ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «КРАСНОЯРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ ПРОФЕССОРА В.Ф. ВОЙНО-ЯСЕНЕЦКОГО» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР «КРАСНОЯРСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи

Коловская Ольга Сергеевна

АДРЕСНАЯ КОРРЕКЦИЯ ОПУХОЛЕВЫХ ПРОЦЕССОВ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ МОЛЕКУЛЯРНЫМИ КОНСТРУКЦИЯМИ С РАСПОЗНАЮЩИМИ ЭЛЕМЕНТАМИ – ДНК-АПТАМЕРАМИ

Специальность

1.5.4 - биохимия

Диссертация

на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научный консультант:

д.м.н. Зуков Руслан Александрович

КРАСНОЯРСК, 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ…….. 7
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ…… 16
1.1 Молекулярные распознающие элементы для наномедицины…… 16
1.2 Аптамеры……..... 20
1.3 Наноматериалы для диагностики и терапии онкологических заболеваний, использующиеся для адресной доставки к опухолевым клеткам……. 25
1.3.1 Строение и физико-химические свойства магнитных наночастиц. 26
1.3.2 Факторы, стимулирующие использование магнетизма и магнитных наночастиц в наномедицине…….. 28
1.3.3 Магнето-электрические наночастицы в тераностике…… 34
1.3.4 Покрытие и функционализация магнитных наночастиц…….. 35
1.3.5 Применение МНЧ в наномедицине…… 39
1.3.5.1 Направленный транспорт……. 39
1.3.5.2 Медицинская диагностика и визуализация…… 40
1.3.5.3 Магнитная гипертермия…… 41
1.3.5.4 Адресная магнито-механическая активация……... 42
1.3.6 Магнитные нанодиски – новый перспективный инструмент микрохирургии злокачественных новообразований…… 44
1.3.6.1 Свойства магнитных нано- и микродисков……. 46
1.3.6.2 Биологические эффекты магнитных дисков……. 49
1.3.6.3 Механизм гибели опухолевых клеток дисками в условиях влияния магнитного поля…… 50
1.3.6.4 Биологический эффект магнитных дисков *in vivo*…… 54
1.3.6.5 Модификация и функционализация дисков…… 56
1.3.7 Механизмы проявления токсического эффекта МНЧ……. 57
1.3.8 Аптамеры увеличивают биосовместимость магнитных наночастиц…… 61
1.3.9 Распределение магнитных наночастиц в организме……. 62
1.3.10 Биодеградация и выведение магнитных наночастиц…… 64
ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ…….. 67
2.1 Объект исследования…….. 68
2.2 Аптамеры, ДНК-библиотека и праймеры……. 68
2.3 ПЦР-амплификация…….. 69
2.4 Контроль селекции аптамеров…… 70
2.5 Селекция аптамеров к асцитным клеткам карциномы Эрлиха……... 70
2.6 Клонирование аптамеров…… 72
2.7 Секвенирование и синтез аптамеров……. 75
2.8 Определение констант диссоциации аптамеров…….. 75
2.9 Анализ связываемости аптамеров с асцитными клетками *in vitro*…. 77
2.10 Оценка биологического эффекта аптамеров…….. 78

2.11 Идентификация белковых мишеней аптамеров……. 78
2.12 Клеточные культуры……. 82
2.13 Функционализация наночастиц золота с помощью ДНК-аптамеров…… 83
2.14 Исследование биологического эффекта ФТТ с использованием золотых наночастиц AuНЧ, нацеленных на опухоль с помощью аптамеров, аффинных опухолевых клеткам…… 84
2.15 Функционализация ферроарабиногалактанов FeАГ с помощью ДНК-аптамеров, аффинных опухолевым клеткам……. 86
2.16 Исследование биологического эффекта Апт-FeАГ в переменном магнитном поле……. 87
2.17 Генерация низкочастотного переменного магнитого поля……... 88
2.18 Формирование солидной опухоли ноги у мыши с помощью асцитных клеток карциномы Эрлиха…….. 89
2.19 Терапия солидной опухоли *in vivo* с использованием Апт-FeАГ в переменном магнитном поле низкой интенсивности…… 89
2.20 Магнитно-резонансная томография……. 90
2.21 Гистологический анализ опухолевых тканей……. 91
2.22 Исследование специфичности и чувствительности аптамеров с помощью ПЭТ/КТ……. 91
2.23 Терапия солидной опухоли *in vivo* с использованием Апт-FeАГ в переменном магнитном поле низкой интенсивности……. 93
2.24 Изучение противоопухолевой активности цисплатина и его конъюгатов…… 94
2.25 Функционализация механокомпозитов арабиногалактана с циклофосфамидом ДНК-аптамерами, специфичными к асцитным клеткам…….. 95
2.26 Оценка противоопухолевой эффективности комплекса циклофосфамида с арабиногалактаном, функционализированного ДНК-аптамерами, специфичными к асцитным клеткам карциномы Эрлиха……. 95
2.27 Статистические методы исследований…… 97
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ…….. 98
3.1 Разработка молекулярных распознающих элементов – ДНК-аптамеров…… 98
3.1.1 Селекция ДНК-аптамеров к асцитным клеткам карциномы Эрлиха……. 98
3.1.2 Определение констант диссоциации аптамеров…… 103
3.1.3 Биологический эффект аптамеров, специфичных к асцитным клеткам карциномы Эрлиха……. 108
3.2 Молекулярные мишени ДНК-аптамеров, специфичных к асцитным клеткам карциномы Эрлиха…… 109
3.3 Исследование чувствительности и специфичности ДНК-аптамеров

к асцитным клеткам *in vivo*…… 112
3.3.1 Исследование чувствительности и специфичности аптамеров к асцитным клеткам карциномы Эрлиха *in vivo* методом ПЭТ-КТ с помощью радиофармпрепаратов…… 113
3.3.2 Исследование чувствительности и специфичности аптамеров к асцитным клеткам карциномы Эрлиха in vivo методом магнитно-резонансной томографии с использованием магнитных наночастиц (ферроарабиногалактанов), функционализированных ДНК-аптамерами…… 117
3.3.3 Исследование чувствительности и специфичности аптамеров к асцитным клеткам карциномы Эрлиха флуоресцентным методом. 119
3.4 Бионаноматериалы с адресной доставкой на основе ДНК-аптамеров для противоопухолевой терапии……... 121
3.4.1 Противоопухолевая терапия методом гипертермии, создаваемой золотыми наночастицами, функционализированными ДНК-аптамерами…… 121
3.4.1.1 Плазмонная фототермическая терапия *in vitro*…….. 124
3.4.1.2 Плазмонная фототермическая терапия с золотыми наночастицами, функционализированными аптамерами к асцитным клеткам карциномы Эрлиха (AS42-AuНЧ) *in vivo*…… 129
3.4.2 Магнитомеханический метод противоопухолевой терапии с помощью магнитных наночастиц в переменном магнитном поле. 135
3.4.2.1 Исследование противоопухолевого эффекта магнитных наночастиц NITmagoldCit 50nm, покрытых золотом……. 135
3.4.2.1.1 Оценка эффективности связывания функционализированных ДНК-аптамерами суперпарамагнитных наночастиц (Ап-МНЧ) с клетками асцитной карциномы Эрлиха, клеток печени, почек, сердца и селезенки *in vitro*…… 138
3.4.2.1.2 Определение времени связывания Ап-МНЧ с клетками асцитной карциномы Эрлиха…… 141
3.4.2.1.3 Биологические эффекты модифицированных аптамерами МНЧ в переменном магнитном поле *in vitro*…….. 142
3.4.2.1.4 Магнитомеханическая противоопухолевая терапия функционализированными ДНК-аптамерами магнитными наночастицами в переменном магнитном поле *in vivo*……. 146
3.4.2.1.5 Гистологический анализ тканей после магнитомеханической нанотерапии AS14-МНЧ в переменном магнитном поле……. 148
3.4.2.2 Магнитомеханическая противоопухолевая терапия с помощью функционализированных ДНК-аптамерами ферроарабиногалактанов в переменном магнитном поле…… 152
3.4.2.2.1 Влияние Апт-FeАГ на клетки карциномы *in vitro*…….. 156
3.4.2.2.2 Эффективность магнитомеханической терапии с помощью Апт-FeАГ *in vivo*…….. 158

3.4.2.2.3 Механизм противоопухолевого эффекта ферроарабиногалактана, функционализированного аптамерами. 162
3.4.2.3 Магнитомеханическая противоопухолевая терапия с помощью наноскальпеля (функционализированных ДНК-аптамерами трехслойных нано- и микродисков) в переменном магнитном поле……. 163
3.4.2.3.1 Характеристика трехслойных дисков (Au/Ni/Au) с магнитным моментом, параллельным его плоскости……. 164
3.4.2.3.2 Исследование противоопухолевого эффекта магнитных микродисков, функционализированных ДНК-аптамерами, *in vitro*…….. 168
3.4.2.3.3 Исследование противоопухолевого эффекта магнитных микродисков, функционализированных ДНК-аптамерами, *in vivo*…… 178
3.5 Адресная доставка лекарственных препаратов с помощью ДНК-аптамеров…… 184
3.5.1 Адресная доставка цисплатина с помощью ДНК-аптамеров……... 185
3.5.2 Адресная доставка циклофосфамида и его конъюгатов с помощью аптамеров…….. 194
3.6 Биобезопасность бионаноматериалов на основе ДНК-аптамеров для адресной противоопухолевой терапии……. 208
3.6.1 Биобезопасность золотых наночастиц, функционализированных аффинными и специфичными к асцитным клеткам карциномы Эрлиха ДНК-аптамерами……. 211
3.6.2 Биобезопасность функционализированных ДНК-аптамерами покрытых золотом суперпарамагнитных наночастиц……... 212
3.6.3 Биобезопасность функционализированных ДНК-аптамерами трехслойных магнитных микродисков……... 213
3.6.4 Биобезопасность цисплатина и его конъюгатов с арабиногалактаном и ДНК-аптамерами…….. 215
3.6.5 Биобезопасность циклофосфамида и его конъюгатов с арабиногалактаном и ДНК-аптамерами……. 217
3.6.6 Биобезопасность радиофармпрепарата $^{11}CH_3$-AS14…….. 219
ЗАКЛЮЧЕНИЕ…… 224
ВЫВОДЫ…….. 247
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ…… 250
БЛАГОДАРНОСТИ…… 294

СПИСОК ПРИНЯТЫХ СОКРАЩЕНИЙ

АГ – арабиногалактан

МНЧ – магнитная наночастица

ММТ – магнитомеханическая терапия

МП – магнитное поле

оцДНК – одноцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭТ/КТ – позитронно-эмиссионная томография с компьютнрной томографией

ФТТ – фототермическая термотерапия

ЦФА – циклофосфамид

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс

ASGPR – асиалогликопротеиновый рецептор

Au-НЧ – золотая наночастица

Cis – цисплатин

dNTP – дезокситриозофосфаты

DPBS – фосфатный буфер с Ca^{2+} и Mg^{2+}

FAM – флуоресцентная метка

Fe-АГ – ферроарабиногалактан

^{18}F-FDG – 2-дезокси-2-[фтор-18]фтор-D-глюкоза

Kd – костанта жиссоциации

PBS – фосфатный буфер

P-SAF – искусственные антиферромагнитные диски

ROS – активные формы кислорода

SAF – искусственные антиферромагнитные диски

SELEX – системная эволюция лигандов экспоненциальным обогащением

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы

Злокачественные новообразования до настоящего времени остаются одной из лидирующих причин смертности трудоспособного населения и важной проблемой общественного здравоохранения [1, 2]. Несмотря на развитие новых методов диагностики онкологических заболеваний и противоопухолевой терапии по данным Globocan доля смертельных исходов из числа всех онкобольных превышает 40% [2].

Ведущими методами локальной терапии злокачественных новообразований остаются хирургия и лучевая терапия, основным недостатком которых является их высокая инвазивность. Как хирургическое вмешательство, так и радиотерапия повреждают окружающие опухоль здоровые ткани, что особенно опасно при лечении глиальных опухолей головного мозга [3]. Другим недостатком этих методов является невозможность радикального удаления всех опухолевых клеток, поскольку микрометастазы, макроскопически незаметные для хирурга, впоследствии могут стать очагом формирования рецидивной опухоли.

Естественная и насущная потребность в повышении эффективности и снижении степени токсичности и инвазивности лечения в сочетании с достижениями и возможностями биомедицины, биофармацевтики и нанотехнологий привела к возникновению новой отрасли медицины – наномедицины [4], методы и технологии которой нацелены на создание и применение медицинских изделий для дифференциальной диагностики заболеваний и адресной терапии на молекулярно-клеточном уровне. В последнее десятилетие в области терапии злокачественных новообразований, в основе которой лежит целенаправленное воздействие на ключевые молекулы, стимулирующие рост и прогрессирование опухоли, достигнуты значительные успехи [4].

Основными направлениями наномедицины стали ранняя и точная диагностика и медицинская визуализация, снижение нагрузки на организм от хирургии и радиотерапии, уменьшение дозировки традиционных противоопухолевых лекарственных средств и поиск инновационных неинвазивных решений для персонализированного лечения [5].

Степень разработанности темы исследования

Несмотря на то, что за последние годы в области наномедицины достигнут значительный технологический успех, это не позволило решить все проблемы и разработать эффективную платформу для таргетной терапии онкологических заболеваний. В первую очередь, это связано с наличием неустранимых проблем современных нанотерапевтических подходов, в том числе с высоким риском побочных эффектов химиотерапии, ядерной медицины, сложностью и дороговизной технической реализации и эксплуатации. Пришло понимание того, что бионаноматериалы, которые могут быть использованы в наномедицине в качестве противоопухолевых препаратов, должны обладать биосовместимостью без системных побочных эффектов, накапливаться в клетках-мишенях, обладать точной реакцией на внешние и внутренние сигналы, иметь долговременную стабильность в системе кровообращения и др.

Одной из наиболее острых проблем наномедицины является адресное (активное) нацеливание на патологическую молекулярную мишень, эффективное решение которой достигается с помощью создания нанопрепаратов, конъюгированных с молекулярными распознающими лигандами. В настоящее время наибольшее распространение в качестве молекулярных распознающих лигандов получили моноклональные антитела [6].

Однако сейчас вследствие достигнутых успехов в области молекулярной биологии стало понятно, что наиболее приемлемой заменой

моноклональным антителам могут стать их синтетические функциональные аналоги – аптамеры, представляющие собой однонитевые олигонуклеотиды (размером 30-80 нуклеотидов) или пептиды, способные к специфичному связыванию с любыми молекулярными и клеточными мишенями: белками, малыми органическими молекулами, вирусными частицами, бактериями, антителами, целыми клетками, клеточными лизатами и даже тканями [8, 9]. Аптамеры, которые можно легко подобрать к любой заданной мишени, обладают наиболее подходящими характеристиками для адресного нацеливания на опухоль [7].

Немаловажным преимуществом аптамеров по сравнению с моноклональными антителами является то, что эти молекулы производятся химически в легко масштабируемом процессе, их синтез не подвержен вирусному или бактериальному загрязнению, они неиммуногенны и нетоксичны. Малые размеры аптамеров позволяют им эффективно проникать в любые опухоли, они обратимо денатурируют с восстановлением нужной конформации, их можно химически модифицировать без нарушения нужной конформации [8-10]. Кроме того, производство аптамеров примерно в 100 раз дешевле, чем производство моноклональных антител.

Аптамеры получают с использованием технологии SELEX, позволяющей осуществлять направленный отбор олигонуклеотидов, обладающих сродством к заданным биологическим мишеням [7] .

Цель исследования

Разработать подходы к эффективной и малоинвазивной диагностике и терапии онкологических заболеваний, основанные на многофункциональных молекулярных конструкциях с адресными распознающими элементами – ДНК-аптамерами.

Задачи исследования

1. Селекция молекулярных распознающих элементов – ДНК-аптамеров, аффинных и специфичных к асцитным клеткам карциномы Эрлиха.
2. Оценка чувствительности и специфичности ДНК-аптамеров к асцитным клеткам карциномы Эрлиха *in vivo* с помощью стандартных методов медицины (ПЭТ/КТ, МРТ).
3. Разработка наноконструкций с адресной доставкой на основе молекулярных распознающих элементов – ДНК-аптамеров и золотых наночастиц для разрушения злокачественных опухолей методом гипертермии.
4. Разработка методов дистанционного адресного малоинвазивного способа разрушения опухолевых клеток *in vivo* с помощью магнитомеханической трансдукции с использованием магнитных наночастиц, функционализированных ДНК-аптамерами.
5. Разработка средств адресной доставки стандартных противоопухолевых препаратов (циклофосфамида и цисплатина) для снижения их токсичности и увеличения терапевтического эффекта.

Научная новизна работы

1. Впервые получены молекулярные распознающие элементы на основе ДНК-аптамеров AS9, AS14 и AS42, высокочувствительных и высокоспецифичных асцитным клеткам карциномы Эрлиха, молекулярными мишенями которых являются структурные компоненты цитоскелета филамин А и миозин 9 (AS9), фибронектин, гельзолин, α- и β-субъединицы АТР-синтазы (AS14) и молекулярные шапероны Hspa8 и Hsp90ab1 (AS42).

2. Впервые показано, что с помощью радиофармпрепарата $^{11}CH_3$-AS14, адресно связывающегося с асцитными клетками, можно *in vivo* выявлять опухолевые очаги и их метастазы методом ПЭТ/КТ.

3. Впервые показано, что покрытые арабиногалактаном и функционализированные ДНК-аптамерами к асцитным клеткам суперпарамагнитные наночастицы способны *in vivo* выявлять первичные опухолевые очаги и их метастазы методом МРТ.

4. Впервые получены комплексы золотых наночастиц (37 нм) с ДНК-аптамерами к асцитным клеткам (AS42), способные *in vivo* осуществлять адресную плазмонную фототермическую терапию карциномы Эрлиха.

5. Впервые показано, что дистанционно управляемые биобезопасным низкочастотным переменным магнитным полем ферроарабиногалактаны, магнитные наночастицы (NITmagoldCit 50nm) и трехслойные магнитные нанодиски с квазидипольной структурой (Au/Ni/Au), функционализированные ДНК-аптамерами к асцитным клеткам, способны осуществлять целевое разрушение асцитной карциномы Эрлиха *in vivo*.

6. Впервые показано, что ДНК-аптамеры способны адресно доставлять конъюгаты циклофосфамида с арабиногалактаном к опухолевым очагам, снижая токсичность и увеличивая эффективность стандартной противоопухолевой терапии *in vivo*.

7. Впервые показано, что целевая доставка конъюгатов цисплатина с арабиногалактаном к злокачественной опухоли с помощью ДНК-аптамеров снижает токсичность и увеличивает эффективность стандартной противоопухолевой терапии *in vivo*.

Положения, выносимые на защиту

1. Молекулярные распознающие элементы – ДНК-аптамеры обладают высокой степенью чувствительности и специфичности к опухолевым клеткам асцитной карциномы Эрлиха. Вероятными

молекулярными мишенями для ДНК-аптамеров, высокочувствительных и высокоспецифичных к асцитным клеткам карциномы Эрлиха являются структурные компоненты цитоскелета, белок гельзолин, α- и β-субъединицы АТР-синтазы и молекулярные шапероны.

2. Радиофармпрепарат $^{11}CH_3$-AS14 и магнитные наночастицы, функционализированные ДНК-аптамерами, способны связываться с опухолевыми клетками *in vivo* и осуществлять визуализацию опухолевых очагов и их метастазов методами МРТ и ПЭТ/КТ.

3. Плазмонная фототермическая терапия золотыми наночастицами, функционализированными ДНК-аптамерами к асцитным клеткам карциномы Эрлиха (AS42-AuНЧ) разрушает солидные опухоли *in vivo*.

4. Магнитные наночастицы и микродиски, функционализированные целевыми ДНК-аптамерами, под влиянием низкочастотного переменного магнитного поля разрушают солидные опухоли в условиях *in vivo*.

5. Адресная доставка стандартных противоопухолевых препаратов (цисплатина и циклофосфамида) к опухолевым клеткам увеличивает эффективность препаратов и снижает их токсичность.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическая значимость работы заключается в оптимизации и модификации метода селекции ДНК-аптамеров к клеткам злокачественных опухолей и создании на их основе наноконструкций для диагностики и терапии онкологических заболеваний. Разработанные технологии получения наноконструкций для адресной доставки средств терапии являются теоретической основой для создания противоопухолевых препаратов.

Практическая значимость основана на том, что полученные аптамеры используются в научно-исследовательской работе в Лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий на базе КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого Минздрава России и Лаборатории цифровых

управляемых лекарств и тераностики ФИЦ КНЦ СО РАН для создания средств тераностики рака легкого и глиобластомы. Технология получения противоопухолевых препаратов на основе ДНК-аптамеров к экспериментальной опухоли мышей позволяет её транслировать для получения препаратов для диагностики и терапии других онкологических заболеваний.

Степень достоверности результатов

Результаты получены на современном оборудовании с использованием стандартизированных методик и программ. Селекция аптамеров проведена с использованием термоциклера SensoQuest (Германия), Eppendorf (США). Контроль селекции аптамеров осуществляли с использованием гель-документирующей системы GBOX/EF2-E. Секвенирование последовательностей аптамеров было проведено «Génome Québec Innovation Centre» (Канада). Последовательности аптамеров были синтезированы «Integrated DNA Techonologies» (США). Определение чувствительности и специфичности аптамеров проводили на проточном цитометре Beckman Coulter FC-500, Galios (США). Результаты проанализированы с помощью программного обеспечения: Kaluza 1.1, MaxQuant 1.3, SIMCA, FlowJo, FlowingSoftware 2.5.1, Microsoft Excel 2007, Origin 6.0, базе данных UniProtKB/Swiss-Prot. Результаты работы опубликованы в рецензируемых журналах и представлены на всероссийских и международных конференциях.

Внедрение результатов исследования

ДНК-аптамеры и разработанные на их основе наноконструкции используются при создании новых диагностических систем и терапевтических средств для глиобластомы головного мозга человека и рака легкого человека в Лаборатории биомолекулярных и медицинских

технологий (БиоМеТ) в КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (г. Красноярск, Россия) и Лаборатории управляемых цифровых лекарств и тераностики ФИЦ КНЦ СО РАН (г. Красноярск, Россия).

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 294 страницах машинописного текста и состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа иллюстрирована 88 рисунками, 6 таблицами. В список литературы включено 4 отечественных и 348 зарубежных источника литературы.

Апробация работы

Результаты исследования доложены на международных и российских конференциях в виде устных и постерных докладов: «13th Tetrahedron Symposium-Asia Edition», Тайвань (2012); «Eupa 2013 Scientific Meeting», Франция (2013); «9th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society», Италия (2013); «1st International Symposium and Exibition Aptamers», Великобритания (2014); «11th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society», Нидерланды (2015); «Aptamers in Bordeaux», Франция (2016, 2017, 2018); «Молекулы и системы для диагностики и адресной терапии», Томск (2017); «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация», Россия (2017, 2019, 2021); «Aptamers in Russia», Россия (2020); «Цифровые лекарства на стыке наук», Россия (2015, 2018, 2019, 2020, 2021, 2022).

Публикации

Основные положения диссертации опубликованы в 19 статьях, из которых 12 – в зарубежных журналах, 7 – в российских журналах, рекомендованных ВАК, 1 патенте.

Личный вклад автора

Автором самостоятельно спланированы эксперименты и сформулированы научные гипотезы, лично проведено большинство исследований и проанализированы полученные результаты. Публикации по результатам исследований написаны совместно с коллегами творческого коллектива лаборатории. Все главы диссертации написаны автором самостоятельно.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Потребность в повышении эффективности и снижении токсичности терапевтических препаратов привела к возникновению новой отрасли медицины – наномедицины, основными направлениями которой стало создание методов ранней и точной диагностики, медицинской визуализации, способов снижения нагрузки на организм от хирургии, химио- и радиотерапии, уменьшения дозировки традиционных лекарственных средств и поиск инновационных неинвазивных решений для персонализированного лечения. Физической основой одного из таких решений стала терапия, реализуемая путем дистанционного управления мультифункциональными наноконструкциями, в том числе биомагнитными наночастицами, адресно связывающимися с тканями и клетками-мишенями [11]. При этом биологически активные молекулы обеспечивают специфическое связывание с целевыми белками клеток-мишеней, а физически многофункциональное ядро выполняет лечебно-диагностические манипуляциий на молекулярно-клеточном уровне [12].

1.1 Молекулярные распознающие элементы для наномедицины

Основным принципом наномедицины стало адресное воздействие на патологическую клеточную мишень, которое достигается с помощью определенных лигандов, специфичных и чувствительных к конкретному эпитопу. Такой метод нацеливания узнающего лиганда на молекулярно-клеточную патологичекую мишень позволяет не только обнаружить и охарактеризовать заболевание, но и осуществить более эффективную терапию, способствуя накоплению терапевтического средства в органе-мишени.

В качестве нацеливающих лигандов, в основном, используют пептиды, антитела и небольшие молекулы, связывающиеся с различными биологическими мишенями, такими как рецепторы, ферменты, белки и др. Функционализацию терапевтических и диагностических наноконструкций распознающими клеточную мишень лигандами осуществляют различными методами в зависимости от природы наноконструкции и распознающего лиганда [13]. Распознающие лиганды, иммобилизованные на поверхности наноконструкций, стабилизацируют их и служат защитой от деградации под воздействием различных факторов, увеличивая время их циркуляции в крови. Наноконструкции, в свою очередь, также защищают лиганды от разрушения. В частности, ДНК, иммобилизованная на поверхности наночастицы, сохраняет свою стереометрию и проявляет устойчивость к действию нуклеаз [14-17]. Наноконструкции защищают лиганды белковой природы от денатурации, что очень важно для сохранения функциональной активности и аффинитета к мишени, например при нацеливании посредством антител [18].

В настоящее время основными нацеливающими на патологическую мишень молекулами стали моноклональные антитела, небольшие химические вещества, пептиды и нуклеиновые кислоты.

Пептиды, представляющие собой короткие аминокислотные последовательности, к настоящему времени уже синтезированы для множества биологических мишеней. Пептиды могут быть нацелены на внеклеточный матрикс или внутриклеточную мишень. В частности, пентапептид CREKA (Cys-Arg-Glu-Lys-Ala) связывается с комплексами фибриногена внутри внеклеточного матрикса опухолей [19]. Другие пептиды нацелены на специфические рецепторы клеточной мембраны, экспрессирующихся в опухолевых клетках, но не экспрессирующихся на здоровых клетках. В последнее время особый интерес для терапии рака представляют проникающие в клетки пептиды. Магнитные наночастицы (МНЧ), покрытые такими пептидами, входящими в опухолевые клетки путем

эндоцитоза, успешно используют для адресной доставки к метастазам, что приводит к подавлению роста опухоли [20; 21].

В качестве нацеливающих агентов магнитных наночастиц успешно используют такие малые молекулы, как галактоза и фолиевая кислота [22]. В частности, асиалогликопротеиновый рецептор (ASGP-R), представленный в гепатоцитах, опухолях и лимфоцитах, легко связывает галактозу, маннозу, арабинозу, которые могут быть использованы в качестве агентов для направленной доставки [23–16].

Фолиевая кислота – водорастворимым витамином B6, участвующий в процессе клеточного роста и деления, особенно во время эмбрионального развития [27], связывается с рецептором фолата, который избыточно экспрессируется на поверхности опухолевых клеток, что делает наночастицы, функционализированные фолиевой кислотой, высокоаффинными опухолевым клеткам [23; 28; 29].

Одними из наиболее часто используемых биомолекул, обеспечивающих специфичность и биоактивность наночастиц из-за их высокой специфичности и большого разнообразия, являются антитела. Специфические антитела можно получить в больших количествах против любого вещества, в том числе против вирусов, бактерий, лекарств, гормонов, бактериальных токсинов, аллергенных пептидов и т.д. Антитела имеют высокую аффинность связывания и сохраняют свою специфичность для целевых молекул даже в сложных средах или при низких концентрациях мишеней [30]. Антитела помогают МНЧ связываться с опухолевыми клетками [31] и атеросклеротическими бляшками [32]. Моноклональные антитела против человеческого эпидермального фактора роста 2 (HER/neu) обычно используются для нацеливания на клетки рака молочной железы, поскольку около 25% пациентов с раком молочной железы демонстрируют чрезмерную экспрессию HER2/neu, что делает его объектом, представляющим интерес для улучшения доставки лекарств. Существует

множество анти-HER2-фрагментов, которые были изучены для ориентации наночастиц [33].

На сегодняшний день методы лечения с помощью моноклональных антител, связывающихся с молекулами-мишенями с высокой специфичностью и сродством, являются наиболее успешными стратегиями лечения больных раком [34]. Более 30 терапевтических антител уже используются в клинике, а множество находятся на стадии клинических испытаний [35]. Широкое распространение антител в клинике связано с их преимуществами в лечении онкологических заболеваний, в частности, с (1) их высокой специфичностью по отношению к терапевтической мишени; (2) большими размерами, предотвращающими их почечную фильтрацию и увеличивающими, тем самым, период полувыведения; (3) широким распространением технологий получения антител и (4) отсутствием интеллектуальной собственности на производство антител.

Однако, несмотря на широкое использование антител в диагностике и терапии онкологических заболеваний, в их использовании и производстве имеются недостатки, ограничивающие их применение в качестве противоопухолевых препаратов, наиболее важными из которых являются следующие: (1) иммуногенность; (2) большие размеры (~150 кДа), ограничивающие их биодоступность или препятствующие доступу к своей мишени, что особенно часто наблюдается в случае солидных опухолей, когда вхождение в опухолевую ткань из кровеносных сосудов является критическим для эффективности препарата; (3) процедура их получения, которую трудно масштабировать, не влияя на их характеристики; (4) возможность вирусного или бактериального загрязнения производственного процесса, которое способно изменять качество продукции; (5) трудности в поиске антител с терапевтическим эффектом; (6) ограниченный срок хранения вследствие возможной необратимой денатурации; (7) сложность химической модификации антител для придания им новых свойств и (8)

высокая стоимость разработки и производства терапевтических моноклональных антител. Именно поэтому поиск новых инновационных препаратов, заменяющих моноклональные антитела, является актуальным.

1.2 Аптамеры

В последнее время вследствие достигнутых успехов в области молекулярной биологии стало понятно, что наиболее приемлемой заменой моноклональным антителам могут стать их синтетические функциональные аналоги – аптамеры. Аптамеры – синтетические однонитевые олигонуклеотиды (размером 30-80 нуклеотидов) или пептиды, способные к специфичному связыванию с любыми молекулярными и клеточными мишенями: белками, малыми органическими молекулами, вирусными частицами, бактериями, антителами, целыми клетками, клеточными лизатами и даже тканями [36–39].

Аптамеры получают с использованием технологии SELEX, позволяющей осуществлять направленный отбор олигонуклеотидов, обладающих сродством к заданным биологическим мишеням. Пептидные аптамеры представляют собой простые пептиды, содержащие петлевую область в центре, а также концы, связанные с белками. Петлевая область отвечает за селективные свойства пептидов. Функционально аптамеры представляют собой аналоги антител, но благодаря своим физико-химическим свойствам и способу получения обладают рядом преимуществ по сравнению с антителами, в частности, высокой специфичностью, высокой стабильностью в сухом виде или в растворе, слабой иммуногенностью, способностью выдержать обратимую денатурацию и низкой стоимостью. Кроме того, аптамеры связываются с большими и маленькими мишенями, в то время как антитела главным образом связываются с крупными молекулами [40].

Аптамеры, состоящие из коротких ДНК- или РНК-олигонуклеотидов (15-100 нт), образуют сложные третичные или квадрупольные структуры путем гибридизации комплементарных последовательностей. Большие площади поверхности аптамеров, несмотря на их малую молекулярную массу (5-30 кДа), обеспечивают их высокое сродство с молекулярными мишенями [41]. Константы диссоциации (Kd) аптамеров, как правило, находятся в диапазоне от нескольких микро- до нескольких пикомолей [42; 43], что сопоставимо с аффинностью антител. В настоящее время синтез аптамеров автоматизирован, что обеспечивает экономичное и быстрое объемное производство с минимальным изменением от партии к партии, в отличие от моноклональных антител. Кроме того, структурная стабильность аптамеров обеспечивает им длительный период хранения. Аптамеры способны выдерживать широкий диапазон температур, их функциональная третичная структура легко восстанавливается после тепловой денатурации. Другим значительным преимуществом аптамеров является их способность к химическим модификациям.

Химические модификации основной цепи ДНК обеспечивают устойчивость к нуклеазам и часто увеличивают их аффинность к своей мишени [44]. Введение функциональных групп в основу аптамера позволяет конъюгировать их с лекарственными средствами, siRNA [45] и наночастицами [43; 46], что дополнительно расширяет применение аптамеров в качестве мультифункциональных терапевтических средств.

Таким образом, за последние два десятилетия аптамеры становятся все более популярными кандидатами в терапевтические препараты, поскольку обладают важными преимуществами по сравнению с другими целевыми терапевтическими препаратами по следующим причинам: (1) аптамеры можно легко подобрать к любой нужной мишени; (2) аптамеры обладают высокой специфичностью и аффинностью к своей мишени; (3) аптамеры производятся химически в легко масштабируемом процессе; (4) химический

процесс производства аптамеров не подвержен вирусному или бактериальному загрязнению; (5) аптамеры неиммуногенны и нетоксичны; (6) малые размеры аптамеров позволяют им эффективно проникать в любые опухоли; (7) аптамеры могут обратимо денатурировать с восстановлением нужной конформации, фосфодиэфирная связь химически стабильна; (8) аптамеры могут быть химически модифицированы без изменения конформации; (9) химические соединения для присоединения красителей или функциональных групп могут быть легко введены во время синтеза.

Аптамеры способны не только доставлять терапевтические препараты к своим мишеням, но и сами обладают противоопухолевой активностью, механизм действия которых обусловлен их способностью взаимодействовать с ключевыми функциональными белками, активирующими или блокирующими в опухолевых клетках внутриклеточные сигнальные пути, связанные с процессами онкогенеза. Противоопухолевые аптамеры могут подавлять ангиогенез, пролиферацию, лекарственную устойчивость, инвазию, метастазирование и активировать процессы апоптоза, воздействуя на определенные клеточные и внутриклеточные рецепторы [47].

Предполагается, что наиболее перспективными аптамерами для терапии онкологических заболеваний могут стать олигонуклеотиды, ремодулирующие цитоскелет [48], поскольку именно ремоделирование цитоскелета опухолевые клетки используют для продвижения метастатической сигнализации. По этой причине аптамеры, нацеленные на цитоскелет, обладают большим потенциалом для их использования в качестве антиметастатических препаратов. Один из таких аптамеров, блокирующих связывание ламинина с интегрином, показал *in vitro* противоопухолевый эффект в отношении рака предстательной железы [49].

Тем не менее, как показано рядом авторов, несмотря на хорошие перспективы использования аптамеров в терапии онкологических заболеваний, они до сих пор не получили широкого распространения в

качестве противоопухолевых препаратов, что обусловлено рядом причин. К ограничению применения аптамеров в качестве средств противоопухолевой терапии приводят следующие их недостатки: (1) непредсказуемость фармакокинетических и других системных свойств аптамеров; (2) малые размеры, обуславливающие быструю почечную фильтрацию, снижающую период полувыведения аптамеров; (3) подверженность деградации нуклеазами в условиях *in vivo* и, кроме того, (4) существование интеллектуальной собственности на коммерческое использование аптамеров [50].

Тем не менее, из литературных данных следует, что аптамеры обладают минимальной иммуногенностью, легкостью масштабирования химического синтеза, низкой стоимостью и более высокой химической стабильностью по сравнению с антителами [51]. Восприимчивость к деградации нуклеазами, быстрая фильтрация в почках и недостаточная аффинность в физиологических условиях [52] препятствуют их развитию в качестве кандидатов на лекарственные средства для терапевтических применений [53]. Преодолеть ограничения в использовании аптамеров в качестве терапевтических средств можно путем их химической модификации [54]. В частности, стратегии преодоления деградации аптамеров нуклеазами представлены в статьях [55; 56], тактика улучшения аффинности аптамеров – в статьях [57; 55], снижения почечной фильтрации – в статье [56].

Следует подчеркнуть, что в настоящее время для преодоления ограничений в применении аптамеров в качестве противоопухолевых препаратов выбраны следующие подходы:

(1) Модификация библиотек с введением гидрофобных участков, увеличивающих аффинность аптамеров к различным мишеням, селекция *in vivo* [50].

(2) Оптимизация аптамеров для повышения функциональной активности в физиологических условиях при отборе или после проведения селекции.

(3) Увеличение массы аптамеров путем присоединения дополнительных компонентов, в частности, полиэтиленгликоля или холестерина, увеличивающее период полувыведения терапевтических аптамеров.

(4) Химические модификации сахаров или межнуклеотидных фосфодиэфирных связей, усиливающие устойчивость к нуклеазам.

Аптамеры, находящиеся на стадии клинических испытаний:

1. NOX-A12 (NOXXON Pharma), l-РНК-аптамер предотвращает пролиферацию опухоли путем ингибирования CXC хемокинового лиганда 12 (CXCL12), проявляет противоопухолевую активность в отношении солидных опухолей и множественной миеломы. Находится на II фазе клинических испытаний [57].

2. AS1411 – аптамер, образующий квадрупольный богатый гуанином 27-мерный олигонуклеотид. Находится на II фазе клинических испытаний. Белковой мишенью аптамера AS1411 является нуклеолин. Аптамер проявляет минимальную токсичность у пациентов с солидными опухолями, ингибирует пролиферацию широкого спектра линий раковых клеток через механизм, нарушающий взаимодействие нуклеолина с белками [58].

В настоящее время несколько аптамеров для лечения онкологических заболеваний находятся на стадии доклинических исследований. К 2020 году рынок аптамеров достиг 244,93 млн. долл. США. Коммерческими разработками препаратов для диагностики и терапии на основе аптамеров во всем мире сейчас активно занимаются около 40 компаний. Некоторые из разрабатываемых препаратов уже коммерчески доступны, другие могут появиться на рынке в ближайшие 5-10 лет [58].

Есть мнение [59], что самое узкое место в использовании коммерческих аптамеров в диагностике и терапии связано не с какими-либо недостатками в технологиях получения и применения аптамеров, а с незнанием аптамерных технологий и с укоренившимся характером использования антител в лечении онкологических заболеваний. Другой немаловажной причиной ограничения использования аптамеров в клинических исследованиях являются огромные финансовые инвестиции в разработку и производство моноклональных и гуманизированных антител, которые приводят к тому, что биотехнологическая отрасль неохотно инвестирует капитал в новые технологии, связанные с аптамерами [58].

1.3 Наноматериалы для диагностики и терапии онкологических заболеваний, использующиеся для адресной доставки к опухолевым клеткам

В последние годы появилось большое разнообразие наноматериалов со свойствами, подходящими для терапевтических и диагностических применений в лечении онкологических заболеваний. Такие наноматериалы применяют для дистанционного управления функциональным состоянием клеток, доставки лекарств, визуализации, противораковой терапии и лучевой диагностики. К таким наноматериалам, в частности, относятся магнитные и золотые наночастицы, магнитные диски, полимерные материалы и др. Управляющим звеном терапии и диагностики, зачастую, является лазерное излучение или электромагнитное поле, способное: (1) дистанционно осуществлять идентификацию магнитных наночастиц (МНЧ); (2) направленно перемещать МНЧ; (3) осуществлять локализацию МНЧ в органах-мишенях; (4) оказывать механическое или тепловое воздействие на мишени молекулярно-клеточной терапии.

1.3.1 Строение и физико-химические свойства магнитных наночастиц

Биомагнитные наночастицы (БМНЧ) представляют собой биологически и физически многофункциональные, управляемые электромагнитными полями наноустройства (манипуляторы молекулярно-клеточного уровня), физическую основу которых составляют магнитные наночастицы, которые могут обеспечить:

1) резонансное (ЯМР, ЭПР, ФМР) и диссипативное (магнитострикция, рассеивание/поглощение рентгеновского излучения) поглощение электромагнитной энергии;

2) перемещение, колебание и вращение в неоднородных, переменных и вращающихся магнитных полях.

Эти функционально значимые для разработки медицинских приложений свойства зависят от характеристик магнитных материалов, из которых изготовлены МНЧ, от их стехиометрического состава, кристаллической структуры, размеров, технологий изготовления и др. Для расширения спектра и границ их функциональных возможностей в качестве магнитного ядра могут быть использованы нанокомпозиты и конгломераты из магнитных, немагнитных наночастиц и связующего матрикса. Все эти свойства проявляются в условиях электромагнитного поля, а параметры характеристик зависят от напряженности и частоты электромагнитного поля.

Укрупненная и упрощенная структурно-функциональная схема МНЧ представлена на рис.1. В ней можно выделить три составные части различной функциональности:

1. Биологически функциональная (биосенсорная) поверхность. Может выполнять функции адресного взаимодействия (пассивного или регуляторного) с мишенями молекулярно-клеточной тераностики, а также их диагностической индикации *in vivo* и *in vitro*. Может включать молекулярные

биосенсоры и зонды цветовой, флуоресцентной и радиологической индикации.

