения

В связи с наличием данных литературы о разностороннем действии УФ-света на биологические системы и в частности на компоненты иммунной защиты организма человека, особый интерес представляет изучение влияния УФ-света на процессы образования и функционирования нейтрофильных внеклеточных ловушек.

Эти исследования были проведены на изолированных нейтрофилах. Облучение клеток проводили светом лампы ДРТ-400 в дозах 151, 453, 906 и 1359 Дж/м<sup>2</sup> с использованием светофильтра УФС-1 с полосой пропускания 240-390 нм. После фотомодификации суспензии клеток инкубировали с частицами латекса в концентрации  $5 \cdot 10^9$  ч/л в течение 30 минут для стимулирования образования НВЛ.

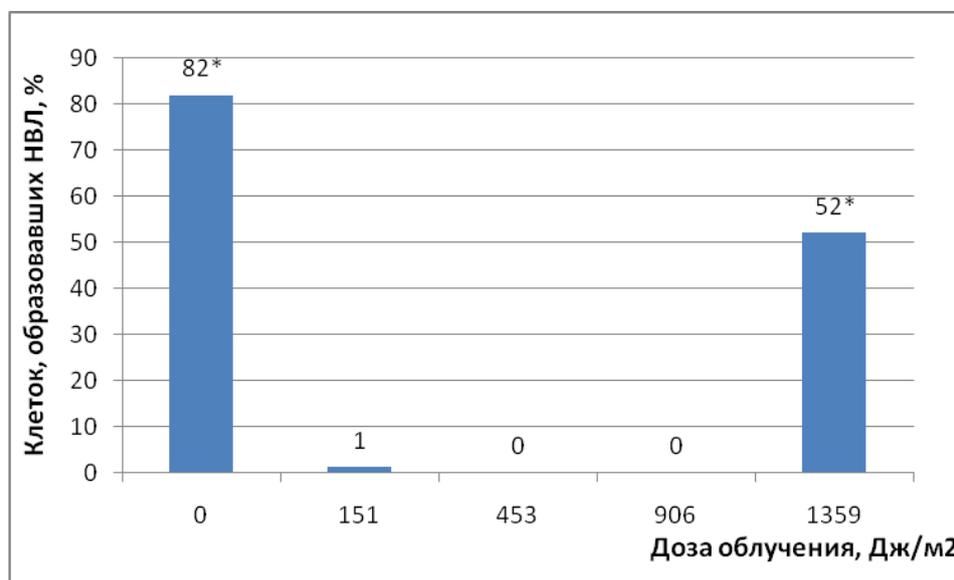


Рис.10. Динамика изменения числа клеток, образующих НВЛ в интактном состоянии и при облучении УФ-светом в дозах 151 - 1359 Дж/м<sup>2</sup>

Анализ микроскопических препаратов показал, что УФ-излучение в дозах 151, 453 и 906 Дж/м<sup>2</sup> оказывает иммунодепрессивное действие на способность нейтрофилов образовывать НВЛ. При подсчёте 100 клеток не было обнаружено образования внеклеточных сетей. Вместе с тем при дозе 906 Дж/м<sup>2</sup> нами были обнаружены группы, образованные 3-5 клетками (Рис.10).

При увеличении дозы облучения до 1359 Дж/м<sup>2</sup> мы также наблюдали образование таких групп клеток, однако, в отличие от образцов, облучённых в дозе 906 Дж/м<sup>2</sup>, они образовывали единую ловушку, существенно превосходящую по размерам ловушки, образованные одной клеткой, причём данный эффект сохранялся на всех проанализированных нами образцах. (Рис.11)

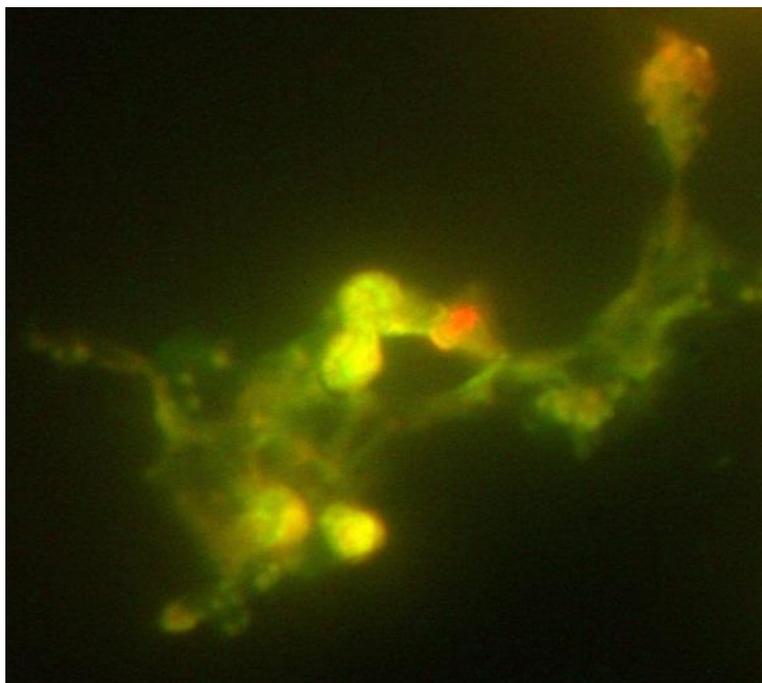


Рис.11. Образование внеклеточных сетей группами фотомодифицированных в дозе 1359 Дж/м<sup>2</sup> нейтрофилов

### 3.4. Изучение изменений метаболической активности нейтрофилов, стимулированных к образованию внеклеточных ловушек после УФ-излучения

Была измерена интенсивность флуоресценции красителя акридинового оранжевого при длинах волн 640 и 530 нм, которые соответствуют формам красителя, связанным с РНК (640 нм) и ДНК (530 нм). Особый интерес представляют собой отличия соотношения интенсивностей флуоресценции РНК к ДНК в сравнении с контролем.

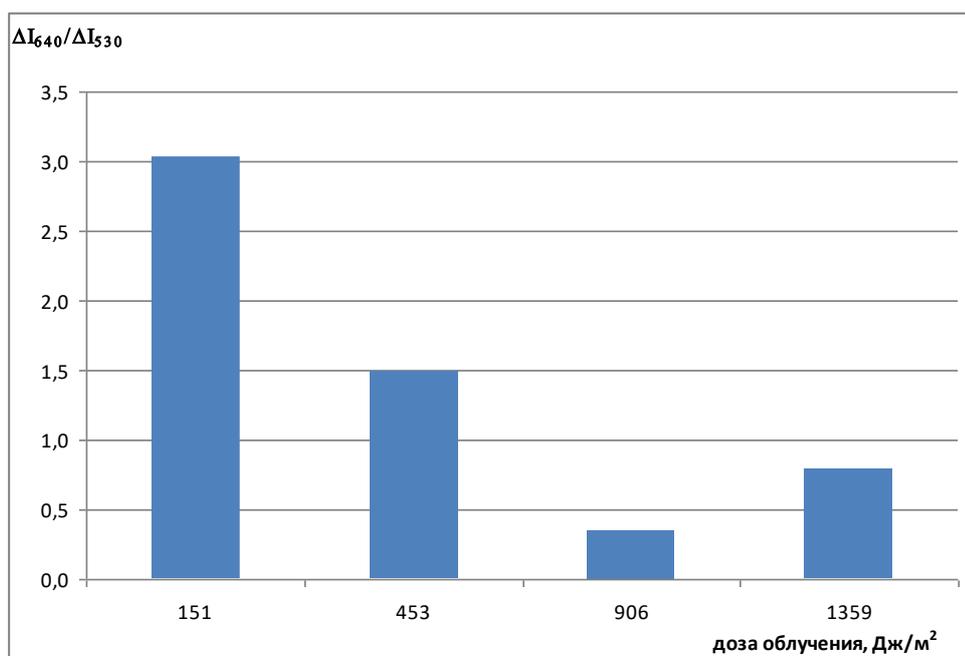


Рис.12. Соотношение количества РНК к ДНК при облучении различными дозами УФ-света нейтрофилов, стимулированных к образованию внеклеточных ловушек

Установлено, что при облучении в дозе 151 Дж/м<sup>2</sup> соотношение интенсивностей свечения при 640 и 530 нм увеличивается в 3,0 раза по

отношению к контролю, в дозе 453 Дж/м<sup>2</sup> – в 1,5 раза, в дозе 906 Дж/м<sup>2</sup> – в 0,3 раза, в дозе 1359 Дж/м<sup>2</sup> – в 0,8 раз.

Сопоставление полученных данных с результатами вышеуказанных исследований позволят констатировать, что при снижении секреции нейтрофильных внеклеточных ловушек повышается количество нуклеиновых кислот в нейтрофилах. Это наводит на мысль о том, что нуклеиновые кислоты используются для другой цели. Возможно, НК синтезируются, чтобы стать каркасом для ловушек, однако из-за нарушения одного из последующих звеньев механизма образования НВЛ они не могут выйти из клетки, либо в нейтрофилах запускается иной механизм иммунного ответа, требующий синтеза НК.

### 3.5. Изучение степени фрагментации нуклеиновых кислот, выделенных во внеклеточную среду нейтрофилами, стимулированными к образованию внеклеточных ловушек после воздействия УФ-излучения

Так как в предыдущих экспериментах было показано, что ультрафиолетовое облучение негативно влияет на процесс образования внеклеточных ловушек, определённый интерес представляет изучение воздействия УФ-света на структурную целостность нуклеиновых кислот, выделенных во внеклеточную среду после стимуляции к образованию внеклеточных ловушек.

Анализ полученной электрофореграммы показал, что молекулярная масса нуклеиновых кислот, входящих в состав внеклеточных ловушек, составляет около 10 000 п.н. и более (Рис.13).

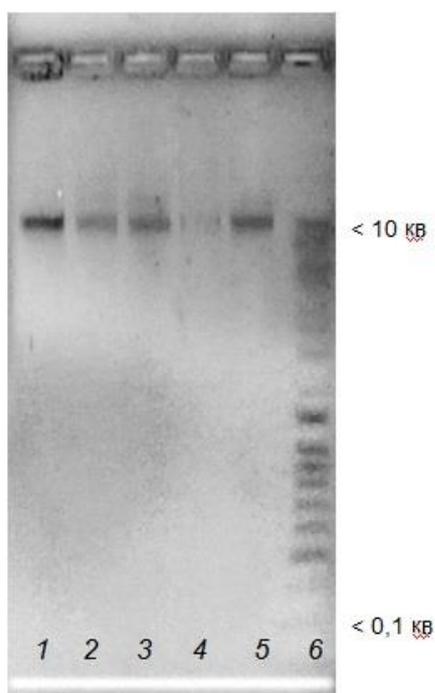


Рис.13. Электрофореграмма нуклеиновых кислот, выделенных нейтрофилами периферической крови человека после стимуляции их к образованию внеклеточных ловушек

1) Контроль 2) 151 Дж/м<sup>2</sup> 3) 453 Дж/м<sup>2</sup> 4) 906 Дж/м<sup>2</sup> 5) 1359 Дж/м<sup>2</sup> 6) ДНК-маркер

Негативное влияние УФ-света выбранного диапазона и доз на процесс нетоза, по-видимому, может быть связано с нарушением проницаемости ядерных мембран и возможным образованием сшивок ДНК-белок. Полученные результаты должны учитываться при терапии заболеваний, в патогенезе которых принимают участие НВЛ.

## ГЛАВА 4. СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ МАГНЕТИТА И МАРГАНЦЕВОГО ФЕРРИТА

### 4.1. Подбор концентраций исходных веществ

В качестве магнитоуправляемых компонентов наносистем нами были выбраны частицы магнетита и марганцевого феррита. Данный выбор обусловлен высокой степенью намагничиваемости и относительно низкой токсичностью данных наночастиц.

Химический метод соосаждения является наиболее простым и эффективным способом получения магнитных частиц. Оксиды железа ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  либо  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), как правило, получают путем смешивания солей двух и трехвалентного железа в присутствии основания. Процесс можно представить следующим химическим уравнением для получения  $\text{Fe}_3\text{O}_4$



Согласно термодинамике этой реакции полного осаждения  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  следует ожидать при стехиометрическом соотношении 2:1 ( $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ).

На первом этапе был осуществлён подбор концентрации ионов железа, при которой образующиеся частицы обладали бы большей агрегационной устойчивостью. Для этого измеряли кинетику осаждения полученных частиц. Нами были выбраны промежутки времени - 1 минута и 10 минут. О степени осаждения частиц судили по отношению светопропускания через эти промежутки времени к значению светопропускания в начальный момент времени. Анализ полученных данных показал, что при концентрации ионов железа 30 мМ это отношение минимально, что говорит о минимальном осаждении частиц (Рис. 14). В дальнейшей работе при приготовлении магнетита использовали концентрацию солей железа 30 мМ.

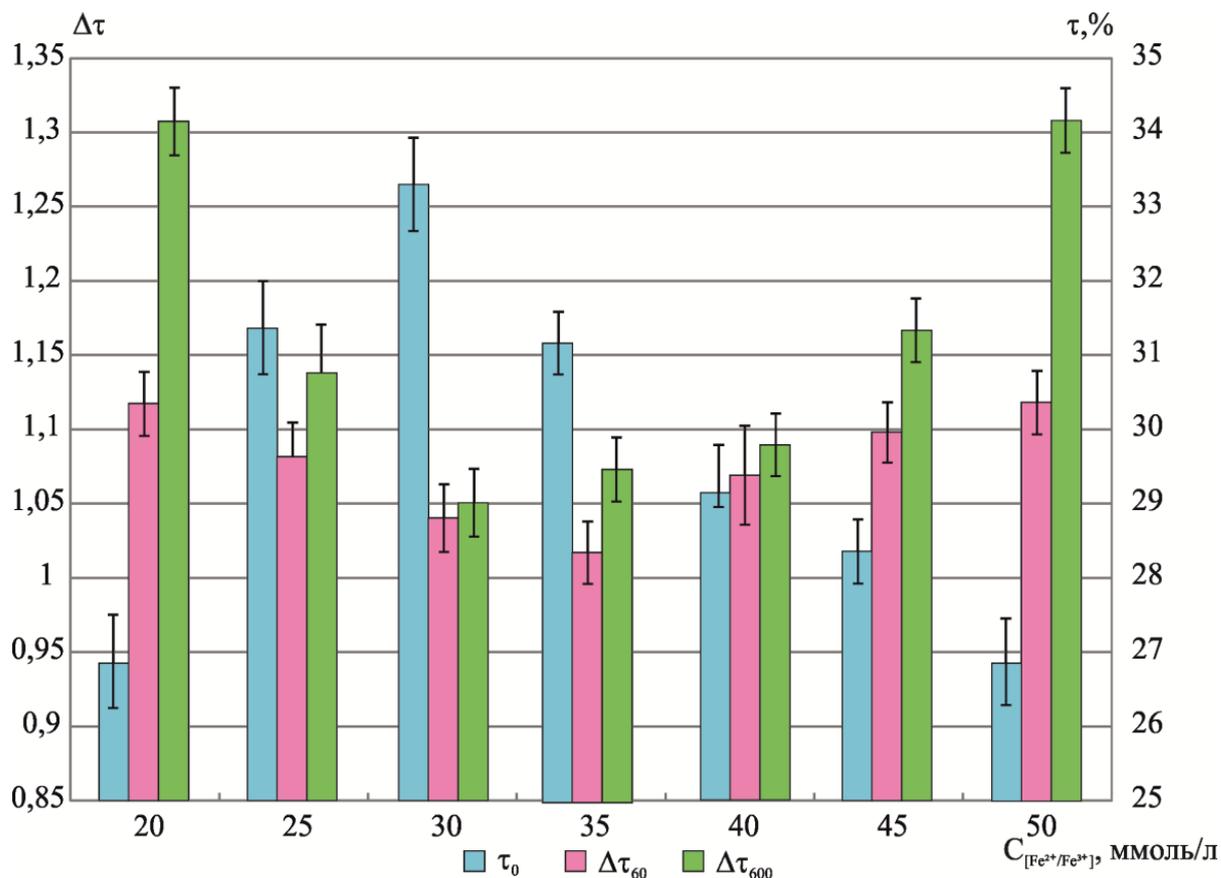


Рис 14. Зависимость величины параметра светорассеяния раствора магнетита от исходной концентрации солей железа

