

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Воронеж - 2022

Работа выполнена на кафедре биофизики и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет» (ФГБОУ ВО ВГУ)

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
профессор
Артюхов Валерий Григорьевич

Официальные оппоненты:

Воденеев Владимир Анатольевич
Доктор биологических наук, доцент
Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Национальный
исследовательский Нижегородский
государственный университет им. Н.И.
Лобачевского", Институт биологии и
медицины, кафедра биофизики, заведующий
кафедрой

Пылаев Тимофей Евгеньевич
Кандидат биологических наук
Институт биохимии и физиологии растений
и микроорганизмов Российской академии
наук, лаборатория нанобиотехнологии,
научный сотрудник

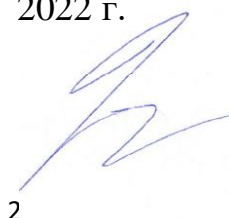
Ведущая организация: Федеральное
государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Российский университет
дружбы народов"

Защита состоится « 26 » апреля 2022 г. в 13:30 часов на заседании диссертационного совета 24.2.288.02 при Воронежском государственном университете по адресу 394018, г. Воронеж, Университетская пл., д.1., ауд.59

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке Воронежского государственного университета.

Автореферат разослан «25» февраля 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного
совета, доктор биологических наук,
профессор



Грабович М.Ю.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. 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. 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. НВЛ играют ключевую роль в патогенезе некоторых заболеваний. Среди таких заболеваний - фиброз цисты, преэклампсия, васкулит, псориаз, системная красная волчанка и другие. 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 лекарственных, в том числе и противоопухолевых препаратов.

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.

Для достижения данной цели решались 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 стандартизированного размера
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 ζ - 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 H3 (ФХ / ХЛ / ДСФЭ-ПЭГ / АТ-гистон H3 / Fe₃O₄-ЦТАБ) и взаимодействующих с молекулами гистона H3 в структуре НВЛ. Исследованы цитотоксические свойства синтезированных иммуномагнитолипосом. Анализ исследования цитотоксичности показал, что синтезированные иммуномагнитолипосомы в

концентрациях 1-1000 липосом на клетку не оказывают токсического воздействия на лимфоциты крови человека, разрушение эритроцитов наблюдается в концентрациях 100-1000 липосом на клетку. При концентрации 1000 наночастиц на клетку наблюдается активация роста количества клеток микроводоросли *Chlorella vulgaris*.

Теоретическая значимость работы. Уточнены особенности протекания процесса нетоза при стимуляции нейтрофилов крови человека частицами латекса. Расширены представления о влиянии условий получения наночастиц магнетита, марганцевого феррита на их физико-химические характеристики. Выявлены особенности влияния полученных иммуномагнитолипосом на жизнеспособность ряда животных и растительных клеток.

Практическая значимость работы. 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».

Положения, выносимые на защиту:

1. При стимуляции нейтрофилов крови человека при 37⁰С 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/м² 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 (FeCl_3 , FeSO_4 , MnCl_2) 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 НЗ / Fe_3O_4 -ЦТАБ) не оказывают токсического воздействия на клетки крови человека (лимфоциты и эритроциты) и микроводоросли *Chlorella vulgaris* (при концентрациях 1-1000 липосом на 1 клетку).

Личный вклад автора. 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.

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 материалам диссертации опубликован 1 патент РФ, 4 статьи в рекомендованных ВАК РФ рецензируемых научных журналах, 1 статья РИНЦ, 11 тезисов докладов.

Структура и объем 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 32 рисунка. Список литературы состоит из 162 наименований.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

Изучение условий образования и структуры НВЛ. Выделение нейтрофилов из гепаринизированной донорской крови осуществляли методом седиментации на двойном градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho_1=1,119\text{г/см}^3$, $\rho_2=1,077\text{г/см}^3$). Инициацию образования нейтрофильных внеклеточных ловушек полиморфно-ядерными лейкоцитами запускали, инкубируя суспензию клеток с латексом ($d=1,5\text{ мкм}$) 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. Визуализацию НВЛ осуществляли методом флуоресцентной микроскопии с использованием красителя акридинового оранжевого. О фрагментации нуклеиновых кислот в структуре НВЛ судили с помощью метода электрофореза в агарозном геле. Наличие участков митохондриального генома в неклеточных сетях определяли методом РТ-ПЦР, используя праймеры к гену цитохрома b. Методом иммуноферментного анализа было установлено наличие в структуре НВЛ гистона Н3.

Были проведены эксперименты по изучению влияния УФ-света на способность нейтрофилов образовывать внеклеточные ловушки. Облучение клеток проводили светом лампы ДРТ-400 в дозах 151, 453, 906 и 1359 Дж/м² с использованием светофильтра УФС-1 с полосой пропускания 240-390 нм.

Синтез магнитных наночастиц. 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 1% раствора аммиака в соотношении объёмов 2/1, после чего реакционную смесь перемешивали в течение 1 минуты и

осаждали частицы в постоянном магнитном поле. Собранные таким образом наночастицы промывали трижды дистиллированной водой.