2. Защитная оболочка. Биологически инертная оболочка, биосовместимая, препятствующая опсонизации и фагоцитозу. Обеспечивает устойчивость биологически функциональной (биосенсорной) поверхности и защищает организм от токсического действия магнитного ядра. Физико-химические свойства некоторых типов оболочек могут быть дополнительно использованы для индикации и гипертермии опухолевых клеток (золотые наночастицы), для теплового или механического разрушения (магнитные наночастицы), для управляемого/дозированного высвобождения лекарственных средств (липидные или полимерные).

3. Ядро, содержащее магнитные вещества/наночастицы, которые могут обеспечить направленный транспорт, концентрирование и управляемое высвобождение лекарственных препаратов в органах-мишенях, управляемое механическое и тепловое воздействие на биомишени молекулярно-клеточной терапии, их индикацию в глубине организма и медицинскую визуализацию средствами МРТ и КТ. Ядро может включать и другие вещества/наночастицы, физические и химические свойства которых могут обеспечить необходимые и дополнительные функции тераностики.

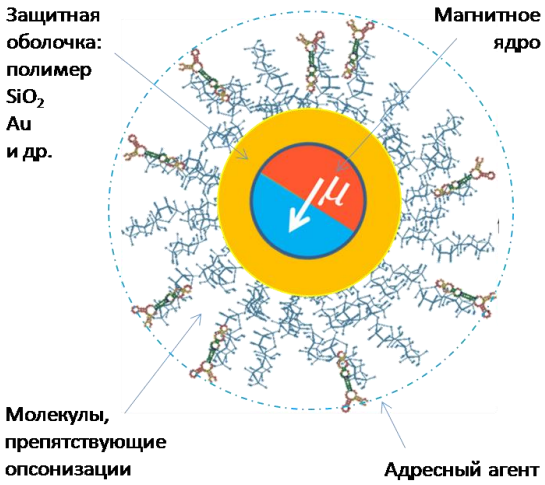


Рисунок 1 – Упрощенная структура биомагнитной наночастицы.

1.3.2 Факторы, стимулирующие использование магнетизма и магнитных наночастиц в наномедицине

Магнитное поле (МП) способно без существенного ослабления глубоко проникать в ткани организма. Магнитные поля различной частоты и напряженности используют для прямого терапевтического воздействия на поражённые ткани [60] и для медицинской визуализации средствами МРТ [61]. Низкочастотные (негреющие) магнитные поля практически биобезопасны. Это связано с отсутствием в организме жизненно-важных структур, обладающих чувствительностью к таким магнитным полям.

Использование МНЧ, обладающих существенной чувствительностью к магнитным полям, позволяет:

(1) применить МП для обеспечения направленного транспорта и концентрирования МНЧ в органе-мишени;

(2) адресно закрепить МНЧ на соответствующих биомишенях и сформировать наноструктуры, предназначенные для эффективного преобразования энергии внешних МП для выполнения лечебно-диагностических манипуляций на молекулярно-клеточном уровне.

Энергия высокочастотных МП может быть преобразована МНЧ в тепловую энергию, а низкочастотных (негреющих) МП может быть преобразована в механическую энергию.

Различные магнитные поля при посредстве МНЧ адресно на молекулярно-клеточном уровне могут индуцировать процессы, необходимые для диагностики и терапии:

(1) возбуждение ядерно-магнитного резонанса (десятки-сотни МГц в полях с магнитной индукцией от 1 до 9 Т) в присутствии МНЧ может быть использовано для создания контрастирующих препаратов для МРТ диагностики-визуализации [61; 62];

(2) высокочастотное МП (200-700 кГц) используется для магнитной гипертермии. Феррожидкости (коллоидный раствор наночастиц магнетита в биосовместимой оболочке) показали свою эффективность для тепловой терапии глубоких или рассеянных опухолей [63]. В [64] приведены решения, одновременно пригодные для гипертермии и диагностики с помощью МРТ;

(3) низкочастотные МП (менее 10 кГц) могут быть использованы:

(3.1) для механической деструкции мембраны и/или внутриклеточных структур клетки-мишени [65–67], которая может быть использована для микрохирургии злокачественных опухолей и их метастазов;

(3.2) для магнитомеханического воздействия МНЧ на целевые белки молекулярно-клеточной регуляции для дистанционного управления функциональным состоянием клеток [11; 68; 69];

(3.3) для дистанционного регулирования химической активности лекарственных препаратов за счёт механической деформации образующих их биомакромолекул, химически прикреплённых к полимерным оболочкам МНЧ, которые испытывают вращательные осцилляции в переменном МП [70];

(3.4) для контролируемого выпуска лекарств из наноконтейнеров – мицелл, липосом, везикул или полимерных оболочек [71; 72] посредством индуцированного магнитным полем теплового или механического разрушения этих оболочек магнитными наночастицами.

Наиболее полно потенциал магнитных наночастиц, используемых и/или предназначенных для разработки средств многофункциональной тераностики в негреющих низкочастотных магнитных полях, представлен в обзоре [11], где рассмотрены основополагающие принципы и модели активации различных процессов в макромолекулярных биоструктурах, содержащих МНЧ, подверженных воздействию низкочастотных (негреющих) магнитных полей. Теоретические оценки проиллюстрированы результатами экспериментальных исследований, выполненных в негреющих МП с

частотой менее 10 кГц (обычно ниже 100 Гц или даже ниже 10 Гц) и амплитудой магнитной индукции (B) менее 1 Т (обычно ниже 100 мТл и иногда ниже 10 мТл). Доказано [11], что индуцированные силы достаточно велики для механической активации широкого спектра процессов в биомолекулярных структурах и клетках. Магнитомеханическая активация сигнальных и канальных механизмов молекулярно-клеточной регуляции может использоваться в автономной безрецептурной терапии. Многофункциональные МНЧ на низких частотах могут быть использованы для управления магнитомеханическими способами инкапсулирования лекарственных веществ при адресной терапии. Наноструктуры размерами более 100 нм, обладающие анизотропией формы и магнитных свойств, могут быть использованы для разрушения мембраны клетки-мишени в адресной микрохирургии [65; 73]. Таким образом, использование МНЧ в сочетании с магнитными полями различной частоты и напряженности открывает широкие возможности для разработки инновационных медицинских изделий дистанционно-управляемой адресной тераностики.

МНЧ в сочетании с низкочастотными (негреющими) магнитными полями небольшой напряженности могут обеспечить низкую инвазивность, универсальность, мультимодальность, высокую проницаемость для глубоких тканей, низкие дозировки, контроль, магнитную макролокализацию и биомолекулярное нацеливание. И, тем самым, стимулировать: (1) повышение эффективности, снижение инвазивности средств диагностики и терапии (МРТ, ПЭТ, радиология, химиотерапии и др.); (2) разработку новых неинвазивных изделий и технологий наномедицины, основанных на прямой магнитомеханической (2.1) активации процессов молекулярно-клеточной регуляции и (2.2) деструкции мембраны и внутриклеточных структур клеток-мишеней. Такой подход позволяет реализовать широкий спектр диагностических, терапевтических и контрольных функций в единой

технологической платформе, как самостоятельное инновационное решение, так и в сочетании с традиционными методами [11].

Для получения магнитных наночастиц используются ферромагнетики, ферримагнетики и суперпарамагнетики. Среди химических элементов ферромагнитными свойствами обладают переходные элементы Fe, Co и Ni (3d-металлы) и редкоземельные металлы Gd, Tb, Dy, Ho, Er. Ферромагнетики также можно получить, используя сплавы и соединения этих металлов между собой и с другими неферромагнитными элементами, сплавы и соединения хрома (Cr) и марганца (Mn) с неферромагнитными элементами.

Свойства объемных магнитных материалов при переходе к наноразмерам сильно меняются. Критическим фактором является размер (соотношение площади к объему наночастицы), анизотропия формы и намагниченности. Например, магнитная анизотропия наночастиц может быть существенно больше, чем у большой частицы, а намагниченность насыщения, наоборот, меньше. В работе [74] отмечено, что температуры Кюри и Нееля для больших частиц могут на сотни градусов отличаться от соответствующих температур для наноразмерных объектов. Показано, что не только размер наночастиц, но и технология их получения существенным образом влияют на эти важные для биомедицинских приложений параметры.

При определенных размерах ферромагнетики могут перейти в однодоменное состояние. В суперпарамагнитном состоянии ферромагнетики становятся равномерно намагниченными по всему объёму, а их магнитный момент может случайным образом менять направление под влиянием температуры и броуновского движения. Для приложений направленного транспорта лекарств существенно, что: (1) в отсутствие внешнего магнитного поля средняя намагниченность суперпарамагнитных частиц равна нулю; (2) во внешнем магнитном поле такие частицы ведут себя как парамагнетики даже при температуре ниже точки Кюри; (3) магнитная восприимчмвость суперпарамагнетиков намного больше, чем парамагнетиков.

Суперпарамагнитные наночастицы могут быть изотропными («ланжевеновскими») и анизотропными («стонер-вольфартовскими»), обладать коорцетивностью, существенно превышающую коорцетивность чистого ферромагнетика [75]. Эти свойства представляют особый интерес для разработки: (1) средств магнитной гипертермии опухолей; (2) магнитомеханической деструкции мембраны или внутриклеточных структур клетки-мишени; (3) магнитомеханической активации целевых белков молекулярно-клеточной регуляции процессов с целью запуска процессов апоптоза, некроза, пролиферации.

Оксидные частицы обладают более слабыми магнитными свойствами, чем наночастицы на основе металлов, однако они более устойчивы к окислению. В настоящее время наиболее широкое применение в биомедицине получили частицы наноразмерного оксида железа, что обусловлено их низкой токсичностью и стабильностью магнитных характеристик [76; 77]. Наиболее востребованы суперпарамагнитные наночастицы оксида железа, состоящие из ядер оксида железа, состав и физико-химические свойства которых непрерывно изменяются от магнетита Fe_3O_4 до маггемита g-Fe_2O. Постоянные магниты Nd-Fe-B могут обеспечить глубину эффективного проникновения поля до 10-15 см внутрь организма. Возможно интраоперационное или малоинвазивное эндоскопическое введение постоянных магнитов или электромагнитов для дистанционного концентрирования наночастиц в органе-мишени.

Для биомедицинских приложений интерес представляют МНЧ с анизотропией формы и большим отношением (длины к толщине). Квазиодномерные образования в виде цепочек сферических наночастиц из оксида железа в оболочке из молекул декстрана представлены в [78; 79]. Магнитные «нано-черви» имеют большую по сравнению с соответствующими отдельными частицами намагниченность насыщения. Контрастность изображений при магнитно-резонансной диагностике с

использованием магнитных «нано-червей» выше, чем у отдельных частиц. Поскольку они имеют более развитую поверхность, то к ним можно прикрепить большее число молекулярных биосенсоров. Одновременное взаимодействие с большим числом сайтов связывания на поверхности клетки-мишени позволяет рассчитывать на более эффективное (биологически и терапевтически значимое) взаимодействие МНЧ типа магнитных «нано-червей» с биомишенями в переменном магнитном поле.

Аналогичными преимуществами перед одиночными магнитными наночастицами сферической формы могут обладать анизометрические наночастицы и наностержни [79-81].

Помимо синтезированных искусственно существуют и магнитные наночастицы природного происхождения – магнетосомы [82]. Магнитные бактерии – группа грамотрицательных бактерий, принадлежащих к α и β классам протеобактерий, обладающих подвижностью, аэротаксисом и способностью синтезировать магнитные частицы Fe_3O_4 (магнетит) и Fe_3S_4 (грейгит) внутри клетки. Магнитные кристаллы магнетосом имеют размеры в пределах от 30 до 150 нм и могут находиться в однодоменном и мультидоменном состоянии. В литературе упоминаются еще три обладающих магнитными свойствами соединения, образующиеся в результате жизнедеятельности одноклеточных микроорганизмов. Это, маггемит – γ-Fe_2O_3, пирротин $Fe_{1-x}S$ ($0<x<0,2$) и ферригидрит $5Fe_2O_3{*}9H_2O$ [83]. Ферригидрит в макроскопическом масштабе является антиферромагнитным гидроксидом. Однако при переходе ферригидрита к наноразмерным частицам магнитные моменты антиферромагнитных подрешёток в этих частицах не компенсируют друг друга. В результате частицы нанодисперсного ферригидрита приобретают собственные (спонтанные) магнитные моменты и, таким образом, могут составить конкуренцию «классическим» ферро- и ферримагнитным частицам в различных практических приложениях тераностики.

Хотя магнитные свойства наночастиц, синтезированных бактериями, в принципе позволяют их применять для диагностики магнитно-резонансным методом, контролируемой доставки лекарств и магнитной гипертермии, но они по каким-то причинам не пользуются популярностью в биомедицинских исследованиях.

1.3.3 Магнето-электрические наночастицы в тераностике

В качестве нового перспективного направления разработки средств управления биохимическими процессами во внутренних органах в [11] рассматривается возможность использования магнето-электрических наночастиц (мультиферроики, магнитосегнетоэлектрики), которые обладают способностью создавать электрическое поле под действием магнитного поля и наоборот, создавать магнитное поле под действием электрического поля. Известна избирательная чувствительность биомолекулярных структур к заряду окружающих молекул и частиц к таким параметрам электрического поля как частота, напряженность в физиологически значимых пределах. Эти свойства позволяют, при соответствующем выборе амплитуды и частоты внешнего магнитного поля и магнитоэлектрических характеристик МНЧ, рассчитывать на биологически/терапевтически значимую селективность влияния МП.

В отличие от электрического поля низкочастотное магнитное поле беспрепятственно проникает внутрь организма. Магнитоэлектрические МНЧ, адресно локализованные на молекулярно-клеточных структурах могут с помощью электрических зарядов и полей напрямую оказывать регуляторное влияние на процессы жизнедеятельности клетки. В [11] отмечено, что в литературе представлено несколько магнитных веществ и многослойных композитов, пригодных для получения наночастиц, обладающих магнитоэлектрическими свойствами. Проанализировано

несколько примеров получения и применения таких наночастиц в тераностике. Некоторые из них можно найти в последних публикациях [84–86].

На основе проведенных экспериментов и их результатов авторы этих работ считают, что предлагаемый подход, можно было бы использовать для эффективного способа перехода через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и лечения заболеваний ЦНС, таких как болезнь Альцгеймера, опухоли головного мозга и нейро СПИД. Показано [11], что использованные в этих экспериментах магнитные наночастицы и низкочастотные магнитные поля могут запускать процессы магнитомеханической активации. Приведены оценки, показывающие не только биологическую, но и существенную техническую и экономическую целесообразность разработки средств магнитоэлектрической тераностики, а возможно и в комплексе с магнитомеханической активацией терапевтически значимых процессов.

Из проведенного анализа следует, что требуется глубокое исследование на молекулярно-клеточном и физико-химическом уровнях механизмов магнитомеханической и магнитоэлектрической активации биологически/терапевтически значимых процессов. В том числе и прямого (механического и электрического) влияния МНЧ на целевые белки молекулярно-клеточной регуляции в низкочастотных негреющих магнитных полях.

1.3.4 Покрытие и функционализация магнитных наночастиц

МНЧ, не покрытые защитной оболочкой, в биомедицинских исследованиях не используются, поскольку при их введении в живой организм возникают некоторые проблемы, в частности:

1. Нестабильность [87; 88].
2. Образование свободных радикалов, опасных для организма [89].

3. Недостаточно прочная связь с лигандами, необходимыми для адресной доставки лекарств [90].
4. Опсонизация – адсорбция белков-опсонинов, распознаваемых клетками иммунной системы. При внутривенном введении МНЧ происходит их быстрая опсонизация, взаимодействие с белками плазмы крови. Опсонизированные частицы быстро выводятся из полости сосудов в результате их захвата макрофагами печени, селезенки и костного мозга [91].

Важнейшим требованием для применения МНЧ является их стабильность. До настоящего времени стабильность МНЧ в течение длительного периода без агломераций и осаждения остается большой проблемой [92]. Для увеличения стабильности, улучшения биосовместимости магнитных наночастиц, снижения их токсичности и избежания опсонизации их покрывают различными веществами. Наиболее полно информация о типах молекулярного покрытия МНЧ представлена в обзорах [12; 93; 94].

Вещества, использующиеся для покрытия магнитных наночастиц:

1. Органические лиганды [95].
2. Полимеры: декстран, крахмал, хитозан, карбоксиметил декстран, аминодекстран, поливинилгликоль, полиэтиленгликол (ПЭГ) и т.д. [96-100].
3. Биомакромолекулы (гепарин, липиды, димеркаптосукцинат) [101].
4. Неорганические материалы – оксид кремния, углерод [102; 103], металлы (золото, серебро, платина [104].

Наиболее распространенным поверхностным полимерным покрытием магнитных наночастиц является полиэтиленгликоль (ПЭГ) [40; 92]. Он растворим в воде, улучшает дисперсию наночастиц в биологических средах, имеет низкую иммуногенность, высокую биосовместимость, способен к

быстрой очистке, увеличивает время циркуляции наночастиц в крови, так как замедляет опсонизацию частиц за счет стерического эффекта [105; 106].

Другим широко используемым полимерным покрытием является декстран, что связано с его биосовместимостью и полярными взаимодействиями с лигандами [99; 107]. Покрытие диоксидом кремния стало популярно благодаря легкости синтеза и стабильности в водных условиях [913; 108]. Формирование магнитных липосом также является типичным методом, поскольку структура липосом аналогична структуре биологических мембран, которые определяют их биосовместимость и эффективность в целевых системах доставки [40; 109]. В последнее время больше внимания уделяется синтезу магнитных наночастиц с углеродным покрытием из-за высокой химической и термической стабильности [77].

Неорганические металлы увеличивают биосовместимость и защищают магнитное ядро от окисления, коррозии и агрегирования. Наиболее подходящим кандидатом для покрытия МНЧ является золото, благодаря его стабильности, биосовместимости, низкой реакционной способности, способности образования прочной связи сера-золото, энергия которой составляет 40 ккал/моль [110]. Благодаря оптическим свойствам, таким как локализованный поверхностный плазмонный резонанс и поверхностное усиленное рассеяние, магнитные наночастицы, покрытые золотом, могут быть использованы в магнитно-резонансной томографии как контрастные или терапевтические средства [109-111].

Несплошные покрытия способны вызывать токсическое воздействие на ткани, поскольку они легко опсонизируются и поглощаются макрофагами. На скорость поглощения макрофагами влияют размеры МНЧ и их заряд. Для получения нейтральных, положительно и отрицательно заряженных МНЧ их покрывают декстраном, аминодекстраном, гепарином и димеркаптосукциновой кислотой.

Взаимодействие МНЧ с клеткой-мишенью зависит от заряда МНЧ – нейтральные наночастицы клетками не поглощаются. Взаимодействие клеток с отрицательно заряженными частицами зависит от химического состава покрытия. МНЧ, покрытые димеркаптосукцинатом, слабо поглощаются клетками, токсический эффект отсутствует. МНЧ, покрытые гепарином, поглощаются только при высоких концентрациях наночастиц. Положительно заряженные МНЧ являются наиболее подходящими для использования в биомедицине в условиях *in vivo,* поскольку они проникают в клетки с высокой эффективностью и их можно обнаружить методом МРТ.

Несмотря на то, что описанные функциональные покрытия придают магнитным наночастицам биосовместимость, для применения в тераностике МНЧ модифицируют различными функциональными группами для конъюгации посредством ковалентного и нековалентного связывания целевых лигандов. Амино-, карбоксильные, сульфгидрильные, гидроксильные, имидные, тиоловые группы являются одними из главных представителей, облегчающих связывание целевых лигандов с поверхностями наночастиц, благодаря высокой аффинности ко многим материалам [112].

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

альдегидная группа (–CHO) также может быть использована для конъюгации лигандов на поверхностях частиц [96; 97].

1.3.5 Применение МНЧ в наномедицине

Функционализированные МНЧ, благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам, получили широкое распространение в наномедицине при создании препаратов для диагностики, терапии, средств для магнитной сепарации и очистки. По сравнению с другими средствами диагностики и терапии, особенно в условиях *in vivo*, МНЧ имеют неоспоримые преимущества, поскольку с помощью аффинных лигандов они могут эффективно связываться с биологическими мишенями, а под влиянием внешнего магнитного поля МНЧ могут двигаться по заданной траектории. Таким образом, МНЧ, благодаря способности к молекулярному узнаванию и трансформации энергии магнитного поля в движение, могут осуществлять доставку лекарств, преобразование энергии магнитного поля в тепловую энергию, осуществлять магнитную сепарацию и очистку. Эти возможности функционализированных магнитных частиц обусловили их использование в наномедицине.

1.3.5.1 Направленный транспорт

Потребность в средствах направленного транспорта и концентрирования лекарственных средств в области терапии, особенно острая в лечении злокачественных опухолей, стимулировала поиск соответствующих решений в области физики магнитных явлений и материалов. Миниатюризация электромагнитов, развитие сверхпроводящей техники и создание способов введения сильных постоянных (Sm-Co and Nd-Fe-B) магнитов внутрь организма позволили применять средства

направленной доставки в таких отраслях медицины как стоматология, кардиология, нейрохирургия, онкология, радиология и др. [63]. При разработке МНЧ этого типа следует учесть, что создание градиента магнитного поля лежит в основе целенаправленной доставки и концентрирования лекарственных препаратов в области терапии.

1.3.5.2 Медицинская диагностика и визуализация

В клинической практике уже разрешены к применению в качестве контрастирующих агентов МРТ медицинской визуализации два типа суперпарамагнитных наночастиц. Это – люмирен (покрытые силиконом частицы оксида железа, диаметром 300 нм) и эндорем (покрытые декстраном наночастицы магнетита, диаметром 150 нм) [61]. Время релаксация магнитного момента протона в магнитно-резонансной томографии около 1 сек без контрастного агента и нескольких десятых секунды с контрастным агентом [113]. Для медицинской визуализации с помощью МРТ используют сильные магнитные поля (с индукцией 1-9 Т) и высокие частоты (десятки-сотни МГц). Поэтому использование технологий МРТ устройств в сочетании с МНЧ одновременно для диагностики и терапии проблематично.

Новые решения для использования МНЧ для медицинской визуализации были предложены в работе [114]. Предложенный подход, в отличие от МРТ, не требует использования сильных магнитных полей и высоких частот для возбуждения ядерного магнитного резонанса. Обнаружение наночастиц происходит из-за высокой нелинейности кривой намагничивания Ланжевеновских суперпарамагнитных частиц. Ансамбль таких частиц, сконцентрированных в области органа-мишени, может использоваться для диагностики и/или терапии. Возбуждение МНЧ происходит на частоте в несколько кГц, излучение происходит в радиочастотном диапазоне и сразу на нескольких частотах. Метод описан в

работах [115–117]. Показано, что излучение позволяет получить дополнительную информацию, пригодную для диагностики, чувствительность и скорость работы метода намного выше, а использование МНЧ позволяет одновременно решать задачи диагностики и терапии. Вместе с тем, несмотря на перспективность метода, упоминания об использовании метода в клинической практике на текущий момент не обнаружены.

1.3.5.3 Магнитная гипертермия

Локализованная магнитная гипертермия была предложена и апробирована в работе [118]. Суспензия МНЧ вводилась в организм, МНЧ концентрировались в целевом органе-мишени. Впервые было показано, что в переменном МП частотой 200-800 кГц диссипация энергии в МНЧ приводит к их разогреву и нагреву всей области их локализации [119]. Терапия раковых опухолей методом магнитной гипертермии предполагает нагрев ткани до температуры, лежащей в узком интервале 43-46°C [120; 121]. При этой температуре происходит апоптоз клеток злокачественной опухоли и возможен оптимальный для организма режим регулируемой гипертермии. Нагрев до $T > 46$°C вызывает некроз тканей, который может повлечь за собой тяжелый токсикоз организма [121]. Температура нагрева тканей в процессе магнитной гипертермии определяется не только хорошо контролируемыми физическими характеристиками МП и МНЧ, но и плохо контролируемыми факторами, приводящими к неравномерности распределения МНЧ и неравномерности теплоотвода из области тепловыделения. Эти факторы связаны с анатомическими, физиологическими, морфологическими и патологическими особенностями органа-мишени и могут привести к перегреву и некрозу здоровых тканей. Это ограничивает также и магнито-тепловые подходы к управляемому выпуску лекарств из температуро-чувствительных наноконтейнеров.

В качестве возможного решения этой проблемы в работе [122] был предложен метод, позволяющий локализовать тепловое воздействие на уровне отдельных поражённых клеток. Такая возможность локализации разогрева с помощью МНЧ в переменном МП на уровне клетки была исследована в работе [123]. Вместе с тем в [124] экспериментально показано, что такая гипертермия не может быть пространственно локальной и селективной на уровне одной клетки и несет в себе не только угрозу некроза клетки-мишени, но и перегрева соседних здоровых клеток. Как вариант решения этой проблемы рассматривается возможность использования МНЧ с температурой перехода из ферромагнитного в парамагнитное состояние (точка Кюри) в интервале 44-46°C [125]. Это ограничивает температуру разогрева точкой Кюри. Поэтому при правильно подобранной экспозиции периодического терапевтического воздействия МП с учетом условий теплообмена в окрестности МНЧ, существует принципиальная возможность подбора биобезопасного режима гипертермии.

1.3.5.4 Адресная магнито-механическая активация

В обзорах [126; 127] показано, что при правильном выборе и функционализации магнитных частиц можно в переменном магнитном поле селективно манипулировать основными типами механочувствительных клеточных структур, включая интегрины, цитоскелет, ферменты, ионные каналы. В работе [128] магнито-механическая активация была использована для стимулирования дифференциации стволовых клеток и формирования костной ткани для регенеративной медицины. Были использованы МНЧ диаметром 250 нм, функционализированные PDGFR-антителами для селективного действия на мембранные рецепторы клеток мишеней. В работе [129; 130] опыты продемонстрировали *in vitro* и *in vivo* возможность существенного ускорения дифференциации и экспрессии клеток с

присоединившимися к ним МНЧ в результате действия МП частотой около 1 Гц.

В работе [131] было предложено использовать МНЧ в качестве медиаторов, преобразующих энергию негреющего (до 1 кГц) МП в механическую деформацию пришитых к ним лигандов и биоактивных макромолекул с целью изменения биохимических свойств последних. В работе [132] приводятся оценки сил, возникающих в макромолекулах, которые сшивают магнитные наночастицы между собой в условиях низкочастотного магнитного поля. Результаты экспериментов позволили сделать вывод о том, что причина изменения каталитической активности состоит в механическом изменении структуры макромолекулы, влекущей за собой изменения геометрии её активных центров. В [129] экспериментально показано, что физическое воздействие магнитных наночастиц на рецептор фактора роста тромбоцитов в изменяющихся во времени магнитных полях приводит к повышению регуляции экспрессии α-актина гладких мышц на уровне белка и мРНК. Авторы делают вывод в пользу доказательства концепции дистанционно управляемой, механически индуцированной дифференциации мезенхимальных стволовых клеток человека, полученных из костного мозга, которые могут иметь применение в регенеративной медицине.

1.3.6 Магнитные нанодиски – новый перспективный инструмент микрохирургии злокачественных новообразований

Для максимально радикального удаления опухоли с минимальным повреждением здоровой ткани необходим инструмент, способный находить и адресно удалять только опухолевые клетки, не повреждая при этом здоровые ткани. Создание такого инструмента возможно только с помощью

нанотехнологий, использующих наноматериалы с уникальными электронными, оптическими и магнитными свойствами.

Одним из наиболее перспективных хирургических инструментов для разрушения клеток злокачественных опухолей могут стать магнитные диски [133], выполняющие функцию наноскальпеля. Наноскальпель – магнитный диск с прикрепленным к ней узнающим лигандом, аффинным опухолевой клетке, благодаря чему диск способен избирательно связываться с опухолевой клеткой (или входить в нее) и разрушать ее под влиянием переменного магнитного поля.

Наноразмерный хирургический инструмент для удаления/разрушения опухоли (наноскальпель) включает в себя, как минимум, два компонента (Рис.2). Первый компонент (собственно сам наноскальпель) обладает способностью под влиянием внешних сил повреждать опухолевую клетку, индуцируя процессы ее гибели. Второй компонент выполняет функцию распознающего элемента и взаимодействует с опухолевой клеткой, осуществляя, таким образом, контакт наноскальпеля с опухолевой клеткой.

Рисунок 2 – Принципиально возможные схемы устройства, воздействия и применения наноскальпеля

Появление дисков для разрушения опухолевых клеток связана с тем, что эффективность суперпарамагнитных наночастиц осуществлять деструкцию опухолевых клеток достигла своего предела [77], вследствие того, что величина магнитного отклика суперпарамагнитных частиц, необходимая для биомедицинских применений, ограничена их размерами, так как выше суперпарамагнитного предела наночастицы агрегируют [132], а эффективность наноскальпеля, наоборот, с увеличением магнитного момента наночастицы возрастает [77; 133].

Магнитные микро- и нанодиски характеризуются высокой намагниченностью насыщения и отсутствием остаточной намагниченности, что облегчает дистанционное манипулирование частицами с помощью магнитного поля, позволяет избежать проблемы агломерации дисков, делает диски, таким образом, идеальными магнитомеханическими приводами для нарушения целостности раковых клеток [134].

1.3.6.1 Свойства магнитных нано- и микродисков

Для деструкции опухолевых клеток используют 4 типа магнитных дисков – синтетические антиферромагнитные SAF и P-SAF, вихревые Py [65] и трехслойные системы немагнетик /ферромагнетик/немагнетик. В качестве ферромагнитной начинки в этих дисках использован никель по причине его ярко выраженных магнитострикционных свойств в сочетании с небольшой константой кристалло-графической анизотропии [135] (Рис.3). Предполагается, что данные частицы могут быть использованы для терапии опухолей [136; 137].

Первый тип синтетических антиферромагнитных дисков (SAF) состоит из двух ферромагнитных слоев, разделенных немагнитным слоем. Магнитные слои становятся обменно-связанными и ведут себя как единые магнитные моменты с противоположными направлениями намагниченности,

компенсируя друг друга. При приложении внешнего магнитного поля магнитные моменты ориентируются в одном направлении, достигая насыщения. Синтетические антиферромагнитные частицы SAF обладают уникальными магнитными свойствами [138-140]. Толщина и материал немагнитной прокладки управляют обменной связью между ферромагнитными слоями, что приводит к намагничиванию этих слоев в противоположных направлениях, в результате получается структура с нулевой суммарной намагниченностью, которая легко переключается во внешнем поле. Изменяя толщину слоев, составляющих SAF, и, следовательно, получая магнитную восприимчивость, можно контролировать дисперсию частиц в растворе [141; 142]. Диски P-SAF аналогичны дискам SAF, однако их намагниченность перпендикулярна плоскости диска [143].

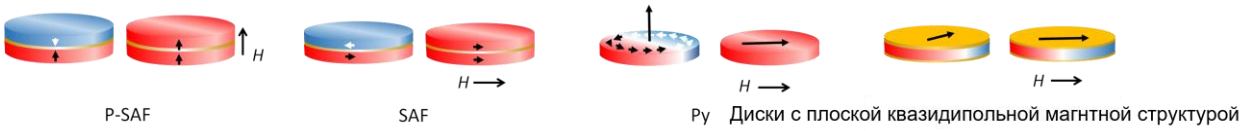


Рисунок 3 – Магнитные диски, используютщиеся для разрушения опухолевых клеток: синтетические антиферромагнетики P-SAF и SAF, вихревые Py и трехслойные системы с плоской квазидипольной магнитной структурой P-SAF: Out-of магнитные моменты плоскости. Отсутствие намагничивания. При значении H диск намагничивается с отклонением от плоскости результирующей намагниченности. SAF: Магнитные моменты в плоскости. Отсутствие намагничивания. При значении H диск намагничивается суммарной намагниченностью в плоскости. Vortex Py: магнитные моменты в плоскости. Отсутствие намагничивания. При значении H диск намагничивается суммарной намагниченностью в плоскости [144]. Диски с плоской квазидипольной магнитной структурой: магнитные моменты в плоскости. Отсутствие намагничивания. При значении H диск намагничивается суммарной намагниченностью в плоскости.

Вихревые диски характеризуются тем, что магнитные моменты закручены в плоскости диска и расположены замкнутыми кругами для минимизации магнитостатической энергии. Только в центре, в ядре вихря, магнитные моменты выходят из плоскости и направлены перпендикулярно. Эта схема вращения также характеризуется нулевой остаточной силой. При приложении внешнего магнитного поля ядро вихря смещается в плоскости диска, пока не достигнет края, где он аннигилирует, и диск становится магнитонасыщенным [145; 146].

Для того чтобы вызвать вибрацию или колебание частиц, приложенное магнитное поле должно вращаться или меняться с достаточной амплитудой, предпочтительно близкой к полю насыщения частиц. Ключевым параметром в этом случае является магнитная анизотропия частицы, которая связывает крутящий момент намагниченности с механическим крутящим моментом на частице. Диаметр и толщина магнитных дисков могут быть оптимизированы для получения необходимой конфигурации магнитного вихря [147], поскольку важно, чтобы плоская магнитная структура обеспечивала низкую остаточную намагниченность, достаточную магнитную восприимчивость для эффективного магнитного срабатывания и не вызывала агломерацию дисков [148–150].

Нано- и микродиски изготавливают методами, сочетающим в себе литографию (обычно, фотолитографию или электронно-лучевую) и физическое осаждение материала (распыление или термическое испарение) [151; 152]. Размеры дисков могут быть уменьшены путем использования последних достижений в области наноимпринтинга и литографии с глубоким УФ-излучением [153]. Методы, используемые для изготовления синтетических антиферромагнитных и вихревых дисков и дисков с плоской квазидипольной магнитной структурой позволяют строго контролировать их форму, размер и состав, что позволяет осуществлять их процесс хорошо воспроизводимым.

1.3.6.2 Биологические эффекты дисков

Фундаментальным свойством всех живых организмов является механочувствительность, которая лежит в основе экзо- и эндорецепции, контролирующей параметры внутренней и внешней среды организма. Механорецепторы управляют функциональным состоянием клетки, контролируют тканевой рост, дифференцировку стволовых клеток [154–156], апоптоз, некроз и др. Следовательно, механочувствительность клеток, в том числе опухолевых, предоставляет возможность для внешнего управления их функциональным состоянием.

Вихревые и искусственные антиферромагнитные (SAF, P-SAF) магнитные нано- и микродиски и диски с плоской квазидипольной магнитной структурой в условиях низкочастотного вращающегося или переменного магнитного поля, преобразующие магнитное поле в механическую энергию, являются перспективным инструментом для дистанционного управления функциональным состоянием клетки, в том числе для дистанционной управляемой микрохирургии. В настоящее время микро- и нанодиски с нулевой намагниченностью начали применять в экспериментах для модуляции клеточной функции при регенерации костной ткани и разрушения опухолевых клеток [145; 157].

Большой интерес к нанодискам связан с их высокой эффективностью осуществлять деструкцию опухолевых клеток. Высокая чувствительность дисков к магнитным раздражителям вызвана тем, что диски, обладая нулевой суммарной намагниченностью в отсутствие поля, в условиях слабых внешних магнитных полей приобретают высокую намагниченность [158; 159]. Kim D-H и соавт. впервые показали, что в условиях вращающегося поля вихревые диски (20:80 Fe/Ni), покрытые 5 нм Au, вызывают гибель 90% глиальных клеток *in vitro*. Впоследствии способность вихревых микродисков способствовать гибели опухолевых клеток была продемонстрирована и

другими авторами *in vitro* и *in vivo* [150; 158-161]. Вихревые нанодиски (140 нм) обладали большей эффективностью осуществлять деструкцию опухолевых клеток, чем вихревые микродиски (1 мкм) [161].

Способность стимулировать гибель опухолевых клеток в условиях магнитного поля оказалось присущей не только вихревым, но и искусственным антиферромагнитным дискам (SAF и P-SAF). При сравнении эффективности вихревых и P-SAF дисков осуществлять деструкцию опухолевых клеток Mansell и соавт. показали [162], что P-SAF диски в 5 раз более эффективны, чем вихревые.

Исследование зависимости эффективности магнитных дисков от частоты приложенного магнитного поля показало, что оптимальный эффект достигается при частотах 10 и 20 Гц (~90% гибели клеток), повышение частоты до 40 Гц снижало показатель смертности клеток до ~ 75%, а при 50 Гц смертность клеток составляла только ~ 25%, при 60 Гц эффект гибели клеток отсутствовал [145]. Влияние более низких частот (от 1 до 20 Гц) оценивали Wong *et al.* [148], которые показали небольшое увеличение летального эффекта при уменьшении частоты с ~ 80% жизнеспособных клеток при 10 Гц до ~73% жизнеспособных клеток при 1 Гц.

1.3.6.3 Механизм гибели опухолевых клеток дисками в условиях влияния магнитного поля

Гибель опухолевых клеток с помощью микро- и нанодисков может происходить в результате некроза или апоптоза. Некроз возникает в результате механического разрушения клеточной мембраны (магнитопорация) или разрушения всей клетки (магнитолиз). Для организма некроз представляет собой неблагоприятный способ деструкции опухолевых клеток, поскольку вызывает воспалительный процесс вследствие попадания лизосомальных ферментов в межклеточное пространство. Поэтому наиболее

благоприятным для организма способом гибели опухолевых клеток является апоптоз, который в раковых клетках подавлен из-за онкогенных мутаций. Апоптоз не сопровождается воспалительным процессом, поэтому все исследователи подбирали такие характеристики магнитного поля, которые стимулировали апоптоз опухолевых клеток [1457; 158]. Диски в магнитном поле вызывают некроз и апоптоз опухолевых клеток двумя путями: 1) интернализуясь в клетку или 2) воздействуя на клетку через белки клеточной мембраны.

Вход магнитных дисков в клетку осуществляется путем эндоцитоза с последующей инкапсуляцией в лизосомы. Предполагается, что разрыв лизосомальной мембраны под влиянием магнитного поля в этом случае является основной причиной гибели клеток (Рис.4). При этом интернализация дисков без влияния магнитного поля не снижает жизнеспособность опухолевых клеток. Процесс интернализации дисков начинается с их воздействия на клеточную мембрану, возможно, связываясь с мембранными белками, которые содержат множество функциональных групп, способных реагировать с поверхностью дисков. Интернализованные в клетке диски накапливаются в лизосомах, содержащих гидролитические ферменты. Количество вошедших в клетку дисков зависит от их размеров. Как показали исследования, в среднем каждая клетка накапливает 10 микродисков или 100 нанодисков. Расчет показал, что масса поглощенного клеткой пермаллоя ($Ni80/Fe_20$) в составе нанодисков почти на два порядка ниже по сравнению с массой пермаллоя, поглощенного в составе микродисков, при этом количество магнитомеханических приводов выше в 10 раз. Таким образом, при большем биологическом эффекте нанодиски проявляют меньшую токсичность.

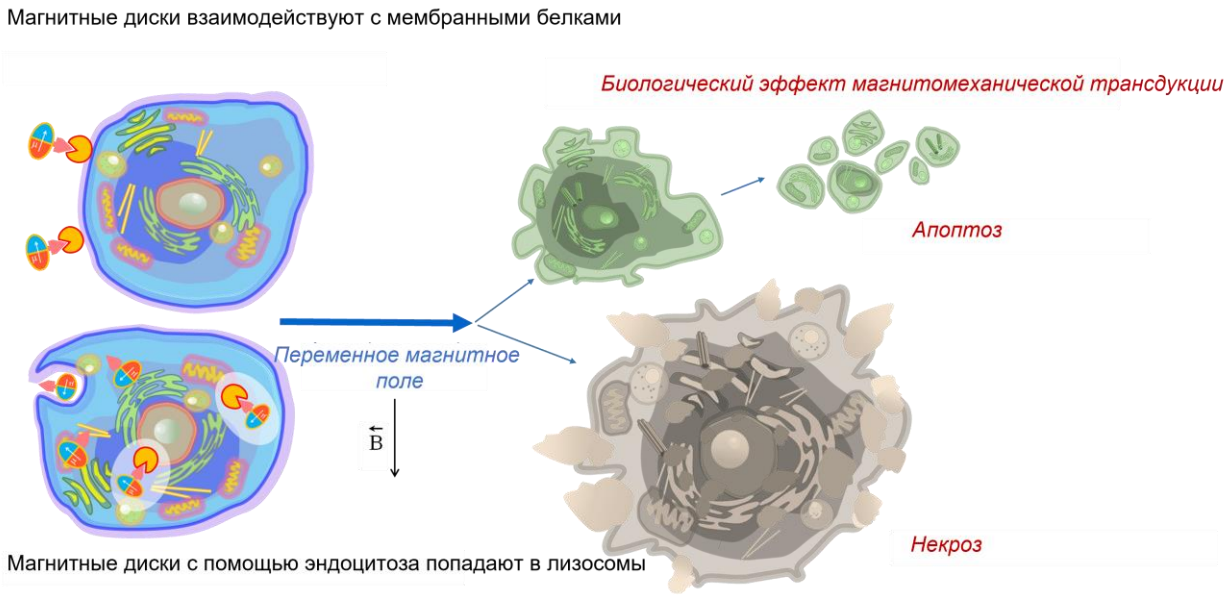


Рисунок 4 – Биологические эффекты магнитомеханической трансдукции.