Обозначения:

$\Delta\tau$  – отношение значения показателя светорассеяния через определённый промежуток времени (  $\Delta\tau_{60}$  -через 60 секунд и  $\Delta\tau_{600}$  -через 600 секунд) к показателю светорассеяния в начальный момент времени)

$\tau_0$  - значение светорассеяния в начальный момент времени

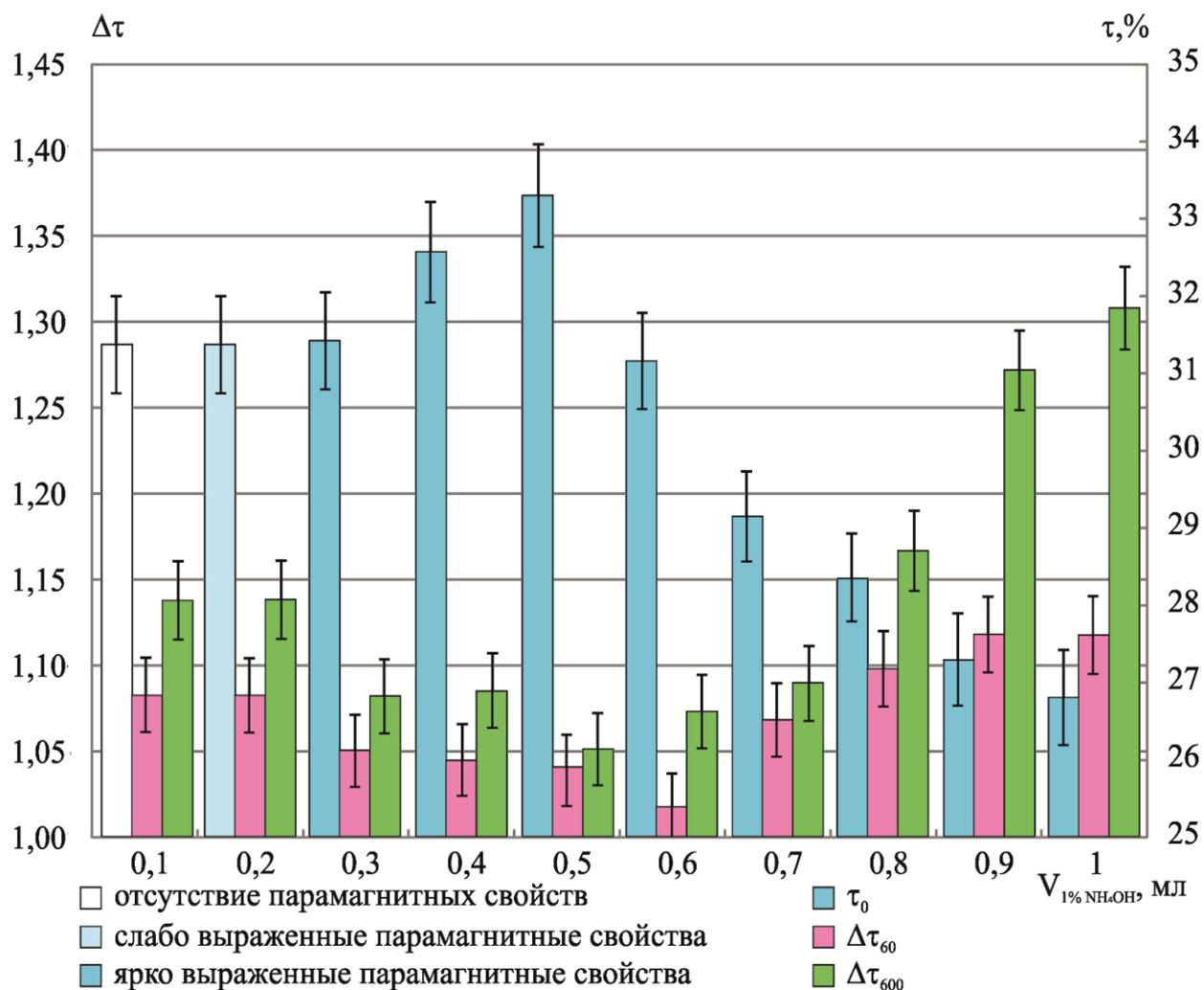


Рис.15 . Зависимость величины параметра светорассеяния раствора магнетита от исходной концентрации водного раствора аммиака

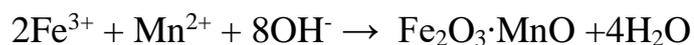
Обозначения:

$\Delta\tau$  – отношение значения показателя светорассеяния через определённый промежуток времени (  $\Delta\tau_{60}$  -через 60 секунд и  $\Delta\tau_{600}$  -через 600 секунд) к показателю светорассеяния в начальный момент времени)

$\tau_0$  - значение светорассеяния в начальный момент времени

Концентрация осадителя (водного раствора аммиака) оказывает также большое влияние на процесс образования наночастиц магнетита и их характеристики. Была исследована способность к осаждению частиц при добавлении 1%-го раствора аммиака объёмом 0,1 -1 мл к 1 мл раствора солей железа. В ходе экспериментов было установлено, что при добавлении 0,1 и 0,2 мл водного раствора аммиака к раствору солей железа образующиеся наночастицы обладали слабовыраженными магнитными свойствами. При увеличении концентрации аммиака у наночастиц появлялись парамагнитные свойства. При добавлении 0,5 мл аммиака значение  $\Delta t$  минимально, что говорит о наименьшей степени оседания частиц (Рис.15).

Процесс синтеза второго типа исследуемых нами наночастиц – марганцевого феррита – можно представить такой химической моделью:



В работе использовали те же концентрации солей металлов, что и при синтезе магнетита – 30 ммоль/л.

Однако в том случае, когда использовалось указанное соотношение реагентов, выяснилось, что реализация второго этапа превращения осадка гидроксидов металлов в их оксиды не происходит. По-видимому, причиной этого являлось изменение рН среды из-за расходования щелочи на осаждение.

В связи с этим нами был проведен блок исследований, направленных на изучение методом динамического рассеяния света (ДРС) влияния условий синтеза наночастиц на их размерные характеристики.

В ходе проведенных опытов нами было установлено, что при термостатировании реакционной смеси при 30оС возможно получение наночастиц от 7,1 до 12,4 нм (Табл. 3.)

Таблица 3

Динамика размера синтезируемых наночастиц марганцевого феррита (нм)

СNaOH, ммоль/л	Температура реакционной смеси, оС				
	30	50	70	80	90
5	7,1±1,1	21,5±3,6	80,7±12,6	191,4 ±32,5	189,3±32,6
10	12,7±2,3	21,3±3,1	124,4±22,7	154,5±11,1	163,9±15,8
15	12,5±2,3	19,1±2,9	58,7±8,6	142,5±34,1	218,1±32,7
20	12,4±1,0	16,5±3,7	106,2±9,5	147,6±22,6	148,3±21,5
25	11,1±1,7	19,5±4,1	89,4±14,8	186,7±23,5	154,3±31,5
30	11,2±0,1	13,7±2,9	77,4±13,6	120,1±23,7	137,6±22,6
35	11,4±0,9	13,0±3,0	84,6±16,2	117,3±16,2	209,0±19,1
40	10,1±1,2	14,1±1,2	97,3±21,5	163,3±13,8	161,5±15,2
45	8,5±1,1	12,3±1,7	69,1±17,3	148,6±21,9	151,8±20,1
50	8,9±1,5	14,6±2,5	71,1±11,5	120,4±17,3	137,9±18,2

Увеличение температуры до 50°С приводило к увеличению размеров получаемых наночастиц: минимальный размер – 12,3±1,7 нм был зарегистрирован при использовании осаждающего реагента в концентрации 45 ммоль/л, а максимальный – 21,5±3,6 нм – при концентрации 5 ммоль/л.

Дальнейшее увеличение температуры от 70°C до 90°C способствовало увеличению регистрируемого показателя от  $58,7 \pm 8,6$  до  $218,1 \pm 32,7$  нм.

#### 4.2. Изучение размеров наночастиц магнетита и марганцевого феррита

В связи с тем, что процессы агрегации магнитных наночастиц значительно затрудняют применение метода ДРС для оценки их истинного размера, были проведены исследования по определению размера синтезированных нами МНЧ методом ПЭМ. Были исследованы образцы, синтезированные в подобранных условиях: общая концентрация солей металлов – 30 ммоль/л, температура при синтезе марганцевого феррита – 50°C, концентрация гидроксида натрия – 25 ммоль/л. В ходе проведённых исследований было установлено, что размер МНЧ магнетита составил  $4,23 \pm 1,19$  нм, марганцевого феррита –  $4,00 \pm 0,73$  нм. (Рис. 16).

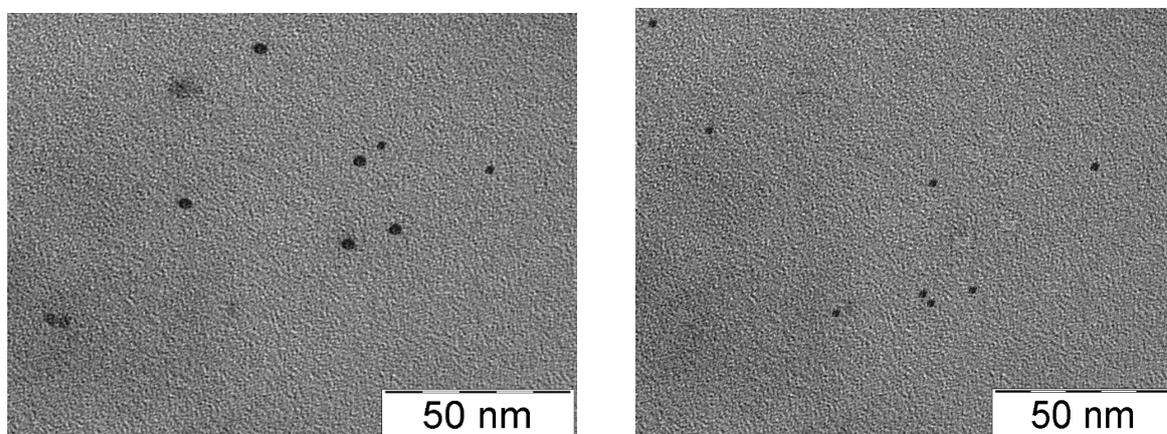


Рис. 16. Изображения наночастиц магнетита (слева) и марганцевого феррита (справа), полученные методом просвечивающей электронной микроскопии.

#### 4.3. Влияние некоторых факторов (рН, введение стабилизатора) на стабильность наночастиц магнетита

В ходе исследований было определено влияние окружения ионов в растворе на агрегационную устойчивость магнитных наночастиц.

В процессе получения наночастиц марганцевого феррита наименьшие значения  $\zeta$ -потенциала выявлялись нами при использовании натрий-ацетатного буфера в диапазоне рН 4,0-5,5. При использовании натрий-фосфатного буфера со значением рН 5,5 наблюдалось большее значение величины  $\zeta$ -потенциала наночастиц марганцевого феррита, чем при использовании натрий-ацетатного буфера с тем же значением рН (-14 мВ и -9,76 мВ соответственно). При увеличении величины рН натрий-фосфатного буфера до 6 происходит возрастание значения  $\zeta$ -потенциала, в диапазоне рН 6,0-8,0 статистически значимых отличий не наблюдалось. В точке рН 8,0 при использовании трис-глицинового буфера значение  $\zeta$ -потенциала наночастиц выше, чем в случае натрий-фосфатного буфера. При использовании трис-глицинового буфера с рН 9,0 значение  $\zeta$ -потенциала статистически достоверно снижается относительно вышеописанных условий эксперимента (рис.17).

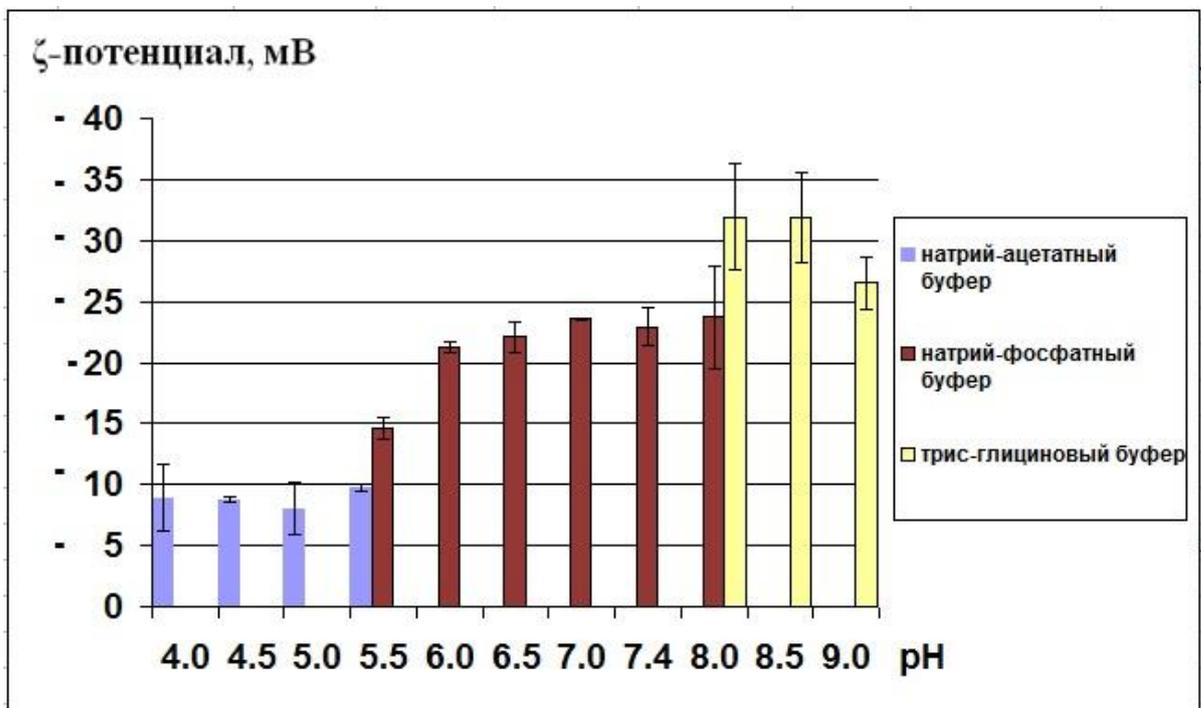


Рис. 17. Величины  $\zeta$ -потенциала наночастиц марганцевого феррита в различных буферных системах

Наночастицы магнетита обладают более низкой стабильностью, чем наночастицы марганцевого феррита. При низких значениях рН в случае использования натрий-ацетатного буфера величина  $\zeta$ -потенциала не превышает -15 мВ. (рис.18) При применении натрий-фосфатного буфера значение  $\zeta$ -потенциала значительно возрастает. В буферах со значением рН 5,5 он возрастает с - 5,5 мВ до - 14,6 мВ.

При увеличении значения рН до 6,5 происходит увеличение  $\zeta$ -потенциала до - 19,5 мВ. Дальнейшее увеличение рН не приводило к статистически значимым изменениям  $\zeta$ -потенциала (рис.18).