Подготовка образцов марганцевого феррита осуществлялась следующим образом: к 200 мкл раствора солей (FeCl_3 и MnCl_2) в их соотношении 2/1 добавляли 0.5 М раствор NaOH объёмом 50 мкл. Образцы инкубировали в течение 120 минут при 50°C . Полученные наночастицы осаждали методом центрифугирования при 10 000 об/мин в течение 15 минут. Надосадочную жидкость удаляли, осадок наночастиц ресуспендировали в 1 мл 0.1 М натрий-фосфатного буфера.

Характеристику наночастиц осуществляли методами динамического и электрофоретического светорассеяния (Zetasizer Nano ZSP (Malvern, Великобритания)), рентгеновской дифракции (ARL X'TRA (Thermo Scientific)) и электронной микроскопии (Libra 120 (ZEISS)).

Получение иммуномагнитолипосом.

Липосомы синтезировали методом гидратации/регидратации. Раствор фосфатидилхолина (0,5%) (Sigma, США), холестерина (0,5%) (Sigma, США) и дистероилфосфоэтанолламин–полиэтиленгликоля (2000) (0,1%) (Avanti Polar lipids, США) в этиловом спирте испаряли в роторном испарителе RV10 control (IKA, 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) 1 ч. Тиолированное антитело добавляли к синтезированным липосомам и инкубировали в течение 12 ч при $t = 4^\circ\text{C}$. [Theresa M.Allen, 2005]

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).

Оценка взаимодействия иммуномагнитолипосом со структурами НВЛ. Для оценивания взаимодействия липосом со структурами НВЛ использовали метод флуоресцентной микроскопии. Нейтрофилы стимулировали частицами латекса в течение 30 мин. при $t=37^\circ\text{C}$. При синтезе липосом к липидам добавляли амфотерицин В (0,005%). 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 (Сайфитдинова А.Ф., 2008) с окраской красителем Sybr Green (0,1%). Просмотр препаратов осуществляли на микроскопе Nikon Eclipse Ni-E/Ni-U. Изображение поля зрения просматривали в 2х каналах ($E_x=340-380$ нм и $E_x=465-495$ нм) и накладывали изображения в программе Adobe Photoshop.

Дизайн токсикологических экспериментов с клетками крови человека.

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 (D_{412}) 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 D_1 . 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 D_2 . Каталитическую активность ЛДГ оценивали по формуле:

$$A = (D_1 - D_2) \cdot V_{\text{пр}} / (\varepsilon \cdot l \cdot t),$$

где ε – молярный коэффициент поглощающего соединения (NADH), равный $6,22 \cdot 10^3$ моль⁻¹ см⁻¹, l – длина оптического пути, t – время инкубации (30 с), $V_{\text{пр}}$ – конечный объём реакционной смеси (3 мл).

Определение токсических свойств наночастиц на лимфоцитах крови человека.

Лимфоциты крови человека выделяли центрифугированием на градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1.077$ г/см³). К лимфоцитам добавляли наночастицы в тех же соотношениях, что и в экспериментах 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%.

Дизайн токсикологических экспериментов с микроводорослями.

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 ΔD_k и $\Delta D_{дс}$ – средние значения прироста оптической плотности в контроле и в дисперсной системе соответственно.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявление условий образования и структуры нейтрофильных внеклеточных ловушек

На первом этапе исследований были визуализированы структуры нейтрофильных внеклеточных ловушек и подобраны временные условия их образования. Нами было установлено, что для активации процесса нетоза необходимо инкубировать суспензию нейтрофилов с частицами латекса не менее 30 мин. По истечении этого времени внеклеточные сети образуют $80 \pm 2\%$ клеток. Нами была исследована структура внеклеточных сетей методом электрофореза в агарозном геле. При стимулировании частицами латекса клеток к выделению 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.1). При этом не наблюдалось ни характерной для апоптоза «апоптотической лестницы», ни наблюдаемой при некрозе «размытой дорожки». Следовательно, мы показали, что при стимуляции нейтрофилов частицами латекса происходит образование нейтрофильных внеклеточных ловушек без фрагментации ДНК.



Рис.1. Визуализация и структура НВЛ

Для выявления роли митохондрий в процессах образования НВЛ нами была проведена оценка внедрения фрагментов мтДНК в образующиеся внеклеточные структуры методом RT-PCR. Для образцов, содержащих нуклеиновые кислоты митохондрий (в качестве положительного контроля) и внеклеточных сетей, значение C_p (номер цикла, при котором флуоресценция превышает пороговое значение) по каналу Fam составило 27,7 и 31,7 соответственно. 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 констатировать, что латекс-стимулированный нетоз протекает по пути, предложенному *Yousefi S.* и соавторами (2009 г.). Выделенные НВЛ анализировали методом ИФА. Было установлено, что в образцах НВЛ присутствует гистон H3 (Рис.2).