Воздействие дисков на клеточную мембрану опухолевых клеток так же, как при интернализации их в клетку, осуществляется, благодаря их связыванию с мембранными белками. Такой путь воздействия магнитных дисков на опухолевые клетки запускает программируемую клеточную гибель – апоптоз [163; 164]. Связывание дисков с клеточной мембраной осуществляется благодаря их функционализации распознающими молекулами – антителами или аптамерами. В частности, в работе [158] для функционализации дисков были использованы антитела к карбоангидразе CA9, которая сверхэкспрессируется на клеточной поверхности солидных опухолей. Воздействие функционализированных анти-CA9, магнитных дисков под влиянием магнитного поля в течение 1 ч вызывало апоптоз у 70% опухолевых клеток [158]. Другие авторы с помощью функционализированных магнитных дисков антителами к IL13α2R изменяли гомеостаз катионов кальция в опухолевых клетках, стимулируя апоптоз. В данном случае стимуляция клеточных механочувствительных рецепторов колеблющимися дисками вызывала растяжение клеточной мембраны, что

приводило к повышению внутриклеточного уровеня катионов кальция [164]. Предположительно, ключевую роль в управлении функциональным состоянием внешних магнитных полей играет реагирующий на внешние или внутренние физические стимулы цитоскелет, ответственный за клеточную механическую передачу сигнала, регуляцию формы клетки и ее миграцию [165]. Принципиальная схема воздействия магнитных нанодисков на белки клеточной мембраны представлена на рис.5.

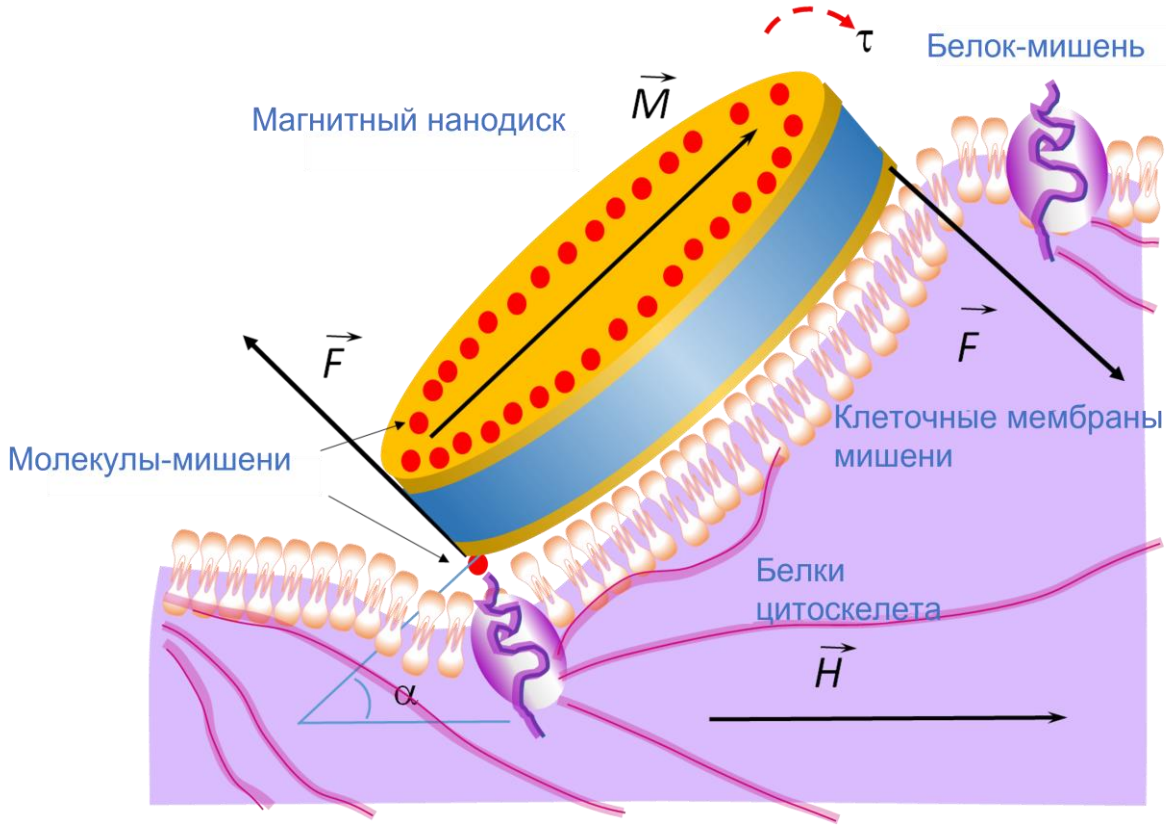


Рисунок 5 – Принципиальная схема дистанционного управления функциональным состоянием клетки-мишени путем воздействия магнитных дисков на мембранные белки в условиях переменного/вращающего магнитного поля

1.3.6.4 Биологический эффект магнитных дисков *in vivo*

Биологический эффект магнитных дисков в условиях влияния магнитного поля, наблюдаемый *in vitro*, зачастую отличается от такового в условиях *in vivo*. Это объясняется тем, что диски, попадая в кровь, оказываются в сложной многокомпонентой среде, параметры которой отличны от условий клеточного культивирования. По этой причине для достижения требуемого биологического эффекта магнитных дисков необходимо рассмотрение поведения дисков не только на уровне клеток, но и в кровеносном русле, и в опухолевой ткани. Анализ литературы, проведенный S. Wilhelm и соавт. [166], показал, что только 1% наночастиц, введенный в организм, попадает в клетки солидной опухоли, в то время, как основная масса наночастиц накапливается в печени, селезенке и легких [166; 167]. Наночастицы небольших размеров выводятся почками, лимфатическими узлами и кожей. Однако биосовместимость магнитных частиц и их адресная доставка в опухолевую ткань увеличивается, благодаря их функционализации аптамерами [168].

В кровеносном русле анизотропные магнитные диски, движущиеся в потоке крови, из-за инерционных и гидродинамических сил проявляют склонность отклоняться к стенке сосуда и осуществлять боковой дрейф по линиям тока к эндотелию [169]. С большой вероятностью это приводит к адгезии частиц на эндотелии рядом с местом опухоли, что будет способствовать их диффундированию из кровеносного сосуда в опухолевую ткань согласно «эффекту повышенной проницаемости и удерживания (EPR)» в опухоли. Опухолевая ткань имеет измененные сосуды нм [166] (Рис.6). Для опухолевых первичных сосудов характерны истончение или сжатие эндотелиальных клеток, деградация базальных мембран и отслоение перицитов. В результате этих структурных изменений опухолевые сосуды становятся высокопроницаемыми не только для небольших молекул, но и для

крупных белков плазмы. Такие сосуды нестабильны и со временем дифференцируются на сосуды гломерулоидной микроваскулярной пролиферации, сосудов с мальформацией и капилляров. В механизме экстравазации межэндотелиальных клеток магнитные диски транспортируются через щели диаметром 100–500 нм [160].

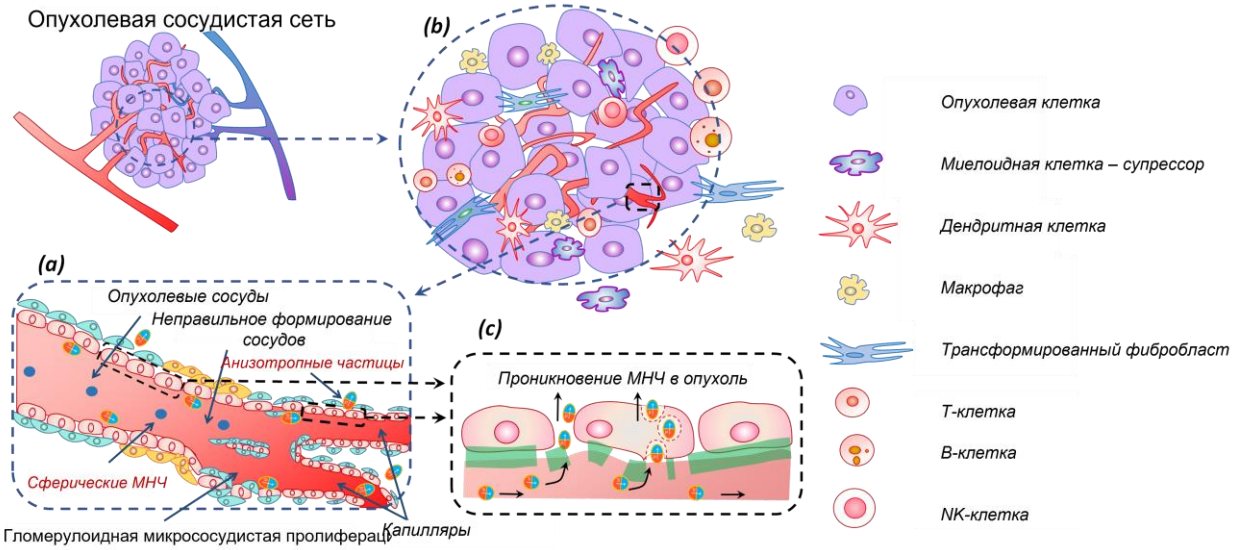


Рисунок 6 – Опухолевые сосуды. *(a)* Транспорт магнитных анизотропных дисков и сферических магнитных наночастиц по трансформированным сосудам опухоли. Анизотропные магнитные диски передвигаются по периферии сосуда, что приводит к более сильному взаимодействию частиц со стенкой сосуда и способствует их трансмиграции в опухоль. Сферические частицы передвигают в центральной части сосудистого русла. *(b)* Структура опухоли (опухолевые и иммунные клетки) указывает на необходимость адресного разрушения опухолевых клеток с помощью нацеливающих молекул. В качестве нацеливающей молекулы более предпочтительны аптамеры, которые за счет своих небольших размеров способны переносить магнитные наночастицы в солидные опухоли с высокой плотностью. *(c)* Магнитные нанодиски способны проходить в опухоль через поврежденную базальную мембрану двумя способами: через эндотелиальные клетки и просветы между ними.

Анизотропная форма магнитной частицы будет способствовать лучшему проникновению в опухоль [170], поскольку анизотропные частицы генерируют колебания за счет гидродинамических или магнитных сил, что приводит к более сильному взаимодействию частиц со стенкой сосуда и способствует их трансмиграции в опухоль [144; 171]. Белки плазмы увеличивают вязкость крови и замедляют кровоток, в результате чего наночастицы внутри сосудов опухоли имеют тенденцию двигаться медленно или застаиваться. Это дает наночастицам достаточно времени, чтобы диффундировать из сосуда во внеклеточный матрикс опухоли. Важным условием для магнитных частиц является их размер, они должны быть достаточно маленькими, чтобы не закупоривать микрокапилляры крови и, таким образом, проходить через поры кровеносных сосудов и диффундировать в ткани [172].

1.3.6.5 Модификация и функционализация дисков

Стабильность магнитных частиц в суспензии зависит от гидрофобно-гидрофильных сил и сил Ван-дер-Ваальса. Магнитные диски имеют большую величину отношения площади поверхности к объему, что является причиной образования из них кластеров микрометрового размера из-за гидрофобных взаимодействия и притягивающих сил Ван-дер-Ваальса [144]. Для снижения образования кластеров используют модификацию поверхности поверхностно-активными веществами, природными диспергаторами, органическими красителями или полимерами, делающими магнитные частицы более стабильными в биологических средах [167]. Диспергируемость магнитных частиц улучшают диоксид кремния и золото [173; 174]. Однако использование немагнитных материалов для покрытия магнитных частиц может привести к снижению насыщения намагничивания. Для оптимизации характеристик дискообразных магнитных частиц

необходимо искать компромисс между модификацией поверхности и сохранением магнитных свойств [139].

Стабильность магнитных дисков увеличивается также благодаря их функционализации, способствующей адресному воздействию на патологическую мишень – опухолевую клетку. Кроме того, для снижения побочных эффектов необходимо, чтобы магнитные частицы входили только в опухолевые клетки. Для достижения такого эффекта важно, чтобы магнитные частицы были функционализированы лигандами, специфичными только к опухолевыхм клеткам. Хорошо известно, что раковые клетки сверхэкспрессируют определенные мембранные рецепторы. В частности, рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGFR), рецепторы трансферрина, интегрины и др. Кроме того, оптимизация целевого биораспределения магнитных дисков *in vivo* будет определяться местным кровотоком, pH, организацией сосудистой сети и внеклеточного матрикса.

Следовательно, для повышения эффективности доставки магнитных дисков к опухоли необходимо специфическое нацеливание с помощью лигандов, комплементарных сайтам-мишеням, которыми могут быть перитуморальные и внутриопухолевые кровеносные сосуды, внеклеточный матрикс, опухолевые клетки или внутриклеточные мишени, тогда как при неспецифическом (пассивном) нацеливании поверхность наночастиц покрывается только стабилизирующими агентами. Очевидно, что функционализация магнитных частиц аффинными к опухолевым клеткам лигандами будет увеличивать накопление магнитных частиц в опухоли. В качестве специфических лигандов использованы антитела или аптамеры.

1.3.7 Механизмы проявления токсического эффекта МНЧ

В настоящее время наиболее популярными исследованиями биосовместимости МНЧ являются исследования *in vitro*, несмотря на то, что

в условиях организма МНЧ могут вести себя иначе [174; 175], поскольку кровь, куда попадают биомагнитные НЧ, представляет собой сильно ионизированную гетерогенную среду [62]. Поэтому при попадании в кровь МНЧ могут (1) слипаться; (2) менять свои магнитные свойства; (3) вступать в реакции с протеинами плазмы, межклеточным веществом и клетками, не являющимися целью их доставки.

Одним из основных факторов, определяющих биосовместимость МНЧ и их время циркуляции в плазме, является опсонизация, зависящая от: (1) гидрофобности МНЧ [176]; (2) заряда МНЧ; (3) размера и формы МНЧ [177; 178]. Опсонизированные МНЧ удаляются из кровотока в течение нескольких минут. 80-90% опсонизированных МНЧ попадает в печень, 5-8% – в селезенку, 1-2% – в костный мозг. Снижение опсонизации МНЧ достигается путем придания наночастицам гидрофильности. Гидрофильные и нейтральные МНЧ не распознаются макрофагами и имеют большее время циркуляции в плазме.

Следующим ограничивающим фактором использования МНЧ на уровне организма является наличие барьеров при их переходе из кровеносных сосудов в лимфатическую систему и ткани [179], а также при входе в клетки [180]. Тип, структура и геометрия МНЧ определяет эффективность преодоления этих барьеров [180]. Гидродинамические размеры МНЧ влияют на распределение МНЧ внутри кровеносных сосудов, механизм вывода частиц из организма и пути преодоления биологических барьеров. Уменьшение размеров сферических частиц приводит к увеличению их концентрации в центре кровеносных сосудов и уменьшению их взаимодействия со стенками сосудов, что увеличивает время циркуляции МНЧ в крови [167]. Гидродинамический размер влияет на вывод частиц из организма [62]: малые частицы (менее 20 нм) выводятся почками, частицы средних размеров (30-150 нм) накапливаются в костном мозге, сердце, почках и желудке, крупные частицы (150-300 нм) накапливаются в печени и

селезёнке. Влияние формы частиц на время их циркуляции в организме представлено в ряде исследований [181].

Наиболее биосовместимыми являются наночастицы на основе железа [182; 183], поскольку железо в организме легко деградирует. Кроме того, на токсичность и биосовместимость оказывают воздействие способы введения МНЧ в организм. В частности, интраназальное введение МНЧ вызывает морфологические изменения, активацию и пролиферацию микроглии в обонятельной луковице, гиппокампе и стриатуме [181], острое пероральное введение МНЧ приводит к ингибированию ацетилхолинэстеразы, Na^+-K^+-pump, а также Mg^{2+}- и Ca^{2+}-ATPase у крыс [181]. Существенным фактором, определяющим биосовместимость МНЧ, является их покрытие [184].

МНЧ могут способствовать развитию таких токсических эффектов, как окислительный стресс, эмбриотоксичность, мутагенность, генотоксичность, эмболия сосудов вследствие агломерации МНЧ в кровотоке, активация иммунной системы, воспалительные процессы [185], изменение морфологии клеток, нарушение клеточной сигнализации и дифференцировки стволовых клеток, повреждение цитоскелета. Механизмы токсического эффекта МНЧ до конца не ясны.

Одним из наиболее вероятных механизмов токсичности является окислительный стресс [25; 72; 186-188], причиной которого является образование активных форм кислорода (ROS) в реакции Фентона $Fe^{2+} + H_2O_2 = Fe^{3+} + OH^{\cdot} + OH^-$ при взаимодействии магнетита с клетками [26; 189]. Ионы железа образуются в клетке при разложении магнетита в лизосомах, а образовавшиеся гидроксильные радикалы могут вступать в нежелательные реакции с ДНК, белками, полисахаридами и липидами.

Кроме того, активные формы кислорода (АФК) могут быть сгенерированы с поверхности МНЧ путем выщелачивания ионов металлов или высвобождения окислителей путем ферментативной деградации МНЧ. Накопление АФК разрушает клеточные белки, ферменты, липиды и

нуклеиновые кислоты и, как следствие, способствует нарушению клеточных процессов, приводящему к апоптозу и некрозу [191–193]. АФК могут нарушать активность митохондрий, изменять мембранный потенциал и вызывать морфологические изменения в митохондриях, что может оказывать неблагоприятное воздействие на жизнеспособность, пролиферацию и метаболическую активность клеток [26]. Активные формы кислорода супероксид-анион $O^{2\cdot-}$, гидроксил-радикал, синглетный кислород, при взаимодействии с компонентами ДНК приводят к нарушению их структуры [192].

В *in vitro* исследованиях установлено, что наночастицы с сильными окислительными (CeO_2, Mn_3O_4, Co_3O_4) или восстановительными (Fe_0, Fe_3O_4, Ag_0, Cu_0) свойствами могут быть цитотоксичными и генотоксичными по отношению к своим биологическим мишеням. Одним из основных источников токсичности является электронный и/или ионный перенос, возникающий в процессе окисления-восстановления, растворения и каталитических реакций либо внутри кристаллической решетки наночастиц, либо при выходе в культуральную жидкость [195].

МНЧ могут изменять клеточный метаболизм, в частности, увеличивать секрецию IL-1β, IL-6 и TNF-α в первичной микроглии крысы [196], уменьшать секрецию IL-1β, но не TNF-α в первичной микроглии мыши [197]. В клеточной линии BV2 МНЧ вызывали кратковременное увеличение продукции NO [181]. Данные о токсичности МНЧ на нейроны противоречивы [195]. Показано, что воздействие высоких концентраций МНЧ нарушает метаболизм глюкозы [198], изменяет экспрессию генов, связанных с метаболизмом органических кислот (OAs) и аминокислот (AA) в клетках HEK293 [188].

МНЧ могут повреждать цитоскелет, нарушать целостность клеточных мембран или нативные цепи транспорта ионов и электронов [195], в результате чего в клетках, подвергнутых воздействию суперпарамагнитных

наночастиц оксида железа, могут ослабевать функции митохондрий, активироваться воспалительные процессы, стимулироваться апоптоз, происходить утечка биологически активных молекул через клеточную мембрану, активироваться генерация активных форм кислорода, увеличиваться количество микроядер (что свидетельствует о повреждении хромосом и является показателем генотоксичности), а также происходить конденсация хромосом [189].

1.3.8 Аптамеры увеличивают биосовместимость магнитных наночастиц

Одним из наиболее важных факторов, увеличивающих биосовместимость магнитных наночастиц, является их функционализация, поскольку она: (1) препятствует опсонизации магнитных частиц; (2) изменяет заряд и форму МНЧ; (3) экранирует ионы Fe, вызывающие окислительный стресс; (4) снижает иммунотоксичность; (5) приводит к накоплению МНЧ только в нужных органах, обеспечивая адресное связывание магнитных частиц только с молекулярными мишенями; (6) снижает риск тромбоза вследствие предотвращения агломерации МНЧ в кровотоке.

В качестве целевых лигандов с функциональными свойствами используют пептиды, аптамеры, антитела, полисахариды и небольшие молекулы в виде кислот [92]. Лиганды придают МНЧ новые свойства, увеличивают время их циркуляции в крови и способствует их адресной доставке к патологическому очагу. Наиболее перспективными лигандами для функционализации МНЧ и увеличения биосовместимости являются аптамеры.

Критерием биосовместимости исследуемых материалов, в том числе МНЧ считается выживаемость более 80% клеток после их воздействия. При исследовании биосовместимости этот критерий был использован для оценки

токсичности магнитных наночастиц [199]. Одним из наиболее важных факторов токсичности МНЧ является их концентрация [189; 200–203]. Показано, что НЧ магнетита в концентрации 50 мкг/мл, как непокрытые, так и покрытые декстраном, вызывали клеточную смерть и сокращали пролиферацию фибробластов [76]. В то время, как МНЧ SiO_2 с такими же размерами, но в меньших концентрациях, не вызывали токсичности in vivo, проникали через ГЭБ, были обнаружены во всех тканях и сохранялись в организме в течение длительного времени. Такие же данные о пороге токсичности МНЧ были получены и в других исследованиях, показавших, что МНЧ, использованные в концентрации 60 мкг/мл проявляли цитотоксичность и снижали выживаемость клеток [204].

Аптамеры существенно увеличивают порог токсичности. Показано, что магнитные наночастицы, функционализированные аптамерами, даже при высокой (100-200 мкг/мл) концентрации не проявляли цитотоксичности *in vitro* и *in vivo* [69; 205; 206]. Более того, аптамеры способствовали снижению цитотоксичности наночастиц на основе PbS. В частности, показано, что наночастицы, функционализированные аптамерами, не изменяли жизнеспособность клеток *in vitro*, тогда как нефункционализированные наночастицы на основе ацетата свинца проявляли ярко выраженный цитотоксический эффект [207].

1.3.9 Распределение магнитных наночастиц в организме

Экспериментально показано, что около 40% МНЧ удаляются из системного кровообращения уже в первые 24 часа, в том числе с мочой. Распределение МНЧ в органах и тканях напрямую зависит от размера частиц. МНЧ размером более 100 нм преимущественно накапливаются в печени и селезенке [208], МНЧ размером 50 нм *in vivo* проникают через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) и накапливаются в головном мозге

[181; 209], локализуясь в нейронах, астроцитах и макрофагах [210]. Однако больше всего МНЧ накапливаются в печени, селезенке, почках, сердце и опухоли, меньше – в легких и яичках [100; 210] (Рис.7). Накопление МНЧ в тканях происходит не только само по себе, но и вследствие их поглощения макрофагами, с которыми они поступают в печень, селезенку, легкие и костный мозг [211]. МНЧ ZnO, независимо от размера частиц, накапливаются в печени, легких и почках [183].

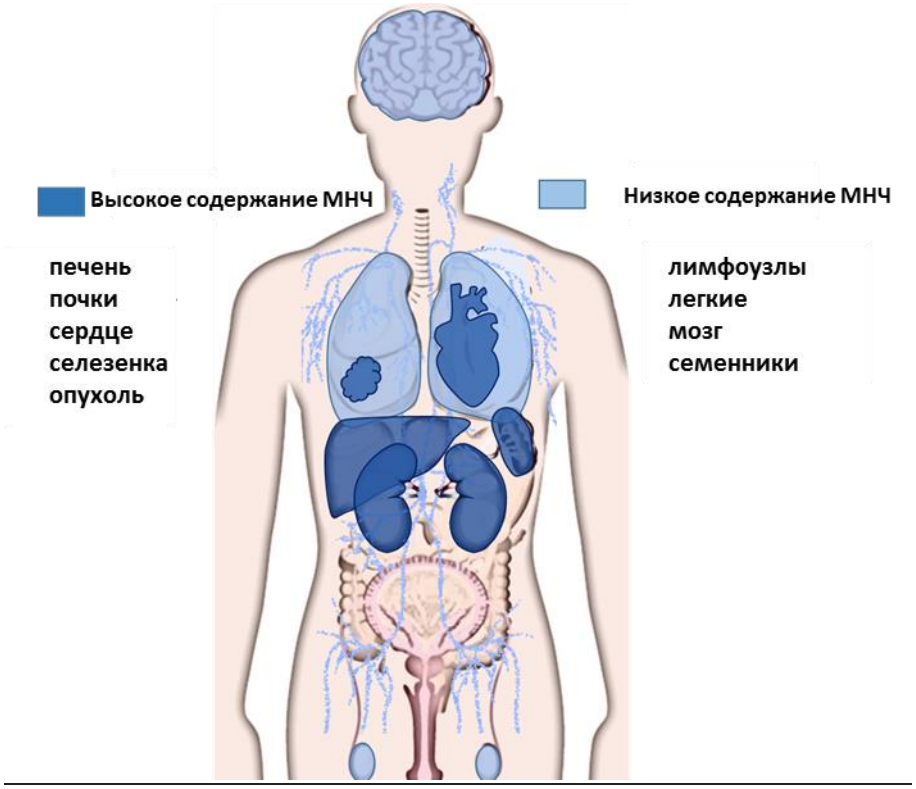


Рисунок 7 – Распределение магнитных наночастиц в органах и тканях. Высокая концентрация МНЧ накапливается в печени, почках, селезенке, сердце и опухолях. Более низкие концентрации МНЧ наблюдаются в головном мозге, легких, лимфатических узлах и яичках [190].

Окончательное распределение наночастиц оксида железа выглядит следующим образом: 80-90% – печень, 5-8% – селезенка и 1-2% – костный мозг. Долгосрочные исследования *in vivo* на мышиной модели показали, что

наночастицы, покрытые DMSA, накапливаются в селезенке, печени и легких в течение длительного времени (по меньшей мере, до 3 месяцев) без каких-либо существенных признаков токсичности. В течение этого времени наночастицы подвергаются процессу биотрансформации путем уменьшения размера или агрегации частиц, или и того, и другого. Низкие дозы магнитных наночастиц быстро метаболизируются [206]. Аптамеры существенно изменяют распределение МНЧ, поскольку они адресно доставляются за счет аптамеров только к своим молекулярным мишеням.

1.3.10 Биодеградация и выведение магнитных наночастиц

МНЧ поглощаются клетками, в основном, путем эндоцитоза. Эндосомы, содержащие МНЧ, попадают в лизосомы, где разрушаются с помощью множества гидролитических ферментов, таких как лизосомальный катепсин L. МНЧ, функционализированные аптамерами, подвергаются биодеградации так же, как и нефункционализированные магнитные наночастицы. Аптамеры могут быть гидролизованы под влиянием нуклеаз плазмы крови или нуклеаз лизосом. В кислой среде лизосом железо высвобождается из МНЧ и восстанавливается. Ионы двухвалентного железа транспортируются в цитозоль [212]. В цитозоле ионы железа связываются с различными белками, участвующими в окислении, хранении и транспорте железа [213; 214]. В метаболизме железа в цитозоле участвует не менее 5-ти белков (Рис.9), экспрессия которых в присутствии МНЧ увеличивается: ферритин L, ферритин H, ферропортин, DMT1 и трансферрин [212]. Сверхэкспрессия генов, кодирующих ферритин L и ферропортин происходит уже на 3-й день и прогрессивно возрастает в соответствии со скоростью деградации МНЧ, без изменения экспрессии гена ферритина H и гена двухвалентного металлического транспортера 1 [173; 174].

В цитозоле железо может быть использовано для синтеза железосодержащих белков, в частности, гема в митохондриях [215], экспортировано из клетки трансмембранным транспортером (ферропортином). МНЧ вызывают увеличение экспрессии ферритина и транспорта железа в макрофагах и повышение уровня ферритина в эндотелиальных клетках [215] (Рис.8). Вне клетки железо окисляется и транспортируется в кровь в комплексе с трансферрином в те органы, где клетки имеют рецептор трансферрина на клеточной мембране: гепатоциты в печени, эритробласты в костном мозге и эритроциты [173].

В почках происходит постоянная фильтрация железа и последующая его реабсорбция в петлях Генле. МНЧ быстро поглощаются эндотелиальными клетками и макрофагами печени, селезенки и атеросклеротических поражений после внутривенной инъекции. Большая часть суперпарамагнитного железа МНЧ разлагается в течение 30 дней. Загрузка железа с помощью МНЧ индуцирует дифференциальную реакцию механизмов клеточного гомеостаза железа с увеличением ферритина и белков транспорта железа в макрофагах и увеличением ферритина в эндотелиальной системе.

Массовая биодеградация магнитных наночастиц происходит в течение месяца благодаря связыванию с ферритином и не влияет на клеточный гомеостаз железа [213; 216-218]. На биодеградацию МНЧ не влияет их размер. Деградация происходит по механизму «все или ничего», наночастицы либо полностью растворяются, либо остаются нетронутыми. Структурные и магнитные свойства оставшихся наночастиц после процесса разложения значительно отличаются от свойств исходной суспензии. На кинетику деградации влияют pH, покрытие и средний размер частиц наночастиц [219].

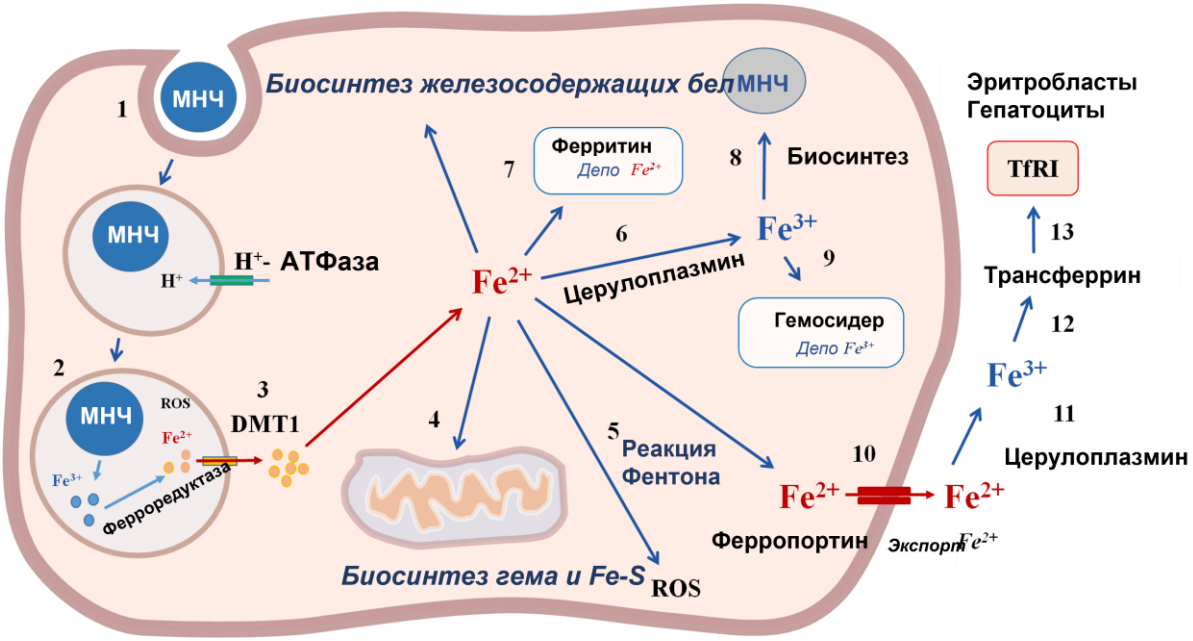


Рисунок 8 – Механизмы включения и биодеградации магнитных наночастиц железа в клетке. 1 – включение МНЧ с помощью эндоцитоза; 2 – деградация МНЧ и восстановление железа ферредуктазой; 3 – перенос Fe^{2+} через мембрану с переносчиком двухвалентного металла ДМТ1; 4 – транспорт Fe^{2+} в митохондрии для биосинтеза гема и Fe-S; 5 – образование АФК в реакции Фентона; 6 – окисление Fe^{2+} церулоплазмином до Fe^{3+}; 7 – отложение Fe^{2+} с ферритином; 8 – биосинтез клеточных МНЧ; 9 – отложение Fe^{3+} гемосидерином; 10 – экспорт Fe^{2+} из клетки с ферропортином; 11 – окисление Fe^{2+} церулоплазмином до Fe^{3+}; 12 – связывание с трансферрином; 13 – поступление трансферрина в клетки, которые содержат рецепторы трансферрина TfR1 на клеточных мембранах, в частности, эритробластов и гепатоцитов [190].

Таким образом, магнитные наночастицы – один из самых перспективных инструментов наномедицины, которые используются в качестве эффективных диагностических и терапевтических средств. МНЧ потенциально токсичны, поскольку они накапливаются в печени, селезенке,

почках и других тканях, а также проходят через ГЭБ. Аптамеры увеличивают биосовместимость МНЧ и снижают их токсичность, поскольку они биосовместимы, высокоаффинны, высокоспецифичны, неиммуногеннны, легко биодеградируемы (Рис.9).

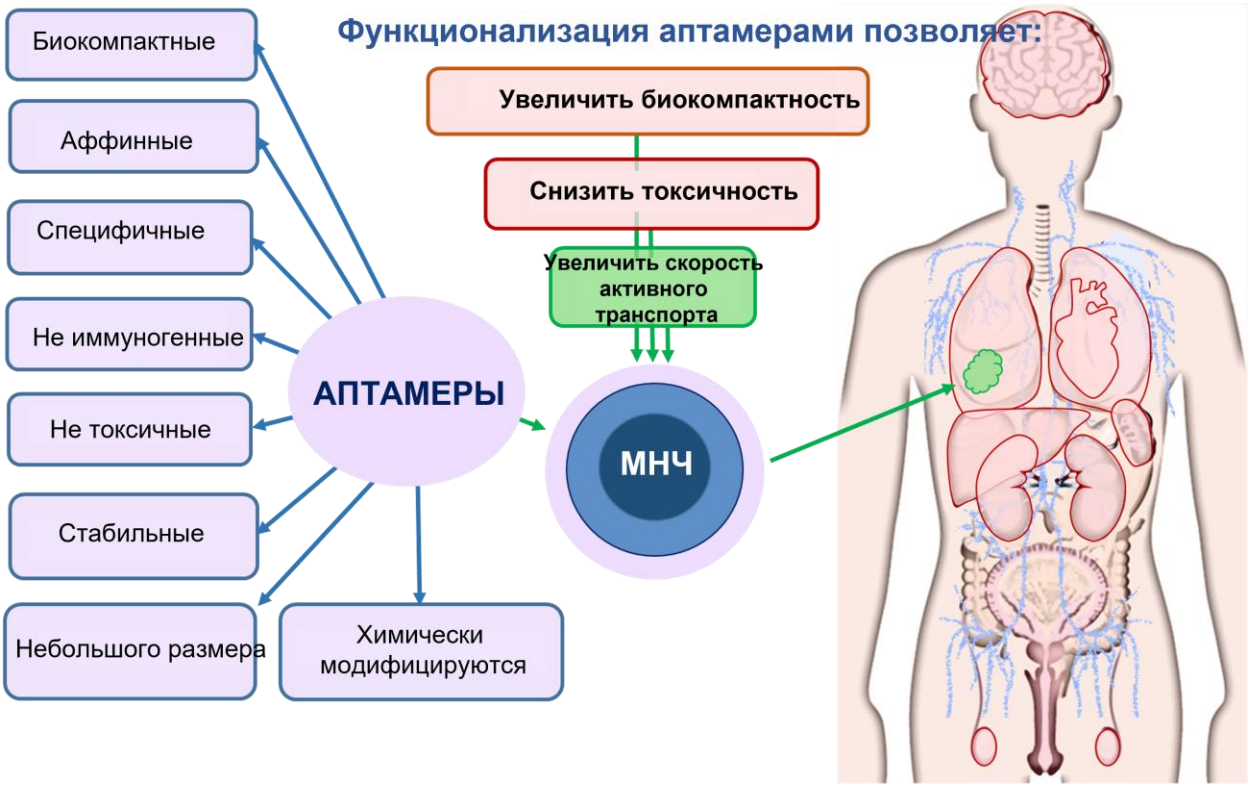


Рисунок 9 – Свойства аптамеров, увеличивающие биосовместимость магнитных наночастиц [190].

ГЛАВА 2 ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе использовались следующие материалы и реактивы: буфер Хенкса (Sigma-Aldrich, USA); ТЕ-буфер (SigmaAldrich, USA); dNTP (Promega INC., USA); прямой праймер (F4) (Promega INC., USA), меченный Alexa-488 (Promega INC., USA); обратный праймер (R4) (Promega INC., USA); MgCl2; ДНК-библиотека N80, меченная флуоресцентной меткой Alexa-488 (Promega INC., USA); маскирующая ДНК (Salmon sperm DNA) (Promega INC., USA); Yeast RNA; набор для клонирования «M13mp18 Perfectly Blunt Cloning Kit»; Taq-полимераза (Promega INC., USA); вода без нуклеаз (Promega INC., USA); PBS-буфер (Sigma-Aldrich, USA); DPBS-буфер (Sigma-Aldrich, USA); агароза (Sigma, USA); DMEM; AcNH4; 0,8M LiCl; 0,2M NaCl; 0,3M AcONa; синтетические ДНК-аптамеры асцитным клеткам карциномы Эрлиха, питательная среда LB; агар; cut off фильтры Pall Centrifugal devices. Triton-X100 (Sigma-Aldrich, USA); Annexin V Alexa Fluor® 488 (Invitrogen Corporation, USA); CellTrace™ Far Red DDAO-SE (Invitrogen Corporation, USA); FBS; PI (Sigma-Aldrich, USA); SYTO (Sigma-Aldrich, USA); Трис-ClO_4 буфер (pH 8.6); Hoechst 33342; золотые наночастицы Au-НЧ; трехслойные (Au/Ni/Au) магнитные нано- и микродиски; магнитные наночастицы, покрытые золотом; ферроарабиногалактаны.

Исследования проведены с использованием следующего оборудования: проточный цитометр Beckman Coulter Cytomics FC 500; флуоресцентный микроскоп Olympus BX 41; Olympus Fluoview 10vi (Olympus Optical Co., Япония); Nanodrop 2000 Thermoscientific; вакуумная центрифуга ScanVac VacSafe 15 (LaboGene ApS, Denmark); гельдокументирующая система GBOX/EF2-E; камера для горизонтального электрофореза; амплификатор; масс-спектрометр Orbitrap; флуоресцентный микроскоп Carl Zeiss Axiostar plus, Microm HM 650V и др.

Исследования выполнены на базе Лаборатории биомолекулярных и медицинских технологий ФГБОУ ВО КрасГМУ им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого и Лаборатории цифровых управляемых лекарств и тераностики КНЦ СО РАН. Часть исследований была проведена в центре Ядерной медицины ФМБА России и Университете Оттавы (Оттава, Канада). Все манипуляции с животными проводили в строгом соответствии с рекомендациями «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health», одобренными этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого.

2.1 Объект исследования

Объектом для селекции аптамеров к опухолевым клеткам экспериментальных животных стали клетки асцитной карциномы Эрлиха, выделенные из брюшной полости мышей линии ICR на 9 сутки после их внутрибрюшинной трансплантации. Клетки крови, ткани печени, почек и селезенки выделяли у мышей без опухоли.

2.2 Аптамеры, ДНК-библиотека и праймеры

Одноцепочечная библиотека ДНК-аптамеров, длина которых составляла 80 нуклеотидов, имела в своей центральной рандомизированной части 40 нуклеотидов (N40), ограниченных с обеих сторон сайтами гибридизации для праймеров длиной 20 нуклеотидов (5’-CTCCTCCTGTGATAACCACG-(N)40-GCATAGGTAGTCCAGAAGCC-3‘).
Праймеры для 5’-конца помечены флуоресцентным красителем Cy3 или FAM (5’-/метка /CTCCTCCTGTGATAA CCACG-3), немеченые для 3’ (5’-

GGCACTTTCTGG ACCTAT GC-3‘) использовали в ПЦР для синтеза одноцепочечной ДНК в асимметричной ПЦР при селекции аптамеров. Немеченые 5’- и 3’-праймеры использовали для ПЦР в целях получения двухцепочечной ДНК в процессе симметричной ПЦР и при клонировании. Праймер для 5’-конца, меченный биотином, использовали в ПЦР при получении аптамеров и библиотеки, меченных биотином.

Синтетические аптамеры были произведены в Integrated DNA Technologies (Iowa, USA).