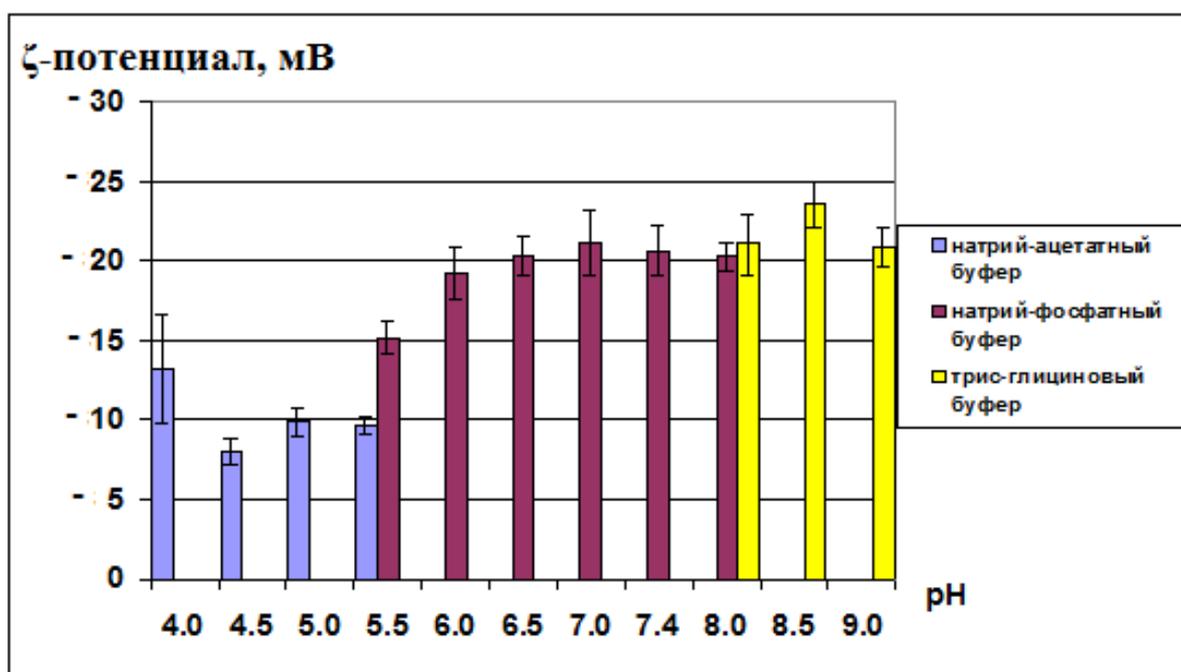


Рис. 18. Величины  $\zeta$ -потенциала наночастиц магнетита в различных буферных системах

Из полученных данных следует, что наночастицы на основе оксидов металлов при значениях рН 4,0-5,5 обладают низкой стабильностью в силу процессов их окисления. Оптимальными условиями для марганцевого феррита является трис-глициновый буфер со значениями рН 8,0-8,5. Для

магнетита оптимальным является более широкий диапазон значений pH: 6,5-8,0 для натрий фосфатного и 8,0-8,5 для трис-глицинового буферов.

Полученные данные можно объяснить различной адсорбционной способностью ионов, входящих на состав буферов. Согласно лиотропным рядам Гофмейстера, адсорбционная ёмкость ионов возрастает с размером иона. Из полученных данных мы видим, что наименее агрегируют частицы в трис-глициновом буфере, что предположительно связано с высокой адсорбцией глицина на поверхности МНЧ. Уксусная кислота обладает небольшой силой диссоциации, поэтому в натрий-ацетатном буфере высокая степень агрегации наночастиц, достоверно выше, чем на натрий-фосфатном буфере при том же значении pH (5,5).

## ГЛАВА 5. ПОЛУЧЕНИЕ МАГНИТОУПРАВЛЯЕМЫХ ЛИПОСОМ

### 5. 1. Определение размеров полученных липосом из фосфатидилхолина

На первом этапе синтеза липосом методом гидратации / регидратации были получены липосомы различных составов липидов и изучены их размерные характеристики. Размер полученных липосом определяли с помощью метода динамического светорассеяния.

Известно, что при использовании метода гидратации / регидратации образуется несколько фракций липосом. Для получения однородной фракции по размерам необходимо применять дополнительные методы. В частности, эффективным методом стандартизации размеров липосом является обработка суспензии ультразвуком. Облучение синтезированных нами липосом проводили на ультразвуковом дезинтеграторе Qsonica Sonicators в течение 15 минут (20кГц, 10 секундный импульс с перерывом 3сек).

Суспензию липосом подвергали продавливанию через мембранные фильтры с определённым размером пор. В работе использовали липосомальный экструдер LP-50, LipoFast, размер пор мембранного фильтра составлял 100 нм.

Размер полученных липосом измеряли с помощью спектрометра динамического светорассеяния Photocor-FC. Данные, полученные с использованием этого метода, показывают, что образована монодисперсная система. В случае использования только ультразвукового дезинтегратора гидродинамический радиус частиц составляет  $106,2 \pm 4,8$  нм; в случае использования дезинтегратора и экструдера –  $59,95 \pm 2,5$  нм. (Табл.5)

Табл.5. Определение размера липосом из фосфатидилхолина

Условия эксперимента	d, нм
УЗ – обработка (15 минут (20кГц, 10 секунднй импульс с перерывом 3сек))	106,2 ± 4,8
Экструзия через мембранные фильтры (100 нм)	59, 95 ± 2,5

Таким образом, при применении вышеуказанного режима ультразвуковой обработки мы получили суспензию липосом с узким распределением по размеру. В дальнейшей работе использовали данный режим ультразвуковой обработки без применения экструзии.

## 5.2. Определение включаемости белков во внутреннюю полость липосомальных наночастиц

В качестве агентов, включаемых в липосомы, нами были выбраны инсулин и гемоглобин. Концентрацию белка определяли методом Лоури. Включаемость инсулина составила  $57,5 \pm 2,2$  %, включаемость гемоглобина составила  $33,2 \pm 2,8$  %. (Рис.19)

Следующим этапом работы стало определение роли гидрофобных связей в процессе включения инсулина. В качестве агента, разрушающего гидрофобные связи, нами была выбрана мочеви́на. К раствору инсулина в натрий-фосфатном буфере добавляли мочеви́ну в концентрации 8М и измеряли степень включения инсулина по вышеописанной схеме.

Включаемость резко снизилась и составила  $13,1 \pm 0,5 \%$ .

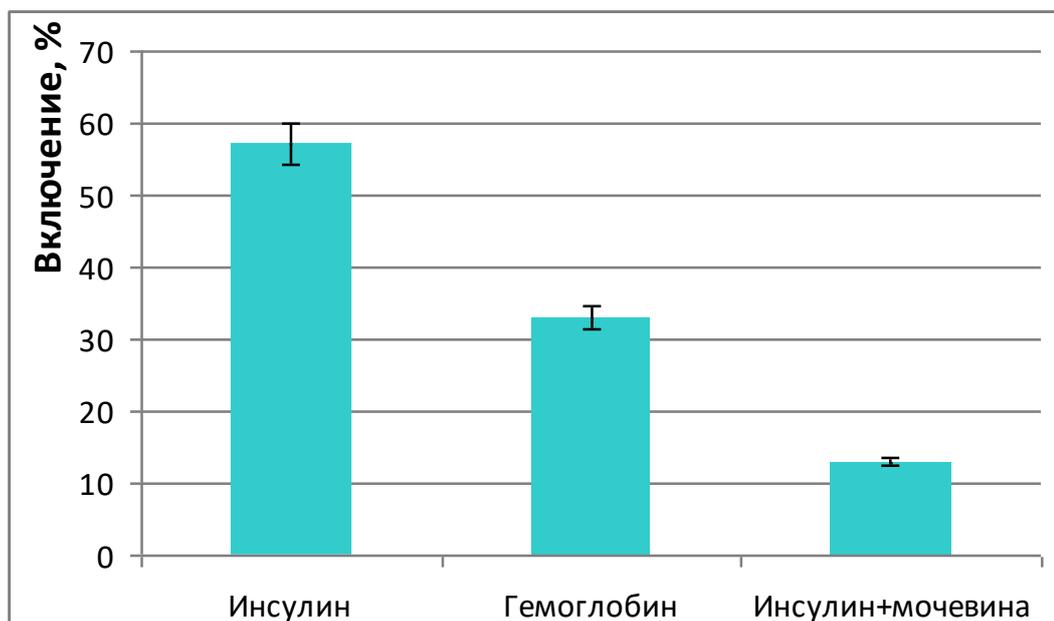


Рис. 19. Включение различных белков во внутреннюю полость липосом

Снижение степени включения инсулина после воздействия мочевиной, по-видимому, связано с разрушением гидрофобных связей между молекулами белка и липидов, что свидетельствует о значительной роли гидрофобных взаимодействий в процессах включения данного белка в липосому.

### 5.3. Определение уровня пероксидного окисления липидов в липосомах

При создании липосом важным моментом является контроль уровня окисления входящих в их состав липидов. Уровень ПОЛ в липидном бислое липосом определяли по содержанию диеновых и триеновых конъюгатов. Липосомы подвергали облучению ультразвуком. Облучение проводили на ультразвуковом дезинтеграторе Qsonica Sonicators в течение 15 минут (20кГц, 10 секундный импульс с перерывом 3 сек).

Рассчитывали содержание диеновых и триеновых конъюгатов по отношению к уровню ненасыщенных липидов (D232/D220 и D276/D220).

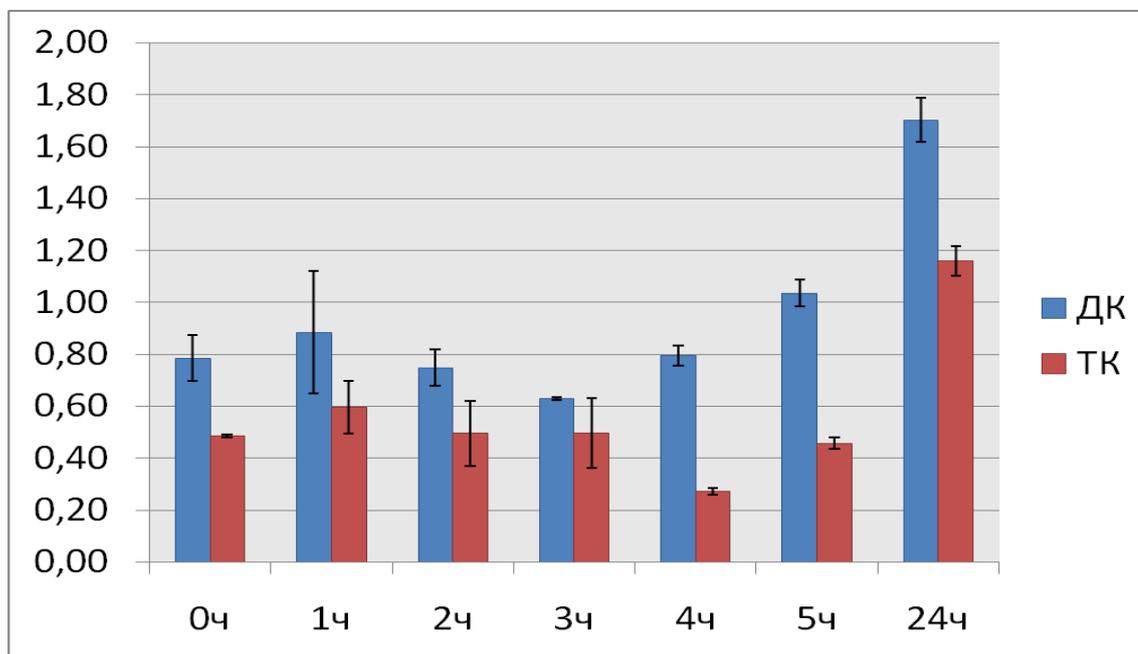


Рис.20. Образование диеновых и триеновых конъюгатов в липидном бислое липосом после УЗ-обработки

Было установлено, что в течение первых 5 часов не происходит статистически значимого изменения в уровне содержания диеновых и триеновых конъюгатов (Рис. 20). Через 24 часа после облучения липосом наблюдается статистически значимое увеличение уровня ПОЛ. Показатель D232/D220 увеличился на 0,91, показатель D276/D220 – на 0,67. Из этих данных следует, что в процессе облучения липосом идёт более ускоренное образование диеновых конъюгатов.

#### 5.4. Динамика изменения размера липосомальных наночастиц из соевого лецитина в процессе лиофилизации с сахарозой различной концентрации

При создании липосом используется сублимационная сушка для стабилизации данных структур. Однако сама лиофилизация может приводить

к разрушению бислоевой мембраны липосом, поэтому необходимо проводить её в определённом режиме и с добавлением вспомогательных веществ, обеспечивающих сохранение мембранных компонентов.

Целью данных исследований явился подбор концентрации сахарозы при использовании её в качестве криопротектора в процессе лиофилизации липосом.

Было выявлено, что при небольших концентрациях сахарозы (молярные соотношения фосфатидилхолин/сахароза – 1/0-1/2) наблюдается рост размера липосом относительно контрольных образцов.

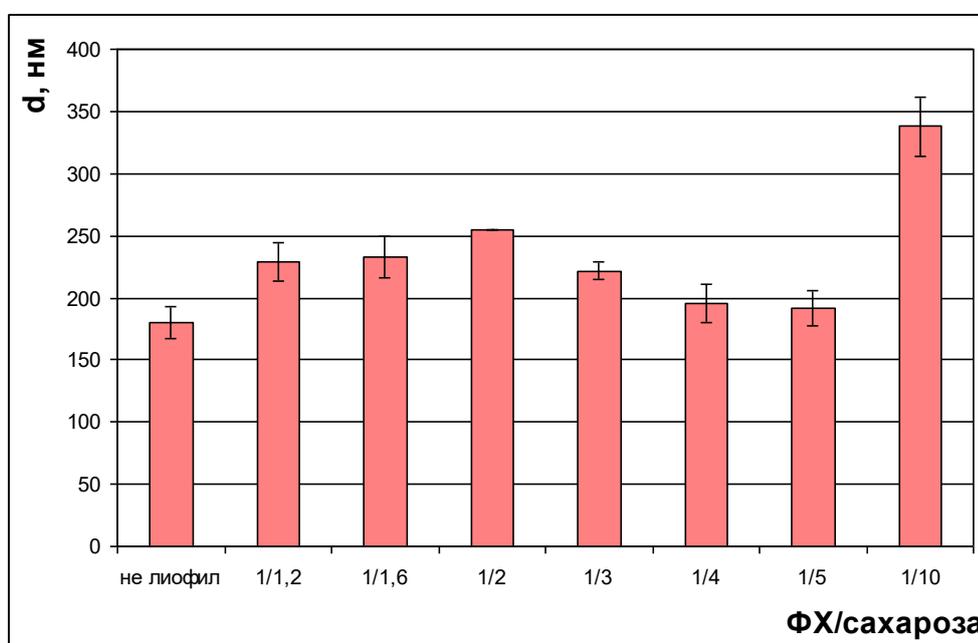


Рис. 21. Зависимость размера лиофилизированных липосомальных наночастиц от концентрации сахарозы

При соотношениях фосфатидилхолин-сахароза от 1/3 до 1/5 диаметр ресуспендированных липосом близок к таковому параметру интактных образцов. (Рис.21.)

Таким образом, мы показали, что использование сахарозы в качестве криопротектора при лиофильной сушке липосом позволяет сохранить

необходимый размер получаемых наночастиц. Оптимальный диапазон соотношений ФХ/сахароза = 1/3-1/5.

### 5.5. Изучение встраивания наночастиц магнетита в липосомы

Для встраивания магнитных наночастиц в структуру липидного бислоя липосом поверхность магнетита была модифицирована молекулами ЦТАБ. Стабилизацию производили в растворе ЦТАБ с концентрацией  $10^{-6}$  М.