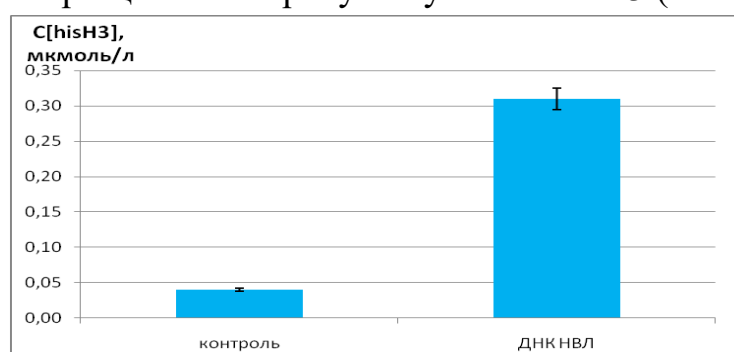


Рис.2. Выявление содержания гистона H3 в структуре НВЛ методом иммуноферментного анализа

Его концентрация статистически значимо возрастает по сравнению с контролем, в качестве которого служили нейтрофилы крови человека, не стимулированные к образованию НВЛ.

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.

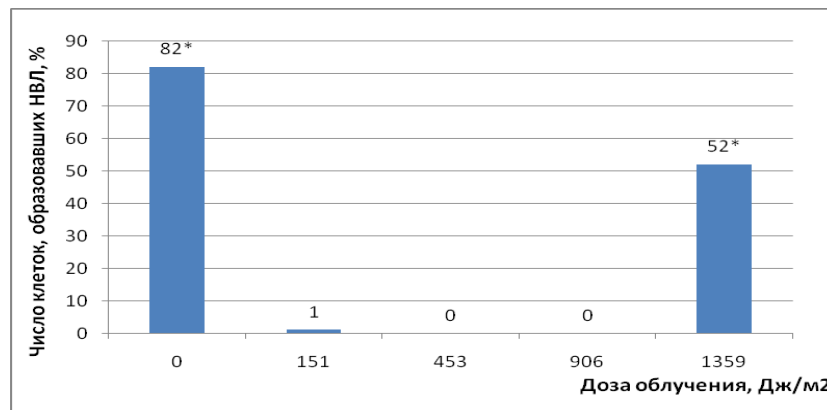


Рис.3. Динамика изменения числа клеток, образующих НВЛ в интактном состоянии и при облучении УФ-светом в дозах 151 - 1359 Дж/м²

Анализ микроскопических препаратов показал, что УФ-излучение в дозах 151, 453 и 906 Дж/м² оказывает иммунодепрессивное действие на способность нейтрофилов образовывать НВЛ. При подсчёте 100 клеток не было обнаружено образования внеклеточных сетей. (Рис.3). При увеличении дозы облучения до 1359 Дж/м² мы наблюдали образование групп клеток, которые формировали единую ловушку, существенно превосходящую по размерам ловушки, образованные одной клеткой, причём данный эффект сохранялся на всех проанализированных нами образцах.

Синтез наночастиц магнетита и марганцевого феррита

Первым типом синтезируемых магнитных наночастиц (МНЧ) явился магнетит (Fe₃O₄). На начальном 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. В дальнейшей работе при приготовлении магнетита использовали концентрацию солей железа 30 мМ. 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 Δt минимально, что говорит о наименьшей степени оседания частиц.

Вторым типом МНЧ явился марганцевый феррит ($MgO \cdot MnO \times 2Fe_2O_3$). В ходе проведенных опытов нами было установлено, что при термостатировании реакционной смеси при 30°C возможно получение наночастиц размером от 7,1 до 12,4 нм. Увеличение температуры до 50°C приводило к увеличению размеров получаемых наночастиц: минимальный размер – $12,3 \pm 1,7$ нм – был зарегистрирован при использовании осаждающего реагента в концентрации 45 ммоль/л, а максимальный – $21,5 \pm 3,6$ 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.

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. 4).

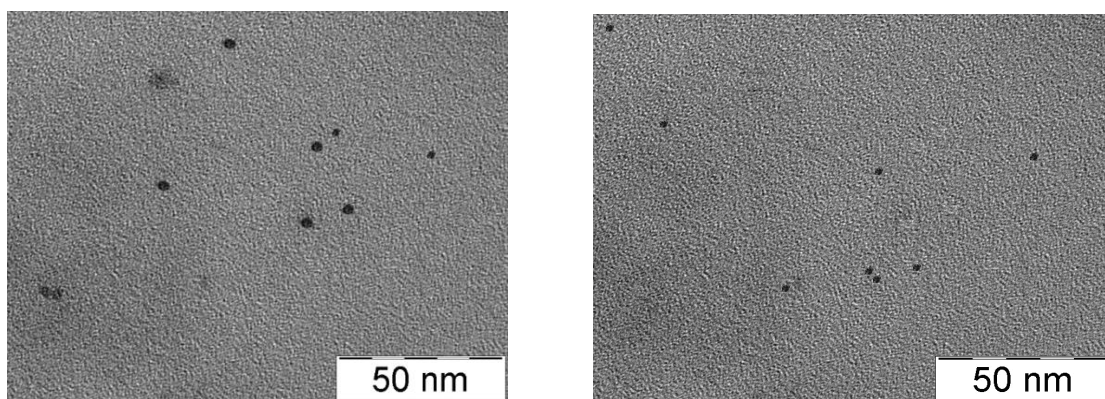


Рис. 4. Изображения наночастиц магнетита (слева) и марганцевого феррита (справа), полученные методом просвечивающей электронной микроскопии