2.3 ПЦР-амплифкация

Для симметричной ПЦР использовали 5 мкл аптамеров в ТЕ буфере и 45 мкл реакционной смеси, содержащей: 1Х ПЦР буфер, 2,5 мМ $MgCl_2$, 0,025 Ед/мкл KAPA2G HotStart Robust polymerase (KAPABiosystems, USA), 220 мкМ dNTP, 300 нМ обратного праймера (5′-GGCTTCTGGACTACCTATGC-3′) и 300 нМ прямого праймера (5′-CTCCTCTGACTGTAACCACG-3′). При проведении асимметричной реакции ПЦР концентрация прямого праймера была в 20 раз выше, чем обратного. Для реакции брали 45 мкл асимметричной ПЦР-смеси и 5 мкл симметричного ПЦР-продукта: 1Х ПЦР буфер, 2,5 мМ $MgCl_2$, 0,025 Ед/мкл KAPA2G HotStart Robust polymerase, 220 мкМ dNTP, 1 мкМ прямого праймера с меткой или без метки (5′-/метка/CTCCTCTGACTGTAACCACG-3′) и 50 нМ обратного праймера (5′-GGCTTCTGGACTACCTATGC-3′).

Режим амплификации: предварительный нагрев 2 минуты при 95°С, затем 15 циклов – 30 секунд при 95°С, 15 секунд при 56,3°С и 15 секунд при 72°С.

2.4 Контроль селекции аптамеров

Наличие ПЦР-продукта контролировали с помощью 3% агарозного гельэлектрофореза. Концентрацию одноцепочечных ДНК-аптамеров в выбранных пулах определяли на спектрофотометре Nanodrop 2000 Thermoscientific или NanoVue plus (GE Healthcare, Life Sciences, USA). Детекцию флуоресценции одноцепочечной ДНК, меченной флуоресцентной меткой осуществляли в гель-документирующей системе GBOX/EF2-E.

2.5 Селекция аптамеров к клеткам асцитной карциномы Эрлиха

Селекцию аптамеров к клеткам асцитной карциномы Эрлиха проводили методом систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением (SELEX) из оцДНК-библиотеки аптамеров. Первый раунд начинали с библиотеки N40 (Integrated DNA Technologies, США), содержащей оцДНК, в которых центральные 40 нуклеотидов были рандомизированы и фланкированы двумя стандартными последовательностями для связывания праймеров при амплификации (5'-CTC CTCTGACTGTAACCACGN40GCATAGGTAGTCCAGAA GCC-3').

Перед каждым раундом селекции и другими экспериментами оцДНК-библиотеку или пул денатурировали в течение 5 мин при 95°C, после чего ренатурировали на льду в течение 10 мин. Все опыты с клетками проводили в бесцветном фосфатном буфере (DPBS) (Sigma-Aldrich, США) или бесцветной среде Хенкса (Sigma-Aldrich, США). В каждом раунде селекции использовали 1 млн. клеток, разведенных в фосфатном буфере.

Всего было проведено 10 раундов селекции, включающих: (1) инкубацию исходной библиотеки аптамеров в первом раунде селекции (1 мкМ) или пула аптамеров (100 нМ), полученного в предыдущем раунде, с негативными мишенями (клетки крови, ткани печени, почек и селезенки); (2)

удаление с помощью центрифугирования из пула ДНК-олигонуклеотидов, связавшихся с негативными мишенями, и сбор свободных аптамеров в супернатанте; (3) инкубацию пула аптамеров с клетками асцитной карциномы Эрлиха; (4) отмывку клеток от несвязавшейся ДНК; (5) экстракцию связанных с клетками ДНК-аптамеров с помощью денатурации и центрифугирования; (6) амплификацию пула аптамеров с помощью симметричной и асимметричной ПЦР.

Клетки асцитной карциномы для уменьшения неспецифического связывания с ними ДНК, начиная с 5-го раунда селекции и в каждом последующем, преинкубировали с маскирующей ДНК (salmon sperm scrambled DNA; 0.1 мг/мл). Для проведения симметричной ПЦР использовали 5 мкл пула аптамеров в трис-ЭДТА буфере (pH7.4) и 45 мкл реакционной смеси, содержащей: однократный буфер для ПЦР; 2.5 мМ $MgCl_2$; 0.025 Ед/мкл KAPA2G HotStart Robust polymerase (KAPABiosystems, США); 220 мкМ dNTP; 300 нМ прямого праймера (5'-CTCCTCTGACTGTAACCACG-3') и 300 нМ обратного праймера (5'-GGCTTC TGG ACT ACCTAT GC-3') (Синтол, Россия). Асимметричную ПЦР проводили с 5 мкл симметричного ПЦР-продукта и 45 мкл асимметричной ПЦР-смеси: 1 × ПЦР_буфер; 2.5 мМ $MgCl_2$; 0.025 Ед/мкл KAPA2G HotStart Robust polymerase; 220 мкМ dNTP; 1 мкМ прямого праймера с меткой Alexa-488 (5'-Alexa488_CTCCTC TGACTGTAACCACG-3'), и 50 нМ обратного праймера (5'-GGCTTCTGGACT ACCTATGC-3').

Режим амплификации: предварительный нагрев – 2 мин при 95°C; 15 циклов по 30с при 95°C; 15с при 56.3°C и 15с при 72°C. Наличие ПЦР-продукта контролировали с помощью электрофореза в 3% агарозном геле. Для дальнейшего использования пулы аптамеров очищали с помощью 30 кДа cut off фильтров Pall Centrifugal devices (Pall, США). Концентрацию оцДНК-аптамеров определяли на спектрофотометре NanoVue plus (GE Healthcare, Life Sciences, США). В результате получали аптамеры с флуоресцентной

меткой Alexa-488. Технология cell-SELEX схематично представлена на рис.10.

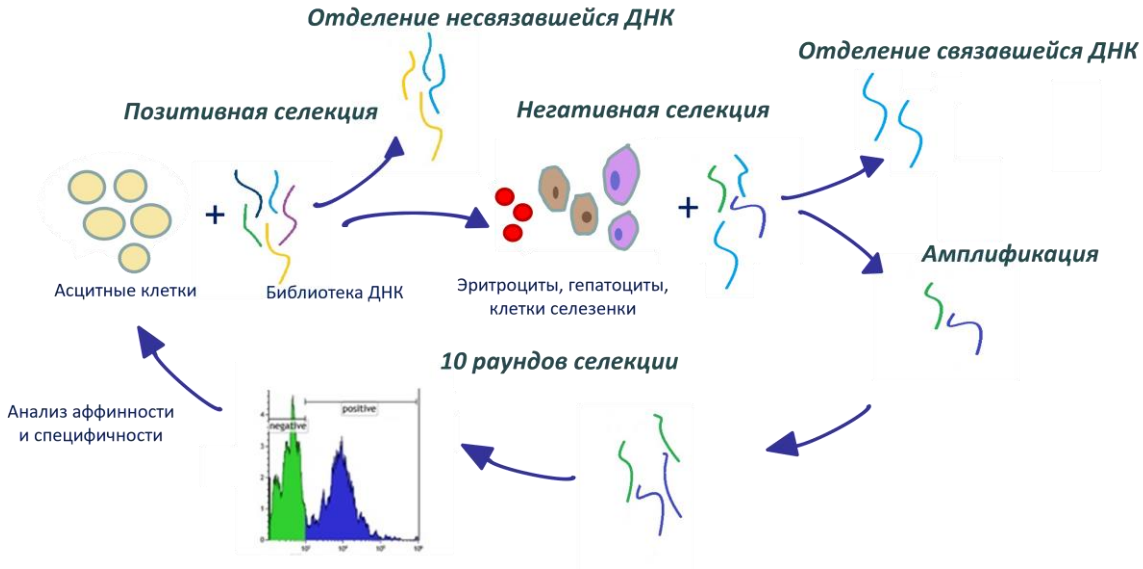


Рисунок 10 – Схема селекции ДНК-аптамеров к асцитным клеткам

2.6 Клонирование аптамеров

Пулы аптамеров, обладающих наибольшей аффинностью к своим мишеням, были клонированы для разделения на отдельные последовательности ДНК-олигонуклеотидов. Клонирование аптамеров проводили с использованием набора для клонирования «M13mp18 Perfectly Blunt Cloning Kits», подходящего для клонирования любых ДНК-фрагментов, независимо от типа их концов.

Алгоритм клонирования:

1. *Конвертирование концов*. В микропробирку помещали 6,9 нг ДНК в 0.5–2.0 мкл ПЦР-продукта (или 2 мкл вектора), 5.0 мкл буфера, воду без нуклеаз для достижения объема смеси в 10 мкл. Смесь перемешивали и инкубировали в течение 15 минут при 22°C. Реакцию останавливали нагреванием до 75°C в течение 5 минут и охлаждали на льду 2 минуты. Быстрым центрифугированием сбрасывали капли конденсата на дно пробирки.

2. *Лигирование*. Для лигирования 1 мкл вектора смешивали с 10 мкл образца ДНК после завершения реакции конвертирования и с 1 мкл T4 ДНК-лигазы и инкубировали при 22°C в течение 15 минут.
3. *Трансформация компетентных клеток.* 4 мкл смеси после реакции лигации осторожно смешивали с размороженными на льду компетентными клетками и инкубировали 5 минут на льду, после этого пробирки с клетками выдерживали ровно 30 секунд при 42°C и немедленно возвращали на лед на 2 минуты, после чего к клеткам добавляли питательную среду.
4. *Посев компентентных клеток на чашки Петри с питательной средой*. В чашки Петри заливали теплую автоклавированную питательную среду LB (20 г/л) с агаром (10 г/л) и ампицилином (100 мг/мл). После полимеризации геля по его поверхности равномерно распределяли 35 мкл 50 мг/мл X-gal в диметилформамиде и 20 мкл 100 мМ IPTG (в воде) и выдерживали при 37°C 30 мин для того, чтобы вещества абсорбировались. Содержимое пробирки с клетками разделяли на 2 чашки и равномерно распределяли по поверхности геля. Инкубировали 12 часов при температуре 37°C.
5. *Амплификация клонов аптамеров.* Режим амплификации клонов аптамеров: прогрев на 2 мин при 95°C; 15 циклов по 30с на 95°C; 15с на 56.3°C; 15с на 72°C; удерживать на 4°C. Смесь для симметричной ПЦР включала: 1X ПЦР-буфер, 2.5 мМ $MgCl_2$, 0.025 мкМ/мкл полимеразу KAPA2G HotStart Robust (KAPABiosystems, USA), 220 мкМ dNTP, прямой праймер 300 нМ (5′-CTC CTCTGACTGTAACCACG-3′), обратный праймер 300 нМ (5′-GGCTTC TGGACTACCTATGC-3′) (Integrated DNA Technologies, USA). Смесь для асимметричной ПЦР включала: 1X ПЦР-буфер, 2.5 мМ $MgCl_2$, 0.025 мкМ/мкл полимеразу KAPA2G HotStart Robust, 220 мкМ dNTP, 1 мкМ прямого парймер с FAM (5′-FAM –

CTCCTCTGACTGTAACCACG-3′), и 50 нМ обратного праймера (5′-GGCTTCTGGACTACCTATGC-3′). Полученные ПЦР-продукты помещали на 3% агарозный гель и разгоняли в камере для горизонтального электрофореза. Для детекции флуоресценции меченых FAM одноцепочечных ДНК использовали гель-документирующую систему GBOX/EF2-E. В дальнейшей работе использовали только те клоны, в которых были обнаружены вставки из олигонуклеотидов (80 п.н.).

6. *Осаждение ДНК.* Для осаждения ДНК использовали этанол. Суть метода заключается в том, что ДНК агрегирует в 70% этаноле в присутствии соли (агрегация проходит лучше при пониженной температуре и для неё требуется некоторое время). Затем образовавшиеся агрегаты осаждаются центрифугированием. Понижение температуры до 0°C и увеличение времени инкубации до 15 мин не оказывает заметного влияния на эффективность осаждения (для концентрации ДНК>20нг/мл). Наиболее заметный эффект даёт увеличение времени центрифугирования до 30 мин при 4°C. Для осаждения ДНК доводили соли до следующих концентраций:
    - $AcNH_4$ – до 2.0 М;
    - LiCl – до 0.8М;
    - NaCl – до 0.2М;
    - AcONa – до 0.3М.

$AcNH_4$ использовали для уменьшения копреципитации dNTP (2-кратное переосаждение приводит к удалению ~99% dNTP). LiCl использовали для осаждения длинной РНК, когда требовались высокие концентрации этанола. NaCl применяли для осаждения ДНК из растворов, содержащих SDS. AcONa использовали для преципитации ДНК.

Для осаждения ДНК к 1 объему ДНК с солью добавляли 2,5 объема 96% этанола и инкубировали 30 мин при температуре -20°С. После инкубации полученный образец центрифугировали 30 мин при 13000 об/мин (4°С), дважды промывали 70% этанолом и вновь центрифугировали. Промывка 70% этанолом удаляла избыток соли и остатки исходного буфера. Полученный осадок после удаления остатка этанола растворяли в фосфатном буфере. После проведенной процедуры осаждения в полученных образцах определяли концентрацию ДНК. Концентрацию одноцепочечных ДНК-аптамеров в выбранных клонах определяли на спектрофотометре Nanodrop 2000 Thermoscientific. Концентрация ДНК в разных клонах аптамеров составляла от 2,2 нг/мкл до 12,3 нг/мкл. Концентрацию ДНК во всех пробах доводили до 100 нМ.

2.7 Секвенирование и синтез аптамеров

Выделенные клоны аптамеров были секвенированы компанией «Génome Québec Innovation Centre» (Канада). Выбор аптамеров для синтеза определяли по результатам проточной цитометрии и расчетами стабильности аптамеров (расчет производился с помощью программного обеспечения OligoAnalyzer 3.1). Последовательности аптамеров по полученным последовательностям были синтезированы компанией «Integrated DNA techonologies» (США). Все дальнейшие исследования проводили с использованием синтетических аптамеров.

2.8 Определение констант диссоциации аптамеров

Для определения константы диссоциации аптамера измеряли зависимость количества связавшихся с аптамером мишеней от его

концентрации. Полученную зависимость изображали в координатах Лайнуивера–Берка (Рис.11).

График, полученный в обратных координатах Лайнуивера–Берка:

$$y = 1/F\ (1/C)\ (1),$$

где F – связавшиеся мишени, C – концентрация аптамера, представляет собой прямую, тангенс угла наклона которой равен:

$$tg\alpha = Kd/Fmax\ (2),$$

отрезок, отсекаемый прямой на оси ординат равен:

$$y = 1/Fmax\ (3),$$

отрезок, отсекаемый прямой на оси абсцисс, равен:

$$x = -1/Kd\ (4),$$

где Kd – константа диссоциации аптамеров

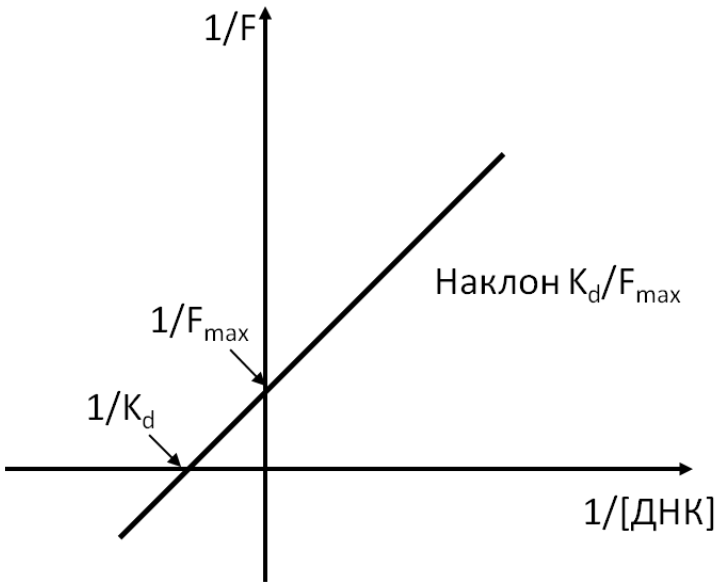


Рисунок 11 – Зависимость связывания ДНК-аптамеров с мишенями от концентрации субстрата в координатах Лайнуивера-Берка.

Для определения константы диссоциации использовали асцитные клетки-мишени. Константы диссоциации были определены для аптамеров с

наибольшей аффинностью. Для определения констант диссоциации аптамеры в конечных концентрациях 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 250 нМ инкубировали с клетками-мишенями в фосфатном буфере, содержащем Ca2+ и Mg^{2+} в течение 30 минут на шейкере в темном месте при комнатной температуре. Связывание аптамера с мишенью определяли с помощью проточного цитометра FC-500 (Beckman Coulter Inc., USA).

2.9 Анализ связываемости аптамеров с асцитными клетками *in vitro*

Аффинность и специфичность аптамеров к асцитным клеткам карциномы Эрлиха оценивали с помощью проточной цитометрии на цитометре FC-500 Flow Cytometer (Beckman Coulter Inc., США). Перед инкубацией с аптамерами клетки асцитной карциномы для уменьшения неспецифического связывания инкубировали с маскирующей ДНК (0.1 мг/мл ДНК спермы лосося) в течение 15 мин при 19–24°C. Далее каждый образец, содержащий 250000 клеток, инкубировали в 500 мкл 100 нМ раствора аптамеров в среде Хенкса в течение 30 мин при 37°C, затем клетки отмывали от несвязавшихся последовательностей.

В качестве контроля использовали флуоресцентно меченую исходную библиотеку аптамеров. Все образцы ресуспендировали в 0.5 мл среды Хенкса и использовали для анализа связывания аптамеров с клетками, регистрируя 30000 событий для каждой пробы. Флуоресценцию, превышающую базовую флуоресценцию интактных клеток, считали истинной флуоресценцией аптамеров с меткой Alexa-488, связанных с асцитными клетками. Для определения констант диссоциации (*K*d) 50000 клеток асцитной карциномы Эрлиха титровали 0, 5, 10, 25, 50 или 100 нМ аптамеров в фосфатном буфере с магнием и кальцием, строили графики зависимости связывания ДНК-аптамеров с клетками.

2.10 Оценка биологического эффекта аптамеров

Для определения биологического эффекта аптамеров асцитные клетки культивировали в питательной среде DMEM с 5% фетальной сыворотки крупного рогатого скота с добавлением аптамеров – AS9, AS14, AS42 или ДНК-библиотеки (конечная концентрация ДНК в пробах – 250 нМ) в CO_2-инкубаторе в течение 24 ч при 37°С. Уровень апоптоза асцитных клеток после их инкубации в течение 10 ч с аптамерами или библиотекой аптамеров оценивали методом проточной цитометрии по транслокации фосфатидилсерина с помощью Annexin V Alexa Fluor® 488 (Invitrogen Corporation, США) по протоколу производителя. Пролиферацию оценивали при помощи красителя Cell TraceTM Far Red DDAO-SE (Invitrogen Corporation, США) по протоколу производителя.

2.11 Идентификация белковых мишеней аптамеров

Для идентификации белковых мишеней аптамеров выделяли белки, связывающиеся с аптамерами, абсорбировали их на магнитных частицах, очищали и анализировали методом масс-спектрометрии. Для этого клетки инкубировали с маскирующей ДНК (ДНК спермы лосося в конечной концентрации 50 нМ) на шейкере в течение 30 мин при комнатной температуре для маскировки неспецифических сайтов связывания с олигонуклеотидами. Затем образцы инкубировали еще 30 мин при комнатной температуре на шейкере с биотинилированными аптамерами (конечная концентрация 50 нМ). Схема пробоподготовки приведена на рис.12.

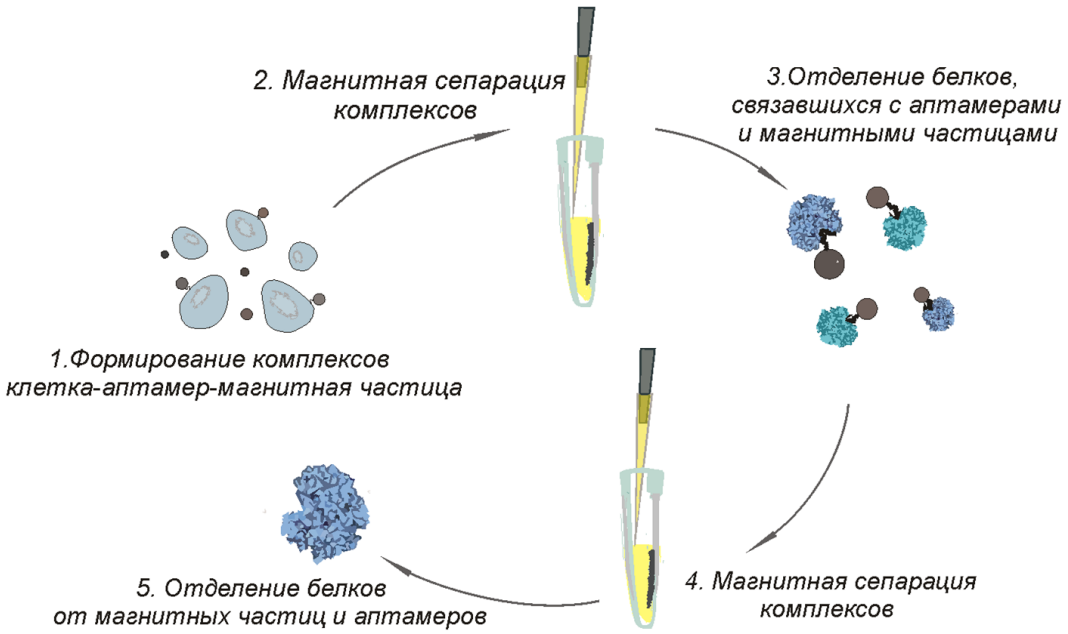


Рисунок 12 – Схема выделения белков-мишеней аптамеров асцитных клеток для масс-спектрометрического анализа.

Масс-спектрометрическую идентификацию белков, выделенных из клеток с помощью аптамеров, проводили с помощью технологии AptaBID [212], оптимизированной для определения мишеней одного аптамера. Для идентификации молекулярных мишеней аптамеров белки очищали из клеточного лизата путем магнитной сепарации с использованием 1 мг магнитных частиц, покрытых стрептавидином (MagneSphere, Promega, США). К образцам добавляли магнитные частицы, покрытые стрептавидином, и инкубировали в течение 30 мин. С помощью магнита на боковой поверхности пробирки концентрировали комплексы клеток, связанных аптамерами с магнитными частицами, и отмывали от несвязавшихся клеток и ДНК. К очищенным комплексам добавляли 0.1% дезоксихолата натрия в фосфатном буфере для мягкого лизиса клеток и оставляли при комнатной температуре на 30 мин. После инкубации магнитные частицы с аптамерами и белками вновь концентрировали с использованием магнита на боковой поверхности пробирки и удаляли

фосфатный буфер, содержащий дезоксихолат натрия. Комплексы несколько раз промывали для удаления неспецифических белков и прочих клеточных компонентов. Осадок белков, связанных через аптамеры с магнитными частицами, разводили свежеприготовленной 8М мочевиной, профильтрованной через 22-мкм фильтры, и инкубировали в течение 60 мин для денатурации аптамеров и высвобождения белков, связанных с аптамерами. После этого магнитные частицы с аптамерами удаляли с помощью магнита и собирали надосадочную жидкость, содержащую белки-мишени аптамеров. С контрольными пробами, в которых вместо аптамеров использовали ДНК-библиотеку, проводили аналогичные процедуры. Конечные концентрации белка в пробах определяли на спектрофотометре NanoVue plus (GE Healthcare, Life Sciences, США). Пробы перед анализом хранили при температуре –20°С не более 2 суток.

Для проведения анализа использовали 20 мкл раствора белка, выделенного с помощью аптамеров, в 8 М мочевине (0.2-1.6 мкг в зависимости от концентрации). Белковую пробу добавляли к 30 мкл 50 мМ раствора бикарбоната аммония. Дисульфидные связи восстанавливали, добавляя в пробирку с пробой 3 мкл 100 мМ раствора дитиотреитола, и инкубировали в течение 60 мин при температуре 37°С. Для алкилирования тиоловых групп цистеиновых остатков в пробирку после остывания добавляли 6 мкл 100 мМ раствора иодацетамида и инкубировали в темноте в течение 30 мин при комнатной температуре. После этого вносили 1 мкл раствора трипсина (100 нг/мкл) и инкубировали в течение 16 ч при 37°С. После трипсинизации пептидную смесь очищали с помощью пипеточных наконечников ZipTipC18 (Millipore Corporation, США) объемом 10 мкл согласно протоколу производителя. В качестве растворителя-элюента использовали 10 мкл 80% раствора ацетонитрила, содержащего 0.1% трифторуксусной кислоты. После элюирования растворитель выпаривали с помощью вакуумной центрифуги ScanVac VacSafe 15 (LaboGene ApS,

Дания), пептидную смесь перерастворяли в 20 мкл деионизированной воды, содержащей 0.1% муравьиной кислоты. Затем 10 мкл пробы переносили в 96-луночный планшет автосамплера хроматографа.

Для масс-спектрометрического анализа отбирали 5 мкл пробы (0.4 мкг или менее в зависимости от начальной концентрации). Всего было проведено три независимых серии масс-спектрометрических экспериментов с белками, полученными из клеток разных животных. Инкубацию и выделение белка в каждой серии проводили в четырех повторностях для каждой пробы олигонуклеотидов (двух аптамеров AS9 и AS14 и контрольной библиотеки). В каждой серии проведено по 12 анализов, т.е. всего проанализировано 36 проб. Первичные концентрации белка в пробах составляли 0.01-0.08 мг/мл. Белковые пробы идентифицировали с использованием приборного комплекса, состоящего из нанопотокового высокоэффективного жидкостного хроматографа Easy-nLC 1000 и гибридного масс-спектрометра высокого разрешения Orbitrap Velos Pro с источником ионов EasySpray (все Thermo Scientific, Германия). Хроматографическое разделение пептидов производили на обращено-фазной колонке, встроенной в источник ионов, длиной 15 см и внутренним диаметром 50 мкм, заполненной частицами C18, диаметром 2 мкм.

В качестве хроматографической фазы “A” использовали деионизированную воду с 0.1% муравьиной кислоты, в качестве фазы “B” – ацетонитрил с 0.1% муравьиной кислоты. Разделение пептидов производили путем создания градиента с нарастанием содержания ацетонитрила (фазы “B”) от 5 до 40% в течение 90 мин. Масс-спектрометрические эксперименты производили в тандемном режиме с применением анализа, зависимого от данных. Первичное сканирование пептидных брутто-масс производили в полном диапазоне m/z (300-2000) с помощью масс-анализатора орбитальной ловушки (FTMS) с разрешением 60000. После этого поочередно анализировали фрагменты 15 наиболее часто встречающихся пептидных

прекурсоров, активированных методом соударений (CID), который осуществляли с помощью масс-анализатора ионной ловушки (ITMS) со стандартным разрешением, после чего цикл сканирования повторяли.

Проанализированные прекурсоры помещали во временный список исключения на 60 с. В начале каждой экспериментальной серии производили калибровку с помощью бычьего сывороточного альбумина для оценки качества анализа. Отклонения в точности определения масс не выходили за пределы 5 ppm (мг/кг), что соответствовало норме для внешней калибровки прибора. Идентификацию белков с использованием баз данных и сравнительный количественный анализ проводили с помощью программы MaxQuant 1.3. Поиск белков производили в актуальной базе данных UniProtKB/Swiss-Prot, ограниченной таксоном “Mus Musculus”. Квантификацию Label Free производили с параметрами, выставленными в программе по умолчанию. Результаты каждой серии опытов анализировали отдельно. В итоговые таблицы белков-кандидатов в мишени аптамеров вносили только белки, преобладающие в пробах с аптамерами, одновременно во всех трех сериях опытов и отсутствующие или представленные в значительно меньших количествах в контрольных пробах с ДНК-библиотекой.

2.12 Клеточные культуры

Для исследований *in vitro* использовали культуру клеток карциномы Эрлиха. Асцитные клетки мыши культивировали в чашках для культивирования клеток (CELLSTAR) в среде DMEM с добавлением 100 ед./мл пенициллина, 100 ед./мл стрептомицина и 5% (об./об.) FBS в CO_2 при 37°C. Все эксперименты на клетках проводили в фосфатном буфере, содержащем 0,9 мМ $CaCl_2$ и 0,49 мМ $MgCl_2$.

2.13 Функционализация наночастиц золота с помощью ДНК-аптамеров

Для создания средств для фототермической деструкции опухолевых клеток использовали золотые наночастицы AuНЧ со средним диаметром 37 нм. Спектры экстинкции конъюгатов AuНЧ с ДНК-аптамером регистрировали на спектрофотометре UV-3600 (Shimadzu, Япония). Стабилизацию наночастиц проводили с помощью тиолированного зонда: очищенный с помощью жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) олигонуклеотид 50-CGT GGT TAC AGT CAG AGG AGA A-/ThioMC6-D/-30, модифицированный на 3’ конце 6-гидроксигексилдисульфидной группой (Integrated DNA Technologies, США) в буфере для хранения AuНЧ в течение 24 часов при 4°C на шейкере (конечная концентрация 500 нМ). Этот тиолированный зонд дополняли 5’-концом аптамера AS42: 50-CTC CTC TGA CTG TAA CCA CGT CAA TGG GTG ATA TAT GCA GGT TAC GCT GGC TAG TTG AAA GCA TAG GTA GTC CAG AAG CC-30.

Эту смесь разбавляли в 2 раза, смешивая ее с фосфатным буфером (с кальцием и магнием), а затем с эквимолярным количеством аптамера AS42 или олигонуклеотида AG: 50-CTC CTC TGA CTG TAA CCA CG (AG) 20 GCA TAG GTA GTC CAG AAG CC-30 в качестве неспецифического контроля, и инкубировали в течение 24 часов на шейкере. Перед использованием олигонуклеотиды нагревали при 95°C в течение 10 минут и охлаждали на льду в течение 10 минут.

2.14 Исследование биологического эффекта ФТТ с использованием золотых наночастиц AuНЧ, нацеленных на опухоль с помощью аптамеров, аффинных опухолевых клеткам

Для возбуждения плазмонного резонанса AuНЧ использовался непрерывный лазер Millennium V (Spectra-Physics Lasers, США) с длиной волны 532 нм. Кювету с раствором помещали в область, где диаметр лазерного луча был равен 2 см; за температурой суспензии следили с помощью тепловизора. Мощность лазера – 2,5 Вт, время экспозиции – 10 мин на сеанс.

Анализ ФТТ in vitro. Для исследования биологического эффекта золотых наночастиц в условиях воздействия лазера готовили 8 образцов, содержащих 10^6 клеток, которые обрабатывались следующим образом: (1) интактные клетки (10^6 клеток на миллилитр) в 1 мл; (2) клетки после 10-минутного облучения лазером на длине волны 532 нм; (3) клетки, инкубированные с AS42-AuНЧ (10^8 частиц на мл); (4) клетки инкубировали с AS42-AuНЧ (10^8 частиц на мл) в течение 30 минут с последующим 10-минутным облучением лазером с длиной волны 532 нм; (5) клетки инкубировали с аптамером AS42 (500 нМ) в течение 30 мин; (6) клетки инкубировали с аптамером AS42 (500 нМ) в течение 30 мин с последующим 10-минутным облучением лазером с длиной волны 532 нм; (7) клетки инкубировали с AG-AuНЧ (10^8 частиц на мл) и (8) клетки инкубировали с AG-AuНЧ (10^8 частиц на мл) с последующим 10-минутным лазерным облучением с длиной волны 532 нм.

Образцы с клетками инкубировали при 37°C в CO_2-инкубаторе до и после облучения. Все образцы были приготовлены в трех повторностях. Определение процента поврежденных клеток проводили через 3 часа после облучения лазером с использованием 0,4% трипанового синего (Sigma-Aldrich, США).

Анализ ФТТ in vivo. Для оценки биологического эффекта использовали шестинедельных мышей-самцов ICR весом 25 г; по пять животных в группе. За 2 недели до экспериментов животных приучали сохранять спокойствие при помещении их в экспериментальную клетку. Для формирования опухоли в правую ногу каждой мыши трансплантировали по 2 млн. клеток карциномы Эрлиха. Каждые вторые сутки, начиная с 7-го дня после трансплантации опухоли до 11-го дня, животным проводили ФТТ.

Для возбуждения плазмонного резонанса АuНЧ использовали непрерывный волновой лазер на длине волны 532 нм. Перед исследованием конечность мыши с солидной опухолью обрабатывали кремом для удаления волос Veet (Reckitt Benkiser, Франция), т.е. проводили депиляцию. После этого животное помещали в экспериментальную клетку так, чтобы опухоли в области облучения лазерным лучом, равным 2 см; температуру ноги контролировали с помощью инфракрасной камеры (Testo 875-1i от TESTO, Германия). Мощность лазера – 2,5 Вт, время экспозиции – 5 мин на сеанс.

Инъекции в хвостовую вену мышам проводили на 7-ой, 9-ый и 11-ый дни после трансплантации опухоли (всего 3 раза). Группы животных: группа 1 – инъекция 100 мл фосфатного буфера; группа 2 – инъекция 100 мл фосфатного буфера с последующим 5-минутным лазерным облучением; группа 3 – введение AS42-AuНЧ в 100 мл фосфатного буфера (1,1 мг/кг; 50 частиц на клетку); группа 4 – введение AS42-AuНЧ в 100 мл фосфатного буфера (1,1 мг/кг; 50 частиц на клетку) с последующим 5-минутным лазерным облучением и группа 5 – введение AG-AuНЧ в 100 мл фосфатного буфера (1,1 мг/кг 1; 50 частиц на клетку) с последующим 5-минутным лазерным облучением. Через 30 мин животных помещали внутрь испытательной клетки, а ногу с опухолью оставляли снаружи и облучали 532 нм лазером в течение 5 мин.

ПЭТ/ КТ. Объемы опухоли контролировали с помощью ПЭТ/КТ на

6-ой день (перед первой обработкой) и на 12-ый день после трансплантации опухоли (на следующий день после третьей процедуры обработки). Животным внутривенно вводили 4-6 МБк (0,11–0,16 мКи) [^{1}8F]-фтордезоксиглюкозу с последующим проведением ПЭТ/КТ сканирования через 1 час после инъекции. Животных под анестезией (кетамин / ксилазин: внутрибрюшинная доза 70 мг/кг кетамина и 5–12 мг/кг ксилазина) фиксировали для визуализации.

Исследование проводилось на сканере Discovery ПЭТ/КТ 600 (General Electric, США) и состояло из компьютерной томографии в спиральном режиме с толщиной слоя 3,75 мм с последующей пост-реконструкцией со срезом 0,625 мм. После этого сканирование излучения позитронов было выполнено в 3D-режиме в течение 5 мин с итеративной реконструкцией полученных изображений. Полученные данные анализировали с помощью программы PET VV на рабочей станции AW Volume Share 5. Эффективность лечения оценивалась по локализации опухоли, контурам, размерам и степени накопления [^{18}F]-фтордезоксиглюкозы. КТ-изображения анализировали с использованием шкалы денситометрии Хаунсфилда.

2.15 Функционализация ферроарабиногалактанов FeАГ с помощью ДНК-аптамеров, аффинных опухолевым клеткам

Суперпарамагнитные FeАГ были получены из промышленного образца АГ (молекулярная масса 16645 Да) и фрагментированного АГ (молекулярная масса 8380 Да) лиственницы сибирской и предоставлены для исследований Иркутским институтом химии им. Фаворского, г. Иркутск, Россия).

Для функционализации ферроарабиногалактанов использовали смесь аптамеров (1:1) (50-CTCCTCTGACTGTAACCACGAAGGTGTCGGCCTTAGTAA GGCTACAGCCAAGGGAACGTAGCATAGGTAGTCCAGAAGCC-30), AS14

и (50-CTCCTCTGACTGTAACCACGTCAATGGGTGATATATGCAGGTTAC GCTGGCTAGTTGAAAGCATAGGTAGTCCAGAAGCC-30), AS42, в концентрации 500 нМ в буфере DPBS, содержащем 0,9 мМ $CaCl_2$ и 0,49 мМ $MgCl_2$, смешивали 1: 1 с FeAG (800 мкг/мл в DPBS), инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин.

2.16 Исследование биологического эффекта Апт-FeAГ в переменном магнитном поле

Асцитные клетки мыши Эрлиха культивировали в чашках для культивирования клеток размером 35 × 10 мм (CELLSTAR®, Фриккенхаузен, Германия) в среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM; Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США). В среду дополнительно добавляли 100 Ед/мл пенициллина, 100 Ед/мл стрептомицина и 5% (об./об.) и фетальной бычьей сыворотки (FBS). Все операции по культивированию проводили в CO_2-инкубаторе при 37°C. Один миллион клеток в 500 мл бесцветной среды DMEM с высоким содержанием глюкозы с кальцием и магнием инкубировали с различными составами FeAГ в соотношении 1: 1000 (конечная концентрация 1×10^9 частиц на 1 мл) или только DPBS в течение 30 минут при 37°C в CO_2-инкубаторе при 37°C. Все образцы готовили в трех экземплярах. После инкубации клетки выдерживали в переменном магнитном поле в течение 10 мин.

Уровень апоптоза оценивали по активности каспазы 3/7 через 3 часа после обработки с использованием реагента для обнаружения зеленого цвета CellEvent ™ Caspase-3/7 (Molecular Probes, ThermoFisher Scientific, Остин, Техас, США) в соответствии с протоколом производителя с использованием проточного цитометра (FC-500, Beckman Coulter, Ирвинг, Техас, США).

Уровень некроза определяли по накоплению йодида пропидия (Sigma Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) в мертвых клетках через 5 ч после обработки в соответствии с протоколом производителя.

2.17 Генерация низкочастотного магнитного поля

Для создания переменного низкочастотного магнитного поля использовались Катушки Гельмгольца; оборудование было специально разработано для этих экспериментов (Рис.13). На два цилиндра внутренним диаметром 20 см была намотана медная проволока диаметром 0,53 мм; внешний диаметр катушки составлял 22 см, сопротивление катушки – 21,4 Ом. Параметры магнитного поля: синусоидальная форма волны, частота 50 Гц, напряженность 100 Э. Катушки обеспечивали создание однородного магнитного поля в объеме 15 × 15 × 15 см. Напряженность магнитного поля 100 Э контролировалась миллитесламетром ТЛ-5. В рабочую зону колец можно было одновременно поместить до 5 мышей.

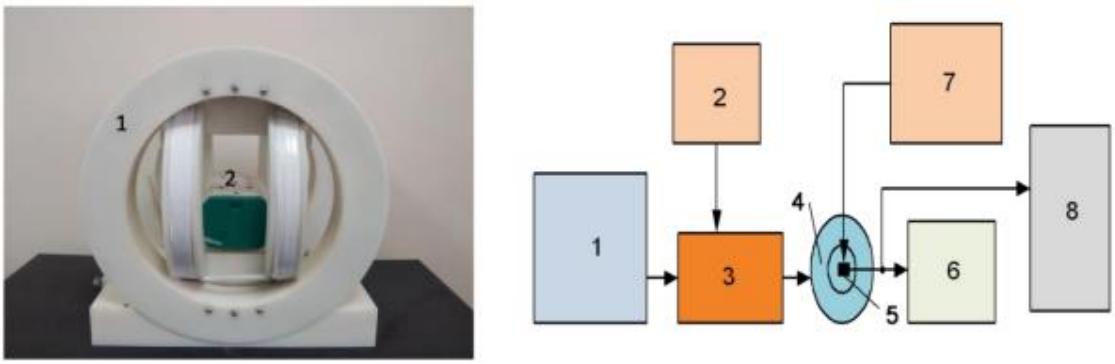


Рисунок 13 – (А) катушки Гельмгольца для генерации низкочастотного магнитного поля (1); коробка для экспериментальной мыши (2). (Б) Схема установки оптимальной магнитодинамической терапии. (1) – генератор сигналов, (2) – источник стабилизированного постоянного напряжения, (3) – мостовой усилитель, (4) – катушки Гельмгольца, (5) – датчик Холла, (6) – микровольтметр, (7) – источник питания 5 В для датчика Холла, (8) – осциллограф.

Протокол работы с животными был одобрен местным комитетом по этике экспериментов на животных Красноярского государственного медицинского университета (этический кодекс №77; 26 июня 2017 г.). Это исследование было проведено в соответствии с рекомендациями Руководства по уходу и использованию лабораторных животных Национального института здравоохранения. Все процедуры проводились под анестезией, и все усилия были направлены на то, чтобы минимизировать страдания животных.

2.18 Формирование солидной опухоли ноги у мыши с помощью асцитных клеток карциномы Эрлиха

Для формирования солидной опухоли подкожно в правую ногу трансплантировали 3 млн. клеток асцитной карциномы Эрлиха в 100 мкл фосфатного буфера.