Сорбцию молекул ЦТАБ подтверждали, исследуя  $\zeta$ -потенциал наночастиц до и после добавления ЦТАБ. Исследования показали, что синтезированные наночастицы магнетита без покрытия ПАВ имеют отрицательный заряд поверхности и  $\zeta$ -потенциал, равный  $-22,2 \pm 0,70$  мВ. После покрытия молекулами ЦТАБ значение  $\zeta$ -потенциала составило  $-3,80 \pm 4,07$  мВ. (Табл.6).

Табл. 6. Характеристики наночастиц магнетита при покрытии ЦТАБ

	$\zeta$ -потенциал
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	$-22,2 \pm 0,70$ мВ
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ –ЦТАБ	$-3,80 \pm 4,07$ мВ

Для оценки качественного состава синтезируемого магнетита были зарегистрированы рентгенограммы наночастиц. Обнаруженные на рентгенограммах пики  $2\theta = 18; 30,20; 35,53; 43,1; 57,1$  соответствуют показателям стандартного образца магнетита ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (PDF-2 карта №01-088-0315) (Рис.22).

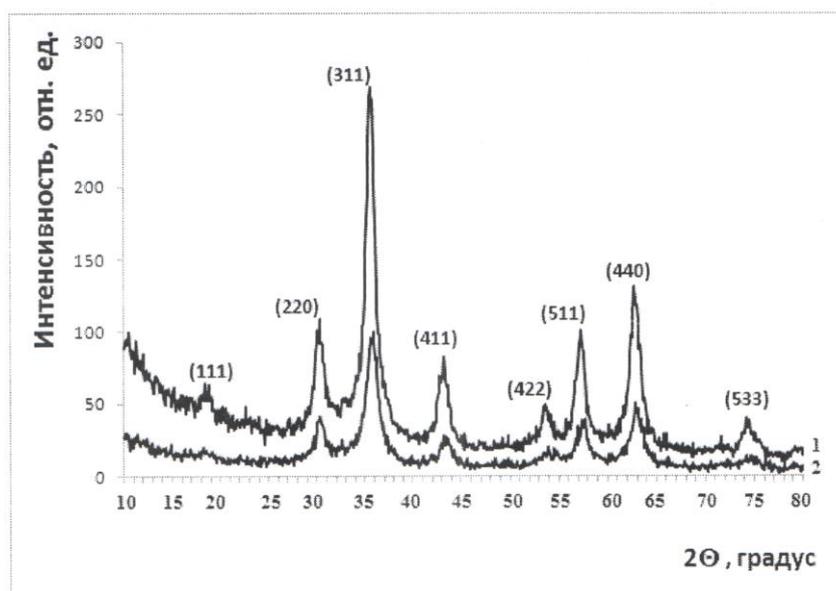


Рис.22. Рентгенограмма наночастиц магнетита

1 -  $\text{Fe}_3\text{O}_4$

2 -  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  -ЦТАБ

Исследования с помощью спектрофотометрического метода показали, что в случае магнетита без оболочки наблюдается включение  $49,2 \pm 0,5$  % магнетита, при использовании покрытия в виде ЦТАБ в липидный бислой включается  $80,8 \pm 0,5$  % магнетита. (Табл.7)

Табл.7. Определение количества включённого в липидный бислой липосом магнетита спектрофотометрическим методом

	<i>Включение в липидный бислой, %</i>	<i>Включение во внутреннюю полость, %</i>	<i>Невключившийся магнетит, %</i>
$\text{Fe}_3\text{O}_4$	$49,2 \pm 0,5$	$32,1 \pm 0,5$	$18,9 \pm 0,1$
$\text{Fe}_3\text{O}_4$ -ЦТАБ	$80,8 \pm 0,5$	$13,9 \pm 0,2$	$5,2 \pm 0,3$

Таким образом, покрытие наночастиц магнетита молекулами ЦТАБ способствует встраиванию наночастиц в структуру липидного бислоя липосом, освобождая место внутренней полости липосом для переноса лекарственных препаратов.

На Рис. 23 представлены характерные электронномикроскопические изображения липосом с адсорбированными наночастицами магнетита. На микрофотографиях липосом с наночастицами  $Fe_3O_4$ -ЦТАБ [Рис.23, в] заметно увеличение числа наночастиц магнетита, встроенных в липидный бислой, по сравнению с частицами, немодифицированными ЦТАБ [Рис.23, б].

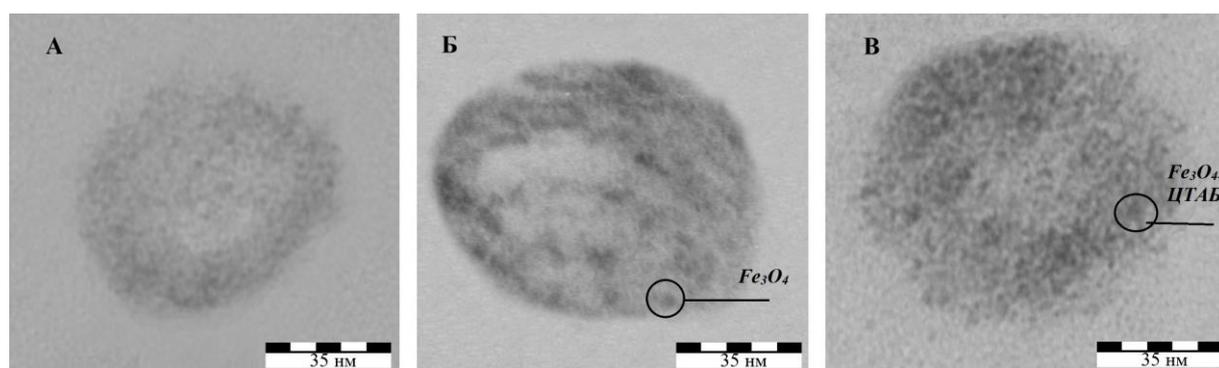


Рис.23. Изображения липосом, полученные с помощью метода ПЭМ

А) липосомы без добавления магнетита

Б) липосомы с включёнными наночастицами магнетита

В) липосомы с включёнными наночастицами магнетита, покрытыми ЦТАБ

Увеличение доли встроенных в липидную мембрану наночастиц  $Fe_3O_4$  обусловлено взаимодействием гидрофобной углеводородной цепи молекулы ЦТАБ ( $[C_{16}H_{33}N(CH_3)_3]Br$ ) и гидрофобных остатков жирных кислот молекул фосфатидилхолина.

## 5.6. Получение иммуномагнитолипосом и их размерные характеристики

Для осуществления возможности точечного взаимодействия получаемых магнитолипосом со структурами НВЛ необходимо включать в их состав специальные векторные молекулы, взаимодействующие специфическим образом с «мишенями» в структуре НВЛ. В качестве такой «мишени» была выбрана молекула гистона H3. Схематическое изображение синтезированных нами магнитолипосом приведено на рис.24.

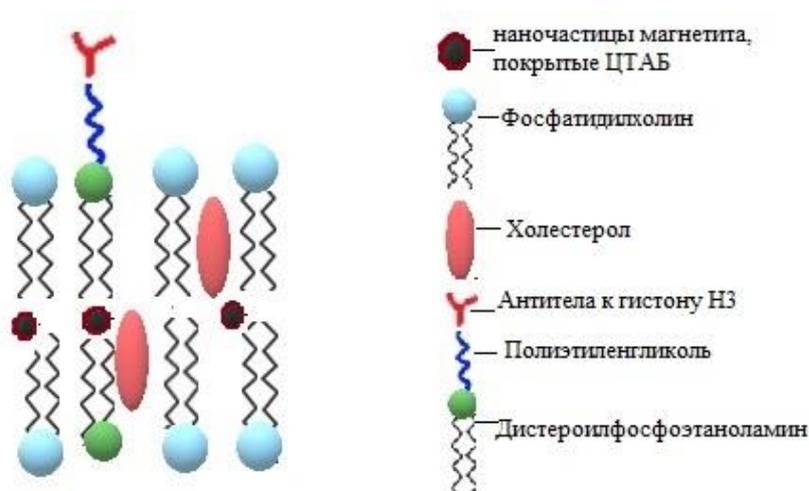


Рис.24. Схематическое изображение строения мембраны синтезированных магнитоиммунолипосом

При получении данных наночастиц контролировали их размер и  $\zeta$ -потенциал на разных этапах синтеза.

В ходе проведения исследования мы показали, что размер полученных иммуномагнитолипосом составил  $176,4 \pm 12,95$  нм. (Табл.7.) В связи с тем, что для обеспечения прохождения липосом через ряд физиологических барьеров в организме они должны иметь размер менее 200 нм, полученные

нами иммунолипосомы могут быть использованы для проведения терапии различных патологических процессов.

Табл.7. Значения гидродинамического радиуса и  $\zeta$ -потенциала липосомальных наночастиц

Условия эксперимента	Среднее значение диаметра частиц (нм)
Фосфатидилхолин (1%) + ультразвук 15 минут (20кГц, 10 секунднй импульс с перерывом 3сек)	173,8 ± 12,5
Фосфатидилхолин (0,5%)+холестерин (0,5%) + ультразвук 15 минут (20кГц, 10 секунднй импульс с перерывом 3сек)	171,8±28,4
Фосфатидилхолин (0,5%) + холестерин (0,5%) + дистероилфосфоэтаноламин-полиэтиленгликоль (0,1%) + антитела к гистону H3 + Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ЦТАБ + УЗ 15 минут (20кГц, 10 секунднй импульс с перерывом 3сек)	176,4 ± 12,9

### 5.7. Оценка цитотоксичности получаемых наночастиц липосом

Для оценки токсичности получаемых липосом необходимо контролировать их вводимую концентрацию. Концентрацию липосомальных наночастиц рассчитывали следующим образом.

Количество молекул на одну липосому рассчитывалось исходя из формулы, впервые предложенной *Huang* и *Mason* [79].

$$N_{tot} = \frac{\left[ 4\pi\left(\frac{d}{2}\right)^2 + 4\pi\left(\frac{d}{2} - h\right)^2 \right]}{a},$$

где:  $N_{tot}$  – общее количество молекул, где  $4\pi(d/2)^2$  – площадь одного из монослоев липосомы,  $d$  – диаметр липосом,  $h$  – толщина бислоя (около 5 нм),  $a$  – площадь «головки» липида  $0,71 \text{ нм}^2$ . Таким образом, для однослойных липосом состоящих из фосфатидилхолина вышеописанное уравнение имело вид:

$$N_{tot} = 17,69 \times \left[ \left(\frac{d}{2}\right)^2 + \left(\frac{d}{2} - 5\right)^2 \right],$$

Так, для липосомы диаметром 100 нм число молекул на липосому равнялось приблизительно 80 047. Концентрация липидов в растворе являлась известной величиной. Число липосом в растворе вычислялось, исходя из молярной массы липидов, входящих в состав липосомы по формуле:

$$N_{lipo} = \frac{(n_1 + n_2 + n_3) \times N_A}{N_{tot}},$$

где  $N_{lipo}$  – число липосом;  $n_1, n_2, n_3$  – количество липидов (моль);  $N_{tot}$  – число молекул в одной липосоме;  $N_A$  – число Авогадро  $6,02 \times 10^{23}$ .

Таким образом, в случае полученных нами липосом  $N_{tot} = 4,5 \times 10^{14}$  липосом в литре.

Азид натрия — токсичное химическое вещество, накапливаясь в митохондриях, вызывает разобщение окислительного фосфорилирования. Данное вещество использовалось нами в качестве модельной системы, позволяющей оценить стабильность липосом и выход лекарственного препарата из них.

Нами были проведены исследования по изучению токсических свойств полученных наночастиц по отношению к эритроцитам крови человека. Наночастицы добавляли к эритроцитам крови человека в соотношениях: липосомы / эритроциты = 1/1, 1/10, 1/100, 1/1000.

В ходе исследований было установлено, что при инкубации клеток с «пустыми» липосомами в соотношениях клетка/липосома = 1/1-1/1000 не наблюдается повышения содержания ЛДГ в надосадочной жидкости по сравнению с контролем. (рис.25)

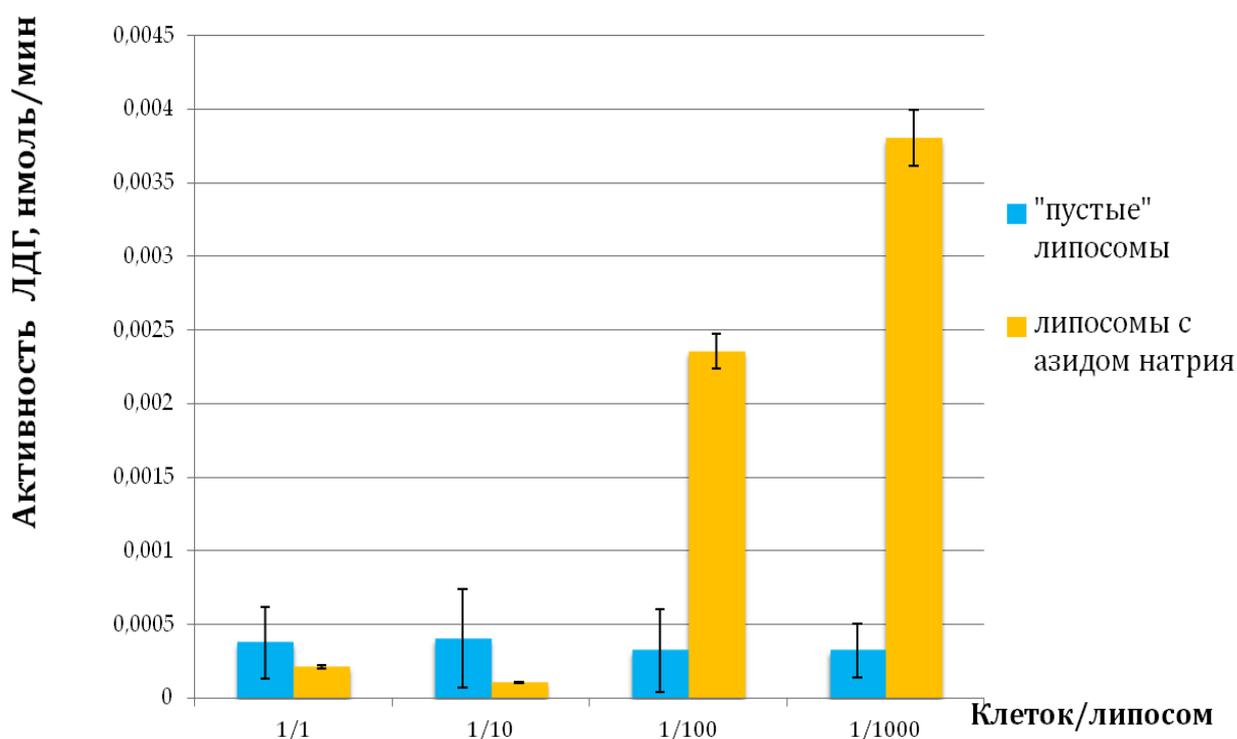


Рис.25. Выход ЛДГ из эритроцитов крови человека при их инкубации с липосомами

При инкубации эритроцитов с липосомами, содержащими азид натрия, повышение выхода ЛДГ наблюдалось в соотношении клетка/липосома = 1/1-1/100-1/1-1/1000.

Исследования на лимфоцитах крови человека проводились в тех же соотношениях клетки/липосома, что и в экспериментах с эритроцитами.