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

В процессе получения наночастиц марганцевого феррита наименьшие значения ζ -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 ζ -потенциала наночастиц марганцевого феррита, чем при использовании натрий-ацетатного

буфера с тем же значением рН (- 14,00 мВ и - 9,76 мВ соответственно). При увеличении величины рН натрий-фосфатного буфера до 6 происходит возрастание значения ζ -потенциала, в диапазоне рН 6,0-8,0 статистически значимых отличий не наблюдалось. В точке рН 8,0 при использовании трис-глицинового буфера значение ζ -потенциала наночастиц выше, чем в случае натрий-фосфатного буфера. При использовании трис-глицинового буфера с рН 9,0 значение ζ -потенциала статистически достоверно снижается относительно вышеописанных условий эксперимента (рис. 5,а).

Наночастицы магнетита обладают более низкой стабильностью, чем наночастицы марганцевого феррита. При низких значениях рН в случае использования натрий-ацетатного буфера величина ζ -потенциала не превышает - 15 мВ. (рис.5,б). При применении натрий-фосфатного буфера значение ζ -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 ζ -потенциала до - 19,5 мВ. Дальнейшее увеличение величины рН не приводило к статистически значимым изменениям ζ -потенциала.

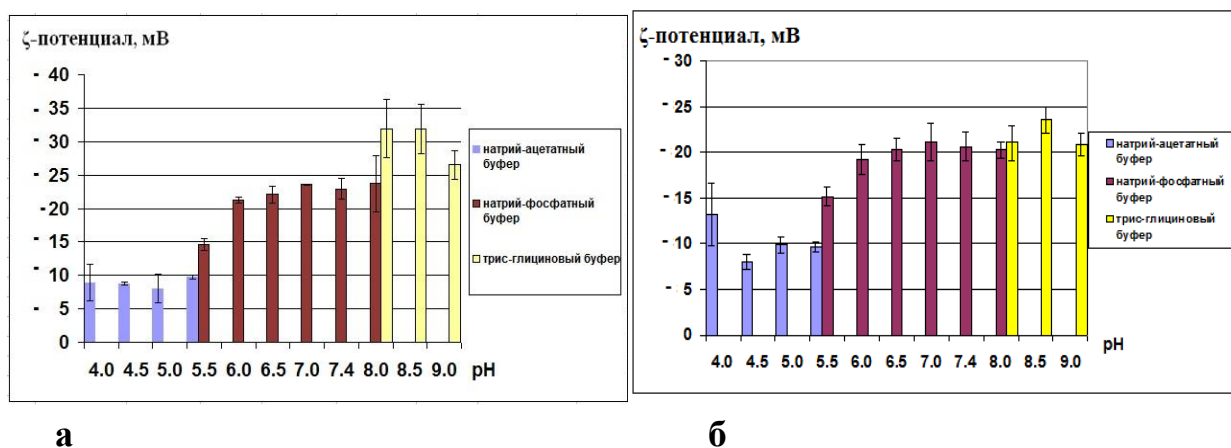


Рис. 5. Величины ζ -потенциала наночастиц оксидов металлов в различных буферных системах (а – марганцевого феррита, б – магнетита)

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. Оптимальным условием для марганцевого феррита является трис-глициновый буфер со значениями рН 8,0-8,5. Для магнетита оптимальным является более широкий диапазон значений рН: 6,5-8,0 для натрий фосфатного и 8,0-8,5 для трис-глицинового буферов.

Получение магнитоуправляемых липосом

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. Облучение синтезированных нами липосом проводили на ультразвуком дезинтеграторе Qsonica Sonicators в течение 15 минут (20кГц, 10 секундный импульс с перерывом 3 сек). 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. 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.

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 ультразвуком 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). Было установлено, что в течение первых 5 часов не происходит статистически значимого изменения в уровне содержания диеновых и триеновых конъюгатов. 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.

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 $33,2 \pm 2,8$ %. Следующим этапом работы стало определение роли гидрофобных связей в процессе включения инсулина. В качестве агента, разрушающего гидрофобные связи, нами была выбрана мочевины. К раствору инсулина в натрий-фосфатном буфере добавляли мочевины в концентрации 8М и измеряли степень включения инсулина по вышеописанной схеме. Включаемость белка резко снизилась и составила $13,1 \pm 0,5$ %. Снижение степени включения инсулина после воздействия мочевины, 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 липосомы.

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 (Fe_3O_4) (PDF-2 карта №01-088-0315) (Рис.6).