2.19 Терапия солидной опухоли *in vivo* с использованием Апт-FeАГ в переменном магнитном поле низкой интенсивности

Животных экспериментальной группы лечили конъюгированным с аптамером суперпарамагнитным FeАГ (6%) с последующим помещением в низкочастотное переменное магнитное поле. Контрольными группами были следующие: (1) мыши без лечения; (2) лечение смесью аптамеров; (3) FeАГ. Каждый третий день, начиная с четвертого дня после трансплантации опухоли до десятого дня (на 4, 8 и 10 дни после трансплантации опухоли, всего трижды), животных помещали в переменное магнитное поле на 10 минут; за 30 минут до этой процедуры мышам вводили инъекции в хвостовую вену следующим образом:

Группа 1: контроль без лечения;

Группа 2: инъекция смеси аптамеров AS-14 и AS-42 в 100 мкл фосфатного буфера (400 мкг / кг);

Группа 3: инъекция FeAG (6%) в 100 мкл фосфатного буфера (1,6 мкг / кг);

Группа 4: инъекция смеси аптамеров (AS-14, AS-42), конъюгированной с FrFeAG (6%) в 100 мкл фосфатного буфера (0,8 мкг / кг);

Через 30 мин животных помещали внутрь магнитной катушки и воздействовали переменным магнитным полем низкой частоты в течение 10 мин.

2.20. Магнитно-резонансная томография

МРТ-визуализация проводилась с помощью спектрометра Avance DPX 200 (Bruker BioSpin GmbH, Райнштеттен, Германия), оснащенного принадлежностями для визуализации в следующей конфигурации: сверхпроводящий магнит с вертикальным отверстием диаметром 89 мм, водоохлаждаемый самозащитный Bruker GREAT 3. / 60, датчик PH MINI 0,75 (максимальная сила градиента до 292 мТл / м) и катушка в виде птичьей клетки с внутренним диаметром 38 мм, настроенная и согласованная с частотой ядерного резонанса 1H 200,13 МГц. Срезы-селективные 2D-ЯМР-изображения получали с использованием техники мульти-срезов и мульти-эхо (MSME), поставляемой программным обеспечением Paravision 4.0 (Bruker BioSpinGmbH, Ettlingen, Germany). Параметры получения изображения были следующими: толщина среза 0,71 мм; поле зрения (FOV) 40 мм; матрицы размером 256 × 256 пикселей, что обеспечивало пространственное разрешение 156 мкм на пиксель внутри среза. Время повторения (TR) и время эхо-сигнала (TE) были отрегулированы до 600 мс и 4,7 мс соответственно, чтобы обеспечить взвешивание T1 на изображениях.

Время получения изображения (ТА) составляло 10 мин. Это результат параметров TR и TE и количества сканирований.

2.21. Гистологический анализ опухолевых тканей

Для приготовления срезов использовали солидные опухоли мышей, полученные из асцитных клеток карциномы Эрлиха. Образцы ткани помещали в 4% параформальдегид, разведенный в фосфатном буфере, содержащем Ca^{2+} и Mg^{2+} (объем фиксирующей жидкости в 10 раз превышал объем фиксируемой ткани). Ткань фиксировали в течение 24 часов при температуре 60С, после чего ее помещали в фосфатный буфер, содержащий Ca^{2+} и Mg^{2+}, и резали на микротоме с шагом 40мкм. Полученные срезы заливали раствором TRITON-X100 (0,2%) и оставляли на шейкере при комнатной температуре на 5 минут. Процедура повторялась три раза. После этого срезы промывали фосфатным буфером, содержащим Ca^{2+} и Mg^{2+}. Оценку гистологических изменений срезов опухолевой ткани после терапии проводили на микроскопе (Axioskop 40, Carl Zeiss, Германия).

2.22 Исследование специфичности и чувствительности аптамеров с помощью ПЭТ/КТ

Радиофармпрепарат с радиоактивной меткой ^{11}C состоял из аптамера AS14 5'-CTC CTC TGA CTG TAA CCA CGA AGG TGT CGG CCT TAG TAA GGC TAC AGC CAA GGG AAC GTA GCA TAG GTA GTC CAG AAG CC-3 ' и праймера (праймер $^{11}CH_3$) 5'-^{11}CH3-S-(CH2) 6-GGC TTC TGG ACT ACC TAT GC-3' связанного с 3'-концом AS14.

Гибридизация праймера ^{11}C с аптамером AS14. Аптамер AS14 денатурировали нагреванием до 95°C в течение 10 мин, смешивали с

эквимолярной концентрацией праймера $^{11}CH_3$ для гибридизации, затем охлаждали на льду для восстановления трехмерной конформации.

Оценка связывания $^{11}CH_3$-AS14 с опухолевыми клетками in vivo. Протокол работы с животными утвержден Локальным комитетом по этике в Красноярском государственном медицинском университете (№77 от 26 июня 2017 г.). Исследование проведено в соответствии с рекомендациями Руководства по уходу и использованию лабораторных животных Национального института здоровья. Все процедуры проводились под наркозом и все усилия были направлены на то, чтобы минимизировать страдания животных. Белые 6-недельные самки мышей ICR массой 25 г предоставлены компанией «Вектор» (Новосибирск, Россия). Для образования метастазов суспензию 0,3 миллиона клеток асцитной карциномы Эрлиха в 50 мкл вводили внутривенно в хвостовую вену мыши. Опухолевые клетки, циркулирующие в крови, случайным образом образовывали метастазы в разных органах: легких, лимфатических узлах, почках, печени, тимусе, сердце, тимусе, брюшной полости, кишечнике и яичках. На 9-е (n = 4) и 16-е (n = 6) дни, когда образовались метастазы, опухоли мышей визуализировали с помощью радиофармпрепарата $^{11}CH_3$-AS14 методом ПЭТ/КТ. На следующий день после ПЭТ/КТ мышей умерщвляли с последующим вскрытием и гистологическим анализом тканей.

ПЭТ/КТ-визуализация. Животным вводили в хвостовые вены 0,4 нмоль (10 МБк) в 200 мкл фосфатного буфера аптамера $^{11}CH_3$-AS14 (6 мышей) или праймера ^{11}C (5 мышей) и $^{11}CH_3$-неспецифического аптамера (4 мыши) в качестве отрицательного контроля или ^{18}F-ФДГ (2 мыши) в качестве положительного контроля. Анализы ПЭТ/ КТ с ^{18}F-ФДГ проводили на тех же мышах в течение дня с последующим сканированием ПЭТ/КТ с аптамером $^{11}CH_3$-AS14. Через 5 мин процедуры животных анестезировали пропофолом, безопасным наркозом, который не снижает кровообращение и обеспечивает рабочее окно 15–30 мин с быстрым выздоровлением. Пропофол в средней

дозе 75 мг/кг медленно вводили в хвост мыши, пока она не засыпала. Сканирование ПЭТ / КТ проводили через 10, 20, 30 и 40 мин после инъекции. Исследование проводилось на сканере Discovery PET / CT 600 (General Electric, США). Он состоял из КТ в спиральном режиме с толщиной слоя 3,75 мм с последующей реконструкцией со срезом 0,625 мм. Сканирование излучения позитронов было выполнено в 3D-режиме в течение 5 мин с итеративной реконструкцией полученных изображений. Полученные данные анализировали с помощью программы PET VV на рабочей станции AW Volume Share 5. Оценивали накопление радионуклидов в очагах опухолей разной локализации, контура и размера. КТ-изображения анализировали с использованием шкалы денситометрии Хаунсфилда. После однодневного карантина, вызванного необходимостью исключения радиоактивности, мышей подвергали эвтаназии и вскрытию для подтверждения местоположения опухоли. Ткани были проанализированы гистологически для доказательства наличия раковых клеток.

2.23 Получение конъюгатов цисплатина и арабиногалктаном с аптамерами

Препарат на основе взаимодействия цис-дихлородиамминплатины(II) с арабиногалактаном получен по способу ADDIN [212].

Аптамеры AS9 (CTCCTCTGACTGTAACCACGACTGAGCTTTGGTGGGTCGAGCTATGTG CTGCCTCTTCACGCATAGGTAGTCCAGAAGCC) и AS42 – CTCCTCTGACTGTAACCACGTCAATGGGTGATATATGCAGGTTACGCTG GCTAGTTGAAAGCATAGGTAGTCCAGAAGCC предварительно нагревали при 95°C в течение 10 минут и охлаждали на льду в течение 10 минут для восстановления конформации. Продукты Cis-АГ-AS9 и Cis-АГ-AS42 получали смешиванием 200 мкл 200 нМ AS9 и 200 мкл 200 нМ AS42 с 200

мкл Cis-АГ (2 мг/мл) (каждый компонент был разбавлен бесцветным сбалансированным раствором Хэнкса, фосфатно-солевым буфером или средой DMEM и инкубировали в течение 25-30 минут при комнатной температуре.

2.24 Изучение противоопухолевой активности цисплатина и его конъюгатов

Противоопухолевую активность конъюгатов цисплатина изучали на модели асцитной карциномы Эрлиха и метастатической модели асцитной карциномы Эрлиха.

В исследовании использовали мышей-самцов ICR весом 25 г шестинедельного возраста, по 10 животных в группе. Один миллион клеток асцитной карциномы Эрлиха трансплантировали в брюшную полость каждой мыши. Противоопухолевую терапию проводили цисплатином (Cis), препаратами (Cis-АГ), (Cis-АГ-AS9). Введение препаратов проводили на 3-ые, 5-ые, 7-ые, 9-ые, 11-ые и 13-ые сутки развития опухоли. Мышам первой группы (контроль) вводили по 200 мкл физиологического раствора и 200 мкл 5% раствора глюкозы. Мышам второй группы вводили раствор цисплатина (Cis) в дозе 4 мг/кг массы тела и равный объем 5% глюкозы, мышам третьей группы – препарат (Cis-АГ) в дозе 40 мг/кг (доза цисплатина – 0,52 мг/кг) и равный объем 5% глюкозы, мышам 4-ой группы вводили препарат (Cis-АГ) в дозе 20 мг/кг (доза цисплатина – 0,26 мг/кг), связанный с аптамерами к асцитным клеткам (Cis-АГ-AS9).

После 6 введений препаратов все клетки асцита были изолированы и вымыты из брюшной полости мышей. Мазки асцитных клеток, выделенные из брюшной полости мышей, фиксировали метанолом и окрашивали краской Романовского-Гимза.

Обработанные клетки промывали трижды сбалансированным раствором Хэнкса и концентрации клеток подсчитывали с использованием ручного автоматического счетчика клеток Scepter 2.0 (Millipore Corporation). Более мелкие частицы, такие как клетки крови и мусор, были исключены из расчетов. Общее количество клеток у каждого животного рассчитывали по общему объему асцитической жидкости.

2.25 Функционализация механокомпозитов арабиногалактана с циклофосфамидом ДНК-аптамерами, специфичными к асцитным клеткам

Функционализацию механокомпозитов арабиногалактана с циклофосфамидом осуществляли растворением 5 мкг механокомпозита ЦФА с АГ в 1 мл фосфатного буфера, содержащего катионы кальция и магния, и добавляли аптамеры к асцитным клеткам AS42 в конечной концентрации 500 нМ. Инкубировали на шейкере при комнатной температуре в течение 30 мин.

2.26 Оценка противоопухолевой эффективности комплекса циклофосфамида с арабиногалактаном, функционализированного ДНК-аптамерами, специфичными к асцитным клеткам карциномы Эрлиха

Оценку противоопухолевой активности комплекса ЦФА с АГ *in vitro* проводили на асцитных клетках карциномы Эрлиха, изолированных на 9-ые сутки после их внутрибрюшинной трансплантации белым мышам ICR. Асцитные клетки отделяли от асцитической жидкости центрифугированием в течение 5 мин при 1,5 об/мин, после чего дважды отмывали фосфатным буфером с помощью центрифугирования. В каждую из 15 лунок планшета для культивирования помещали по 100 000 асцитных клеток в 1 мл культуральной среды. Исследование проводили в 5-ти повторностях. 1

группа – асцитные клетки (контроль), 2 группа – асцитные клетки с добавлением 5 мкг ЦФА, 3 группа – асцитные клетки с добавлением 5 мкг механокомпозита ЦФА с АГ. Все образцы инкубировались в течение 24 часов в условиях CO_2-инкубатора. Влияние ЦФА и механокомпозита ЦФА-АГ на жизнеспособность асцитных клеток карциномы Эрлиха определяли с помощью окрашивания клеток трипановым синим через 24 ч после воздействия препаратов с помощью световой микроскопии. Подсчет клеток проводили с применением камеры Горяева.

Определение содержания катионов натрия в клетке проводили с помощью SBFI, катионной калия – PBFI, согласно протоколу производителя методом проточной цитометрии.

Исследование противоопухолевого эффекта производных ЦФА *in vivo* проводили с разрешения локального этического комитата Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого на белых мышах ICR со средней массой 25 г. Для этого всем животным было трансплантировано внутримышечно в бедро 5 млн. асцитных клеток. Все мыши были разделены на 4 группы по 5 животных в каждой. Группа №1 (контроль №1) – введение фосфатного буфера, группа №2 (контроль №2) – введение ЦФА, группа №3 (контроль №3) – введение механокомпозита ЦФА с АГ, группа №4 (опыт) – введение механокомпозита ЦФА с АГ, функционализированного аптамерами. Введение физиологического раствора, ЦФА и его производных проводили внутримышечно 3 раза в неделю. Инъекции проводили объемом 100 мкл. Каждой мыши из группы №1 вводили по100 мкл фосфатного буфера, группы №2 – ЦФА из расчета 5мкг/г в 100 мкл фосфатного буфера, группы №3 – механокомпозит ЦФА с АГ из расчета 5мкг/г в 100 мкл фосфатного буфера, группы №4 – механокомпозит ЦФА с АГ, функционализированный аптамерами (500 нМ) из расчета 5мкг/г в 100 мкл фосфатного буфера.

2.27 Статистические методы исследования

Статистическую обработку результатов проводили в программе Statistica 7.0. Проверку гипотезы о статистической достоверности различий выборок проводили с помощью критерия Манна-Уитни. Обработку данных проточной цитометрии осуществляли с помощью программного обеспечения Kaluza 1.1. Идентификацию белков по базам данных и сравнительный количественный анализ проводили с помощью программы MaxQuant 1.3 (достоверность присутствия белков в пробах согласно заданным характеристикам программы составляет 99%).

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Разработка молекулярных распознающих элементов – ДНК-аптамеров

3.1.1 Селекция ДНК-аптамеров к асцитным клеткам карциномы Эрлиха

Важной составляющей наноразмерного инструмента для диагностики и терапии онкологических заболеваний является молекулярный распознающий элемент, который можно использовать для адресной доставки, чтобы точечно воздействовать на клетку-мишень с целью восстановления нормальных параметров клетки. В качестве адресных молекул используют различные агенты – антитела, небольшие молекулы, в том числе фолиевую кислоту, пептид RGD и др. В последнее время популярными становятся узнающие молекулы на основе высокоаффинных и высокоспецифичных к своим мишеням ДНК-аптамеров, получаемых с помощью технологии SELEX.

Удобной экспериментальной моделью злокачественных новообразований, пригодной для разработки молекул для адресной доставки наноинструментов, является асцитная карцинома Эрлиха, клетки которой хорошо изучены цитологически и цитохимически. Их наружная мембрана морфологически мало отличается от мембран большинства клеток животного происхождения. К тому же асцитная опухоль Эрлиха растет в жидкости в виде суспензии отдельных клеток, не сцепленных одна с другой, время удвоения которых в брюшной полости животного варьирует от 21 до 26 часов. Именно поэтому объектом для разработки распознающих молекул для адресной доставки наноинструментов диагностики и терапии онкологических заболеваний стали асцитные клетки карциномы Эрлиха. В качестве распознающих молекул для адресной доставки наноинструментов, пригодных для наномедицины, были выбраны ДНК-аптамеры к асцитным клеткам карциномы Эрлиха.

Аптамеры к асцитным клеткам карциномы Эрлиха получали по технологии cell-SELEX. Для получения аптамеров к асцитным клеткам проводили 13 раундов обогащения, амплификации и очищения для увеличения аффинности и специфичности к асцитным клеткам (Рис.12).

Каждый раунд селекции включал: (1) негативную селекцию к гепатоцитам, клеткам крови, почек и селезенки; (2) амплификацию аптамеров и (3) позитивную селекцию к асцитным клеткам. Аффинность пулов аптамеров к асцитным клеткам оценивали методом спектрофлуориметрии на спектрофлуориметре Aminco Bowman Series 2, Thermo Spectronic (США), для чего определяли степень связывания пулов аптамеров разных раундов с асцитными клетками (Рис.14). Выявлено, что наибольшую аффинность к асцитным клеткам имели аптамеры 10 раунда селекции.

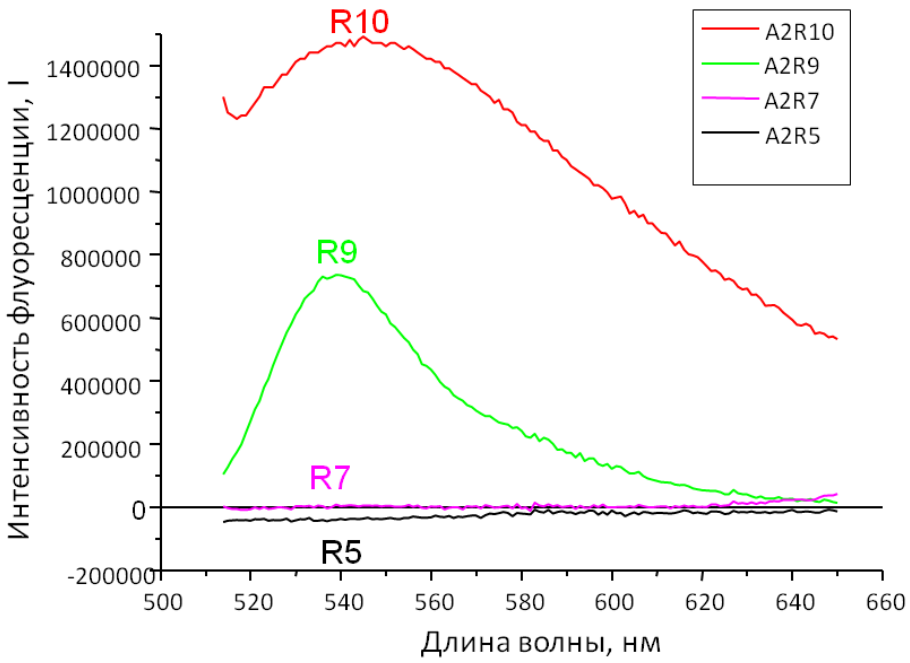


Рисунок 14 – Интенсивность флуоресценции аптамеров разных раундов, связанных с асцитными клетками. R5,7,9,10 – номер раунда селекции.

Анализ аффинности аптамеров к асцитным клеткам с помощью проточной цитометрии показал похожие результаты (Рис.15).

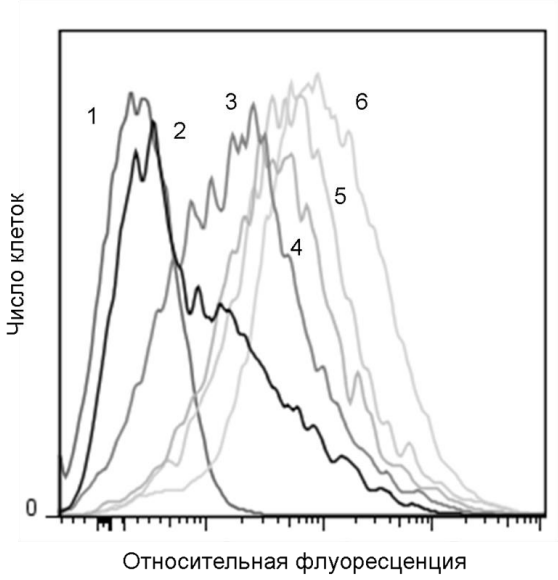


Рисунок 15 – Аффинность ДНК-аптамеров разных раундов селекции по результатам проточной цитометрии: 1 – интактные асцитные клетки; 2 – ДНК-библиотека, связанная с асцитными клетками; 3 – ДНК-аптамеры 7 раунда селекции, связанные с асцитными клетками; 4 – ДНК-аптамеры 8 раунда селекции, связанные с асцитными клетками; 5 – ДНК-аптамеры 9 раунда селекции, связанные с асцитными клетками; 6 – ДНК-аптамеры 10 раунда селекции, связанные с асцитными клетками.

Оценка степени сродства асцитных клеток к аптамерам с помощью флуоресцентной микроскопии показала также аналогичные результаты. В контроле в отсутствие аптамеров флуоресценции асцитных клеток не наблюдалось. Аптамеры, полученные в 6-ом раунде селекции, имели малое сродство к асцитным клеткам, поэтому флуоресценция асцитных клеток, связанных с аптамерами 6-го раунда практически отсутствовала. Максимальная флуоресценция клеток наблюдалась при связывании их с

аптамерами 10-го раунда селекции по сравнению с аптамерами 9 раунда (Рис.16).

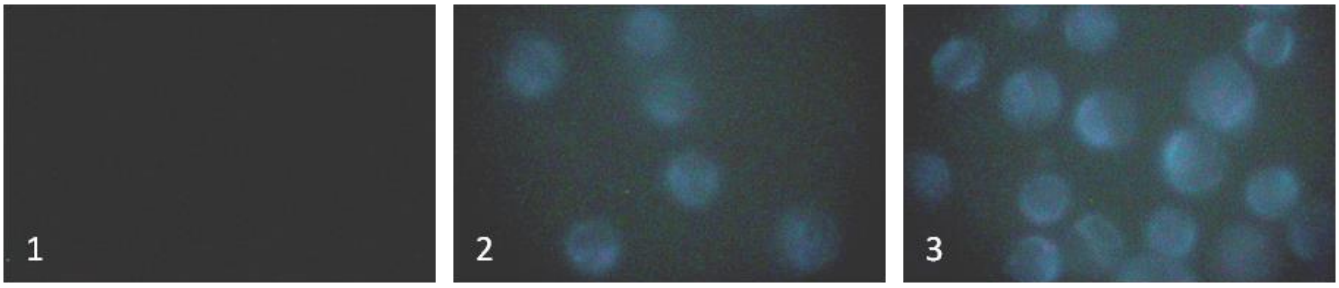


Рисунок 16 – Флуоресцентная микроскопия асцитных клеток, связанных с FAM-мечеными аптамерами разных пулов селекции. 1 – интактные асцитные клетки; 2 – асцитные клетки, связанные с FAM-мечеными аптамерами 9 раунда селекции; 3 – асцитные клетки, связанные с FAM-мечеными аптамерами 10 раунда селекции.

Определение биологической активности аптамеров 10-го раунда селекции показало, что эти олигонуклеотиды обладали способностью осуществлять гибель асцитных клеток (Рис.17). После инкубации асцитных клеток с аптамерами 10 раунда селекции хроматин был конденсирован у 25% клеток, что свидетельствовало о начале апоптотического процесса, при этом 20% клеток находилось в состоянии некроза.

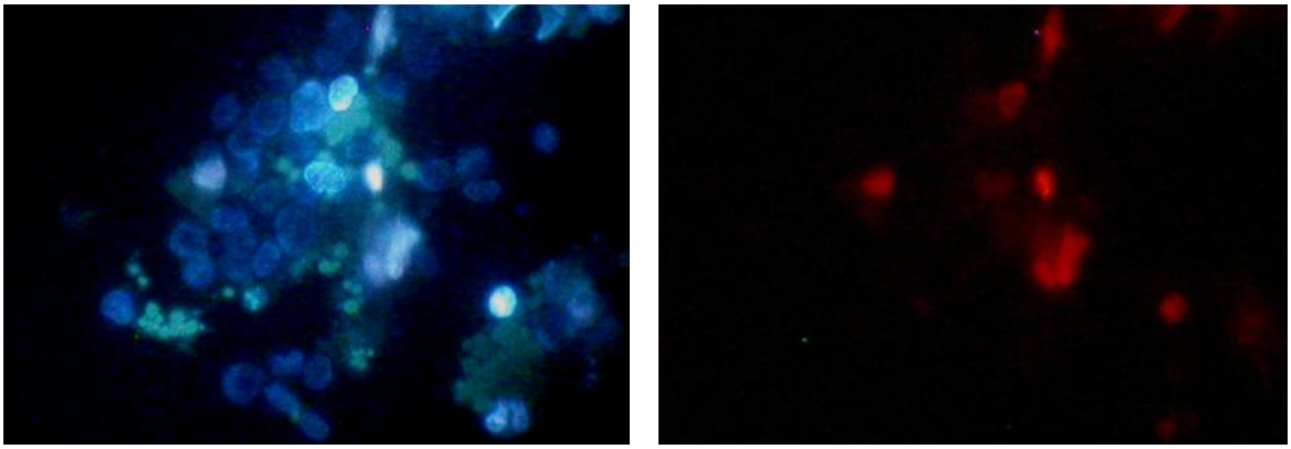
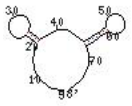
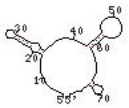
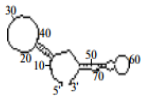
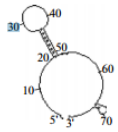


Рисунок 17 – Флуоресцентная микроскопия асцитных клеток, проинкубированных с пулом аптамеров к асцитным клеткам 10 раунда селекции в течение 5 часов. Красное свечение – некроз. Слабоголубое – живые клетки, яркоголубым светится конденсированный хроматин апоптотических клеток. (Увеличение х40).

Пул аптамеров 10 раунда селекции был клонирован (вектором служила плазмида M13mp18) и секвенирован. После бактериального клонирования и секвенирования аптамеров 10 раунда селекции было получено 24 уникальные последовательности олигонуклеотидов, четыре из которых были синтезированы – AS9, AS14, AS18 и AS42. Выбор аптамеров для синтеза определялся результатами проточной цитометрии (именно эти аптамеры обладали наибольшей аффинностью) и расчетами стабильности аптамеров (выполненными с помощью программного обеспечения OligoAnalyzer 3.1). Последовательности нуклеотидов в аптамерах, обладающих наибольшей аффинностью к клеткам карциномы Эрлиха, представлены в табл. 1.

Таблица 1. Аптамеры к клеткам асцитной карциноме Эрлиха

Аптамер	Последовательность нуклеотидов	Свободная энергия фолдинга ΔG, ккал/моль	Вторичная структура
AS-9	CTCCTCTGACTGTAACCACGACTG AGCTTTGGTGGGTCGAGCTATGTG CTGCCTCTTCACGCATAGGTAGTC CAGAAGCC	–7.59	
AS-14	CTCCTCTGACTGTAACCACGAAGG TGTCGGCCTTAGTAAGGCTACAGC CAAGGGAACGTAGCATAGGTAGT CCAGAAGCC	–8.64	
AS-42	CTCCTCTGACTGTAACCACGTCAA TGGGTGATATATGCAGGTTACGCT GGCTAGTTGAAAGCATAGGTAGT CCAGAAGCC	–6.67	
AS-18	CTCCTCTGACTGTAACCACGCCTG GGACAGCCACACAGAAGTGTAGA CCTCGCGGAATCGGCATAGGTAG TCCAGAAGCC	–9.27	

3.1.2 Определение констант диссоциации аптамеров

Аффинность синтетических аптамеров к асцитным клеткам оценивали методом проточной цитометрии, при этом флуоресценцию интактных клеток, принимали за негативную, а флуоресценцию выше этого уровня считали истинной флуоресценцией аптамеров, связанных с асцитными клетками (Рис.18).

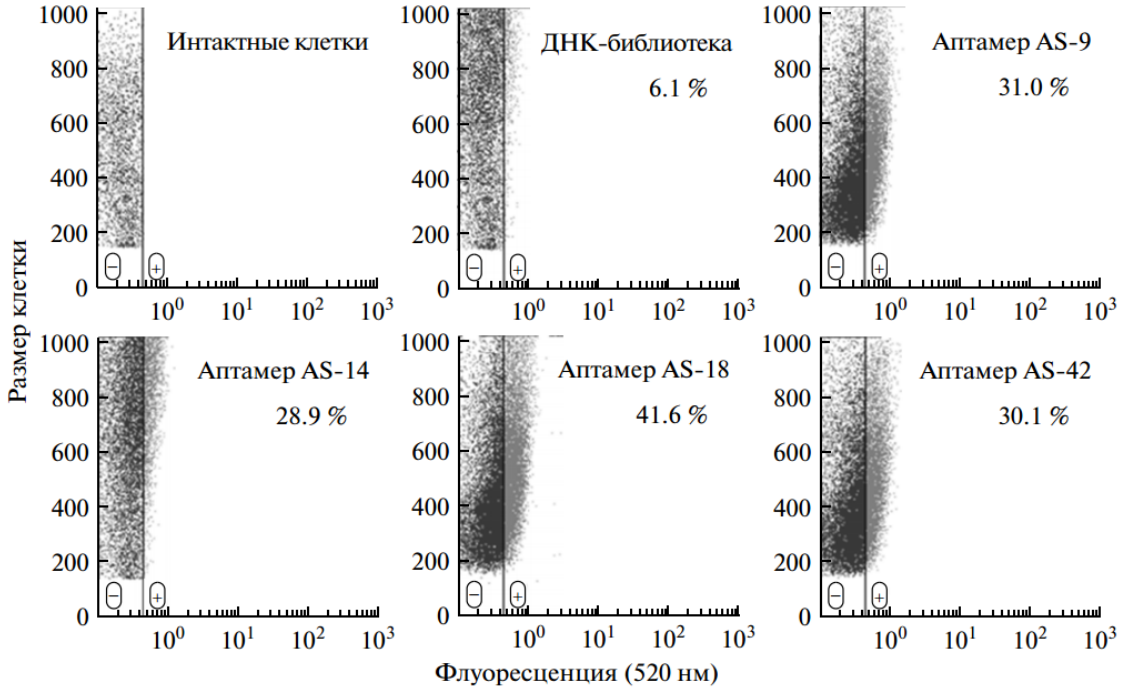


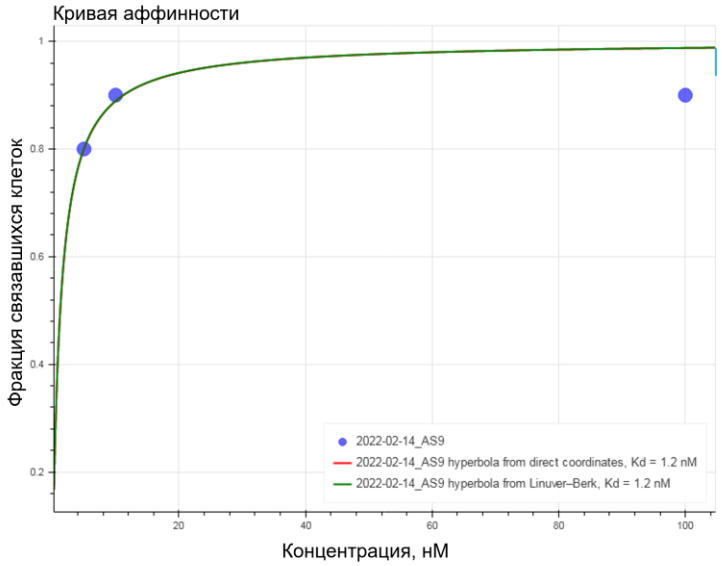
Рисунок 18 – Аффнность синтетических FAM-меченых аптамеров с асцитными клетками карциномы Эрлиха. Флуоресценцию интактных клеток, не связанных с FAM-мечеными аптамерами и библиотекой, принимали за негативную.

Для ДНК-аптамеров AS9 и AS42 оценивали их сродство к мишеням – асцитным клеткам с помощью расчета величин констант диссоциации комплекса с мишенью. Обычно константы диссоциации комплексов белок-аптамер лежат в пределах 10^{-9}-10^{-11}, что является показателем большого сродства аптамера к молекуле-мишени. Зависимость связывания аптамеров со своей мишенью от концентрации аптамеров изображали в координатах Лайнуивера-Берка. График, полученный таким образом в координатах 1/F от 1/[оцДНК], представляет собой прямую, тангенс угла наклона которой равен K_m/F_{max}, а отрезок, отсекаемый на оси ординат, равен $1/F_{max}$. Отрезок, отсекаемый на оси абсцисс, равен $1/K_d$.

Расчет констант диссоциации сделан двумя способами – путем подгонки прямой в обратных координатах Лайнуивера–Берка (Рис.19) и подгонки гиперболы, соответствующей уравнению Михаэлиса-Ментен в прямых координатах. Константа диссоциации (Kd) аптамера AS9, рассчитанная путем подгонки прямой в обратных координатах Лайнуивера-Берка, составила 1.25 нМ (Рис.19а). Kd, рассчитанная путем подгонки гиперболы, соответствующей уравнению Михаэлиса-Ментен в прямых координатах также составила 1.25 нМ (Рис.19б). Константа диссоциации (Kd) аптамера AS42, рассчитанная путем подгонки прямой в обратных координатах Лайнуивера-Берка равнялась 3.91 нМ (Рис.20а). Kd, рассчитанная путем подгонки гиперболы, соответствующей уравнению Михаэлиса-Ментен в прямых координатах, была немного ниже и составила 3,47 нМ (Рис.20б).

Аптамеры AS9, AS14 и AS42, как наиболее аффинные, были использованы в качестве молекулярных распознающих элементов для создания многофункциональных нанокомплексов диагностики и терапии онкологических заболеваний.

а)



б)

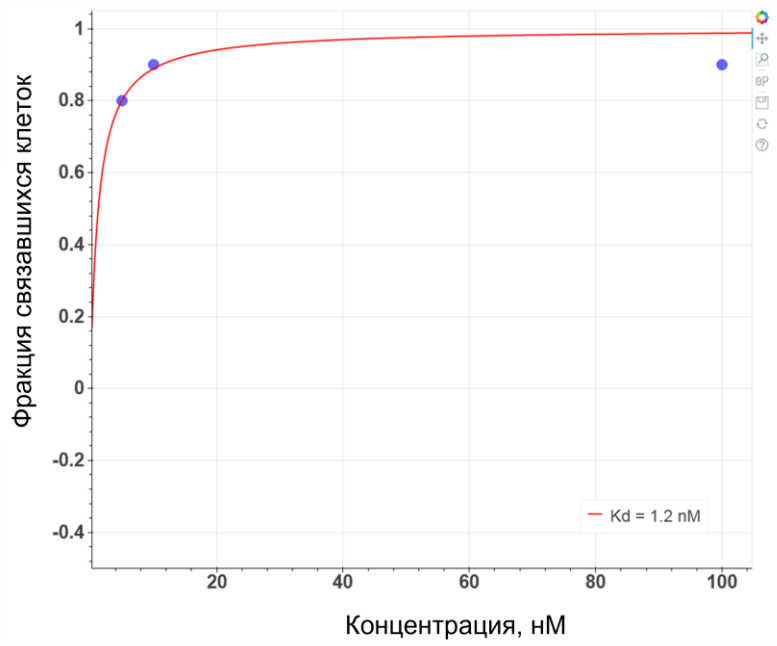
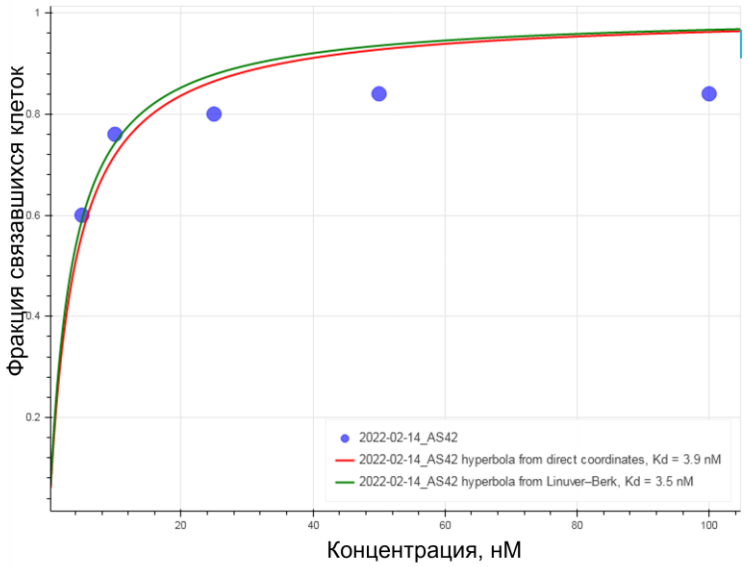


Рисунок 19 – Константа диссоциации аптамера AS9, рассчитанная разными способами (путем подгонки прямой в обратных координатах Лайнуивера–Берка) (зеленые кривые на картинках) и подгонки гиперболы, соответствующей уравнению Михаэлиса-Ментен в прямых координатах (красные кривые на картинках).

а)



б)

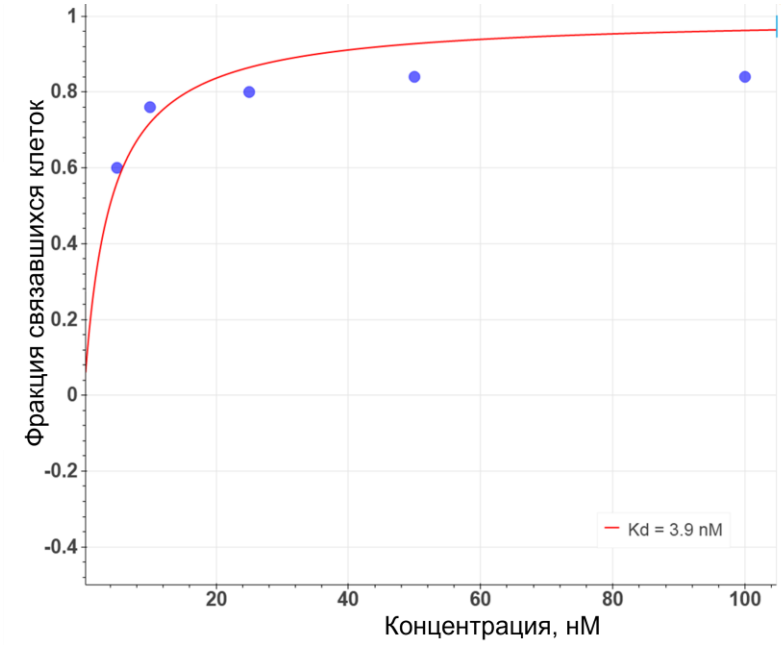


Рисунок 20 – Константа диссоциации аптамера AS42, рассчитанная разными способами (путем подгонки прямой в обратных координатах Лайнуивера–Берка) (зеленые кривые на картинках) и подгонки гиперболы, соответствующей уравнению Михаэлиса-Ментен в прямых координатах (красные кривые на картинках).

3.1.3 Биологический эффект аптамеров, специфичных асцитным клеткам карциномы Эрлиха

Для оценки возможных эффектов аптамеров на функциональное состояние асцитных клеток определяли степень влияния аптамеров на развитие апоптоза по транслокации фосфатидилсерина с помощью AnnexinV FITC. Выявлено, что ДНК-библиотека и аптамер AS9 не изменяли долю клеток в состоянии апоптоза, тогда как аптамеры AS14 и AS18 повышали долю апоптотических клеток в популяции опухолевых клеток более чем в 2 раза, а AS42, наоборот, снижал уровень апоптоза в несколько раз (Рис.21).

Влияние аптамеров на скорость роста асцитной карциномы Эрлиха *in vitro* оценивали с помощью флуоресцентного красителя Cell Trace(tm) Far Red, который связывался с внутриклеточными белками и при делении клеток распределялся равномерно между дочерними клетками. Таким образом, при делении клеток интенсивность их флуоресценции снижалась. В процессе исследований выявлено, что в контрольных образцах и в пробах с ДНК-библиотекой интенсивность флуоресценции опухолевых клеток снижалась, что свидетельствовало о делении опухолевых клеток в культуре. Аптамер AS9 полностью подавлял клеточное деление, а аптамеры AS14, AS18 и AS42 ингибировали деление клеток лишь частично (Рис.22).

В целом, установлено, что ДНК-библиотека не влияла на функциональное состояние опухолевых клеток, поскольку доля апоптотических клеток и скорость клеточного деления в присутствии ДНК-библиотеки практически не изменялись. Аптамер AS9 незначительно увеличивал уровень апоптоза и полностью подавлял клеточное деление. Аптамеры AS14 и AS18 увеличивали долю клеток с транслокацией фосфатидилсерина, что свидетельствовало о стимуляции апоптоза, и почти не влияли на скорость клеточного деления. Аптамер AS42 не изменял скорость удвоения клеток, но значительно уменьшал долю клеток с

транслокацией фосфатидилсерина. Таким образом, очевидно, что аптамеры воздействовали на разные молекулярные мишени, поскольку вызывали различные биологические эффекты.