Жизнеспособность лимфоцитов определяли методом проточной цитофлуориметрии. Было показано, что липосомы не оказывают токсического влияния на лимфоциты крови человека. (Рис.26)

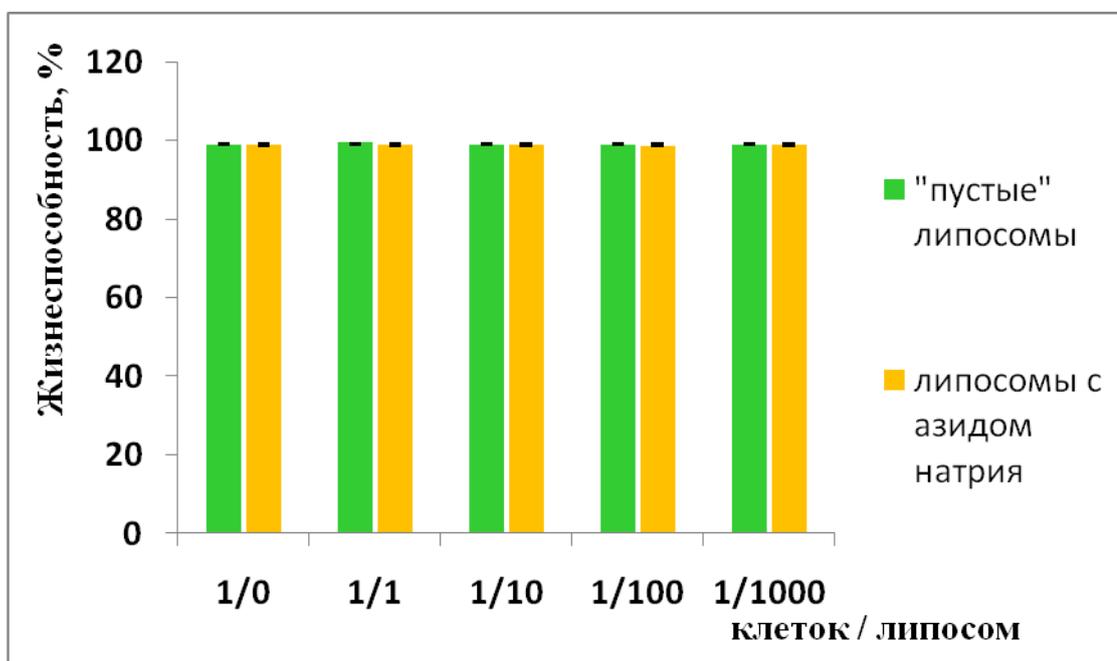


Рис.26. Определение жизнеспособности лимфоцитов крови человека методом проточной цитофлуориметрии при добавлении наночастиц

Было установлено, что количество жизнеспособных клеток во всех образцах составляет более 98%.

С помощью красителя трипанового синего также было показано, что во всём диапазоне исследуемых концентраций липосомы не оказывают токсического воздействия на лимфоциты крови человека. (рис.27)

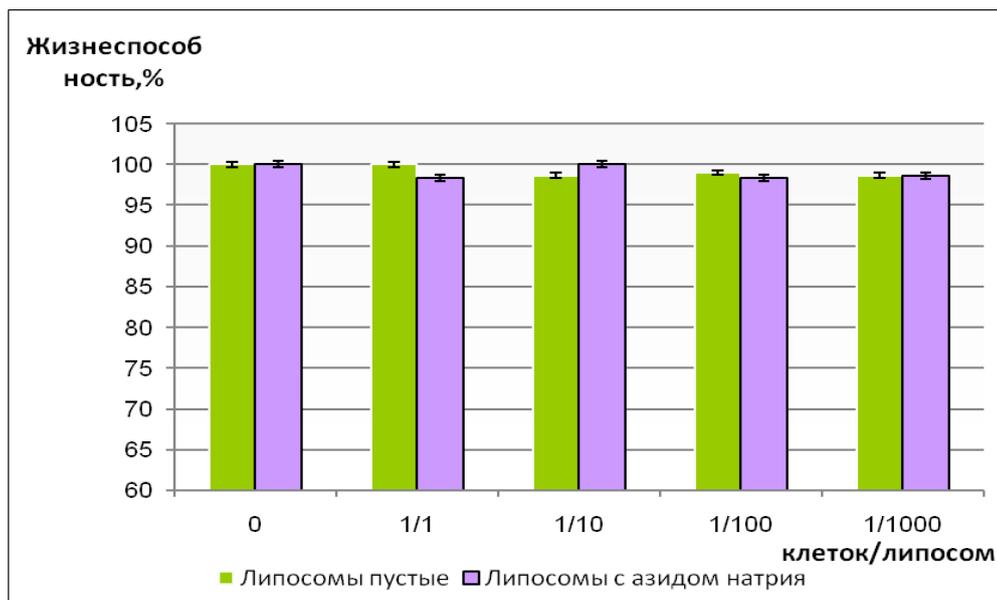


Рис. 27. Жизнеспособность лимфоцитов крови человека при инкубации их с иммуномагнитолипосомами

Важным представляется исследование цитотоксичности полученных наночастиц в отношении микроводорослей. Микроводоросли *Chlorella vulgaris* являются удобным объектом для токсикологических исследований, так как у этой водоросли достаточно короткий цикл развития, составляющий 22 часа.

Исследовали влияние «пустых» липосом и липосом, содержащих в своём составе азид натрия в концентрации 0.03%. Исследования индекса токсичности полученных липосом по отношению к водорослям показало, что при соотношении клетка/липосома от 1/ 1 до 1/ 100 не наблюдается статистически значимых отличий в индексе токсичности. (Таблица 8)

Таблица 8. Индекс токсичности влияния синтезированных липосом на микроводоросли *Chlorella vulgaris*

Клеток/липосом	1 / 1	1 / 10	1 / 100	1 / 1000
«Пустые» липосомы	-2.16±3.06	0.51±0.11	2.61±0.99	-21.03 ±7.11
Липосомы с азидом натрия	3.83±3.28	-3.81±1,04	0.78±3.25	-22.14±1.32

При увеличении числа липосом до соотношения клетка / липосома = 1 / 1000 наблюдается статистически значимое снижение значения индекса цитотоксичности.

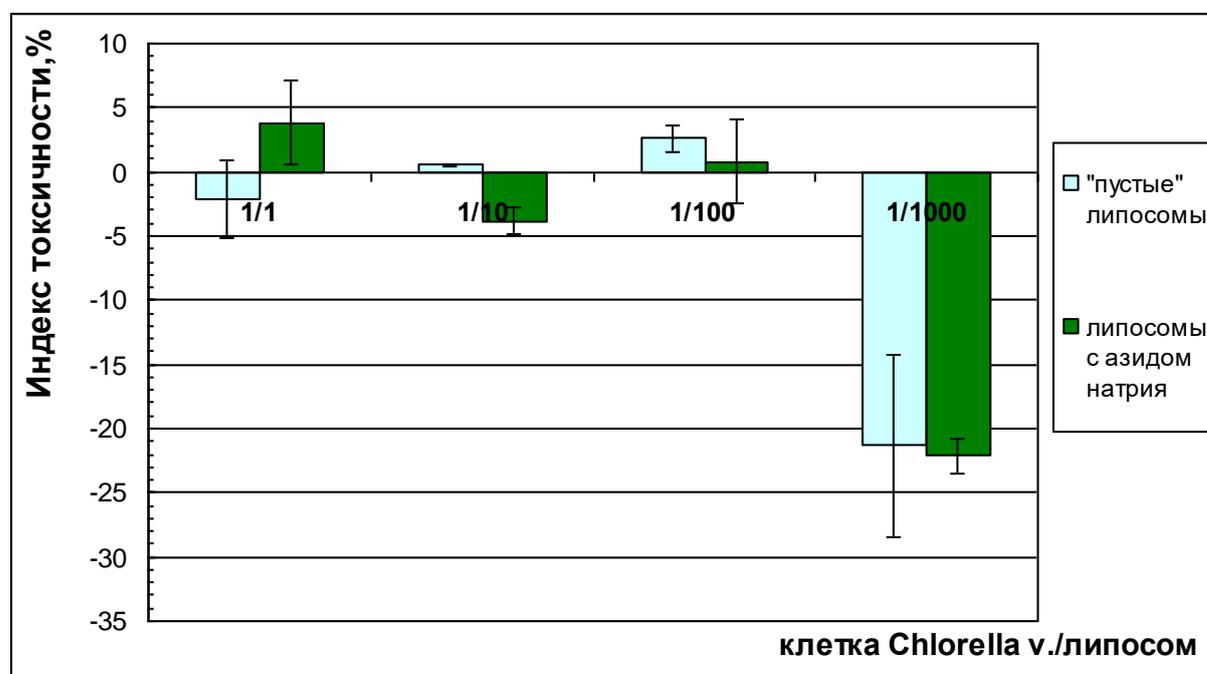


Рис. 28. Определение индекса токсичности синтезированных иммуномагнитоллипосом по отношению микроводорослям *Chlorella vulgaris*.

В процессе исследований контролировали концентрацию клеток микроводоросли. Было выявлено, что при инкубации хлореллы с липосомами в соотношении клетка / липосома = 1 / 1000 происходит увеличение роста клеток (рис. 29)

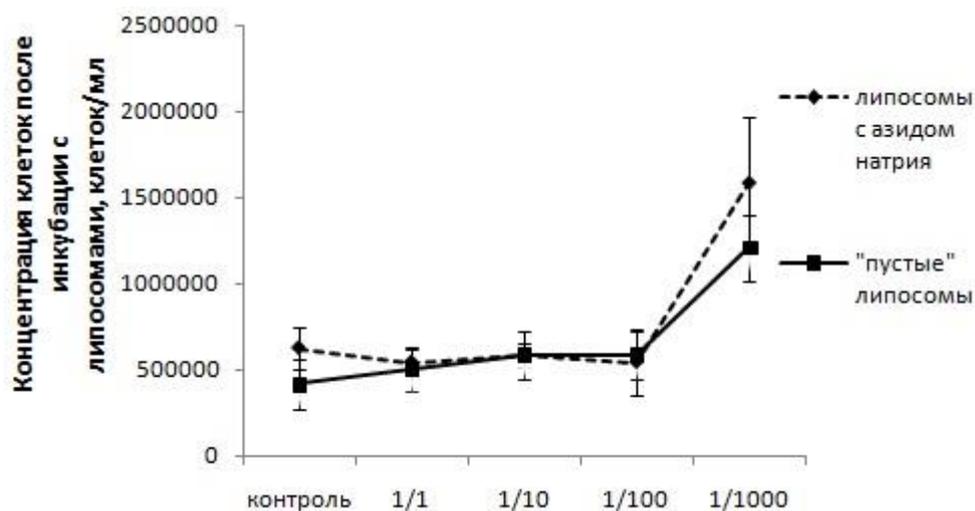


Рис. 29. Концентрация клеток *Chlorella vulgaris* после 22 ч инкубации с липосомами

Увеличение роста численности клеток микроводоросли хлорелла, по-видимому, связано с эффектами оксидов железа, входящих в состав полученных липосом. Железо необходимо для образования хлорофилла. При этом железо катализирует образование предшественников хлорофилла: 5-аминолевулиновой кислоты и протопорфиринов. При недостатке железа нет условий для образования таких важнейших компонентов хлоропластов, как цитохромы, ферредоксин и некоторые другие. Кроме того, целый ряд ферментов содержит железо в негемовой форме. В хлоропластах железо в негемовой форме входит в состав реакционных центров фотосистем I и II.

#### 5.8. Оценка взаимодействия получаемых магнитоуправляемых иммунолипосом со структурами НВЛ

Для того чтобы убедиться в эффективности взаимодействия липосом и НВЛ, мы анализировали изображения, полученные методом флуоресцентной

микроскопии. Для визуализации липосом использовали препарат «Амфотерицин В» (ОАО Синтез, Россия). Данный препарат представляет собой полиеновый макроциклический антибиотик с противогрибковой активностью. Структурная формула приведена на рисунке 29.

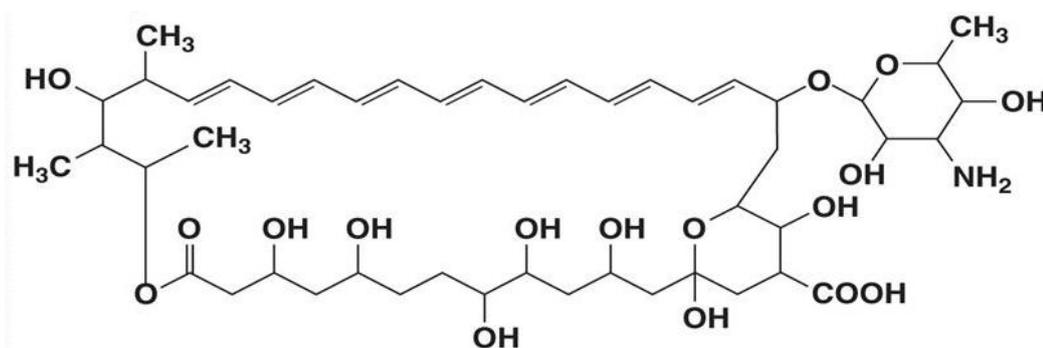


Рис. 30. Химическое строение амфотерицина В

Амфотерицин В избирательно взаимодействует со стеролами. Связываясь с холестерином, имеет максимум возбуждения 328 нм, максимум флуоресценции – 465 нм. На первом этапе работы были подготовлены и проанализированы препараты для флуоресцентной микроскопии, состоящие из липосом с добавлением амфотерицина В. Было показано, что липосомы с добавлением амфотерицина В флуоресцируют. Таким образом, было показано, что амфотерицин В возможно использовать для визуализации липосом, содержащих холестерин.

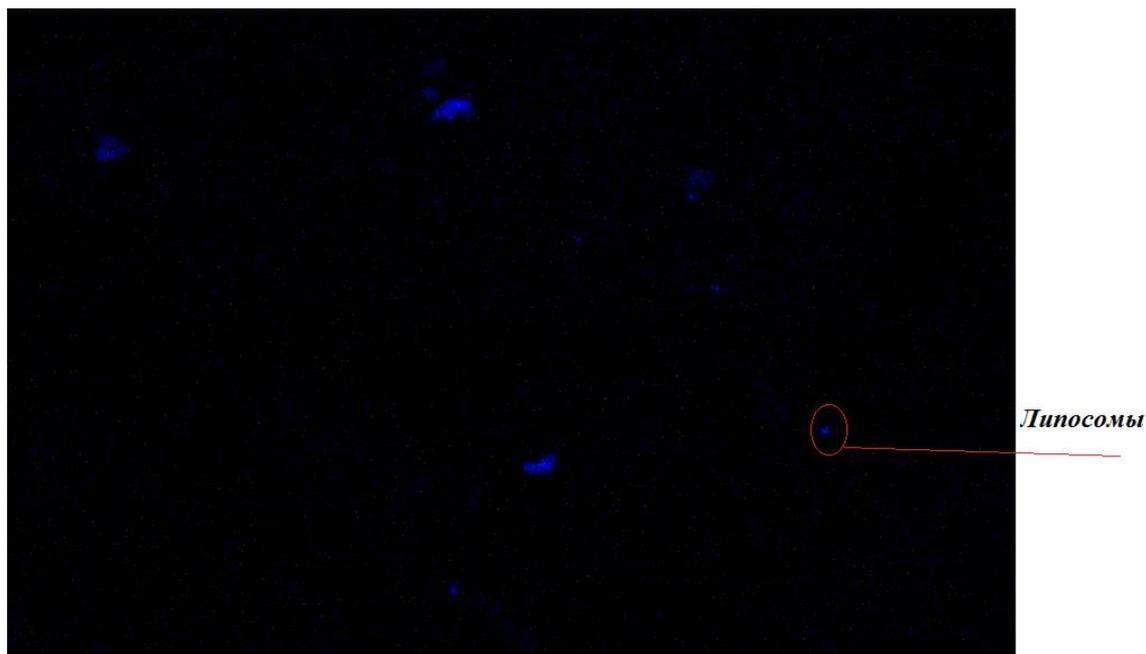


Рис. 31. Изображение липосом, связанных с амфотерицином В, полученное методом флуоресцентной микроскопии

На следующем этапе были проанализированы препараты липосом с амфотерицином В, добавленных к НВЛ и окрашенных красителем Sybr green (Рис. 30).