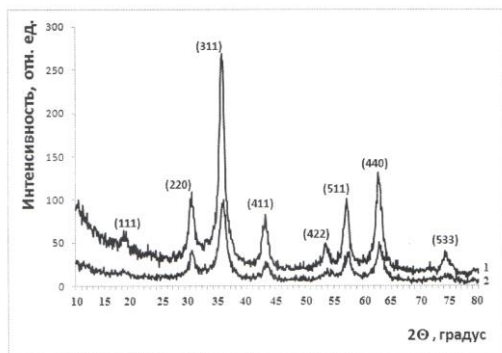


Рис.6. Рентгенограмма наночастиц магнетита
1 - Fe_3O_4
2 - Fe_3O_4 -ЦТАБ

На рис. 7 представлены характерные электронномикроскопические изображения липосом с адсорбированными наночастицами магнетита. На микрофотографиях липосом с наночастицами Fe_3O_4 -ЦТАБ [Рис.7, в] заметно увеличение числа наночастиц магнетита, встроенных в липидный бислой, по сравнению с частицами, немодифицированными ЦТАБ [Рис. 7, б].

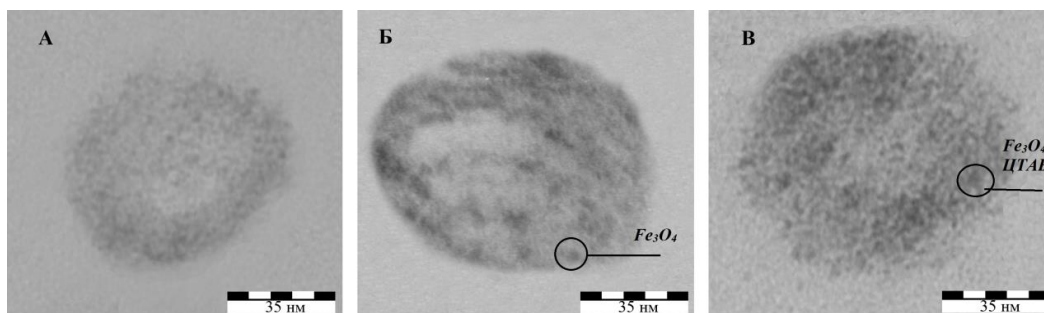


Рис.7. Изображения липосом, полученные с помощью метода просвечивающей электронной микроскопии

А) липосомы без добавления магнетита

Б) липосомы с включёнными наночастицами магнетита

В) липосомы с включёнными наночастицами магнетита, покрытыми ЦТАБ

Количественную оценку встраивания магнетита в липосомы проводили с помощью спектрального метода по формуле: $Nв = (1 - D^{412}_1 / D^{412}_{исх} - D^{412}_2 / D^{412}_{исх}) \times 100$ %, где $Nв$ -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.

Разрушение целостности липосом осуществляли с помощью детергента Triton X-100. Расчёт показал, что в случае Fe_3O_4 в липидный бислой встраивается $49,2 \pm 0,5$ % магнетита, в случае Fe_3O_4 -ЦТАБ - $80,8 \pm 0,5$. Увеличение доли встроенных в липидную мембрану наночастиц Fe_3O_4 обусловлено взаимодействием гидрофобной углеводородной цепи молекулы ЦТАБ ($[\text{C}_{16}\text{H}_{33}\text{N}(\text{CH}_3)_3]\text{Br}$) и гидрофобных остатков жирных кислот молекул фосфатидилхолина.

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.8.

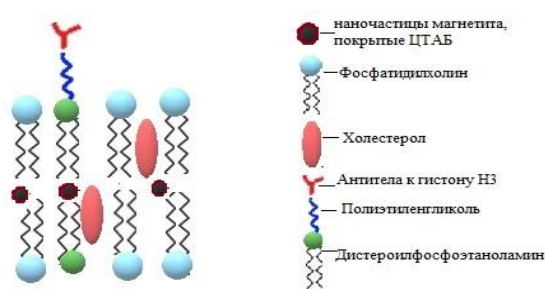


Рис.8. Схематическое изображение строения мембраны синтезированных магнитоиммунолипосом

При получении данных наночастиц контролировали их размер на разных этапах синтеза.

В ходе проведения исследования мы показали, что размер полученных иммуномагнитолипосом составил $176,4 \pm 12,95$ нм. (Табл.1.) 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.1. Значения гидродинамического диаметра липосомальных наночастиц

Условия эксперимента	Среднее значение диаметра частиц (нм)
Фосфатидилхолин (1%) + ультразвук 15 минут (20кГц, 10 секундный импульс с перерывом 3сек)	$173,8 \pm 12,5$
Фосфатидилхолин (0,5%)+холестерин (0,5%) + ультразвук 15 минут (20кГц, 10 секундный импульс с перерывом 3сек)	$171,8 \pm 28,4$
Фосфатидилхолин (0,5%) + холестерин (0,5%) + дистероилфосфоэтанолламин-полиэтиленгликоль (0,1%) + антитела к гистону H3 + Fe_3O_4 -ЦТАБ) + УЗ 15 минут (20кГц, 10 секундный импульс с перерывом 3сек)	$176,4 \pm 12,9$

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.

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.