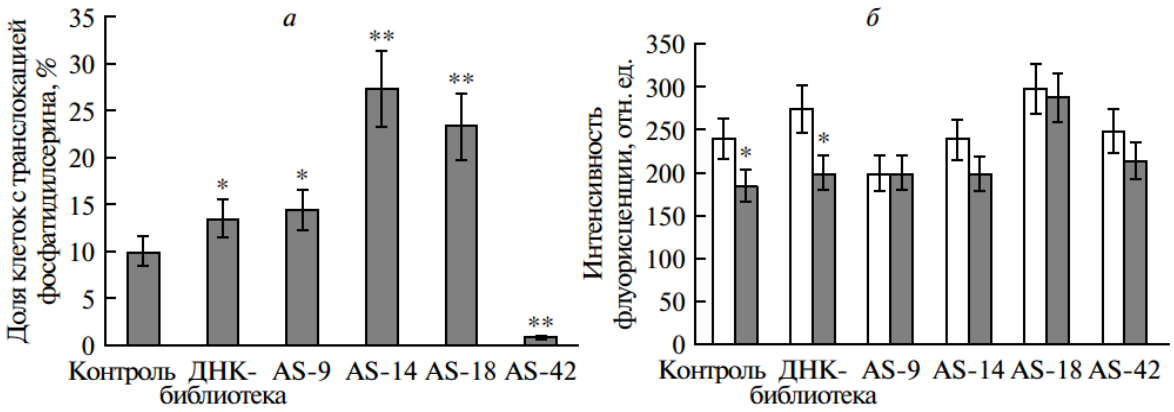


Рисунок 21 – Влияние аптамеров на индукцию апоптоза (*а*) и пролиферацию асцитных клеток карциномы Эрлиха (*б*). Светлые столбики на рисунке *б* – исходная флуоресценция в асцитных клетках красителя Cell Trace Far Red (первые сутки), темные столбики на *б* – флуоресценция в процессе клеточного деления через 24 ч. Статистическая значимость изменений относительно контроля: $*p < 0.05$, $** p < 0.01$.

3.2 Молекулярные мишени ДНК-аптамеров, специфичных асцитным клеткам карциномы Эрлиха

Для объяснения механизма биологического эффекта аптамеров важно знать их молекулярные мишени. Поэтому следующим этапом разработки распознающих опухолевые клетки молекул стало определение белковых мишеней аптамеров. Белки, выделенные из клеток с помощью аптамеров, идентифицировали с помощью технологии AptaBID [220], оптимизированной для определения мишеней одного аптамера. Идентификация белков

осуществлялась с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии и тандемной масс-спектрометрии высокого разрешения.

Выделение белковых мишеней проводили по модифицированной технологии Berezovski M.V. Ключевым моментом аффинного выделения фракции белка-мишени из клеток являлось уменьшение неспецифического взаимодействия аптамеров с белками, связавшимися с пластиковыми пробирками, магнитными частицами и клетками. С этой целью использовали маскирующую ДНК, увеличивали количество отмывок, каждый раз меняя пробирку. Для исключения ложноположительных, случайно связывающихся с ДНК белков, проводили контрольные определения с ДНК-библиотекой.

В результате масс-спектрометрического анализа белков, выделенных с помощью аптамеров, были определены возможные мишени аптамеров. Идентификация белков по базам данных и сравнительный количественный анализ проделаны с помощью программы MaxQuant 1.3. Квантификация Label Free проводилась с параметрами, выставленными в программе по умолчанию. Белки, идентифицированные с помощью базы данных известных контаминантов, исключались из дальнейшего анализа. Коэффициенты корреляции между пробами аптамеров и контролем рассчитывали по относительным количественным показателям “LFQ intensity”. Белки в пробах клонов, количественно преобладающие над пробами контрольной библиотеки, рассматривали как возможные мишени аптамеров.

Белки сортировали по убыванию коэффициентов корреляции между относительной распространенностью в пробах аптамеров против контроля. Среди белков – потенциальных мишеней аптамера AS9, лидировали структурные компоненты цитоскелета, филамин А и миозин 9. Известно, что эти белки играют важную роль в клеточной сигнализации [221-225] и участвуют в образовании метастазов [28; 226-230]. Все вероятные белковые мишени AS9 участвуют в развитии опухолевого процесса и регуляции пролиферации [230-234].

Вероятными мишенями аптамера AS14 стали три белка – гельзолин, α- и β-субъединицы ATP-синтазы. Лидирующей в списке потенциальных мишеней аптамера AS14 стала α-субъединица митохондриальной ATP-синтазы, играющая важную роль в синтезе ATP.

Поиск мишеней аптамеров для AS42 показал, что вероятными белковыми мишенями могут являться молекулярные шапероны, родственные тепловому шоку 71 кДа (Hspa8) и HSP 90-бета (Hsp90ab1). Эти белки способствуют созреванию, поддержанию структуры и правильной регуляции белков, участвующих в контроле клеточного цикла и передаче сигналов, и локализованы в клеточной мембране, цитоплазме и ядре. Важно отметить, что аптамер AS42 имел высокое сродство к асцитным клеткам, но не вызывал апоптоза и не мешал клеточному делению.

Результаты исследований показали, что аптамеры имеют, вероятно, не одну, а несколько мишеней, причем не только на плазматических мембранах, но и внутри асцитных клеток. Возможно, наличие нескольких сайтов связывания для каждого аптамера связано с особенностями селекции, проведенной на целых клетках, в результате чего аптамер может связываться разными частями с разными белками. Не исключено к тому же, что аффинность аптамеров к разным белкам, идентифицированным как их вероятные мишени, может различаться.

Таким образом, показано, что вероятными мишенями для аптамера AS9 являются структурные компоненты цитоскелета, филамин А и миозин 9, для AS14 – гельзолин, α- и β-субъединицы ATP-синтазы, а для AS42 – молекулярные шапероны, родственные тепловому шоку 71 кДа (Hspa8) и HSP 90-бета (Hsp90ab1).

3.3 Исследование чувствительности и специфичности ДНК-аптамеров к асцитным клеткам *in vivo*

Для использования ДНК-аптамеров в качестве распознающих молекул, адресно связывающихся с молекулярными мишенями, в первую очередь необходимо подтвердить их связывание с асцитными клетками *in vivo*. Для этой цели важно использовать стандартные методы диагностики. В нашей работе было взято два стандартных метода визуализации, которые используют в медицинской диагностике, а именно, ПЭТ-КТ, МРТ и метод флуоресцентной визуализации.

В качестве модели для обнаружения опухолевых клеток в организме была взята метастатическая модель асцитной карциномы Эрлиха. Метастатическая модель была выбрана потому, что образование метастазов является признаком злокачественных новообразований и одной из основных причин смерти онкологических больных. Распространение опухолевых клеток через кровообращение и лимфатическую систему начинается уже на ранних стадиях заболевания, иногда даже до того, как первичная опухоль становится достаточно большой для ее визуализации с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), магнитного резонанса (МРТ) или компьютерной томографии (КТ) [235].

Около 3-5% всех злокачественных новообразований – это рак неизвестного первичного происхождения. Обычно при комплексном диагностическом обследовании выявляется первичный очаг. Обычные методы обнаружения метастазов *in vivo* недостаточно чувствительны и специфичны, чтобы различать небольшие объемы трансформированных тканей. Следовательно, существует потребность в методике визуализации, способной точно обнаруживать небольшие первичные опухоли и метастазы. Предпочтительно, чтобы эти методы были неинвазивными.

3.3.1 Исследование чувствительности и специфичности аптамеров к асцитным клеткам карциномы Эрлиха *in vivo* методом ПЭТ-КТ с помощью радиофармпрепаратов

Использование высокоспецифичных радиофармпрепаратов для визуализации опухолей с помощью ПЭТ/КТ является стандартным методом диагностики и мониторинга рака [235]. ПЭТ/КТ-изображение с радиофармацевтическими препаратами, такими как 2-дезокси-2-[фтор-18]фтор-D-глюкоза (^{18}F-FDG), ^{11}C-метионин и ^{11}C-холин в настоящее время являются одними из самых чувствительных методов визуализации опухоли, определения стадии и оценки прогрессирования опухоли [236–238]. Однако, несмотря на высокую чувствительность ПЭТ/КТ, радиофармпрепараты не демонстрируют селективности, накапливаются в опухолях и тканях с высокой метаболической активностью. В качестве лигандов для направленной доставки радиоактивных меток в клетки могут быть использованы антитела, пептиды, фолиевая кислота.

Альтернативой антителам и пептидам для диагностики и адресной доставки являются аптамеры. Однако до настоящего времени нет полной уверенности в чувствительности и специфичности аптамеров *in vivo*. Это является одной из основных причин, которая не позволяет широкое использование аптамеров в медицине. Поэтому промежуточной задачей в разработке препаратов для наномедицины на основе аптамеров является доказательство их чувствительности и специфичности *in vivo*. Одним из стандартных методов, который был использован для решения задачи исследования чувствительности и специфичности аптамеров к асцитным клеткам *in vivo*, для чего был использован радиофармпрепарат на основе аптамеров к асцитной карциноме Эрлиха, стал метод ПЭТ/КТ.

Аптамеры уже использовались для адресной доставки радиоактивной метки [238; 239]. К аптамеру присоединялись различные радионуклиды:

технеций-99m (99mTc), [240] индий-111 (111In), [241] медь-64 (64Cu), фтор-18 (^{18}F) [242]. Нами была впервые использована радиоактивная метка ^{11}C со сверхкоротким (20,38 мин) периодом полураспада, которая является биобезопасной и имеет простой синтез. Такая метка на основе аптамеров к асцитным клеткам была получена в Ядерном центре ФМБА России (Красноярск). В работе представлены результаты исследований по использованию ДНК-аптамера, меченного радиоактивным ^{11}C, для визуализации метастазов *in vivo*, подтвердивших чувствительность и специфичность ДНК-аптамеров.

Способность $^{11}CH_3$-AS14 находить и обнаруживать опухолевые очаги и метастазы в организме оценивалась на мышах Imprinting Control Region (ICR) с опухолями Эрлиха. В исследовании использовались модели метастатических опухолей. Метастазы формировали при внутривенном введении 0,3 млн. асцитных клеток карциномы Эрлиха в хвостовую вену мышей.

Аптамер с радиоактивной меткой позволил идентифицировать метастазы в различных органах мыши, таких как легкие, тимус, кишечник, сердце и селезенка, причем оказалось, что радиофармпрепарат на основе аптамеров был более чувствительным, чем 2-дезокси-2-[фтор-18]фтор-D-глюкоза (^{18}F-FDG) (Рис.22).

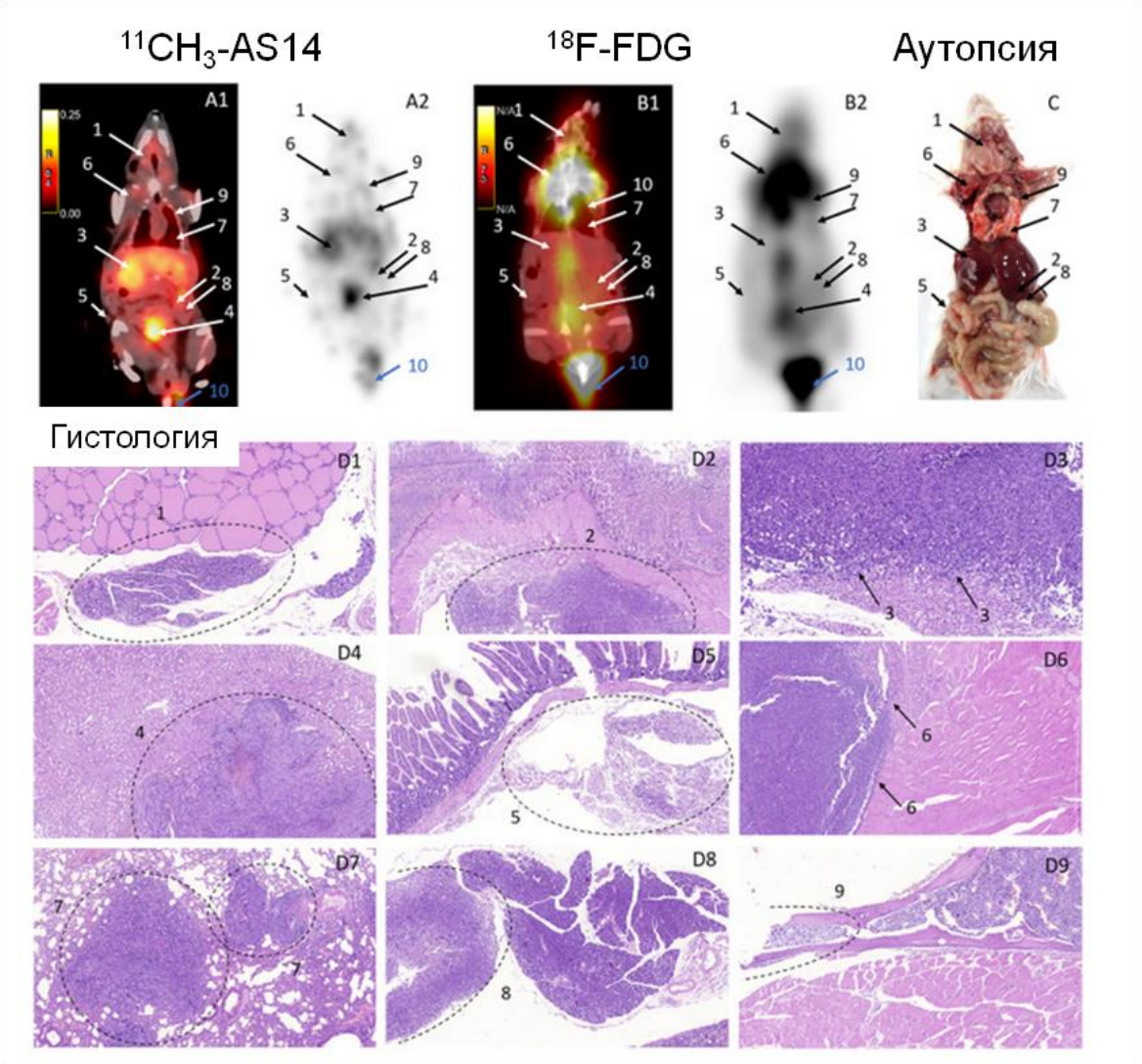


Рисунок 22 – Сравнительная ПЭТ/КТ-визуализация с использованием $^{11}CH_3$-AS-14 с ^{18}F-FDG (A – D). Изображения с $^{11}CH_3$-AS14 (A1 и 2) и 18F-FDG (B1 и 2) на тех же мышах, сканированных на следующий день. Точность результатов ПЭТ / КТ подтверждена аутопсией (B) и гистологическим анализом метастатических опухолевых очагов (D) в различных органах: щитовидной железе (1); желудок (2); печень (3); почка (4); кишечник (5); мышца (6); легкое (7); поджелудочная железа (8); реберный костный мозг (9). Стрелки и пунктирные кружки указывают участки опухоли в различных органах при ПЭТ / КТ, аутопсии и соответствующих срезах тканей.

Самый высокий сигнал наблюдался в пораженных опухолью печени, селезенке, почках и крупных узловых образованиях в брюшной полости (Рис.23). Для каждого метастаза местоположение было подтверждено с помощью вскрытия и гистологического анализа. Метастатические поражения легко отличались как макроскопически, так и микроскопически. Метастатическое поражение во всех органах характеризовалось пролиферацией опухолевых клеток с выраженными явлениями цитологической атипии, проявляющимися в виде ядерного полиморфизма, ядерной гиперхромазии и нарушения ядерно-цитоплазматического соотношения. Опухолевые клетки содержали значительное количество патологических митозов, крупных базофильных ядрышек. Большие очаги роста опухоли в основном обнаруживались в печени, а опухолевые узлы в некрозе брюшной полости проявлялись в виде коагуляции с клеточным детритом.

Для визуализации был использован сканер Discovery ПЭТ/КТ 600 (General Electric, США). Этот сканер имеет предел разрешения 8 мм^2 для стандартных радиофармпрепаратов, таких как ^{18}FDG и метионин. Однако в случае использования радиофармпрепарата на основе ^{11}C-аптамера разрешение было намного выше (<2 мм^2), поэтому мы смогли различить даже более мелкие метастазы, чем при использовании ^{18}FDG. Радиофармацевтический препарат на основе аптамера выявил небольшие метастазы, распространяющиеся по всему телу – в щитовидной железе, желудке, печени, почках, кишечнике, мышцах, легких, сердце, поджелудочной железе и даже в костном мозге ребер. ^{18}F-FDG накапливался в груди, горле и вдоль позвоночника и не позволял определить локализацию небольших метастазов. Мыши с метастазами, которым вводили праймер $^{11}CH_3$ или неспецифический аптамер в качестве контроля, продемонстрировали физиологическое распределение радиофармпрепаратов на основе олигонуклеотидов с небольшим облучением в печени.

3.3.2 Исследование чувствительности и специфичности аптамеров к асцитным клеткам карциномы Эрлиха *in vivo* методом магнитно-резонансной томографии с использованием магнитных наночастиц (ферроарабиногалактанов), функционализированных ДНК-аптамерами

Вторым стандартным методом, подтвердившим аффинность и специфичность ДНК-аптамеров, стал метод ЯМР-томографии. Опухолевые клетки были визуализированы в составе солидных опухолей, полученных в результате трансплантации асцитных клеток карциномы Эрлиха. Асцитные клетки карциномы Эрлиха, трансплантированные в правую ногу и мозг мышей, визуализировали методом ЯМР-томографии с помощью конъюгированных с аптамером суперпарамагнитных наночастиц ферроарабиногалактана (FeАГ).

Сканирование проводили через 30 минут после внутривенной инъекции Апт-FeАГ (8 мкг/кг) или сразу после омнискана (контрастного вещества на основе гадолиния) (1,9 мкМ/кг) (по 3 животных в каждой группе). При томографии мышей использовали газовую анестезию изолфлураном. Результаты исследований показали, что Апт-FeАГ накапливается в солидной опухоли в ноге так же, как и гадолиний (Рис.23), что делает его более контрастным, но по какой-то причине с более низким разрешением, чем у гадолиния.

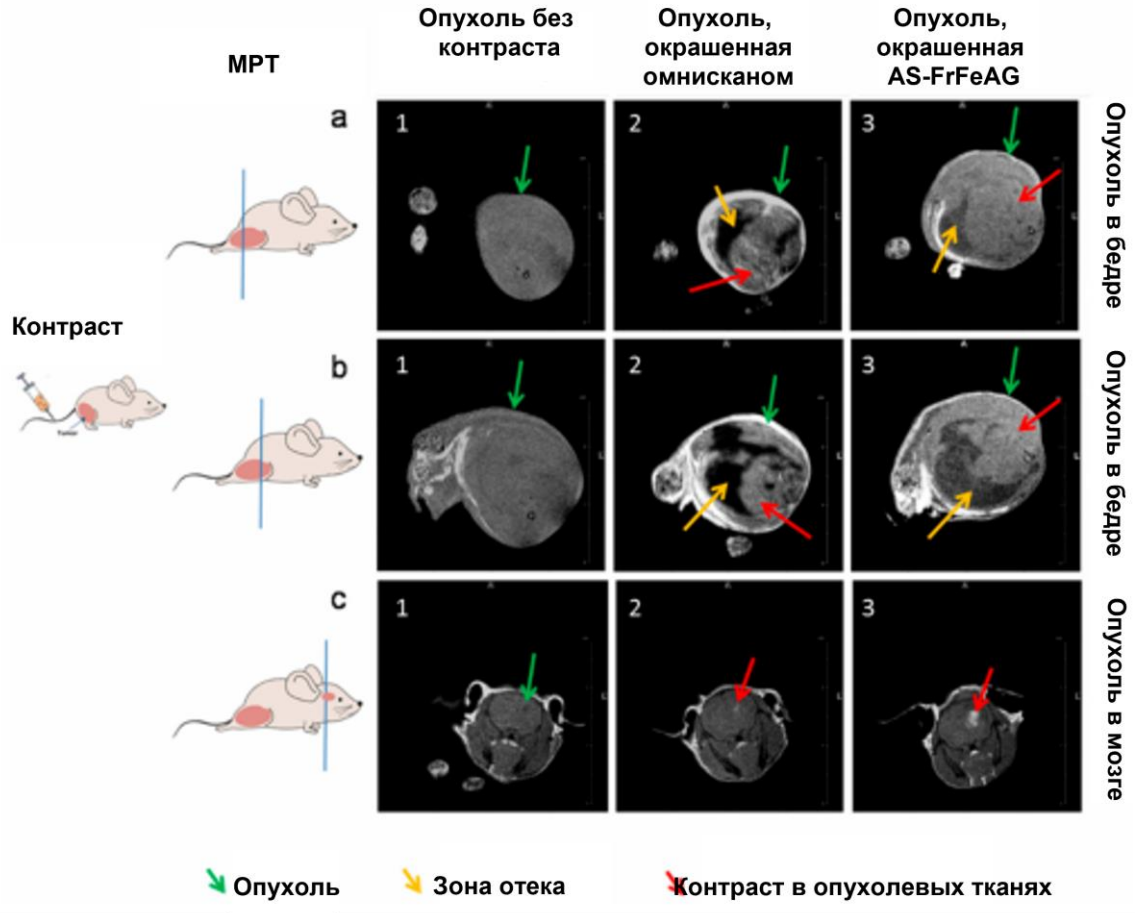


Рисунок 23 – Применение Апт-FeAГ в качестве контрастного вещества опухолей при магнитно-резонансной томографии (МРТ). Мыши с солидной карциномой Эрлиха, трансплантированные в правую ногу (а, б) и мозг (в) без контрастирования (1); с омнисканом (2) и Апт-FeAГ (3) в качестве контрастного вещества.

Исследование распределения магнитных наночастиц в органах у здоровых мышей после внутривенной инъекции продемонстрировано на рис.24. Известно, что АГ можно использовать в качестве агента для доставки лекарств в печень; этот полисахарид накапливается в клетках печени за счет рецепторов асиалогликопротеинов [243]. В экспериментах с использованием МРТ мы не наблюдали накопления Апт-FeAG в печени после 15 мин и 1,5 ч внутривенного (IV) введения. Печень выглядела очень яркой при сканировании еще до введения Апт-FeAГ. Через 1,5 ч после инъекции Апт-

FeAГ был обнаружен в кишечнике, куда он, скорее всего, и мог поступать из печени через желчные протоки.

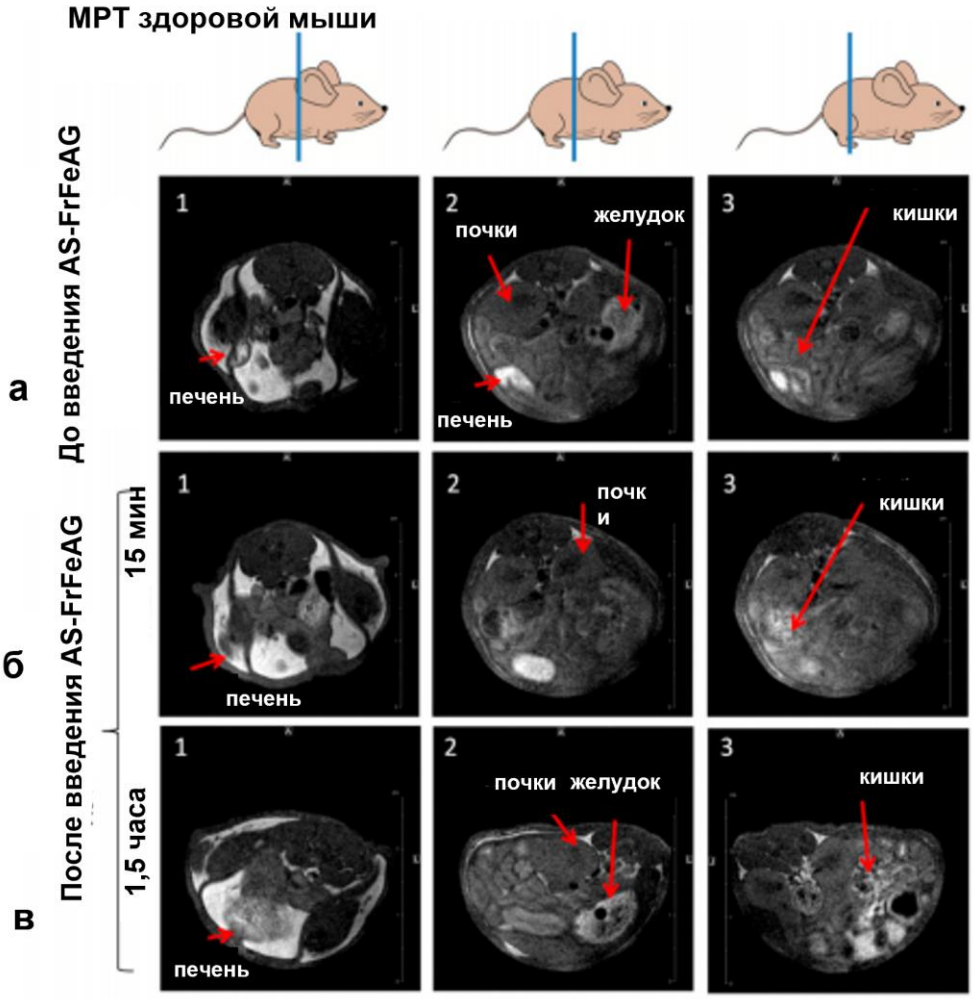


Рисунок 24 – Распределение Апт-FeAГ в различных органах мышей, проанализированное с помощью МРТ, до (а) и через 15 мин (б), через 1,5 ч (в) после внутривенного введения.

3.3.3 Исследование чувствительности и специфичности аптамеров к асцитным клеткам карциномы Эрлиха флуоресцентным методом

Для исследования чувствительности и специфичности флуоресцентным методом аптамеры, меченные Alexa405 и конъюгированные с магнитными

наночастицами, вводили мышам с асцитной карциномой Эрлиха. После этого наблюдали динамику накопления флуоресцентной метки в различных органах и тканях. Для оценки процесса накопления аптамеров в тканях животных через определенное время подвергали эвтаназии, выделяли органы, из которых готовили гомогенаты. Гомогенаты помещали в планшет. Интенсивность флуоресцентной метки определяли с помощью гель-документирующей системы.

Результаты исследований показали, что концентрирование метки в органах происходит в течение 180 мин (Рис.25). Через 30 мин флуоресцентная метка фиксируется в клетках карциномы Эрлиха, почках, мозгу и сердце, а через 180 мин флуоресцентция в клетках мозга и почек уже не отличается от контрольных животных.

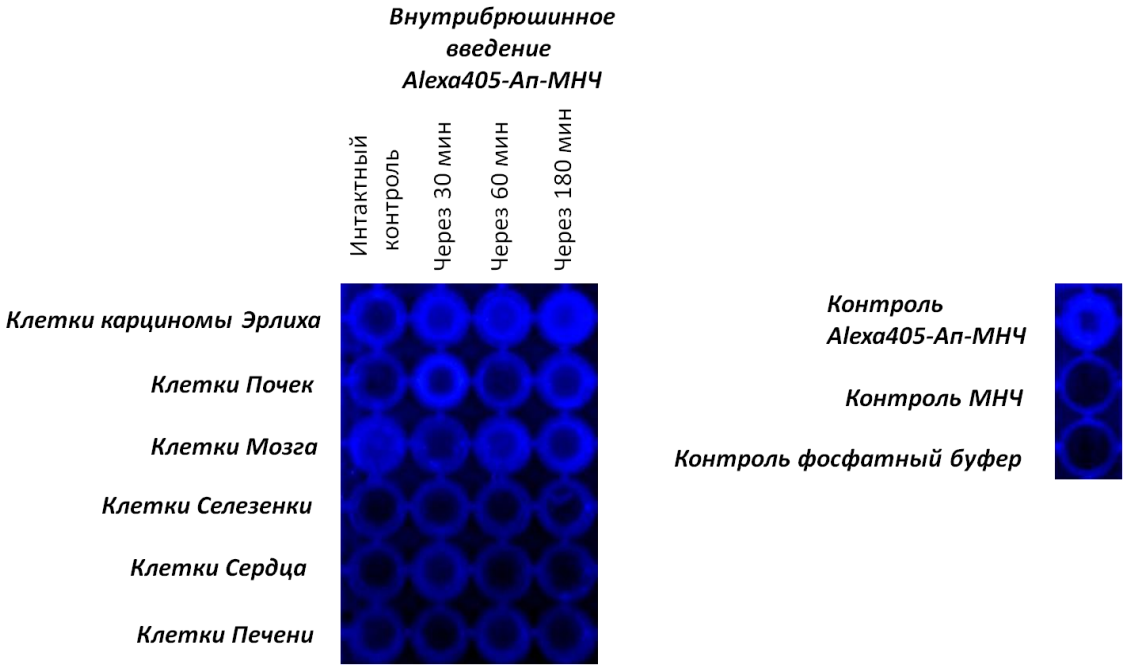


Рисунок 25 – Накопление аптамеров, меченных флуоресцентной меткой Alexa405 в органах мышей с асцитной карциной Эрлиха в течение 180 мин.

Таким образом, исследования чувствительности и специфичности аптамеров к асцитным клеткам *in vivo* с помощью ПЭТ/КТ, ЯМР и флуоресценции показало, что в организме мыши аптамеры находят свою мишень и концентрируются в течение 30-60 мин. Причем необходимо отметить, что в течение 180 мин и более аптамеры в организме мыши стабильны и не подвержены действию нуклеаз.

3.4 Бионаноматериалы с адресной доставкой на основе ДНК-аптамеров для противоопухолевой терапии

3.4.1 Противоопухолевая терапия методом гипертермии, создаваемой золотыми наночастицами, функционализированными ДНК-аптамерами

В последнее время все более популярными становятся методы терапии злокачественных новообразований, основанные на физико-химических и метаболических различиях между опухолевыми и нормальными клетками и тканями. Одним из таких методов является термотерапия, основанная на более высокой чувствительности опухолевых тканей к повышению температуры. Так, нагрев опухоли до +43,5ºС вызывает необратимое нарушение конформации белков из-за более высокой кислотности, характерной для опухолевой ткани, в то время как белки нормальных тканей к этой температуре нечувствительны. Применение наночастиц золота, обладающих уникальными оптическими свойствами, позволяет увеличить термосенсибилизацию опухолевых клеток за счет возбуждения плазмонного резонанса. Облучение опухоли, меченной наночастицами, лазером на длине волны, попадающей в полосу плазмонного резонанса наночастиц, способствует клеточной гибели.

Функционализированные аптамером наночастицы уже использовались для лечения рака, включая фотодинамическую терапию (ФДТ) и

фототермическую терапию (ФТТ) [140; 244]. ФДТ малоинвазивна и минимально токсична. Она разрушает клетки реактивными формами кислорода, генерируемыми светом и фотосенсибилизатором. Конъюгация аптамеров с наночастицами улучшает накопление частиц в опухолевой ткани и селективное фотоиндуцированное повреждение во время ФДТ.

ФТТ является неинвазивным методом лечения рака и основана на способности наночастиц золота поглощать свет и преобразовывать его в тепло, что способствует разрушению аномальных клеток. Эффективность этого метода, в частности, была успешно продемонстрирована при ремиссии опухоли у мышей [2457]. Huang и соавт. продемонстрировали использование аптамеров, конъюгированных с наностержнями, для направленной ФТТ лейкемии человека [246].

В настоящее время наночастицы золота (AuНЧ) представляют большой интерес для лечения рака, особенно для термического разрушения опухолевых клеток, из-за их способности к фототермическому нагреву под действием лазерного излучения. Противораковая термотерапия основана на высокой чувствительности раковых клеток к повышенной температуре. Нагревание опухоли до +43,5°C приводит к необратимой денатурации протеинов, при этом молекулы белка в нормальной ткани остаются нетронутыми. AuНЧ могут служить «оптическими нагревателями» и способствовать разрушению раковых клеток [247].

Осциллирующие электрические поля света, распространяющиеся рядом с коллоидной наночастицей, взаимодействуют со свободными электронами, вызывая согласованные колебания заряда электрона, который находится в резонансе с частотой видимого или ближнего инфракрасного света. Поглощенный свет, преобразованный в тепло, вызывает локальную гипертермию и разрушает злокачественные клетки. Фототермическая терапия (ФТТ) в настоящее время считается относительно неинвазивной альтернативой лечения рака.

Для доставки наночастиц к опухоли обычно используют моноклональные антитела, что позволяет их применять для эффективной фотодеструкции раковых клеток и последующей их гибели [239]. Альтернативным способом адресной доставки золотых наночастиц к опухолевым клеткам могут стать чувствительные и специфичные опухолевым клеткам аптамеры, более предпочтительные для селективной доставки наночастиц из-за их более высокой стабильности и меньшей иммуногенности. Недавно Shi с соавт. сообщили о новом активируемом комплексе золотых наночастиц с аптамерами для визуализации рака *in vivo* и управляемой ФТТ [245]. Авторы использовали ДНК-аптамер, ранее выбранный против линии раковых клеток человека A549 с помощью cell-SELEX, для функционализации Au@Ag/AuНЧ через тиоловую группу.

В наших исследованиях для элиминации опухолевых клеток использовали сферические наночастицы золота, средний размер которых составил 37 нм (Биотест, Новосибирск). В качестве биораспознающих молекул для функционализации наночастиц золота использовали аптамер AS9, обладающий высокой чувствительностью и специфичностью к асцитным клеткам карциномы Эрлиха, поэтому конъюгаты наночастиц с этим аптамером хорошо связывались только с асцитными клетками [248].

Нагревание наночастиц осуществляли путем их облучения видимым лазерным светом с длиной волны 536 нм в течение 5 мин. Спектр абсорбции наночастиц золота представлен на рис.26. Изображения AuНЧ, полученные с помощью просвечивающей электронной микроскопии, демонстрируют небольшие вариации частиц, как по размерам, так и по форме. Для доказательства эффективности гипертермии для деструкции опухолевых клеток использовали позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ) с радиоактивной глюкозой и компьютерную томографию (КТ) с гистологическим анализом опухолевой ткани.

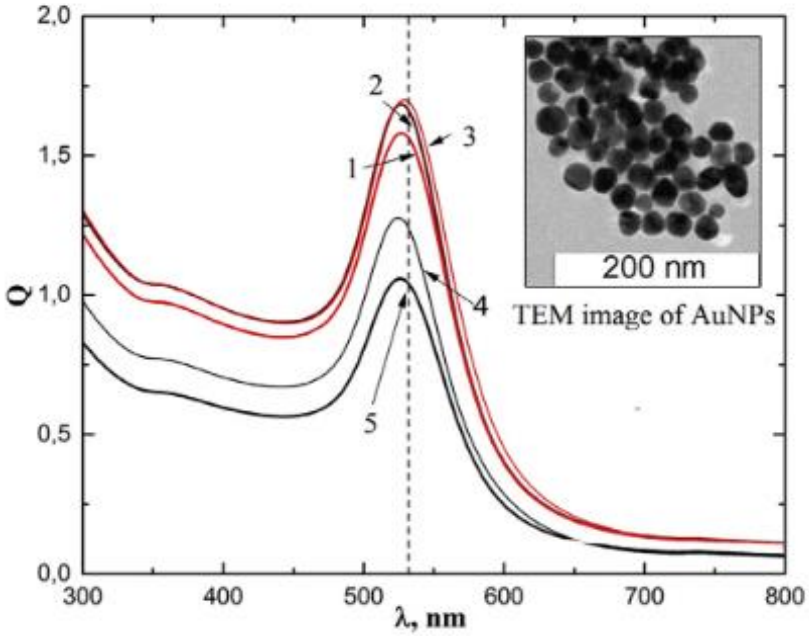


Рисунок 26 – Спектры поглощения коллоидных растворов AuНЧ. Кривые 1–3 соответствуют следующим концентрациям: 1.1, 1012 мл 1 AuНЧ; 4 1,1, 109 мл 1 AuНЧ; и 5 1,1, 108 мл-1 AuНЧ, соответственно. Пунктирная линия указывает длину волны лазера 532 нм. Вставка: изображение AuНЧ, полученное с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ).

3.4.1.1 Плазмонная фототермическая терапия *in vitro*

В настоящее время фототермическая терапия считается относительно неинвазивным альтернативой для лечения рака. В фототермической терапии поглощенный свет преобразуется в тепло и передается в окружающую среду клетки, создавая локализованную гипертермию и уничтожая злокачественные клетки. Жизнеспособность клеток оценивали методами микроскопии с помощью окрашивания трипановым синим. Живые клетки имеют непроницаемую для трипанового синего оболочку и остаются бесцветными, тогда как мертвые клетки аккумулируют краситель внутри себя. Оценка влияния фототермической терапии на функциональное

состояние асцитных клеток показала, что в условиях отсутствия наночастиц золота лазерное облучение не индуцирует элиминацию асцитных клеток, поскольку в этих условиях лазер не повышает температуру суспензии до значений, обеспечивающих начало массовой гибели клеток.

Для обеспечения адресной доставки АuНЧ химически модифицировались праймерами, содержащими дисульфидную группу, и затем были гибридизированы с аптамером AS42 либо с олигонуклеотидом AG в качестве неспецифического контроля. Аптамеры AS42, чувствительные и селективные клеткам асцитной карциномы Эрлиха, имели константу диссоциации равную 2,5 нМ, предполагаемой молекулярной мишенью которого стал белок теплового шока 71 кДа (HSPA8). Важно отметить, что аптамер AS42 имеет высокое сродство к асцитным клеткам, но не вызывает апоптоза и не мешает делению клеток.

Лазерное облучение образцов, содержащих асцитные клетки и биоконъюгаты наночастиц золота с ДНК-аптамерами, в эксперименте повышало температуру суспензии до 44°С. Температура измерялась с помощью инфракрасной камеры Testo 875-1i (TESTO AG, Германия). Причиной повышения температуры было поглощение энергии лазерного излучения, попадающего в полосу плазмонного резонанса наночастицами золота, и теплопередача в биологическую среду. Лазерное облучение опухолевых клеток без наночастиц при длине волны 536 нм в течение 10 мин не приводило к значительному нагреву суспензии клеток. Температура возрастала только до 38,4°С.

При фототермической обработке асцитных клеток карциномы Эрлиха, связанных с AS42-АuНЧ, происходила локальная гипертермия мембран, что индуцировало гибель 45% клеток (Рис.28). Количество наночастиц AS42-АuНЧ на клетку составляло в этих экспериментах 100 наночастиц. В контрольных экспериментах с использованием неспецифичечских AG-АuНЧ тепло рассеивалось в растворе, поскольку олигонуклеотид AG не связывал

АuНЧ с асцитными клетками. Лазерное облучение при длине волны 536 нм и в присутствии только аптамера AS42 без наночастиц не влияло на жизнеспособность клеток *in vitro*. Интересно отметить, что наночастицы, модифицированные AG и AS42, уменьшали количество мертвых клеток в отсутствие облучения (Рис.27).

Титрование с различными концентрациями AS42-АuНЧ (10, 50, 100 и 200 частиц на клетку, выполнялись в трех повторностях) показали, что наночастицы в концентрации 100 частиц на клетку было достаточным для того, чтобы осуществить деструкцию 83±5% асцитных клеток Эрлиха, в то время как 200 частиц привели к полному некрозу клеток в культуре (Рис.27). Контрольные клетки, в качестве которых выступали гепатоциты и клетки крови не ответили на ФТТ с помощью AS42-АuНЧ, самая высокая плотность наночастиц (200 на клетку) вызвала некроз 6±3% клеток (Рис.27). Дальнейшие исследования проводили при концентрации наночастиц 100 AS42-АuНЧ /клетку.

Специфичность ФТТ AS42-АuНЧ *in vitro* была продемонстрирована методом проточной цитометрии на смеси клеток карциномы Эрлиха, крови и клеток печени (Рис.28). Через два часа после ФТТ большая часть асцитных клеток карциномы была некротической, в то время как большинство клеток печени и крови остались живыми. В смеси клеток асцитные клетки погибли, в то время как клетки печени и крови остались жизнеспособными.