Для красителя Sybr green, который селективно связывается с нуклеиновыми кислотами, характерен максимум возбуждения 497 нм, максимум эмиссии – 521 нм.

Были проанализированы полученные изображения и произведён подсчёт липосом, находящихся в структурах НВЛ и вне их. Установлено, что  $83,4 \pm 9,4$  % липосом расположены в структуре НВЛ.

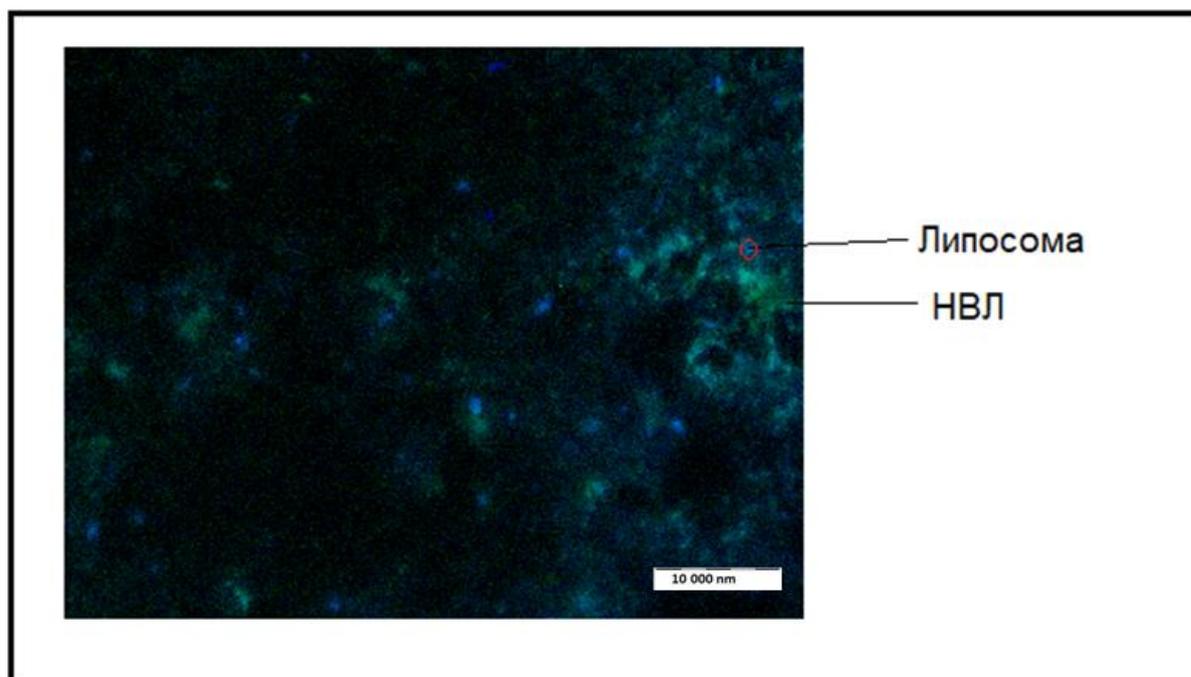


Рис. 32. Изображение липосом и НВЛ, полученное методом флуоресцентной микроскопии

Таким образом, нами было установлено, что  $83,4 \pm 9,4 \%$  липосом (ФХ / ХЛ / ДСФЭ-ПЭГ / АТ-гистон НЗ /  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -ЦТАБ) взаимодействуют с молекулами гистона НЗ в структуре НВЛ.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время в мире активно развиваются исследования, направленные на совершенствование уже существующих и разработку новых средств для таргетной (адресной) доставки лекарственных препаратов.

В ходе проведённых в диссертационной работе исследований нами были изучены и оптимизированы условия синтеза липосом, содержащих в своём составе магнитные наночастицы.

Нами было выдвинуто предположение о возможности использования в качестве мишени для доставки лекарственных препаратов нейтрофильных внеклеточных ловушек, которые являются важным звеном в реализации иммунного ответа и в развитии онкопроцессов в организме. На первом этапе были изучены условия образования НВЛ и их структура. Показано, что при стимуляции нейтрофилов крови человека частицами латекса (1,5 мкм) образование внеклеточных сетей происходит при 37°C в течение 30 минут. Данный процесс реализуется с выделением не только ядерной, но и митохондриальной ДНК. Имеющиеся в структуре НВЛ молекулы гистона H3 были рассмотрены как потенциальные мишени для доставки липосомальных наночастиц.

Липосомы с включёнными в их состав магнитными наночастицами представляют особый интерес, так как перемещением таких систем и высвобождением включённого лекарственного препарата можно управлять с помощью действия внешнего магнитного поля. Поэтому на следующем этапе работы нами были разработаны условия синтеза и изучены характеристики магнитных наночастиц на основе оксидов металлов переменной валентности с целью их дальнейшего включения в состав липосом. При создании наносистемы для доставки лекарственных препаратов были подобраны

условия синтеза, позволяющие получать частицы с необходимыми размерами. Выявлено, что при синтезе магнетита оптимальными являются исходные концентрации солей ( $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{FeSO}_4$ ) - 30мМ и диапазон значений рН: 6,5-8,0 для натрий фосфатного и 8.0-8.5 для трис-глицинового буферов; для марганцевого феррита ( $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{FeMnO}_4$ ) - 45мМ и трис-глициновый буфер со значениями рН 8,0-8,5. Синтезированные частицы магнетита были включены в состав липосом. Установлено, что при покрытии синтезированных наночастиц магнетита цетилтриметиламмония бромидом в липидный бислой липосом встраивалось на 31% больше магнитных наночастиц по сравнению с нестабилизированными ЦТАБ наночастицами. Это является важным моментом для освобождения пространства во внутренней полости липосом для лекарственных препаратов.

Следующим этапом работы стала разработка условий синтеза липосомальных наночастиц. Нами были подобраны условия ультразвуковой обработки, позволяющие стандартизировать размер липосом. Показано, что при обработке липосом ультразвуком частотой 20 кГц в течение 15 минут (10 секундный импульс с перерывом 3 сек) размер липосом из фосфатидилхолина составляет  $106,2 \pm 4,8$  нм. По результатам данных исследований в 2017 году получен патент РФ «Способ получения липосом».

На заключительном этапе были получены липосомы состава фосфатидилхолин (0,5%) + холестерин (0,5%) + дистероилфосфоэтаноламин-полиэтиленгликоль (0,1%) + антитела к гистону H3. Синтезированные липосомы были функционализированы антителами к гистону H3, что позволяет данным наночастицам специфически взаимодействовать с НВЛ. Установлено, что с внеклеточными сетями взаимодействует  $83,4 \pm 9,4$  % липосом.

Обязательным этапом при синтезе наночастиц является изучение их токсических свойств. Исследования цитотоксичности показали, что синтезированные иммуномагнитолипосомы в концентрациях 1-1000 липосом

на клетку не оказывают токсического воздействия на клетки крови человека (эритроциты и лимфоциты), а также на клетки микроводоросли *Chlorella vulgaris*. При включении в липосомы азида натрия (0,03%) происходит нарушение структурной целостности эритроцитов при концентрации 100-1000 липосом на 1 клетку. При концентрации 1000 наночастиц на клетку выявляется активация роста количества клеток хлореллы.

Таким образом, проведённая работа позволила получить новые сведения о зависимости условий синтеза магнитных наночастиц и липосом на их характеристики. Получены новые данные о токсических эффектах синтезированных наночастиц в отношении различных биологических объектов (клетки крови человека, растительные клетки). Показана возможность использования липосом для адресной доставки лекарственных препаратов к структурам нейтрофильных внеклеточных ловушек.

Полученные данные имеют и практическое значение при получении иммуномагнитолипосом с требуемыми характеристиками.

## ВЫВОДЫ

1. При инкубации нейтрофилов крови человека с частицами латекса для фагоцитоза ( $d=1,5$  мкм) в течение 30 минут при температуре  $37^{\circ}\text{C}$  происходит образование внеклеточных ловушек, содержащих в своей структуре мтДНК и гистон H3.
2. Ультрафиолетовый свет в диапазоне длин волн 240-390 нм в дозах 151-906 Дж/м<sup>2</sup> блокирует образование нейтрофильных внеклеточных ловушек.
3. Обработка липосом ультразвуком в течение 15 минут (20 кГц, 10 секундный импульс с перерывом 3 сек) позволила нам синтезировать наночастицы стандартизированного размера (в диапазоне 130-180 нм в зависимости от их липидного состава).
4. Установлено, что при синтезе магнетита оптимальными являются исходные концентрации солей ( $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{FeSO}_4$ ) - 30мМ и диапазон значений pH: 6,5-8,0 для натрий фосфатного и 8,0-8,5 для трис-глицинового буферов; для марганцевого феррита ( $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{MnCl}_2$ ) - 45мМ и трис-глициновый буфер со значениями pH 8,0-8,5.
5. Обнаружено, что покрытие наночастиц магнетита молекулами цетилтриметиламмония бромидом способствует увеличению степени включения магнетита в липидный бислой липосом на 31,6 %.
6. Получены липосомы (ФХ / ХЛ / ДСФЭ-ПЭГ / АТ-гистон H3 /  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -ЦТАБ), способные к адсорбции на нейтрофильных внеклеточных ловушках
7. Показано, что липосомы (ФХ / ХЛ / ДСФЭ-ПЭГ / АТ-гистон H3 /  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -ЦТАБ) не оказывают токсического воздействия на клетки крови человека (эритроциты и лимфоциты) и микроводоросли *Chlorella vulgaris* (при концентрациях 1-1000 липосом на 1 клетку. При концентрации 1000 наночастиц на клетку выявляется активация роста количества клеток хлореллы.

8. Оценены разработанные нами магнитолипосомы и нейтрофильные внеклеточные ловушки как эффективные средства доставки лекарственных препаратов в различные мишени организма человека.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Азаренков Н.А. Наноматериалы, нанопокрyтия, нанотехнологии: Учебное пособие / Н.А. Азаренков, В.М. Береснев, А.Д. Погребняк, Л.В. Маликов, П.В. Турбин – Х.: ХНУ имени В. Н. Каразина, 2009. – 209 с.
2. Азаренков Н.А. Основы нанотехнологий и наноматериалов / Н.А. Азаренков, А.А. Веревкин, Г.П. Ковтун // Харьков, Харьковский национальный университет имени В. Н. Каразина, 2009. – 69 с.
3. Андрюков Б.Г. Защитные стратегии нейтрофильных гранулоцитов от патогенных бактерий / Б.Г. Андрюков, Л.М. Сомова, Е.И. Дробот, Е.В. Матосова // Здоровье. Медицинская Экология. Наука –Т.1–2017.
4. Артюхов В.Г. Практикум по биофизике / В.Г. Артюхов [и др.] — Воронеж: Изд-во ВГУ, 2016. — 314 с.
5. Артюхов В.Г., Наквасина М.А. Биологические мембраны: структурная организация, функции, модификация физико-химическими агентами. 2000.
6. Балоян Б.М. Наноматериалы. Классификация, особенности свойств, применение и технологии получения. / Б.М. Балоян, А.Г. Колмаков, М.И. Алымов, А.М. Кротов // Учебное пособие. - М.: Международный университет природы, общества и человека «Дубна», Филиал «Угреша». – 2007. – 125 с.
7. Барышников А. Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов. / А. Ю. Барышников // Вестник РАМН. – №3. – с.23–31. – 2012.
8. Бахов Н.И. Механизмы защиты организма от вирусных инфекций: нейтрофильные лейкоциты / Н.И.Бахов, Ю.Ф. Майчук, А.В. Корнев // Успехи современной биологии. – 2000. – Т.120, №1. – с.23-25
9. Биологическое действие наночастиц металлов и их оксидов на бактериальные клетки / И.А. Мамонова [и др.] // Российские нанотехнологии. — 2015. — Т. 10, № 1—2. — С. 106—110.

10. Галактионов В.Г. Иммунология / В.Г.Галактионов. – М.: Издательский центр «Академия», 2004. – 528с.
11. Герман С.В. *In vitro* и *in vivo* визуализация гидрозолей магнетита, магнитолипосом и магнитных микрокапсул методом магнитно-резонансной томографии. Дисс. канд. наук. Саратов, 2015.
12. Гуляев Ю.В. ДИСТАНЦИОННАЯ АКТИВАЦИЯ С ПОМОЩЬЮ ИМПУЛЬСНОГО ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОЛЯ НАНОКОМПОЗИТНЫХ МИКРОКАПСУЛ НА ОСНОВЕ КОМПЛЕКСОВ ЛИПИДОВ, ПОЛИМЕРОВ И ПРОВОДЯЩИХ НАНОЧАСТИЦ / Ю.В. Гуляев, В.А. Черепенин, В.А. Вдовин, И.В. Таранов, В.В.Файкин, В.И.Тюкавин, В.П.Ким, Ю.А.Кокшаров, П.А.Кормакова, К.В.Потапенков, А.А.Рахнянская, А.В.Сыбачин, Е.Г.Ярославова, А.А.Ярославов, Г.Б. Хомутов // Журнал радиоэлектроники. – 2014. – № 11. – С. 10.
13. Долгушин И.И. Нейтрофильные ловушки и методы оценки функционального статуса нейтрофилов / И.И Долгушин, Ю.С Андреева, А.Ю.Савочкина // М.: Издательство РАМН– 2009. – 208с.
14. Егунова О.Ю. Синтез, модификация и применение наночастиц магнетита для концентрирования и флуориметрического определения некоторых фторхинолонов Дисс. канд. наук. Саратов, 2017
15. Зеленин А. В. Взаимодействие аминопроизводных акридина с клеткой. / А. В. Зеленин М.: Наука – 1971. – 125с.
16. Искусных А.Ю. Исследование механизмов окислительно-восстановительного гомеостаза на примере системы «активированные нейтрофилы-пероксидное окисление липидов-антиоксиданты»: дисс. канд. биол. наук / А.Ю. Искусных. — Воронеж, 2004. — 158 с.
17. Колтаков И. А. Проточная цитофлуориметрия в современных биофизических исследованиях : учебно-методическое пособие / И.А. Колтаков, В.Г. Артюхов, И.А. Лавриненко ; Воронеж. гос. ун-т .— Воронеж : Издательский дом ВГУ, 2018 .— 113, [1] с. : ил. — Библиогр.: с. 102-104 .— ISBN 978-5-9273-2564-1.

18. Коротина О.Л. Нейтрофильные внеклеточные ловушки: механизмы образования, функции / О.Л. Коротина, И.И. Генералов // Иммунопатология, аллергология, инфектология. №4 — 2012. — с.23-32.
19. Кравцов А. Л. Формирование внеклеточных ловушек - эффективный механизм защиты организма от патогена // Проблемы особо опасных инфекций. — 2012. — №2.
20. Краснопольский Ю.М., Балабаньян В.Ю., Шоболов Д.Л., Швец В.И. Перспективы применения в клинической практике наноразмерных форм лекарственных препаратов. Российский Химический журнал (Журнал Российского химического общества им. Д.И. Менделеева) — 2012 — LVI(3-4): 11–32.
21. Краснопольский Ю.М., Швец В.И. Технологические принципы получения липосомальных лекарственных препаратов и их применение в клинике. Нанотехнология и охрана здоровья — 2013 — V(2):125–135.
22. Лысцов В.Н. Проблемы безопасности нанотехнологий / В.Н. Лысцов, Н.В.Мурзин // М.: МИФИ / – 2007.
23. Малыгин А.А. Физика поверхности и нанотехнология: взаимосвязь и перспективы. // Соросовский образовательный журнал. – 2004. – т. 8, № 1. – с. 32-37.
24. Машков Ю.К. Материалы и методы нанотехнологии / Ю.К. Машков, О.В. Малий // Омск : Изд-во ОмГТУ, 2014. – 136с
25. Мельникова Е. В. Разработка липосомальных форм лекарственных препаратов: методы оценки и показатели / Мельникова Е. В., Горячев Д. В., Чапленко А. А., Водякова М. А., Сайфутдинова А. Р., Меркулов В. А. // Вестник РГМУ. – 2018. – №6. – С. 35–42.
26. Методика определения индекса токсичности нанопорошков, изделий из наноматериалов, нанопокровов, отходов и осадков сточных вод, содержащих наночастицы, по изменению оптической плотности культуры водоросли хлорелла (*Chlorella vulgaris* Beijer) (ФР.1.39.2010.09103), 2010 г.