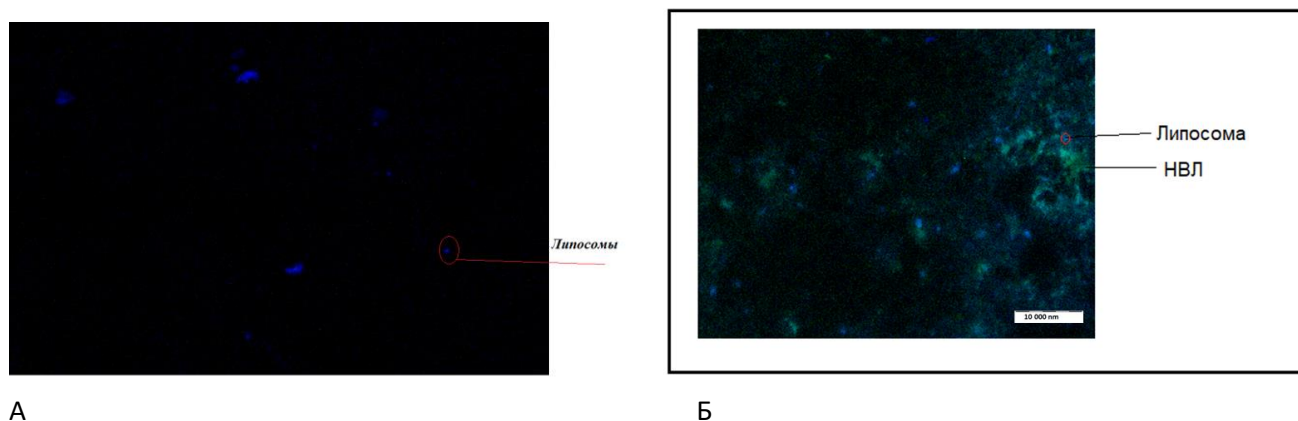


Рис. 8. А)Изображение липосом, связанных с амфотерицином В, полученное методом флуоресцентной микроскопии

Б)Изображение липосом и НВЛ, полученное методом флуоресцентной микроскопии

На следующем этапе были проанализированы препараты липосом с амфотерицином В, добавленных к НВЛ и окрашенных красителем Sybr green (Рис. 8).

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

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

Таким образом, нами было установлено, что $83,4 \pm 9,4$ % липосом (ФХ / ХЛ / ДСФЭ-ПЭГ / АТ-гистон НЗ / Fe_3O_4 -ЦТАБ) взаимодействуют с молекулами гистона НЗ в структуре НВЛ.

Оценка токсических эффектов иммуномагнитолипосом в отношении животных и растительных клеток

Нами были проведены исследования по изучению выхода ЛДГ из эритроцитов крови человека под влиянием полученных наночастиц. Наночастицы добавляли к эритроцитам крови человека в соотношениях: липосомы / эритроциты = 1/1, 1/10, 1/100, 1/1000.

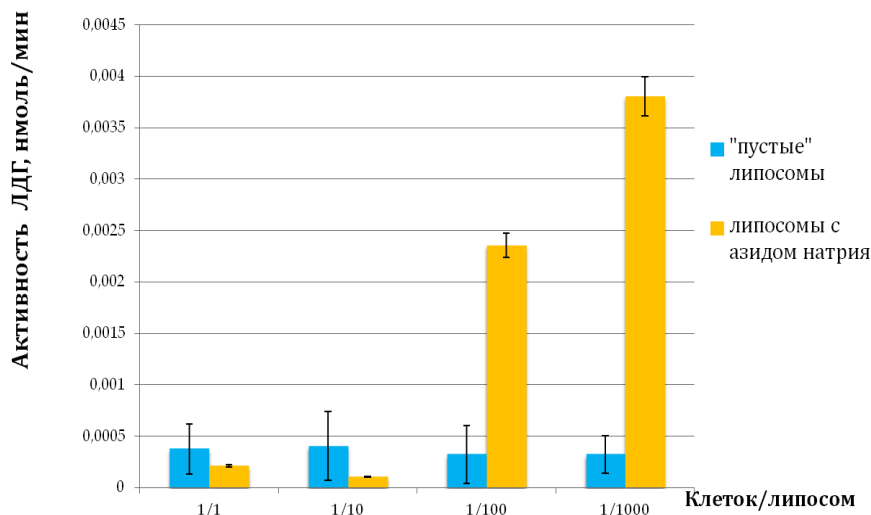


Рис.9. Выход ЛДГ из эритроцитов крови человека при их инкубации с липосомами

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.9)

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

Исследования на лимфоцитах крови человека проводились в тех же соотношениях клетки/липосомы, 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.10)

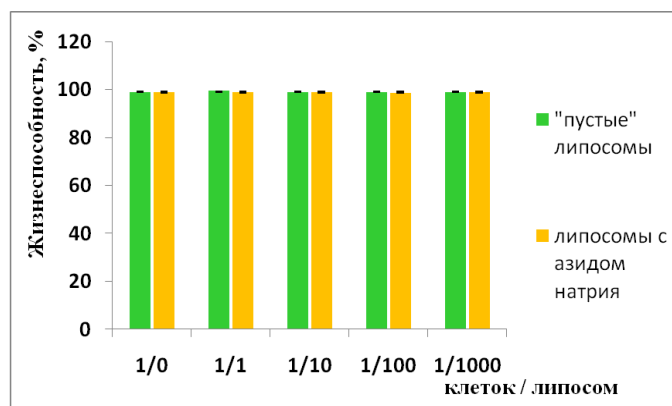


Рис.10. Определение жизнеспособности лимфоцитов крови человека при добавлении наночастиц

Было установлено, что количество жизнеспособных клеток во всех образцах составляет 100%.