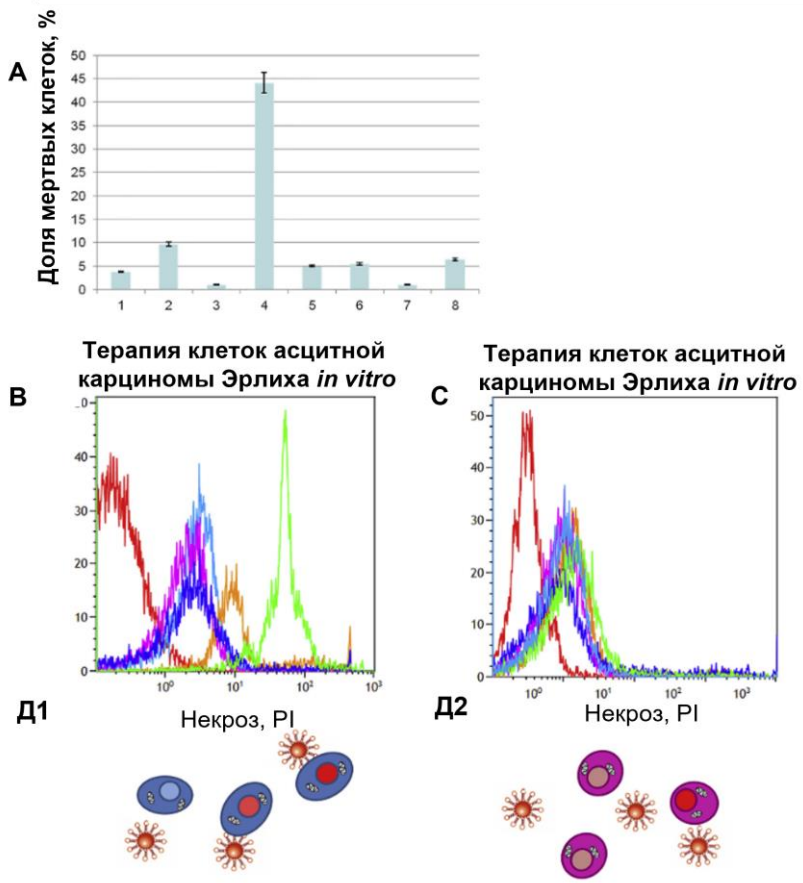


Рисунок 27 – Эффекты фототермической терапии клеток карциномы Эрлиха в зависимости от присутствия наночастиц золота и/или ДНК-аптамеров *in vitro* (A). Долю мертвых клеток измеряли с помощью трипанового синего через 3 часа после воздействия лазерав различных экспериментальных моделях. 1 - интактные клетки карциномы Эрлиха; 2 - клетки карциномы Эрлиха после 4-минутного лазерного облучения; 3 - клетки карциномы Эрлиха, инкубированные с AS42-AuНЧ; 4 - клетки карциномы Эрлиха, предварительно инкубированные с AS42-AuНЧ через 4 мин облучения; 5 - клетки карциномы Эрлиха, инкубированные со свободным аптамером AS42; 6 - клетки карциномы Эрлиха, инкубированные со свободным аптамером AS42 после 10 мин облучения; 7 - клетки карциномы Эрлиха, инкубированные с AG-AuНЧ; 8 - клетки карциномы Эрлиха, инкубированные с AG-AuНЧ через 4 мин облучения. (B) Жизнеспособность клеток Эрлиха после плазмонной фототермической терапии *in vitro* с AS42-AuНЧ (в соотношении 10, 50, 100 и 200 AuNP на клетку). (C) Жизнеспособность смеси клеток печени и крови после плазмонной фототермической терапии in vitro с AS42-AuНЧ (в соотношении 10, 50, 100 и 200 AuНЧ на клетку). PI, иодид пропидия. (D) Схематическое изображение измерений жизнеспособности клеток Эрлиха, печени и крови после плазмонной фототермической обработки. Все данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего.

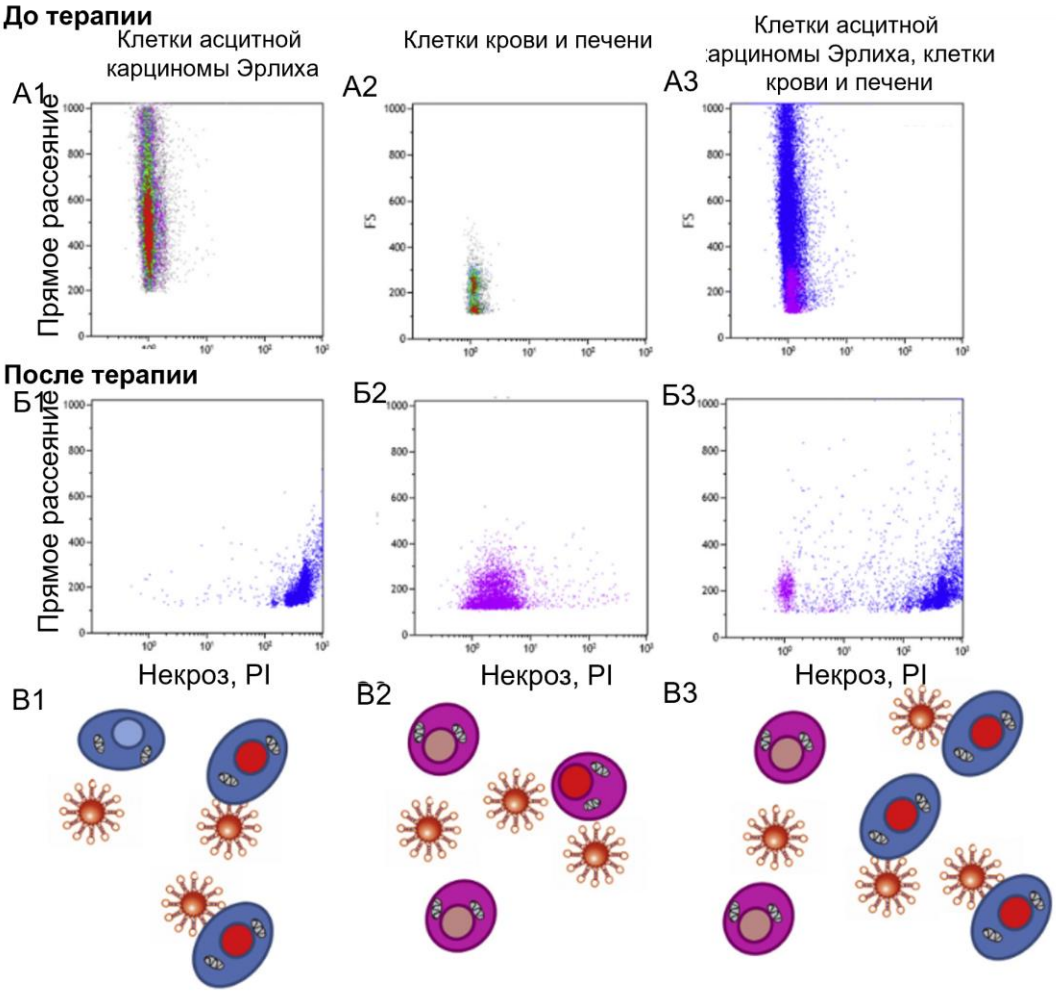


Рисунок 28 – Селективность плазмонной фототермической терапии *in vitro*. (A) Некроз в (1) интактных клетках карциномы Эрлиха; (2) смесь клеток печени и крови (графики плотности проточной цитометрии); и (3) смесь карциномы Эрлиха, клеток печени и крови (точечный график проточной цитометрии). (B) Некроз в (1) клетках карциномы Эрлиха; (2) смесь клеток печени и крови; и (3) смесь карциномы Эрлиха, печени и клеток крови (точечные графики проточной цитометрии) после плазмонной фототермической терапии. (C) схематическое изображение (C1) некротических клеток карциномы Эрлиха; (C2) неповрежденные печень и клетки крови; и (C3) смесь карциномы Эрлиха, печени и клеток крови после фототермической обработки.

3.4.1.2 Плазмонная фототермическая терапия с золотыми наночастицами, функционализированными аптамерами к асцитным клеткам карциномы Эрлиха (AS42-AuНЧ) *in vivo*

Исследование эффективностии ФТТ терапии *in vivo* проводили на солидной опухоли, полученной при трансплантации асцитных клеток в бедро мышей. Мышам с солидной карциномой Эрлиха ФТТ проводили через день, начиная с 7-го дня после трансплантации опухоли до 11-го дня. Изменения температуры на поверхности опухолей контролировали с помощью термографии (Рис.30). Интересно, что облучение лазером с длиной волны 536 нм увеличивало температуру опухолей у мышей, получавших олигонуклеотид-модифицированные наночастицы золота, до 46°C, в то время как у мышей, которым вводили золотые наночастицы в фосфатном буфере, температура повышалась не более чем до 40°C. Это свидетельствует о различиях в концентрации AuНЧ в опухоли. Несмотря на аналогичное повышение температуры в случае обработки AS42-AuНЧ и AG-AuНЧ, Au-НЧ, модифицированные аптамером, оказались более эффективными из-за их направленной доставки AuНЧ на поверхность опухолевых клеток.

Оценка изменений обхвата бедра и размера опухоли, вызванных термической фотоабляцией, показали их зависимость от вводимого вещества (Рис.30). Бедра мышей, которым вводили фосфатный буфер, увеличивались экспоненциально. Лазерное облучение привело к усилению развития опухоли в ходе эксперимента (Рис.30). Это может быть связано с нагревом опухоли лазером до 40°C. Введение AG-AuНЧ с последующим облучением на длине волны 536 нм уменьшало размер опухоли. Использование AS42-AuНЧ увеличило эффекты лазерного облучения (Рис.29). Введение AS42-AuНЧ без лазерного воздействия замедляло рост опухоли, препятствуя делению опухолевых клеток.

Некротические изменения в обработанных и необработанных опухолях наблюдались на 13 день после трансплантации опухоли (Рис.29). Чтобы контролировать последние стадии развития опухоли после лечения, мы выполнили ПЭТ в сочетании с КТ (ПЭТ/КТ) для одной мыши из каждой экспериментальной группы, поскольку визуально опухоли, обработанные одинаково, были неотличимыми, а обхваты бедер в отношении к опухолям также не отличались.

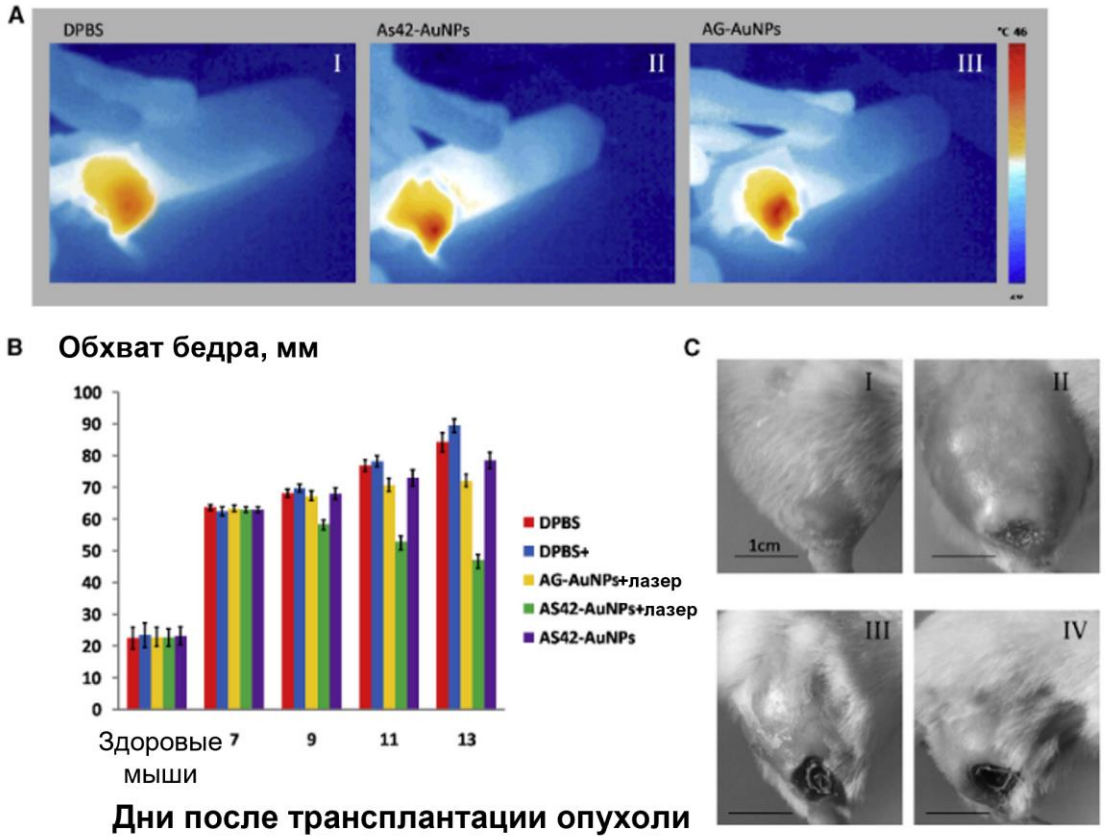


Рисунок 29 – Адресная плазмонная фототермическая терапия *in vivo* (A) Тепловизионные изображения бедер мыши после инъекции в хвостовую вену DPBS (AI), модифицированных AG-AuНЧ (AII) или AS42-AuНЧ (AIII) после 5 минут лазерного облучения при 1,2 W. (B) Изменения обхвата бедра при опухолях. Обработка проводилась на 7, 9 и 11 дни. (C) Репрезентативные изображения опухолей обработанных и необработанных мышей получены на 11 день, обработанные только (I) DPBS; (II) DPBS и 5 минут лазерного облучения, (III) AG-AuНЧ и 5 минут лазерного облучения (IV) AS42-AuНЧ и 5 минут лазерного облучения. Все данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего.

Гистологическое исследование опухолей показало, что на 6-ой день после трансплантации опухоли и до введения AuНЧ и лазерного облучения опухоль имела гомогенную структуру (45-50 единиц Хаунсфилда [HU]) и активно накапливала [^{18}F]-фтордезоксиглюкозу (Рис.30). Глюкоза также накапливалась в мочевом пузыре и печени. Гистологическое исследование нелеченных опухолей показало, что опухоли всех мышей имели по всему объему однородные твердые структуры; воспалительный ответ был слабым, клетки карциномы инфильтрировались и замещали ткань скелетных мышц, а опухоль рекрутировала новые кровеносные сосуды (Рис.31).

Рисунок 30 – ПЭТ/КТ мышей после лечения ФТТ (A – E). Изображения ПЭТ / КТ мышей до лечения PPT (A); после лечения PBS без лазерного облучения (B); после терапии PPT с PBS (C), AG-AuNP (D) и AS42-AuNP (E). Красные стрелки указывают на накопление ^{18}[F] -фтордезоксиглюкозы; зеленая стрелка указывает на некроз и отек.

После третьей инъекции фосфатного буфера с последующим лазерным облучением правой ноги опухоль имела размер 20x17 мм, а ее большая часть (16x10 мм) представляла собой неметаболическую некротическую область (Рис.33). Радиофармпрепарат накапливался в верхней внутренней части опухоли. Размер области накопления имел диаметр 4-5 мм. [^{18}F]-фтордезоксиглюкоза также накапливалась в мочевом пузыре этой мыши. Опухоли всех подопытных мышей были массивными с мелкими язвами. Ткани имели гетерогенные структуры (Рис.32), участки некроза с полной

потерей структуры ткани, но без достаточного воспаления (Рис.32). Вероятно, отсутствие новых кровеносных сосудов в опухоли и лазерный нагрев до 40ºC привели к некротическим изменениям.

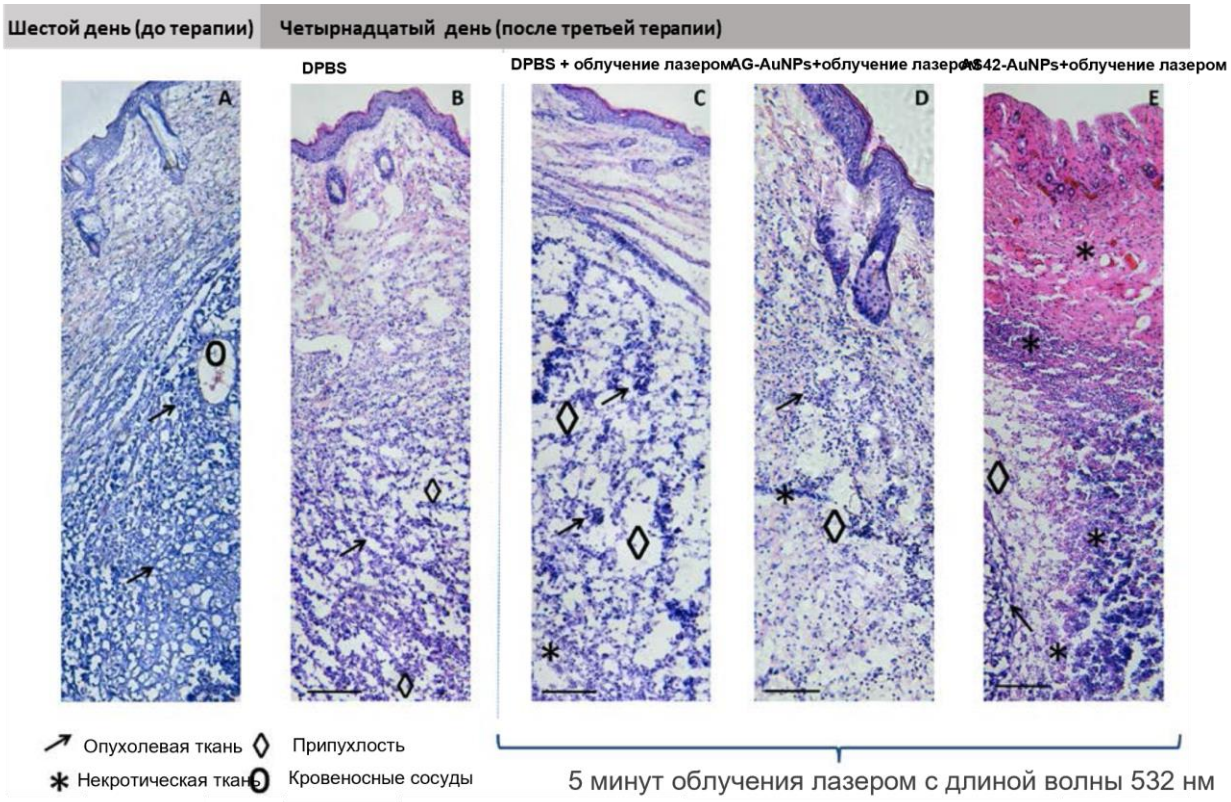


Рисунок 31 – Общий вид гистопатологических изменений солидной карциномы Эрлиха, оцененных окрашиванием гематоксилин-эозином до лечения (A), после введения в хвостовую вену DPBS (B, C), AG-AuNP (D), AS42-uNP (E) после 5 минут воздействия лазера. Увеличение ×100.

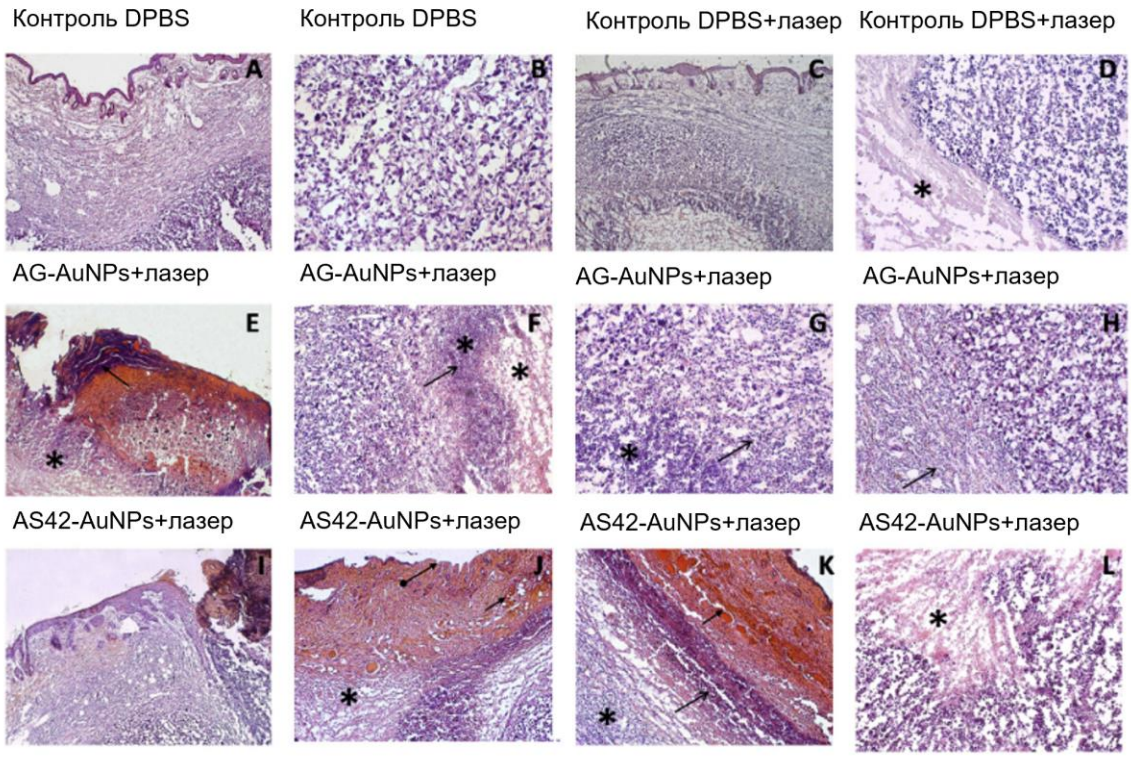


Рисунок 32 – Гистопатологическая оценка окрашивания солидной опухоли карциномы Эрлиха. Репрезентативные срезы были получены после ФТТ только с фосфатным буфером. (A) Карцинома под эпидермисом. (B) Общий вид карциномы мыши, обработанной только фосфатным буфером. ФТТ с фосфатным буфером и 5 мин лазерного воздействия. (C) Общий вид опухоли под эпидермисом. (D) Граница между относительно интактной жизнеспособной и некротической (звездочка) опухолевой тканью, лишенной воспалительных клеток. ФТТ с AG-AuНЧ и 5 мин лазерного облучения. (E) Язвенный дефект. (F) Корка (стрелка) на дне раны и некроз опухоли под дермой (звездочка). (G) Полное разрушение опухолевой ткани в центре некротической области (звездочка). Преимущественно мертвые сегментированные лейкоциты (стрелка). (H) Воспалительная инфильтрация сегментированных лейкоцитов на границе опухоли (стрелка). ФТТ с AS42-AuНЧ и 5 мин лазерного облучения. (I) Язвенный дефект, некроз карциномы (звездочка) внизу под раной. (J) Некроз кожи и подлежащей опухоли (звездочка), потеря эпидермиса (стрелка) и кровотечение из дермы (стрелки). (K) Граница некроза опухоли в дерме отделяется от области лейкоцитарной инфильтрации (стрелка), за пределами которой имеет место гемоциркуляторное нарушение. (L) Некроз опухоли (звездочка) характеризуется кариопикнозом, кариорексисом и аутолизом. Увеличение ×100.

Три процедуры лечения с использованием золотых наночастиц, функционализированных неспецифическими олигонуклеотидами (AG-AuНЧ) с последующим облучением лазером с длиной волны 536 нм привели к визуальному уменьшению размера опухоли. ПЭТ/КТ показала, что опухоль уменьшилась в размере на 18%, до 14×12мм^2, с плотностью 35–42 HU. Она имела неоднородную структуру (Рис.34). Все мыши в этой группе имели язвенные дефекты и некротические изменения, расположенные под дермой кожи (Рис.33). В центре опухоли были обнаружены некротические участки в виде островков с полностью разрушенными клетками. Мертвые и жизнеспособные лейкоциты преобладали в воспалительных инфильтратах и окружали жизнеспособные области карциномы.

Введение AS42-AuНЧ и лазерное облучение почти полностью устранили опухоли, как видно на изображениях ПЭТ/КТ. У всех мышей наблюдались большие язвы на участках опухоли. Основываясь на гистопатологическом анализе, участки опухоли были в основном некротическими с высокой инфильтрацией лейкоцитов. На рис.34 подробно показаны терапевтические эффекты: некроз кожи и подлежащей опухоли, потеря эпидермиса и кровотечение дермы. Мертвые опухолевые клетки имели характерные признаки кариопикноза, кариорексиса и аутолиза. Хотя в центре опухоль выглядела жизнеспособной на гистологических срезах, она не была метаболически активной; согласно анализу ПЭТ, клетки не накапливали [^{18}F]-фтордезоксиглюкозу. Некоторое неспецифическое накопление [^{18}F]-фтордезоксиглюкозы наблюдалось возле хвостовой вены и мочевого пузыря мыши. Это связано с введением радиофармпрепарата в хвостовую вену мыши в физиологическом растворе, который выделялся с мочой.

Данные ПЭТ/КТ соответствует гистологическим анализам, показывающим, что основная масса опухоли у мышей подверглась некрозу (60-70%). В некоторых областях это сопровождалось заметной

пролиферацией фиброзных тканей. Воспаление находилось на поверхности, и под некротическими областями наблюдалась интенсивная агрегация лейкоцитов, кровоизлияние и отек. Глубоко в ткани были видны некротические участки, но в то же время присутствовали неразрушившиеся раковые клетки.

Таким образом, показано, что фототермическая терапия с помощью наночастиц золота, которые адресно доставлялись к опухолевым клеткам, полностью разрушали опухоль, не оказывая никакого воздействия на окружающие опухоль здоровые ткани.

3.4.2 Магнитомеханический метод противоопухолевой терапии с помощью магнитных наночастиц в переменном магнитном поле

Уникальными инструментами для управления клеткой с помощью механотрансдукции стали магнитные наночастицы, преимуществом которых является дистанционное управление. Магнитная маркировка клеток магнитными наночастицами позволяет ими манипулировать, а также контролировать функции клеток путем приложения внешнего магнитного поля, в том числе осуществлять разрушение опухолевых клеток.

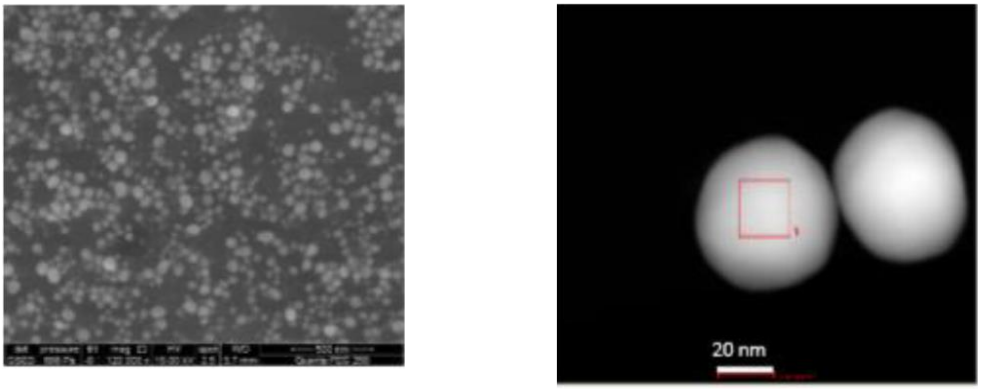
3.4.2.1 Исследование противоопухолевого эффекта магнитных наночастиц NITmagoldCit 50nm, покрытых золотом

Для демонстрации принципиальных возможностей и оценки перспектив применения магнитных наночастиц, функционализированных ДНК-аптамерами, для нужд магнитомеханической терапии, использовались сферические суперпарамагнитные наночастицы с золотой оболочкой испанской фирмы Nanoimmunotech (Рис.33,34).

Техническая спецификация магнитных наночастиц NITmagoldCit 50nm:

- Внешнее покрытие частиц: анионы цитрата
- Диаметр частиц: 51.8 ± 6.1 нм
- Диаметр ядра: 13.6 ± 1.2 нм (определен с помощью метода сканирующей электронной микроскопии)
- Толщина золотого покрытия: 38.2 ± 3.5 нм
- Молярная концентрация: 0.05 нМ (определена согласно Ɛ= $1.9x10^{10}$ $M^{-1}\cdot$ cm^{-1} (Wertsetal. Analyst 2013,138, 583-592))
- Концентрация частиц: 3.2×10^{10} частиц/мл
- Пиковое значение поверхностного плазмонного резонанса: 536 нм
- Индекс полидисперсности: 0,148
- Оптическая плотность: 1
- Растворитель: 5мМ цитрат натрия

Структура и характеристики магнитных наночастиц NITmagoldCit 50nm приведены на рис.34.



(А) (Б)

Рисунок 33 – Изображение магнитных наночастиц NITmagoldCit 50nm, полученное с помощью: А) сканирующей электронной микроскопии и Б) с помощью трансмиссионной электронной микроскопии высокого разрешения.

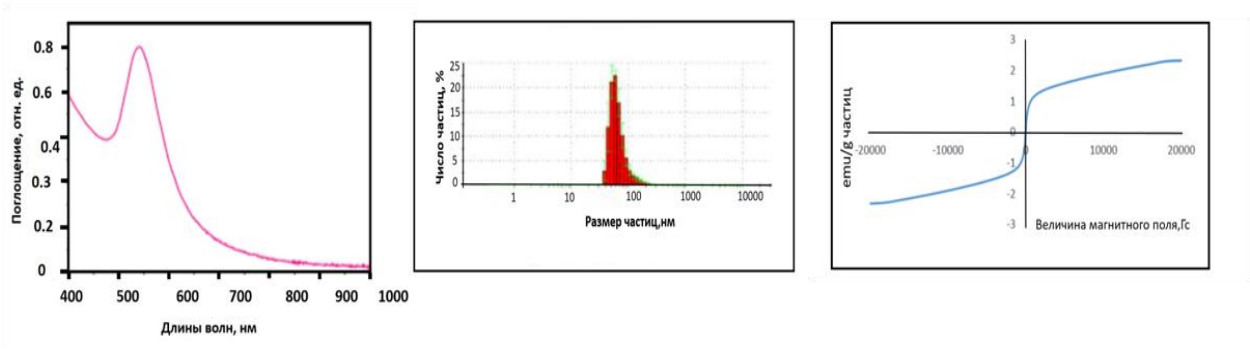


Рисунок 34 – Спектр поглощения магнитных наночастиц NITmagoldCit 50nm (слева); распределение частиц по размерам, исследованное методом динамического рассеяния света (в центре); распределение магнитного поля при измерении с помощью магнитометра с вибрирующим образцом (справа).

Исследование свойств магнитных наночастиц NITmagoldCit 50nm показало, что они могут быть использованы для адресной магнитомеханической деструкции опухолевых клеток.

Для нацеливания на опухоль *in vitro* и *in vivo* мы использовали модифицированные аптамером покрытые золотом магнитные наночастицы (МНЧ). Для селективного нацеливания мы использовали аптамер AS14 к мышиной карциноме Эрлиха. Молекулярной мишенью аптамера AS14 является фибронектин, представляющий собой большой адгезивный гликопротеин, который служит важным компонентом внеклеточного матрикса. Фибронектин образует фибриллы, прикрепляя клетки к волокнам коллагена. Асцитные клетки Эрлиха синтезируют и выделяют большие количества фибронектина в культуральную среду *in vitro*, в асцитическую жидкость и плазму *in vivo* [249]. Этот белок играет важную роль в росте, дифференцировке клеток, заживлении миграционных ран, свертывании крови, эмбриональном развитии, а также в онкогенной трансформации [235]. Содержание фибронектина увеличено в карциномах молочной железы.

Уровень его экспрессии коррелирует с продолжительностью онкогенеза и снижением выживаемости, как у людей, так и у мышей [249].

Аптамер AS14 связывает магнитные частицы с фибронектином, который в свою очередь связывается с поверхностью асцитной клетки через интегрины – большие трансмембранные адгезионные белки, обеспечивающие физическую связь между внеклеточным матриксом и сократительным цитоскелетом [250]. Интегрины и обычные сигнальные рецепторы часто взаимодействуют, чтобы способствовать росту клеток, их выживанию и пролиферации [251]. Активация интегрина меняет его структуру [252; 253]. Как только лиганд связывается с интегрином, его головка открывает шарнир между β-субъединицей и гибридный домен головки и механическая сила значительно ускоряет открытие петли [254].

3.4.2.1.1 Оценка эффективности связывания функционализированных ДНК-аптамерами суперпарамагнитных наночастиц (Ап-МНЧ) с клетками асцитной карциномы Эрлиха, клеток печени, почек, сердца и селезенки *in vitro*

Результаты, полученные при изучении эффективности связывания Ап-МНЧ с асцитными клетками, представлены на рис.35, из которого видно, что Ап-МНЧ эффективно связываются с асцитными клетками, на что указывает выявленная зависимость флуоресценции асцитных клеток от количества связавшихся с ними флуоресцентно меченых Ап-МНЧ. Очевидно, что эффективность связывания будет определять эффективность магнитомеханической терапии. Эта зависимость представлена на рис.36, из которого хорошо видно, что выживаемость асцитных клеток в условиях магнитомеханической терапии определяется временем действия переменного магнитного поля. Максимальный эффект магнитомеханической терапии наблюдался после 10 мин воздействия переменного магнитного поля.

Количество мертвых клеток определяли с помощью флуоресцентного красителя PI. Этот краситель не входит в живые клетки, поскольку мембрана для него непроницаема, а входит только в клетки с поврежденной мембраной.

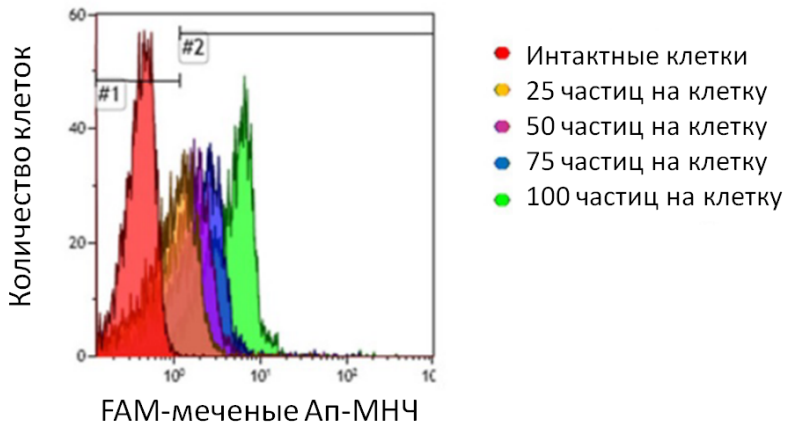


Рисунок 35 – Эффективность связывания Ап-МНЧ с асцитными клетками.

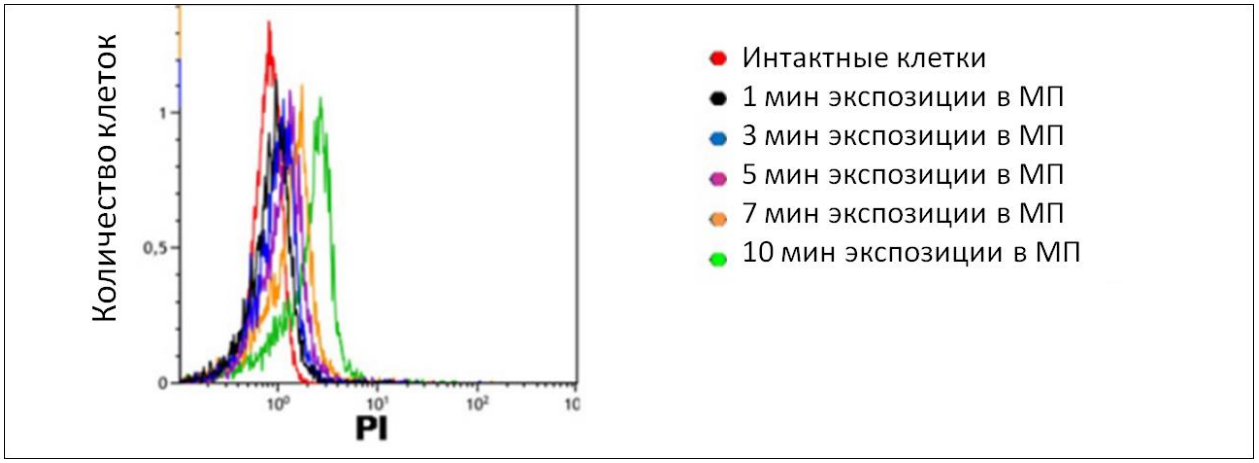


Рисунок 36 – Влияние времени магнитомеханической терапии на гибель асцитных клеток.

Ап-МНЧ практически не связывались с клетками печени, почек и селезенки. Результаты представлены на рис.37.

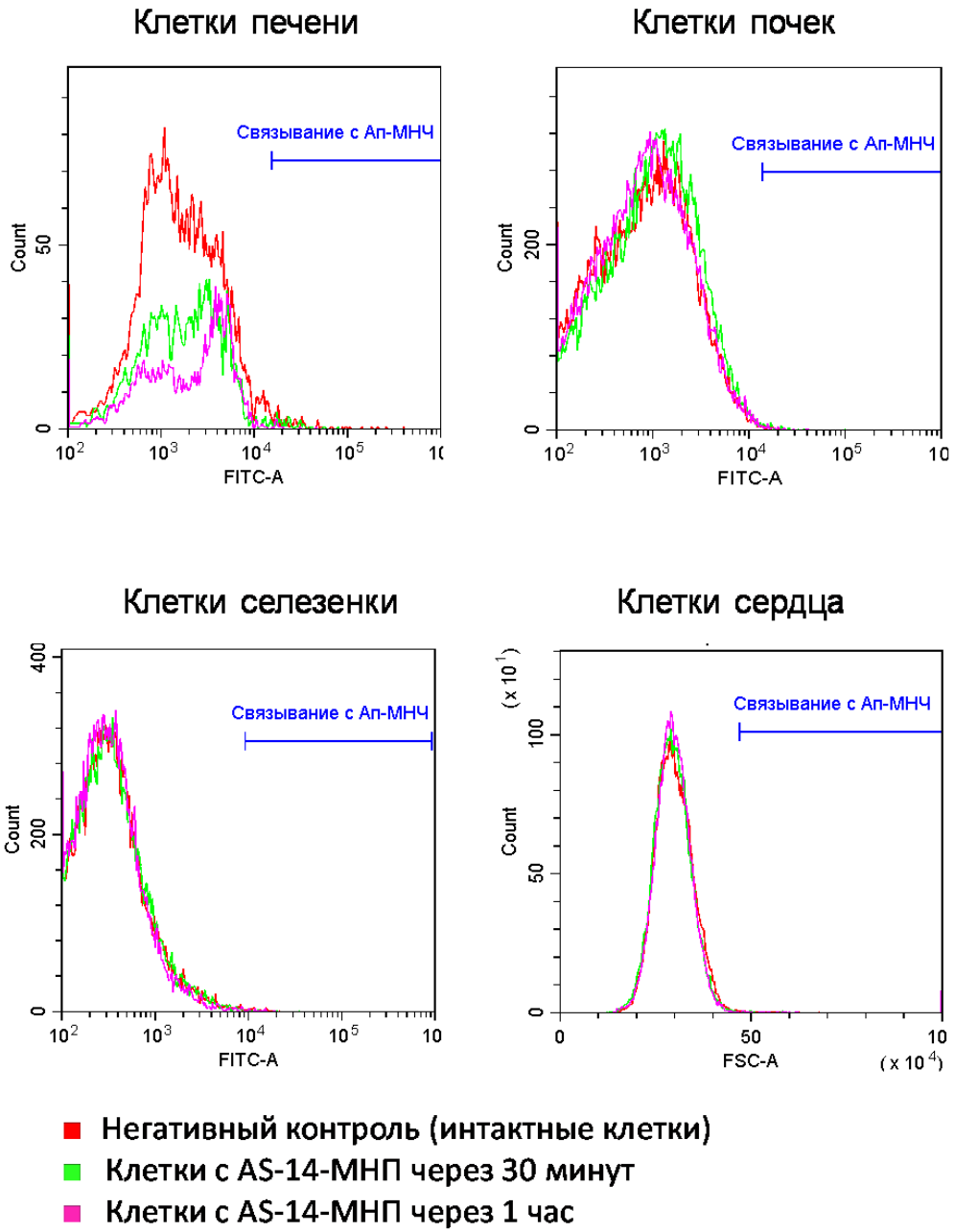


Рисунок 37 – Селективность связывания Ап-МНЧ с клетками органов мыши *in vitro*.

При внутрибрюшинном введении перапарта Ап-МНЧ, меченного флуоресцентной меткой *Alexa405*, Ап-МНЧ обнаруживался в 100% клеток асцитной опухоли через 30 минут, причем эффект сохранялся в течение часа (Рис.38). Ап-МНЧ обнаруживался в 4% клеток почек через 30 минут и 2,5%

– через 1 час. В печени и селезенке препарат связывался менее чем с 1% клеток через 30 минут и через 1 час.

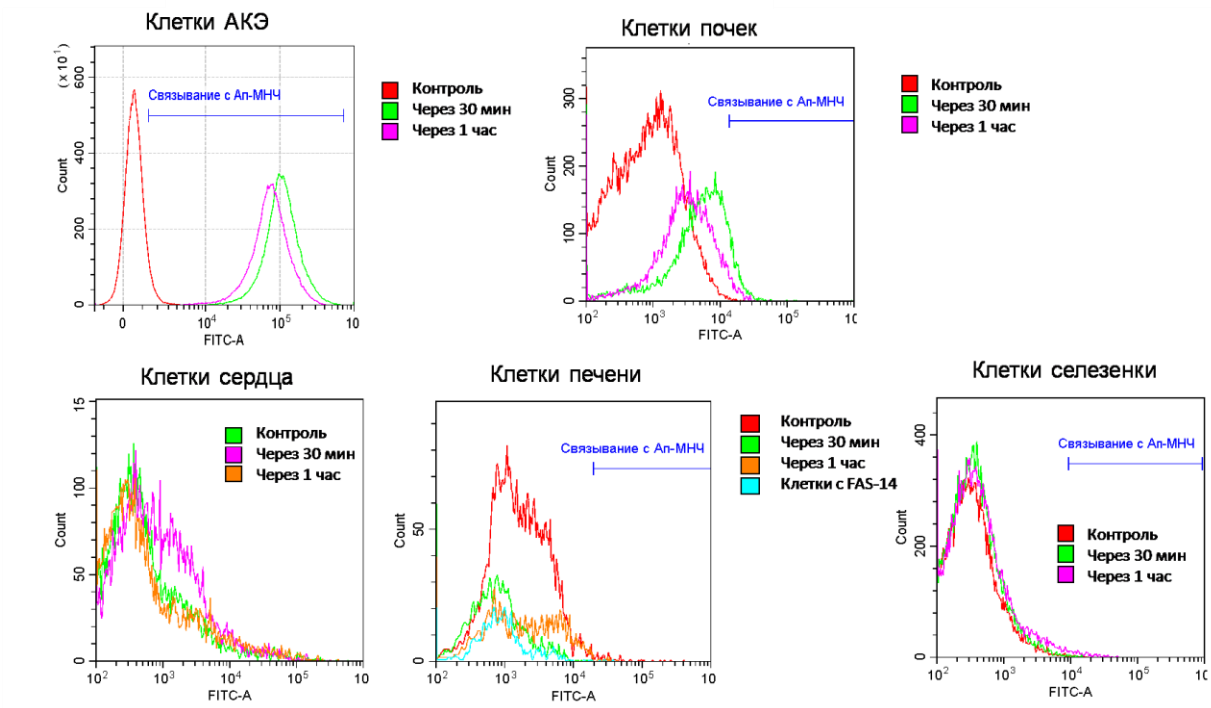


Рисунок 38 – Динамика распределения Ап-МНЧ в клетках разных органов *in vivo*.