27. Наквасина М.А. Бионанотехнологии: достижения, проблемы, перспективы развития : учебное пособие / М.А. Наквасина, В.Г. Артюхов // Воронеж. гос. ун-т .— Воронеж : Издательский дом ВГУ, 2015 .— Библиогр.: с. 146-151
28. Нестерова И.В. Физиологическая роль нейтрофильных гранулоцитов в поддержании иммунного гомеостаза / И.В. Нестерова // *Rus. J. Immunol.* 2004. – Vol. 9, Suppl. 1. – P. 17.
29. Никифоров В.Н. Медицинские применения магнитных наночастиц. / В.Н. Никифоров // *Известия академии Инженерных Наук им. А.М. Прохорова* – 2013 – № 1 – С.23–34.
30. Основы бионанотехнологии : учебно-методическое пособие / Воронеж. гос. ун-т ; сост.: М.А. Наквасина, В.Г. Артюхов .— Воронеж : Издательский дом ВГУ, 2016 .— 72 с. : ил., табл. — Библиогр.: с. 67-68.
31. Постнов В.Н. Наноразмерные носители для доставки лекарственных препаратов / В.Н. Постнов, Е.Б. Наумышева, Д.В. Королев, М.М. Галагудза / *Биотехносфера*. – 2013. – №6 (30).
32. Райков А. О. Разработка технологии и состава иммунолипосомальной формы митоксантрона с гуманизированными моноклональными антителами к HER-2 антигену. Диссерт., 2016
33. Ройт А. Основы иммунологии / А. Ройт. — М. : Мир, 1991. — 328 с.
34. Сайфитдинова А. Ф. Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов : учебно-методическое пособие / А. Ф. Сайфитдинова. - [2-е изд., испр. и доп.]. - Санкт-Петербург : Свое изд-во, 2011. - 110 с.
35. Соколова Д. В. Иммунолипосомальные конструкции доксорубицина и модели для их доклинического исследования Дис. канд. биол. наук. М., 2011; 122 с.

36. Толчева Е. В. Создание конструкции иммунолипосомы и изучение иммунолипосомальной формы противоопухолевого препарата доксорубицин: Дис. канд. биол. наук. М., 2007.
37. Чумаков Д.С. Исследование цитотоксичности ультрамалых фосфониевых золотых наночастиц с использованием культур растительных и животных клеток / Д.С. Чумаков, Т.Е. Пылаев, Е.С. Авдеева, Л.А. Дыкман, Н.Г. Хлебцов, В.А. Богатырев // Российские нанотехнологии. – 2019. – Т.14. №3-4. – С.81-92.
38. Шахмаев А.Е. Исследование методов включения лекарственных субстанций в липосомальные наночастицы. / А.Е. Шахмаев, А.Л.Кацай, В.В.Прохоров, А.В.Стадниченко, В.Ю.Балабаньян, Ю.М.Краснопольский, В.И. Швец // Ремедиум. Журнал о рынке лекарств и медицинской техники. 2015;(12):56-59
39. Шигина Ю.В. Иммунология: учеб. Пособие. / Ю.В. Шигина. — М. : РИОР, 2007. — 183 с.
40. Хаитов Р.М. Иммунология / Р.М.Хаитов, Г.А.Игнатьева, И.Г.Сидорович.-М.:Медицина – 2000. – 432с.
41. Aguilar-Arteaga K., Rodriguez J.A., Barrado E. Magnetic solids in analytical chemistry: A review // Anal. Chim. Acta. 2010. V. 674. № 2. P. 157–165.
42. Akira Ito. Medical Application of Functionalized Magnetic Nanoparticles / Akira Ito, MasashigeShinkai, Hiroyuki Honda, Takeshi Kobayashi. // Journal Of Bioscience AndBioengineering. – 2005. –V.100. P. 1-11.
43. Alekseeva A.A. LIPOSOMAL FORMULATION OF A METHOTREXATE LIPOPHILIC PRODRUG: ASSESSMENT IN TUMOR CELLS AND MOUSE T-CELL LEUKEMIC LYMPHOMA /Alekseeva A.A., Moiseeva E.V., Onishchenko N.R., Boldyrev I.A., Molotkovsky J.G., Vodovozova E.L., Singin A.S., Budko A.P., Shprakh Z.S. // International Journal of Nanomedicine. – 2017. – Т. 12. – С. 3735-3749.

44. Amiebo M. Magneticnanoparticles for drug delivery / M. Amiebo, R. Femandez-Pacbeco, M.R.Arbarra, J. Santamaria // *Nanotoday*. – 2007. – V.2. P.22-32.
45. Asami K. *Journal of ultrastructure and molecular structure research*. – 1986. – 95:38-46.
46. Aoki T. Role of TIMP-1 and TIMP-2 in the progression of cerebral aneurysms / T. Aoki, H. Kataoka, T. Moriwaki // *Stroke*. 2007. – 38(8): 2337-2345.
47. Asmatulu R. Synthesis, characterization andtargeting of biodegradable magnetic nanocomposite particles by external magneticfields / R. Asmatulu, M.A. Zalich, R.O. Claus // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2005. – V.292. P.108-119
48. Auffan M. Chemical stability of metallic nanoparticles: A parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro / M. Auffan, J. Rose, M.R. Wiesner, J. Bottero // *Environmental Pollution*, 157. – 2009. – pp.1127-1133.
49. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. / *Nat Rev Cancer*, – 2009. – 9(5). pp. 361-371.
50. Beiter K. An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. / Beiter K., Wartha F., Albiger B. et al // *Curr. Biol.* – 2006. – №16. – P.401—407.
51. Bergers G. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. / G. Bergers, R. Brekken, G. McMahon // *Nat Cell Biol*, — 2000. — 2(10): 737-744.
52. Berry C.C. Functionalisation of magnetic nanoparticles forapplications in biomedicine / C.C.Berry, A.S.G. Curtis // *J Phys D: Appl Phys*. — 2003. — V.36. P.198-206.

53. Berger-Achituv S. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting / Berger-Achituv S, Brinkmann V, Abed UA // *Front Immunol.* –2013. –4: 48.
54. Bertrand, N., Wu, J., Xu, X., Kamaly, N., & Farokhzad, O. C. (2014). Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. *Advanced drug delivery reviews*, 66, 2-25.
55. Bixner, Oliver & Reimhult, Erik. (2015). Controlled magnetosomes: Embedding of magnetic nanoparticles into membranes of monodisperse lipid vesicles. *Journal of Colloid and Interface Science.* 466. 10.1016/j.jcis.2015.11.071.
56. Boyden S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. // *J. Exp. Med.* – 1962. – Vol.115. – P.453-465.
57. Brinkmann V. Neutrophil extracellular traps kill bacteria./ V.Brinkmann, U.Rechard, C. Goosmann et al. // *Science.* – 2004. - № 303. - P. 1532—1535.
58. Brinkmann V. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? / Brinkmann V, Zychlinsky A. // *J Cell Biol.* 2012 Sep 3;198(5):773-83. doi: 10.1083/jcb.201203170. PMID: 22945932; PMCID: PMC3432757.
59. Blanco M. D. Targeted nanoparticles for cancer therapy. / Blanco, M. D., Teijon, C., Teijón, J. M., & Olmo, R. M. // INTECH Open Access Publisher. — 2012.
60. Buchanan J. T. DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. / J. T. Buchanan, A. J. Simpson, Aziz et al. // *R. K Curr. Biol.* – 2006. — №16.– P.396—400.
61. Buzea C. Nanomaterials and nanoparticles. Sources and toxicity / Buzea C., Blandino I.P., Robbie K. // *Biointerphases.* — 2007. — V.2, No4.

62. Cabel L. Circulating tumor cells: clinical validity and utility. / Cabel L, Proudhon C, Gortais H // *Int J Clin Oncol.* – 2017. – 22(3): 421-430.
63. Coates T.D. Relationship of F-actin distribution to development of polar shape in human polymorphonuclear neutrophils.// *J.Cell Biol.* — 1992. — Vol.117. — №4. —P.765—774.
64. Chekanova A. E. New environmental non – toxic agents for preparation of core-shell magnetic nanoparticles / A. E. Chekanova, T. Sorkina, V. N. Nikiforov, G.A.Davidova, I. I. Selezneva, E. A. Goodilin, A.V.Grigorieva, L. A. Trusov, V. V. Korolev, I. V. Permenova, Yu. D. Tretyakov. // *Mendeleev Communication*, – 2009. – Vol. 19 – P. 1–4.
65. Clark S.R. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. / Clark S.R., Ma A.C., Tavener S.A. // *Nat Med.* – 2007. – 13(4):463 469.
66. Colotta F. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. / Colotta F, Allavena P, Sica A. // *Carcinogenesis.* – 2009. – 30(7): 1073-1081.
67. Cools-Lartigue J. Neutrophil extracellular traps in cancer progression. / Cools-Lartigue J, Spicer J, Najmeh S. // *Cell Mol Life Sci.* – 2014. – 71(21): 4179-4194.
68. Cools-Lartigue J. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. / Cools-Lartigue J, Spicer J, McDonald B. // *J Clin Invest.* – 2013. – 123(8): 3446-3458.
69. Coxon A. FcγRIII mediates neutrophil recruitment to immune complexes. A mechanism for neutrophil accumulation immunemediated inflammation / A. Coxon, X. Cullere, S. Knight // *Immunity* – 2001. c Vol.14 (6). – P. 693-704
70. De Cuyper M. Magnetoliposomes. / De Cuyper M, Joniau M. // *Eur Biophys J* 1988;15:311–9.

71. Demers M. Neutrophil extracellular traps: A new link to cancer-associated thrombosis and potential implications for tumor progression. / Demers M, Wagner DD // *Oncoimmunology*. – 2013. – 2(2): e22946.
72. Demers M. Priming of neutrophils toward NETosis promotes tumor growth. / Demers M, Wong SL, Martinod K. // *Oncoimmunology*. — 2016. — 5(5).
73. Erpenbeck L. Neutrophil extracellular traps: protagonists of cancer progression. / Erpenbeck L, Schin MP. // *Oncogene*. — 2017, 36(18): 2483-2490.
74. Fuches T. A. Novel cells death program leads to neutrophil extracellular traps./ T. A.Fuches, U.Abed, C. Goosmann et al. // *J. Cell Biol.* — 2007—№ 176 (2). —P.231—241.
75. Garley M. NETs in cancer. / Garley M, Jabońska E, Dbrowska D. // *Tumour Biol.* — 2016. — 37(11): 14355-14361.
76. Goya G.F. Magnetic nanoparticles for cancer therapy. / Goya G.F., Grazu V., Ibarra M.R. // *Curr.Nanosci.* —2008. —V.4. P.1-16.
77. Guo Y. Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. / Guo Y, Xu F, Lu T. // *Cancer Treat Rev.* — 2012. — 38(7): 904-910.
78. SMALL, LONG BLOOD HALF-LIFE IODINE NANOPARTICLE FOR VASCULAR AND TUMOR IMAGING *Hainfeld J.F., Stanishevskiy Y., Ridwan S.M., Smilowitz H.M., Smilowitz N.R., Davis J.* *Scientific Reports*. 2018. T. 8. № 1. C. 13803.
79. Hakkim A., Furnrohr B.G., Amann K. et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* — 2010. — 107(21):9813-8.
80. Harris H. Chemotaxis of granulocytes. // *J. Pathol. Bacteriol.* — 1983— Vol.66—P.135-140.

81. Ho A. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles / Ho A., Shinkai M., Honda H., Kobayashi T. // *J.Biosci.Bioeng.* — 2005. — V.100. P.1-11.
82. Huang C. H., Mason J. T. Geometric packing constraints in egg phosphatidylcholine vesicles // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* — 1978. — T. 75. — №. 1. — C. 308–310.
83. Huang H. Damage-associated molecular pattern-activated neutrophil extracellular trap exacerbates sterile inflammatory liver injury. / Huang H, Tohme S, Al-Khafaji AB. // *Hepatology.* — 2015. — 62(2): 600-614.
84. Huh SJ. Transiently entrapped circulating tumor cells interact with neutrophils to facilitate lung metastasis development. / Huh SJ, Liang S, Sharma A. // *Cancer Res.* — 2010. — 70(14): 6071-6082.
85. Gschneldner K. A. Jr. Physical properties and interrelationships of metallic and semimetallic elements // *Solid State Phys.* — 1964. — V. 16. -P. 275-426.
86. Jin S. E., Jin H. E., & Hong S. S. Targeted delivery system of nanobiomaterials in anticancer therapy: from cells to clinics. *BioMed research international*, 2014.
87. Johan S. A block copolymer-stabilized co-precipitation approach to magnetic iron oxide nanoparticles for potential use as MRI contrast agents / Johan S. Basuki, Alexandre Jacquemin, Lars Esser, Yang Li, Cyrille Boyer, Thomas P. Davis. // *Polym.Chem.* — 2014. — V.5. P.2611–2620.
88. Kaufhold S. Central role of Snail1 in the regulation of EMT and resistance in cancer: a target for therapeutic intervention / Kaufhold S, Bonavida B. // *J Exp Clin Cancer Res.* — 2014. — 33: 62.
89. Karlsson A. Assembly and activation of the neutrophil NADPH oxidase in granule membranes. / Karlsson A, Dahlgren C. // *Antioxid Redox Signal.* — 2002. — 4(1): 49-60.

90. Kawada K. Chemokine receptor CXCR3 promotes colon cancer metastasis to lymph nodes. / Kawada K, Hosogi H, Sonoshita M. // *Oncogene*. – 2007. – 26(32): 4679-4688.
91. Kessenbrock K., M. Krumbholz, U. Schönemärck, W. Back, W. L. Gross, Z. Werb, H. J. Gröne, V. Brinkmann, and D. E. Jenne. 2009. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat. Med.* 15: 623–625.
92. King C.A. Cell-substrate interactions during amoeboid locomotion of neutrophil leukocytes. // *Exp. Cell Res.* – 1980 – Vol.126 – 453-458.
93. Kolaczowska E. Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature. / Kolaczowska E, Jenne CN, Surewaard BG. // *Nat Commun.* – 2015. – 6: 6673.
94. Laurent S. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterisations, and biological applications / Laurent S., Forge D., Port M., Roch A., Robic C., Vanderhoff E.L., Muller R.N. // *Chem.Rev.* – 2008. – V.108. P.2064-2110.
95. Lerman I. Neutrophil elastase in the tumor microenvironment. / Lerman I, Hammes SR. // *Steroids*. – 2018. – 133: 96-101.
96. Li CH. Mechanism of tumor microangiogenesis and tumor invasion and metastasis. / Li CH, Li KQ. // *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*. – 2000. – 22(3) P. 181
97. Li P. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps / Li P, Li M, Lindberg MR. // *J Exp Med*. – 2010. – 207(9). P. 1853-1862.
98. Li H. A systematic review of matrix metalloproteinase 9 as a biomarker of survival in patients with osteosarcoma / Li H, Zhang K, Liu LH. // *Tumour Biol*. – 2014. – 35(6): P. 5487-5491.