Исследования индекса токсичности полученных липосом по отношению к водорослям показало, что при соотношении клетка/липосома = 1/ 100 не наблюдается изменений в индексе токсичности. При соотношении клетка/липосома = 1/ 1000 наблюдается увеличение содержания хлорофилла на суспензии клеток роста численности клеток изучаемой водоросли (Рис.11).

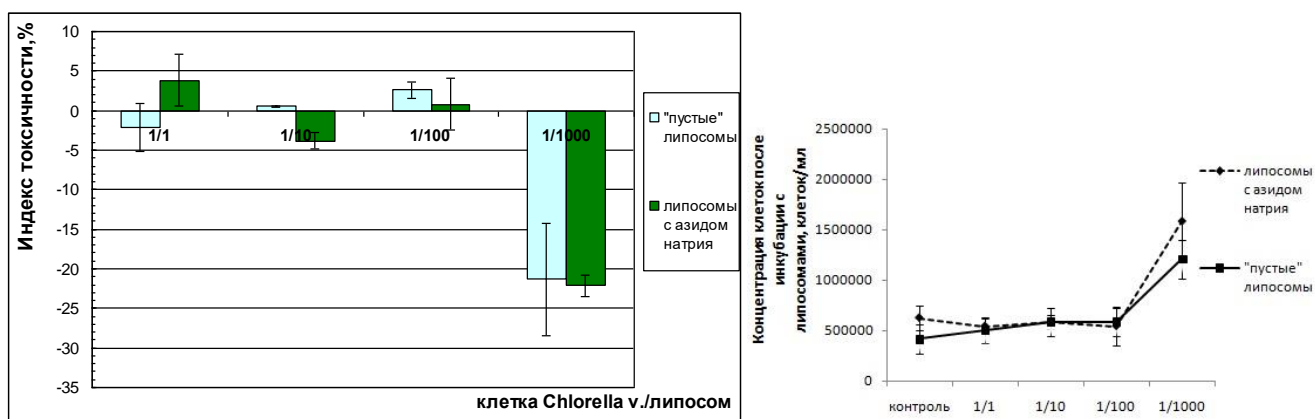


Рис. 11. Определение индекса токсичности синтезированных иммуномагнитоллипосом по отношению к микроводорослям *Chlorella vulgaris*.

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 37⁰С 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 (FeCl₃, FeSO₄) - 30мМ и диапазон значений рН: 6.5-8.0 для натрий фосфатного и 8.0-8.5 для трис-глицинового буферов; для марганцевого феррита (FeCl₃, FeMnO₄) - 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 ± 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%) + дистероилфосфоэтанолламин-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 ± 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 увеличении концентрации до 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°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/м² 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 (FeCl_3 , 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 (FeCl_3 , MnCl_2) - 45мМ и трис-глициновый буфер со значениями рН 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 / Fe_3O_4 -ЦТАБ), способные к адсорбции на нейтрофильных внеклеточных ловушках

7. Показано, что липосомы (ФХ / ХЛ / ДСФЭ-ПЭГ / АТ-гистон НЗ / Fe₃O₄-ЦТАБ) не оказывают токсического воздействия на клетки крови человека (лимфоциты и эритроциты) и микроводоросли *Chlorella vulgaris* (при концентрациях 1-1000 липосом на 1 клетку).

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

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в рецензируемых журналах ВАК РФ:

1. Колтаков И.А. Изучение цитотоксичности иммуномагнитолипосом на примере культуры микроводоросли *Chlorella vulgaris* / И. А. Колтаков, **Е.В. Шилова**, В.Г. Артюхов // Российские нанотехнологии. – Т.17. №2. – 2022. – С. 15-20
2. Koltakov I.A. Study of the immunomagnetoliposomes cytotoxicity to leucocytes and erythrocytes of human blood / I.A. Koltakov, **E.V. Shilova**, V.G. Artyukhov // Opera Medica et Physiologica. – №1. – 2022. – p.5-8.
3. **Шилова Е.В.** О создании магнитоуправляемых липосом для адресной доставки лекарственных средств / Е.В.Шилова, В. Г. Артюхов, Е.Д. Скорбач, М.В. Тололина, Г.Н. Близначева, И.А. Колтаков // Нанотехнологии: разработка, применение: XXI век. – №4. – 2018. – С.9-14.
4. **Шилова Е.В.** Изучение стабильности наночастиц марганцевого феррита и магнетита в различных буферных системах / Е.В.Шилова, Е.Д.Скорбач, В.Г.Артюхов, И.А.Колтаков // Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. –2018. – №4. – С. 137 – 141.

Патент:

Пат. 2621145 Российская Федерация, МПК А61К 9/127, А61К 31/685, В82В 3/00. Способ получения липосом / Артюхов В.Г., Колтаков И.А., **Шилова Е.В.** ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО ВГУ. – № 2015147397; заявл.03.11.15; опубл. 31.05.17, Бюл.№16.

Тезисы докладов:

1. Артюхов В.Г. Структурная целостность генома нейтрофилов в условиях образования внеклеточных сетей / В.Г.Артюхов, И.А.Колтаков, **Е.В.Шилова**, С.В.Шилов.// Eurasian Union of Scientists. – №8. – 2014. – 148 – 151с.
2. Шилов С.В. Об участии митохондриального генома в формировании нейтрофилами внеклеточных сетей в условиях стимуляции латексом / С.В.Шилов, В.Г.Артюхов, И.А. Колтаков, **Е.В. Шилова** // Материалы XXIII съезда физиологического общества им. И.П.Павлова. – Воронеж, 18-22 сентября 2017. – с.2217-2219.
3. **Шилова Е.В.** О путях включения наночастиц магнетита в состав липосом на основе соевого лецитина / Е.В. Шилова, И.А. Колтаков, В.Г. Артюхов // Сборник научных трудов VI Съезда биофизиков России: в 2 томах, том 2 – Краснодар: Полиграфическое объединение «Плехановец», 2019. – Сочи. – 16-21 сентября 2019. –396с. – С. 273.

4. Колтаков И.А. Изучение процесса образования внеклеточных ловушек нейтрофилами крови человека в условиях воздействия УФ-излучения / И.А.Колтаков, **Е.В.Зинкова (Е.В.Шилова)**, В.Г.Артюхов // Международная конференция молодых учёных «Экспериментальная и теоретическая биофизика», сборник тезисов. – 22-24 окт.2012 – с.178-179.
5. Артюхов В.Г. Изучение способности нейтрофилов крови человека образовывать внеклеточные ловушки в условиях УФ-облучения / В.Г.Артюхов, С.В.Шилов, **Е.В.Зинкова (Е.В.Шилова)**, И.А.Колтаков // Современные проблемы биофизики сложных систем. Информационно-образовательные процессы. Материалы докладов Международной научно-методической конференции; 95-летию Воронежского госуниверситета и 50-летию кафедры биофизики и биотехнологии посвящается. – 2013. – С. 26-29.
6. Шилова Е.В. О СОХРАНЕНИИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ ВОЗДЕЙСТВИЯ УФ-ИЗЛУЧЕНИЯ (240-390 НМ) / **Е.В.ШИЛОВА**, М.Л.ШМАТКОВА, И.А.КОЛТАКОВ // I ВСЕРОССИЙСКАЯ XIII МЕЖРЕГИОНАЛЬНАЯ НАУЧНАЯ СЕССИЯ МОЛОДЫХ УЧЁНЫХ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ «СОВРЕМЕННЫЕ РЕШЕНИЯ АКТУАЛЬНЫХ НАУЧНЫХ ПРОБЛЕМ В МЕДИЦИНЕ» . – 18-19 МАРТА 2015. – НИЖНИЙ НОВГОРОД. – С.198.
7. Колтаков И.А. Концентрирование инсулина в липосомах из соевого лецитина / И.А.Колтаков, **Е.В. Шилова**, В.Г.Артюхов // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Создание новых физиологически активных веществ: материалы 6-й Международной научно-методической конференции «Фармообразование 2016», 21-23 апреля 2016 г. / под общ. ред. А.С. Беленовой. – Воронеж: Издательско-полиграфический центр Воронежского государственного университета, 2016. – с.310-313.
8. **Шилова Е.В.** Технология получения липосом из соевого лецитина / Е.В.Шилова, И.А.Колтаков, В.Г.Артюхов // XVI Всероссийская конференция молодых ученых «Экспериментальная и теоретическая биофизика», сборник тезисов. – Пущино, 2-3 ноября 2016г. – с. 26.
9. Колтаков И.А. Влияние наноструктурированного марганцевого феррита на спектральные характеристики гемоглобина крови человека / И.А. Колтаков, Е.Д. Скорбач, **Е.В. Шилова**, В.Г. Артюхов // Материалы XIV международной научной конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии». – Москва, 2019. С. 156
10. Колтаков И.А. Динамика изменения гидродинамического радиуса липосомальных наночастиц из соевого лецитина в процессе лиофилизации с сахарозой / И.А. Колтаков, **Е.В. Шилова**, В.Г. Артюхов // Материалы XIV международной научной конференции «Актуальные вопросы биологической физики и химии». – Москва, 2019. С. 157
11. **Шилова Е.В.** Создание иммунолипосом для адресной доставки лекарственных средств / Е.В. Шилова И.А. Колтаков, В.Г. Артюхов // XI Всероссийская научно-практическая конференция «Нанотехнологии: образование, наука, инновации» – Курск, 2020. С. 6-7.
12. Колтаков И.А. Применение цитрата натрия в качестве стабилизирующего агента при синтезе наночастиц магнетита / И.А. Колтаков, Е.В. Шилова, М.В. Тололина, В.Г. Артюхов // Организация и регуляция физиолого-биохимических процессов: Межрегиональный сборник научных работ. Выпуск 23. ВГУ, 2021. –315с. – С. 113-117.