99. Liao J. Recent advances in formation, properties, and applications of polymersomes / Liao J, Wang C, Wang Y, Luo F, Qian Z. // *Curr Pharm Des.* – 2012. –18(23). P. 3432–3441.
100. Lin A. M., C. J. Rubin, R. Khandpur, J. Y. Wang, M. Riblett, S. Yalavarthi, E. C. Villanueva, P. Shah, M. J. Kaplan, and A. T. Bruce. Mast cells and neutrophils release IL-17 through extracellular trap formation in psoriasis. *J. Immunol.* – 2011. – 187. P. 490–500.
101. Lowry O. H. Protein measurement with the folin phenol reagent / O. H. Lowry, N. J. Rosbrough, A. L. Farr et al. // *J. Biol. Chem.* – 1951.Vol. 193. – P. 265-270
102. Lu A.H. Magnetic nanoparticles: synthesis, protection, functionalization, and application / A.H. Lu., E.L. Salabas, F. Schuth /*Angew. Chem. Int. Ed.*– 2007.– Vol. 46.– P. 1222—1244.
103. Manzenreiter R. Ultrastructural characterization of cystic fibrosis sputum using atomic force and scanning electron microscopy / F. Kienberger, V. Marcos, K. Schilcher, W.D. Krautgartner, A. Obermayer, M. Huml, W. Stoiber, A. Hector, M. Griese et al. // *J. Cyst. Fibros.* – 2012. – 11:84–92.
104. Martina M.S. Generation of Superparamagnetic liposomes revealed as highly efficient MRI contrast agents for in vivo imaging / Martina M.S., Fortin J.P., Mcnager C., Clement O., Barratt G., Grabielle-Madelmont C., Gazcau F., Cabuil V., Lesieur S. // *J.Am.Ctiem.Soc.* – 2005. – V.127. P.10676-10685.
105. McDonald B. Systemic inflammation increases cancer cell adhesion to hepatic sinusoids by neutrophil mediated mechanisms. / McDonald B, Spicer J, Giannais B. // *Int J Cancer.* – 2009. – 125(6): 1298-1305.
106. Mitroulis I., K. Kambas, A. Chrysanthopoulou, P. Skendros, E. Apostolidou, I. Kourtzelis, G. I. Drosos, D. T. Boumpas, and K. Ritis. 2011. Neutrophil extracellular trap formation is associated with IL-1b and autophagy-related signaling in gout. *PLoS ONE* 6: e29318.

107. Mizuno R. The role of tumor-associated neutrophils in colorectal cancer / Mizuno R, Kawada K, Itatani Y. // *Int J Mol Sci.* – 2019. – 20(3).
108. Moriai S. Production of interferon- $\gamma$ -inducible protein-10 and its role as an autocrine invasion factor in nasal natural killer/T-cell lymphoma cells / Moriai S, Takahara M, Ogino T. // *Clin Cancer Res.* – 2009 – 15(22): 6771-6779.
109. Na H. B. Inorganic Nanoparticles for MRI Contrast Agents / Na H. B., Song I. C., Hyeon T. // *Adv. Mater.* – 2009. – V.21. P.2133–2148.
110. Najmeh S. Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells via  $\beta$ 1-integrin mediated interactions/ S. Najmeh, J. CoolsLartigue, R.F. Rayes, S. Gowing, P. Vourtzoumis, F. Bourdeau , B. Giannias, J. Berube, S. Rousseau, L.E. Ferri, J.D. Spicer // *Int. J. Cancer.* – 140. – 2017. – pp. 2321-2330
111. Newman S.L. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte-derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages / Newman S.L., Henson J.E., Henson P.M. // *J. Exp. Med.* – 1982. – Vol. 156. – P.430-442.
112. Oklu R. Neutrophil extracellular traps are increased in cancer patients but does not associate with venous thrombosis / Oklu R, Sheth RA, Wong KHK. // *Cardiovasc Diagn Ther.* – 2017. – 7: S140-S149.
113. Omann G.M. Signal transduction and cytoskeletal activation in the neutrophil // *Physiol. Rev* – 1987 – Vol.67 – N1 – 285-319.
114. Papayannopoulos V. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps / Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A. // *J Cell Biol.* – 2010 – 191(3): 677-691.
115. Park J. Cancer cells induce metastasis-supporting neutrophil extracellular DNA traps / Park J, Wsocki RW, Amoozgar Z. // *Sci Transl Med.* – 2016. – 8(361): 361ra138.
116. Paterno L.G. Magnetic Nanocomposites Fabricated via the Layer-by-Layer Approach / Paterno L.G., Soler M.A.G., Fonseca F.J. // *Journal of Nanoscience and Nanotechnology.* – 2010. –V.10. P.2679-2685.

117. Pieterse E. Neutrophil extracellular traps drive endothelial-to-mesenchymal transition./ Pieterse E, Rother N, Garsen M. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* – 2017. – 37(7): 1371-1379.
118. Pilsczek FH. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. / Pilsczek FH, Salina D, Poon KK // *J Immunol (Baltimore).* – 2010. – 185(12): 7413-7425.
119. Polyak B. Magnetic targeting for site-specific drug delivery: applications and clinical potential / Polyak B., Friedman G. // *Expert.Opin.DmgDeliv.* – 2009. – V.6.P.53-70.
120. Prabhakar U. Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology / Prabhakar U, Maeda H, Jain RK. // *Cancer Res* –2013. –73(8):2412–2417.
121. Pylaev T A novel cell transfection platform based on laser optoporation mediated by Au nanostar layers. / Pylaev T, Vanzha E, Avdeeva E, Khlebtsov B, Khlebtsov N. // *J Biophotonics.* – 2019 Jan; – 12(1):e201800166.
122. Ruoslahti E. Targeting of drugs and nanoparticles to tumors. / Ruoslahti E., Bhatia, S. N., & Sailor, M. J. // *The Journal of cell biology* – 2010. – 188(6) – 759-768.
123. Salata O.V. Applications of nanoparticles in biology and medicine – URL: <http://www.jnanobiotechnology.com> (дата обращения: 16.05.17)
124. Senda N. The mechanism of the movement of leucocytes./ N.Senda, H.Tamura, N. Shibata // *Exp. Cell Res.* — 1975. — Vol.91. —№2 — P.393—407.
125. Sharif S. Toxicity of nanomaterials / Sharif S, Behzadi S, Laurent S, Forrest ML, Stroeve P, Mahmoudi M. // *Chem Soc Rev.* —2012. — 41(6):2323–2343
126. Schuemann J. ROADMAP FOR METAL NANOPARTICLES IN RADIATION THERAPY: CURRENT STATUS, TRANSLATIONAL CHALLENGES, AND FUTURE DIRECTIONS / Schuemann J., Rudek B., Sung

- W., Bagley A.F. et al. // *Physics in Medicine and Biology*. — 2020. — T. 65. № 21. — C. 21.
127. Snyderman R. Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis / R. Snyderman, E. J. Goetzl // *Science* — 1981.— Vol.213. — P. 830—837.
128. Sollberger G. Neutrophil Extracellular Traps: The Biology of Chromatin Externalization / Sollberger G, Tilley DO, Zychlinsky A. // *Dev Cell*. —2018. — Mar 12;44(5):542-553. doi: 10.1016/j.devcel.2018.01.019. PMID: 29533770.
129. Spicer J. D. Neutrophils promote liver metastasis via Mac-1-mediated interactions with circulating tumor cells / Spicer JD, McDonald B, Cools-Lartigue JJ. // *Cancer Res*. — 2012. — 72(16): 3919-3927.
130. Stockhofe K., Postema, J. M., Schieferstein, H., & Ross, T. L. Radiolabeling of nanoparticles and polymers for PET imaging Pharmaceuticals. — 2014. — 7(4), 392-418
131. Stoinova A.M. DIAGNOSIS OF THE THYROID GLAND DISEASES: NANOTECHNOLOGY IN THE DEVELOPMENT OF DIAGNOSTIC TEST SYSTEMS / Stoinova A.M., Stanishevsky Ya.M., Zubkov A.B., Blagonravov M.L., Neborak E.V., Kaitova Z.S., Syatkin S.P., Kharlitskaya E.V., Goryachev V.A. // *FEBS Open Bio*. — 2019. — T. 9. — № S1. — C. 384.
132. Synthesis, properties, and applications of oxide nanomaterials / ed. by Rodriguez J.A., Fernaa'ndez-Garci'a M. - Hoboken, N.J.: Wiley. — 2007. — xi, 717 p. - ISBN 978-0-471-72405-6
133. Takei H. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12 myristate 13 acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis / Takei H., Araki A., Watanabe H., Ichinose A., Sando F. // *Journal of Leukocyte Biology*. — 1996. —59(2): 229 240.
134. Tarahovsky Y. S. “Smart” Liposomal Nanocontainers in Biology and Medicine // *Biochemistry*. — 2010. — V.75(7). P.811-824.

135. Tecchio C. On the cytokines produced by human neutrophils in tumors / Tecchio C., Scapini P., Pizzolo G., Cassatella M.A. // *Sem. Cancer Biol.* —2013. — 23(3): 159–170.
136. Tohme S. Neutrophil extracellular traps promote the development and progression of liver metastases after surgical stress / Tohme S, Yazdani HO, Al-Khafaji AB. // *Cancer Res.* – 2016. – 76(6): 1367-1380.
137. Talekar M. Transferrin-appended PEGylated nanoparticles for temozolomide delivery to brain: in vitro characterisation. *Journal of microencapsulation* / 28(1),21-28.82. Talekar, M., Kendall, J., Denny, W., & Garg, S.. // *Targeting of nanoparticles in cancer: drug delivery and diagnostics. Anti-Cancer Drugs.* –2011. –22(10),949-962.
138. Trellakis S. Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease / Trellakis S., Bruderek K., Dumitru C.A. // *Int. J. Cancer* – 2011. – 129(9): 2183–2193.
139. Urban C. F. Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms./ C. F.Urban, U.Reichard, V.Brinkmann. et al // *Cell. Microbiol.* —2006.— №8. — P. 668—676.
140. Wang X. H. Nano-MnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> powders synthesis by detonation of emulsion explosive / Wang X. H., Li X. J., Yan H. H. // *Appl. Phys. A.* –2008. –V. 90, N 3. - P. 417-422.
141. Wang X. H. Research of Nano-Mn(Zn) Ferrite Synthesis by Detonation of Emulsion Explosive. // *Dalian Univ. of Technology* — 2008.
142. Wang X. H. Experiment research of nano manganese ferrite powders prepared by detonation method / Wang X. H., Li X. J., Zhang Y. J. // *Chin. J. High Pressure Phys.* —2007. —V. 21, N 2. -P. 173-177.
143. Yashchenok A. M. Impact of magnetite nanoparticle incorporation on optical and electrical properties of nanocomposite LbL assemblies / Yashchenok A. M., Gorin D. A., Badylevich M., Serdobintsev A. A., Bedard M., Fedorenko Y.

- G., Khomutov G. B., Grigoriev D. O., Moehwald H. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* — 2010. — V.12. P.10469-10475.
144. Yamazoe N. TOWARD INNOVATIONS OF GAS SENSOR TECHNOLOGY // *Sens. Actuators B* — 2005 — v. 108, p. 2—14.
145. Yaroslavov A. A NOVEL APPROACH TO A CONTROLLED OPENING OF LIPOSOMES / Yaroslavov A., Efimova A., Smirnova N., Erzunov D., Lukashev N., Grozdova I., Melik-Nubarov N. // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.* — 2020. — T. 190. — C. 110906.
146. Yaroslavov A.A. MULTIFUNCTIONAL CARRIERS FOR CONTROLLED DRUG DELIVERY / Yaroslavov A.A., Sybachin A.V. / *Pure and Applied Chemistry.* 2020. T. 92. № 6. C. 919-939.
147. Yingqi W. Facile preparation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) assistant and a study of its adsorption capacity / Yingqi W. Rongmin C., Zi W., Lijun Z. // *Chem. Eng. J.* 2012. V. 181–182. P. 823–827.
148. Yousefi S. Catapult like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. / Yousefi S., Gold J. A., Andina N., Lee J. J. // *Nature Medicine.* — 2008. — 14(9): 949 953.
149. Yousefi S. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. / Yousefi S. Mihalache C., Kozlowski E., Schmid I., Simon, H.U.// *Cell Death Differ.* — 2009. — 16: 1438–44.
150. Yudintsev A.V. LIPOSOMAL FORM OF TETRA(ARYL)TETRACYANOPORPHYRAZINE: PHYSICAL PROPERTIES AND PHOTODYNAMIC ACTIVITY IN VITRO / A.V.Yudintsev, N.Y.Shilyagina, D.V. Dyakova, S.A. Lermontova, L.G. Klapshina, E.L. Guryev, I.V. Balalaeva, V.A. Vodenev // *Journal of Fluorescence.* —2018. —T. 28. № 2. — C. 513-522.

151. Xia T. Morphology-controllable synthesis and characterization of single-crystal molybdenum trioxide / T. Xia, Q. Li, X. Liu, J. Weng, X. Cao // *Journal of Physical Chemistry*. – 2006. – V. B. 110. – P. 2006 – 2012.
152. Wang Y. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation / Y. Wang, M. Li, S. Stadler // *J Cell Biol*. – 2009. – 184(2): 205-213.
153. Wang J. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in osteosarcoma: review and meta-analysis./ J Wang, Q Shi, TX Yuan. // *Clin Chim Acta*. – 2014. – 433: 225-231.
154. Wilczewska A. Z. Nanoparticles as drug delivery systems. / Wilczewska A. Z., Niemirowicz, K., Markiewicz, K. H., & Car, H. // *Pharmacological Reports*. – 2012. – 64(5),1020-1037
155. Wilson TJ. Cathepsin G-mediated enhanced TGF-beta signaling promotes angiogenesis via upregulation of VEGF and MCP-1./ TJ Wilson, KC Nannuru, M. Futakuchi // *Cancer Lett*. – 2010. – 288(2): 162-169.
156. Wislez M. Neutrophils promote aerogenous spread of lung adenocarcinoma with bronchioloalveolar carcinoma features. / Wislez M, Antoine M, Rabbe N. // *Clin Cancer Res*. – 2007. – 13(12): 3518-3527.
157. Witko – Sarsat V. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects / V. Witko – Sarsat, P. Riei, B. Descamps – Latcha // *Lab. Invest*. – 2000. – Vol. 80(5). – P. 617- 653.
158. Wright H. J. Periodontitis Associates with a Type 1 IFN Signature in Peripheral Blood Neutrophils. / Wright H. J., Matthews J. B., Chapple I. L. C., Ling Mountford N., Cooper P. R. // *Journal of Immunology*. – 2008. – 181(8): 5775 5784.
159. Wu L. Tumor-associated neutrophils in cancer. / Wu L, Saxena S, Awaji M. // *Going Pro. Cancers*. – 2019. – 11(4). pii: E564.

160. Zhang J. The targeting effect of Hm2E8b-NCTD-liposomes on B-lineage leukaemia stem cells is associated with the HLF-SLUG axis / Zhang J, Shen D, Jia M, Zhao H, Tang Y. *J Drug Target.* // –2018. – 26(1):55-65.
161. Zhang LM. Progress of NETs in tumor and tumor-related diseases. / Zhang LM, Luo YZ, Zhou H. // *Zhong Liu Yao Xue.* – 2015. – 5(6): 401-405.
162. Zhong X. Y. Increased Concentrations of Antibody Bound Circulatory Cell Free DNA in Rheumatoid Arthritis / Zhong X. Y., Mthlenen I. von, Li Y. // *Clinical Chemistry.* – 2007. – 53(9):1609

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю, профессору кафедры биофизики и биотехнологии ВГУ, д.б.н., Артюхову Валерию Григорьевичу и доценту кафедры биофизики и биотехнологии ВГУ, к.б.н., Колтакову Игорю Александровичу за профессиональное руководство выполнением диссертационной работы, конструктивную критику и помощь в проведении экспериментов.

Автор выражает глубокую признательность и благодарность коллективу кафедры биофизики и биотехнологии ВГУ за конструктивную критику и профессиональные консультации при подготовке диссертационной работы.