3.4.2.1.2 Определение времени связывания Ап-МНЧ с клетками асцитной карциномы Эрлиха

Константа диссоциации аптамера AS14, который использовался для связывания асцитных клеток с магнитными частицами, равен 3,8 нм. В эксперименте для исследования времени связывания Ап-МНЧ с асцитными клетками использовали концентрацию аптамеров, намного превышающую константу диссоциации аптамера со своей мишенью, и анализировали связываемость магнитных наночастиц с асцитными клетками в зависимости

от времени инкубации. Установлено, что максимальное связывание магнитных наночастиц с асцитными клетками наблюдалось через 30 мин инкубации (Рис.39).

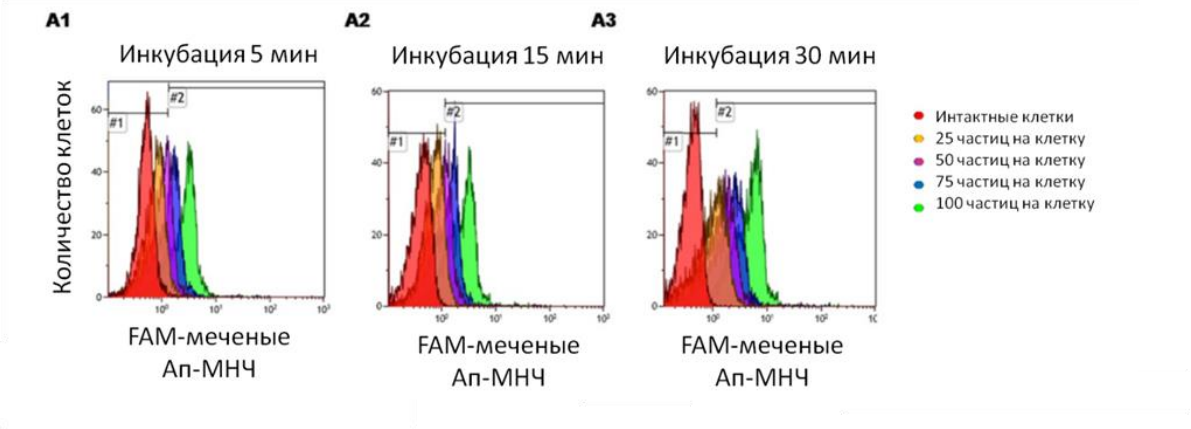


Рисунок 39 – Время связывания магнитных наночастиц с асцитными клетками в зависимости от концентрации функионализированных ДНК-аптамерами магнитных наночастиц

3.4.2.1.3 Биологические эффекты модифицированных аптамерами МНЧ в переменном магнитном поле *in vitro*

Чтобы оптимизировать терапевтическую процедуру *in vitro*, были выполнены эксперименты по титрованию при различных инкубациях раз. При этом показано, что время инкубации не влияет на связывание МНЧ с асцитными клетками, поскольку большинство клеток уже через 5 минут оказались связанными с модифицированными аптамерами флуоресцентно-мечеными наночастицами при добавлении 75 и 100 частиц на клетку. При снижении количества наночастиц на клетку до 25 и 50 для эффективного связывания наночастиц с клетками требовалось больше времени (Рис.40). 100 частиц на клетку было достаточно для быстрого связывания, поэтому эта концентрация была выбрана для экспериментов *in vitro*. Такая доза

наночастициц гарантировала, что в течение 30 мин все частицы будут специфически связаны с асцитными клетками. Для оптимизации времени воздействия переменного магнитного поля, были проведены исследования эффекта магнитного (при соотношении частиц 1:100 после 30 минут инкубации) при его воздействии на клетки в течение 1, 3, 5, 7 и 10 минут (Рис.41).

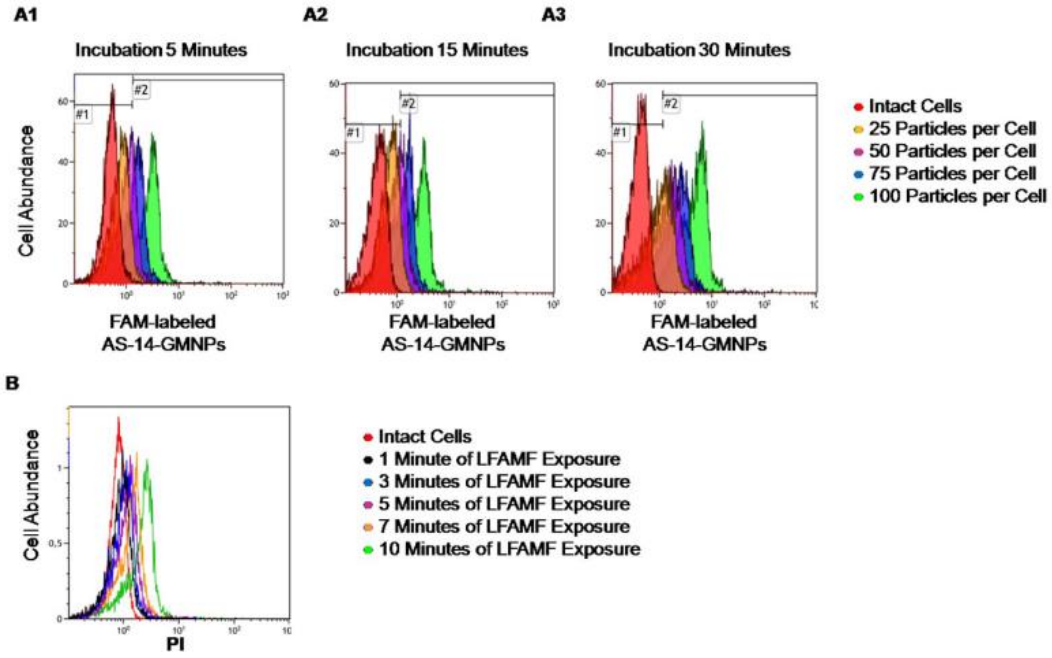


Рисунок 40 – Оптимизации времени воздействия переменного магнитного поля терапевтический эффект. (A) Определение времени инкубации клеток с частицами. (B) Определение времени экспозиции в переменном магнитном поле.

Клеточная смерть регистрировалась через 2 часа после лечения. Выяснилось, что 10 минут было достаточно, чтобы вызвать гибель клеток карциномы Эрлиха.

Для доказательства того, что колебания AS14-МНЧ, связанных с фиборнектином (Fn), в переменном магнитном поле вытягивает интегрины и приводит к активации каскада каспаз, мы провели эксперименты по

связыванию с антителами против Fn, блокирующими взаимодействие AS14 с Fn (Рис.41).

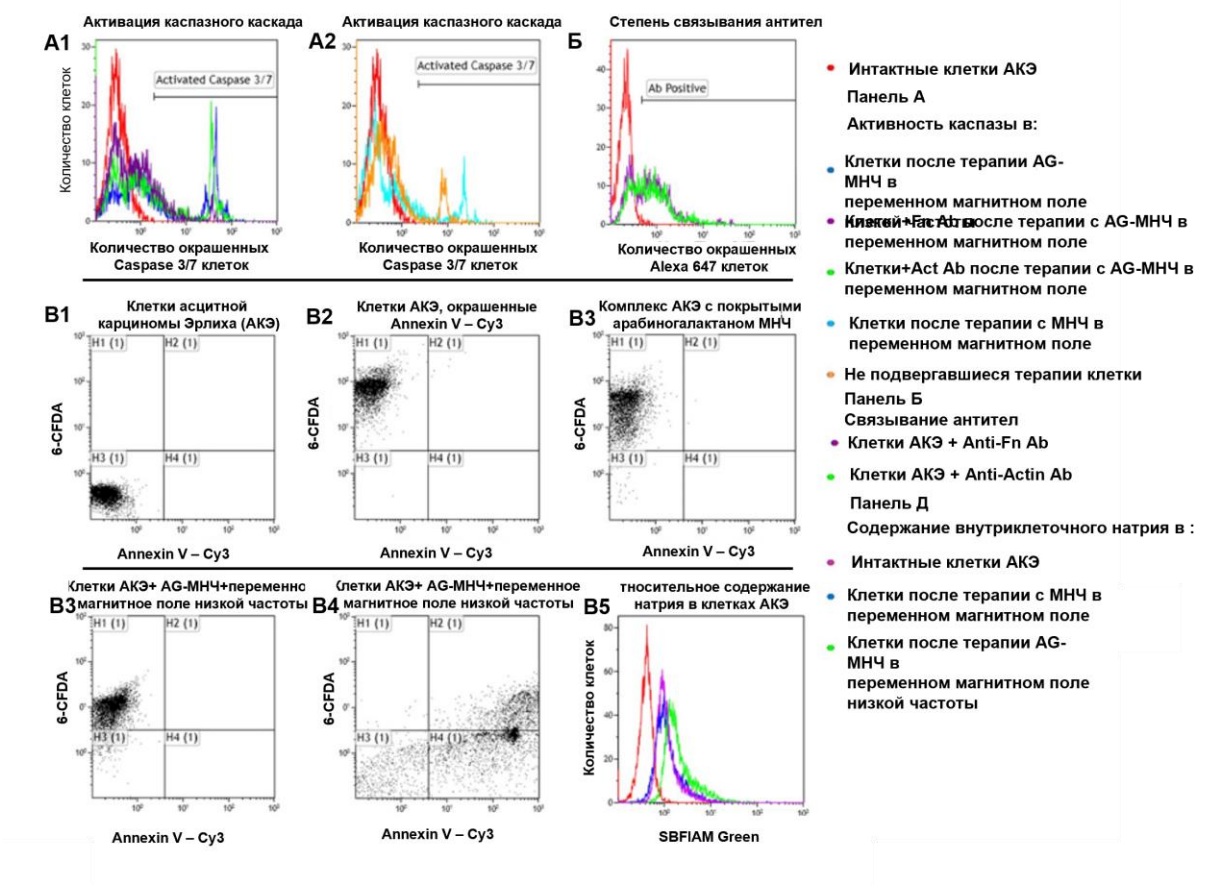


Рисунок 41 – Механизм и эффективность магнитомеханической терапии *in vitro*. (A) Апоптоз оценивался по активности каспазы 3/7. (B) Апоптоз оценивался с помощью Annexin V-Cy3: C1 – интактные клетки без окрашивания, C2 – живые клетки, C3 – клетки через 3 часа после экспозиции в переменном магнитном поле, C4 – клетки через 3 часа после экспозиции в переменном магнитном поле после добавления МНЧ, C5 – клетки через 3 часа после экспозиции в переменном магнитном поле после добавлении AS14-МНЧ. D – относительное содержание каионов натрия в клетке после магнитомеханической терапии.

Результаты исследования показали, что через 3 часа после магнитомеханической терапии с помощью AS14-МНЧ в переменном магнитном поле каспазы 3/7 активировались в 35% клеток. При добавлении

антител против фибронектина (Fn), добавленных к клеткам до лечения, которые занимали сайты связывания для AS14-МНЧ, каскад каспаз не активировался. В интактных клетках каспаза 3/7 была активирована в 11% случаев. Обработка клеток МНЧ в переменном магнитном поле не увеличивала количество апоптотических клеток. Следует отметить, что эти эксперименты проводились на клеточных культурах, которые росли во взвешенном состоянии и, таким образом, имели меньше внеклеточного Fn, чем в солидной опухоли *in vivo*. Антитела против Fn связывались только с 60% клеток.

В экспериментах на клеточных культурах было продемонстрировано, что AS14-МНЧ в клетках карциномы, индуцированных переменным магнитным полем, вызывали транслокацию фосфатидилсерина, что является началом программируемой клеточной гибели – апоптоза (Рис.43). После терапии AS14-МНЧ в условиях переменного магнитного поля большинство положительных по аннексину V клеток также были CFDA-отрицательными (что указывает на то, что эти клетки мертвы). Контрольные эксперименты с AS14-МНЧ без воздействия магнитного поля с МНЧ без аптамеров при воздействии переменного магнитного поля не вызывали гибели асцитных клеток, однако они накапливали меньше CFDA. Кроме того, содержание катионов натрия в асцитных клетках после одновременного воздействия AS14-МНЧ и переменного магнитного поля увеличивалось, что свидетельствовало о состоянии некроза асцитных клеток.

Гибель клеток может быть вызвана активацией различных молекулярных путей, включая апоптоз, некроз и аутофагию, характеризующихся морфологическими и биохимическими особенностями. Процессы клеточной гибели сопровождаются изменением объема за счет изменения потоков ионов, особенно ионов натрия. Значительная потеря натрия, калия и хлора необходимы для активации каспаз и нуклеаз, запускающих развитие апоптоза. Напротив, некроз характеризуется

набуханием клетки из-за повышенного содержания натрия, связанного с недостатком энергии для работы Na/K-АТФазы. Набухание клетки при некрозе вызывает разрыв мембраны и индукцию воспалительного процесса.

3.4.2.1.4 Магнитомеханическая противоопухолевая терапия функционализированными ДНК-аптамерами магнитными наночастицами в переменном магнитном поле *in vivo*

Противоопухолевую активность AS14-МНЧ в переменном магнитном пое *in vivo* оценивали с использованием солидной карциномы Эрлиха. AS14 модифицированные МНЧ (1,6мкг/кг), свободные МНЧ, аптамер AS14 (0,4 мг/кг) и фосфатный буфер вводили животным внутривенно. Через 30 минут животных помещали в переменное магнитное поле на 10 минут. Процедуры магнитомеханической терапии повторяли трижды через день, начиная с 5-го дня после опухоли трансплантация. Эффективность терапии представлена на рис.42.

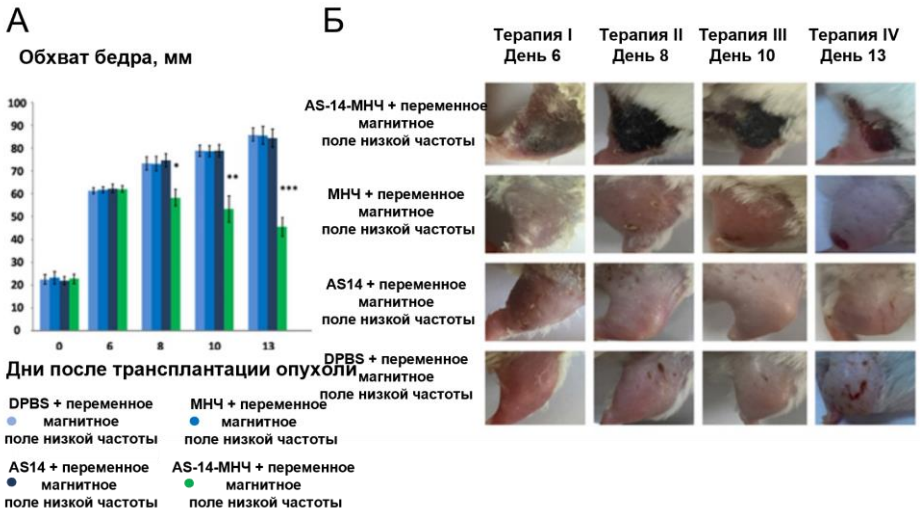


Рисунок 42 – Эффективность магнитомеханической нанотерапии *in vivo*. (А) Динамика размера опухоли во время терапии (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,01). (В) Изменение внешнего вида опухоли в процессе терапии.

Размеры опухоли оценивались в процессе терапии ежедневно путем измерения обхвата ног. Видно, что размер опухоли визуально уменьшился в группе животных после терапии AS14-МНЧ в переменном магнитном поле. На 6-ой день после первого лечения у этих животных на месте опухоли наблюдалось подкожное кровоизлияние (Рис.42). На 8-й день после повторной обработки опухоль переставала расти и образовывалась корка, свидетельствующая о некрозе ткани. После третьей инъекции, на 9-е сутки рана начала заживать. На 13-ый день размер корки значительно уменьшился и кожа вокруг него практически полностью восстановилась. Терапия МНЧ без воздействия магнитного поля и терапия аптамерами AS14 в переменном магнитном поле не снижала рост опухоли. Инъекции нефункционализированных аптамерами МНЧ в условиях воздействия переменного магнитного поля вызвали небольшое воспаление в опухоли, которая, несмотря на то, что росла во время курса лечения, все же демонстрировала незначительный терапевтический эффект. Очевидно, что МНЧ в условиях воздействия переменного магнитного поля сами по себе вызывают некроз опухоли, но этот эффект был значительно меньше без адресной доставки магнитных наночастиц аптамерами в опухоль.

Математическое моделирование показало [69], что используемое низкочастотное переменное магнитное поле не вызывает гипертермию, следовательно противоопухолевый эффект вызван механическим действием переменного магнитного поля. Фибронектин Fn, с которым связаны через аптамер магнитные наночастицы, вызывает подергивание β-домена интегрина, тем самым вызывая активацию интегрина [255] и инициацию гибели клеток каспазным каскадом, который индуцирует первичный апоптоз с последующим увеличением содержания натрия и некроз асцитных клеток. Деструкция опухоли *in vivo* возникла только тогда, когда МНЧ были модифицированы и доставлялись аптамерами к месту опухоли. Для

неспецифического накопления МНЧ в опухоли противоопухолевый эффект был недостаточным.

3.4.2.1.5 Гистологический анализ тканей после магнитомеханической нанотерапии AS14-МНЧ в переменном магнитном поле

Через 5 часов после введения AS14-МНЧ и воздействия переменного магнитного поля в асцитных клетках активировались каспазы 3/7 (Рис.43), тогда как чистые МНЧ или аптамеры AS14 в переменном магнитном поле эти эффекты не вызывали. Не снижался рост опухоли в группе животных, которым вводили фосфатый буфер и воздействовали переменным магнитным полем – клетки остались жизнеспособными, опухоль увеличивалась в размерах и разрушала мышечную ткань, иммунный ответ был слабым (Рис.43). Введение аптамера AS14 и помещение животных в переменное магнитное поле также не показали значительных изменений в структуре опухоли – наблюдалась лимфоцитарная инфильтрация, набухание межклеточного пространства, а мышечные волокна были дегенеративными (Рис.43). Терапия немодифицированными МНЧ вызвала частичный некроз опухолевых тканей, остающихся в виде «островков» (Рис.44). В опухолевых клетках наблюдались необратимые изменения – вакуолизация цитоплазмы и признаки кариолиза. Воспалительная лимфоцитарная инфильтрация вокруг опухоли была выражена слабо.

Значительный терапевтический эффект наблюдался у животных после терапии AS14-МНЧ в переменном магнитном поле (Рис.43). Небольшое количество асцитных клеток осталось только на периферии, на больших участках опухоли наблюдался некроз, в опухолевых клетках наблюдались частичная или полная деструкция с необратимыми изменениями (кариорексис, кариолизис и плазморезис) (Рис.43). Такая терапия вызвала

значительный иммунный ответ, сопровождавшийся воспалительной инфильтрацией сегментированных лейкоцитов на границах некротических участков. Кроме того, наблюдались отек и деструктивные изменения микросреды опухолевой ткани (Рис.43).

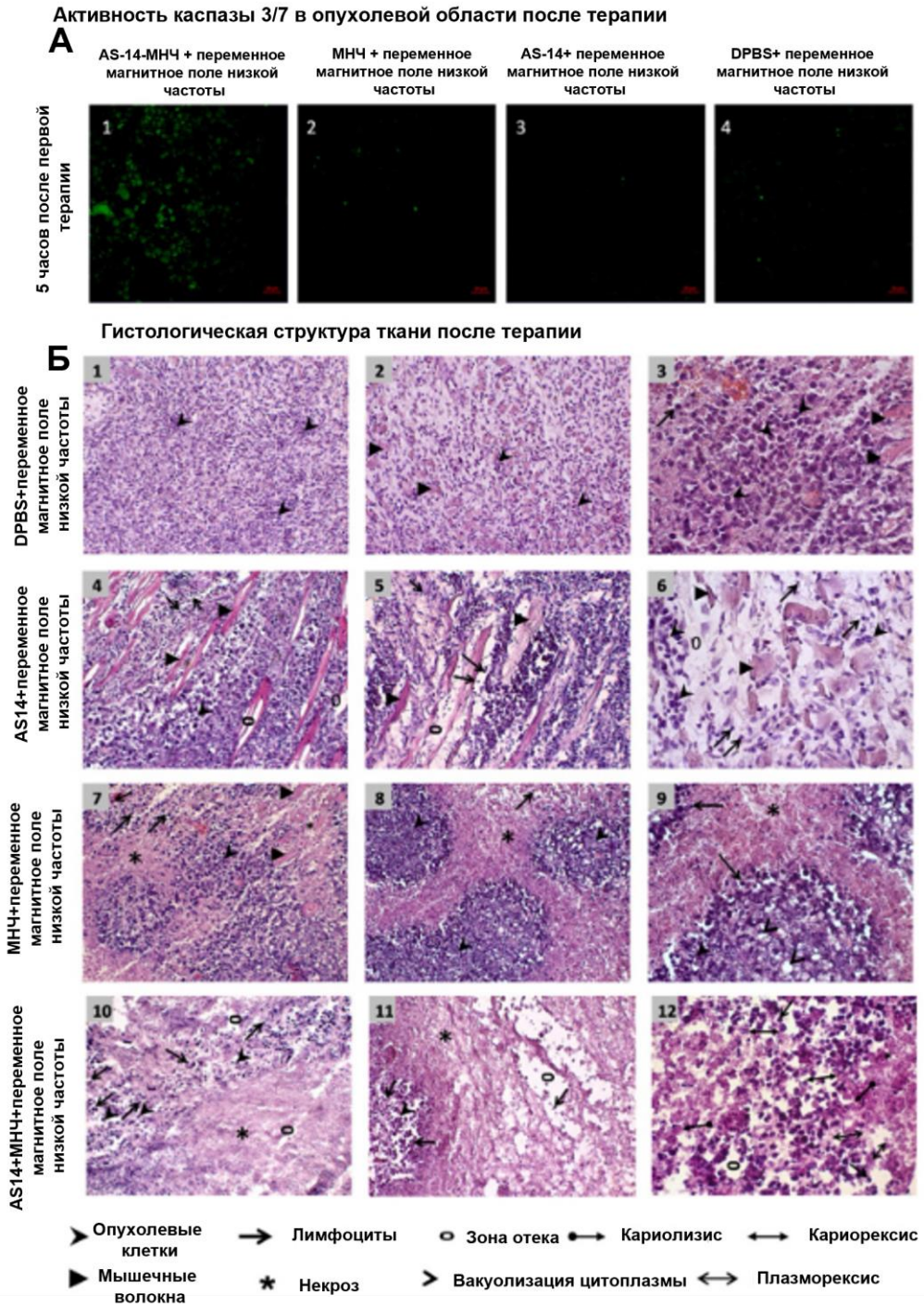


Рисунок 43 – Ответ опухоли на магнитомеханическую терапию. (А) Активность каспаз 3/7 в опухолевых клетках через 5 часов после терапии. В) Гистологическая структура опухолей после терапии. В1-В3 – фосфатный

буфер и переменное магнитное поле – карцинома Эрлиха имеет твердую структуру и прорастает в мышечную ткань, состоящую из атипичных клеток с плеоморфными гиперхроматическими ядрами различной формы и объема. Нет иммунного ответа: очень редко лимфоциты. В 4-6 – карцинома после введения AS14 в переменном магнитном поле, имеет умеренный отек межклеточного простаранства, слабую лимфоцитарную инфильтрацию и мышечные волокна с дегенеративными изменениями. В7-В9 – карцинома после введения МНЧ и воздействия переменного магнитного поля, наблюдается рассеянный некроз опухоли со слабо выраженной воспалительной инфильтрацией, опухолевая ткань сохраняется в виде «островков», в которых находится большинство раковых клеток с вакуолизацией цитоплазмы и признаками кариолиза. В10-В12 – карцинома после введения AS14-МНЧ и воздействия переменным магнитным полем, характеризуется большими участками некроза опухоли, отеком, деструктивными изменениями микроокружения опухолевой ткани и воспалительной инфильтрацией сегментоядерными лейкоцитами. По периферии оставшиеся опухолевые клетки мертвы с кариорексисом, кариолизисом, плазморрексисом. Увеличение: (В1) ×100; (В2, В4, В5, В7, В8, В10, В11) × 200; (В3, В6, В9, В12) ×400.

Для определения механизма противоопухолевой магнитомеханической терапии с помощью магнитных наночастиц был рассчитан магнитный момент, сила и время действия магнитных частиц в переменном магнитном поле с частотой 50 Гц. Показано, что в этих условиях функционализированные ДНК-аптамерами магнитные наночастицы заставляют периодически тянуть и расслаблять С-конец FnIII10 на 0,07нм за 0,01с. Механическое вытягивание интегрина активирует FnIII и вызывает опосредованный интегрином апоптоз путем прямого привлечения и активации каспазы-8. Предположительно, колебания AS14-МНЧ, вызванные переменным магнитным полем, приводят к колебаниям интегринов через фибронектин и вызывают активацию каспаз с последующим апоптозом клеток (Рис.44).

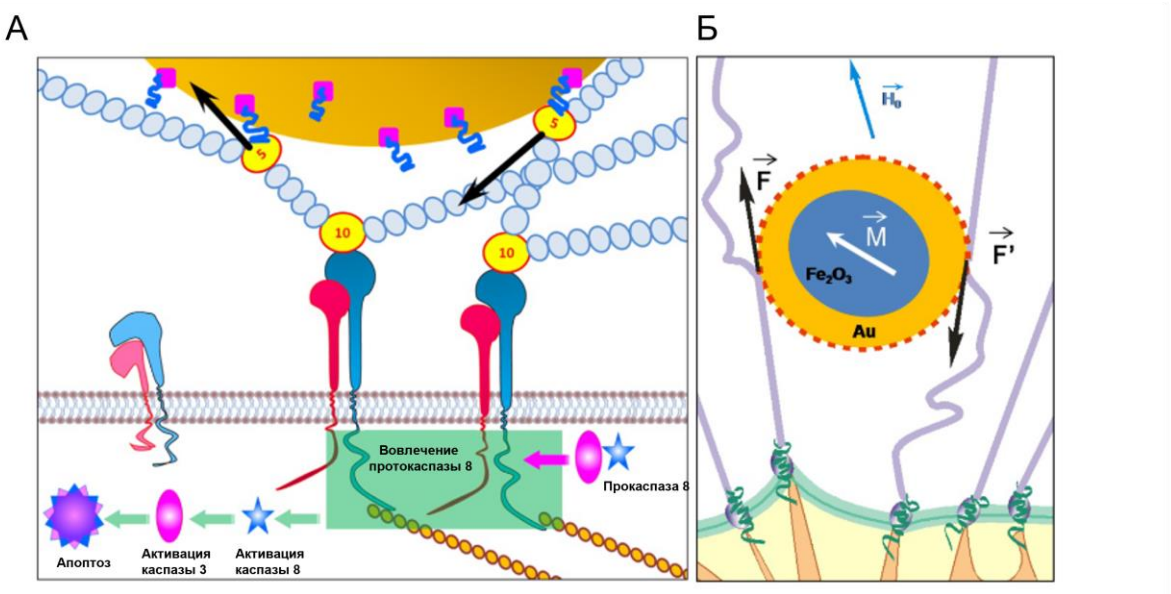


Рисунок 44 –Схематическое изображение апоптотического каскада каспаз. (А) Каскад вызван колебаниями фибронектина в низкочастотном переменном магнитном поле, контролируемом AS-14-GMNP. (Б) Силы, приложенные к АС-14-ГМНП в присутствии низкочастотного переменного магнитного поля, где $\vec{F}$ – сила, тянущая фибронектин; $\vec{M}$ − магнитный момент ГМНЧ; $\vec{H}$ – внешнее магнитное поле.

Таким образом, наше исследование продемонстрировало терапевтический эффект магнитомеханической нанотерапии, управляемой специфическими аптамерами к асцитным клеткам карциномы Эрлиха. Перспективные возможности для эффективного применения предложенного метода основаны на использовании функционализированными аптамерами магнитных наночастиц для целенаправленного лечения опухолей в низкочастотном переменном магнитном поле, которое избирательно уничтожает опухолевые клетки, не затрагивая доброкачественные соседние клетки и ткани.

3.4.2.2 Магнитомеханическая противоопухолевая терапия с помощью функционализированных ДНК-аптамерами ферроарабиногалактанов в переменном магнитном поле

Наиболее распространенная стратегия получения суперпарамагнитных частиц диаметром 10-20 нм заключается в водном осаждении солей железа in situ [91; 256; 257]. Поскольку непокрытые магнитные наночастицы проявляют токсические эффекты, то для терапевтических воздействий используют магнитные наночастицы с покрытием. В последнее время становятся популярными полимерные материалы. Для покрытия наночастиц оксида железа были предложены такие полимерные материалы, как декстран, карбоксиметилированный декстран, карбоксидекстран, крахмал, PEG, AG, гликозаминогликан, органический силоксан и сульфированный стирол [93; 258]. В этой работе нанодисперсный магнетит был инкапсулирован в биополимерную матрицу природного полисахарида арабиногалактана (АГ) (Рис.45).

Ультрадисперсные полимерные частицы гидратированного оксида железа обладают высокой поверхностной энергией из-за их небольшого размера. Полисахарид АГ действует как матрица для образования наночастиц. Это приводит к адсорбции АГ на частицах. АГ стабилизирует наночастицы и предотвращает их агрегацию.

Чистый арабиногалактан не обладает магнитными свойствами и является диамагнитным (Рис.46). Намагничивание FeАГ в растворе имеет кривую, типичную для суперпарамагнитного соединения (Рис.46). Намагничивание порошка ферроарабиногалактана демонстрирует, что FeАГ обладает магнитными свойствами из-за «встроенных» нанодисперсных оксидов железа, предположительно маггемита (Fe_2O_3), и проявляет ферромагнитное или ферримагнитное поведение (Рис.46). Поле насыщения наночастиц FeАГ лежит в области 3кЭ, а их коэрцитивная сила составляет

около 150Э. Намагниченность насыщения составляет 4 emu/g (Рис.46). Следовательно, переменное магнитное поле около 100Э недостаточно для обращения намагниченности ферроарабиногалактана, но достаточно для переориентации наночастиц в растворе.

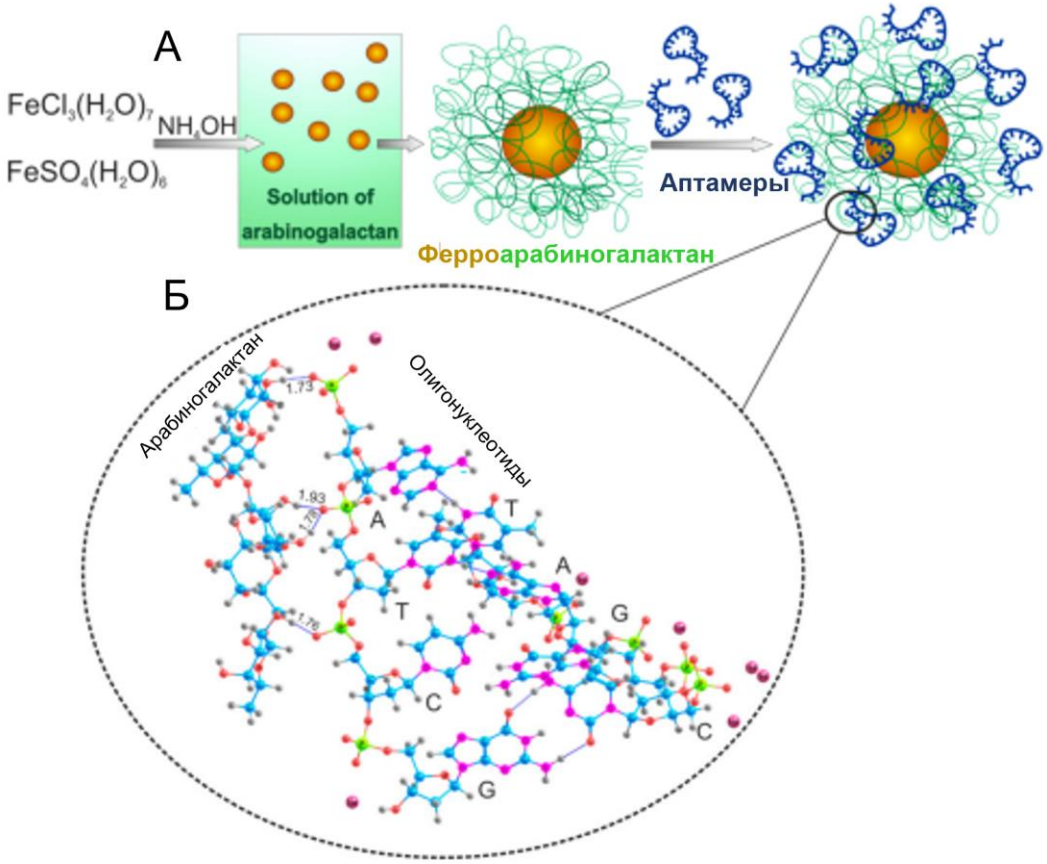


Рисунок 45 – Синтез наночастиц ферроарабиногалактана, конъюгированных с аптамером (AS-FeAG). (а) Схематическое изображение синтеза наночастиц ферроарабиногалактана и их конъюгации с аптамерами. (б) Часть комплекса аптамер-арабиногалактан. C - цитозин, G - гуанин, A - аденин и T - тимин. Нековалентные водородные связи между атомами показаны синими пунктирными линиями. Водород - серый, кислород - красный, углерод - синий, азот - фиолетовый, фосфор - желтый, натрий - розовый.

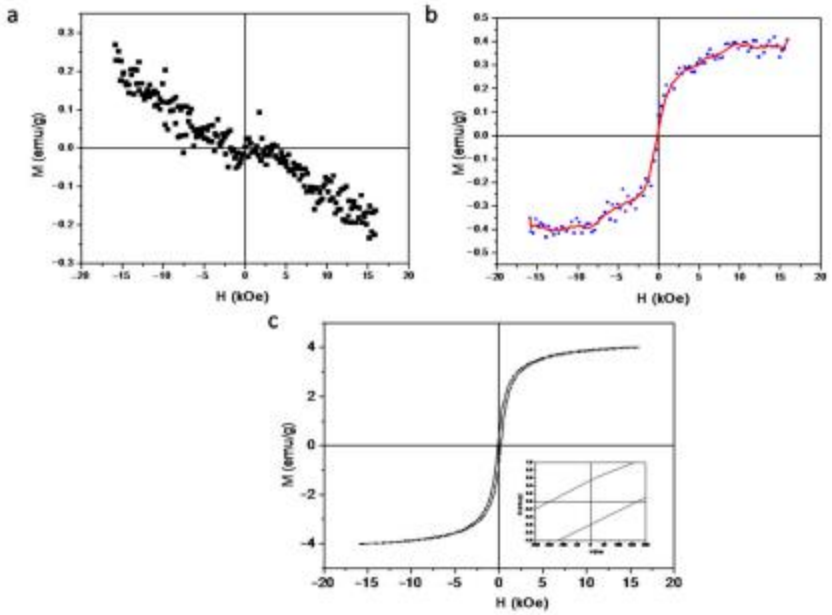


Рисунок 46 – Магнитные свойства ферроарабиногалактана. (а) Чистый арабиногалактан не имеет магнитного момента. (б) Вычитание диамагнитной кривой растворителя из кривой раствора ферроарабиногалактана. (с) Намагниченность суперпарамагнитного нанодисперсного ферроарабиногалактана.

Рентгеновский энергодисперсионный микроанализ показал, что размеры отдельных частиц железосодержащего арабиногалактана составляют 1-3,5 мкм, средний размер которых составил 1,96 мкм (Рис.47).

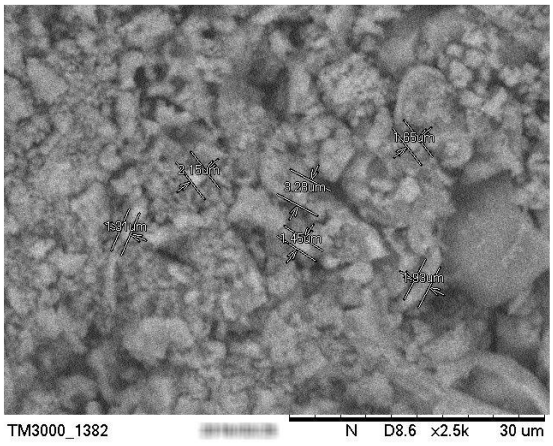


Рисунок 47 – Размеры частиц железосодержащего АГ (мм 8380 Да).

Для определения размеров магнитных частиц образцы ферроарабиногалактана были проанализированы с помощью трансмиссионной электронной микроскопии (ПЭМ) (Рис.48). Результаты исследований показали, что темные пятна представляют собой оксиды железа, окруженные арабиногалактаном. Размер наночастиц составляет около 5 нм. Кроме того, был проведен микроэлектронографический анализ. Судя по радиусу отклонения, частицы в ферроарабиногалактане состоят из магнетита.

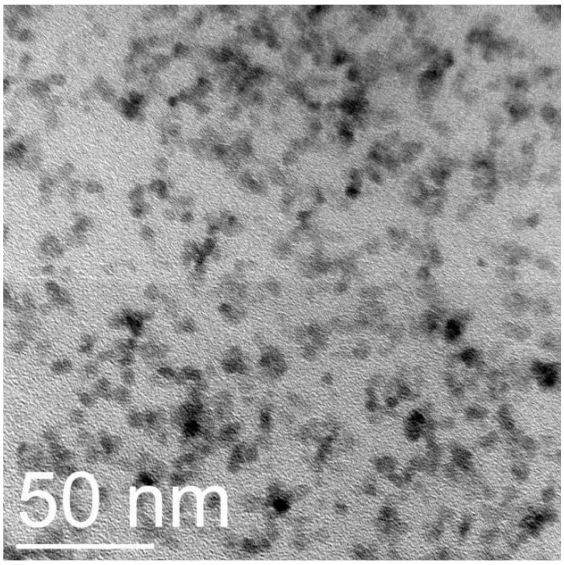


Рисунок 48 – ПЭМ-изображения железосодержащего АГ (ММ 8380 Да).

В качестве адресного носителя ферроарабиногалактанов для улучшения его накопления в опухоли были использованы аптамеры AS14 и AS42 со специфическим связыванием с асцитными клетками карциномы Эрлиха мыши. Аптамер AS14 связывается с посттрансляционно модифицированным фибронектином внеклеточного матрикса раковых клеток, где треонины ацетилировались в положении 1029 и фосфорилировались в положении 1033. AS42 связывается с белком теплового шока 71 кДа (Hsc70).

Конъюгацию с аптамерами 500 нМ проводили путем инкубации FeАГ в фосфатно-солевом буфере Дульбекко с кальцием (II) и магнием (II) при

комнатной температуре в течение 30 минут. АГ имеет разветвленную структуру, состоящую из 1 основной цепи, в которой галактопираноза соединена 1,3-гликозидными связями.

3.4.2.2.1 Влияние Апт-FeАГ на клетки карциномы *in vitro*

В работе показан метод магнитомеханической направленной противоопухолевой терапии в низкочастотном переменном магнитном поле с использованием ферроарабиногалактанов, адресно доставляемых к опухоли с помощью аптамеров. Переменное магнитное поле генерировали с помощью установки для генерации низкочастотного магнитного поля (Рис.13).

Эффективность связывания модифицированных аптамерами AS14 и AS42, меченных флуоресцентной меткой FAM, наночастиц FeАГ с клетками карциномы Эрлиха оценивали с помощью лазерной сканирующей микроскопии. Показано, что наночастицы FeАГ, модифицированные AS42, после попадания в клетку концентрировались вокруг ядра, а FeАГ-AS14 связывался с клеточной мембраной и окрашивал поверхность клетки (Рис.49). Через три часа после обработки переменным магнитным полем частицы на клеточных мембранах отделялись от клетки, а частицы внутри клеток образовали агломераты (Рис.49).

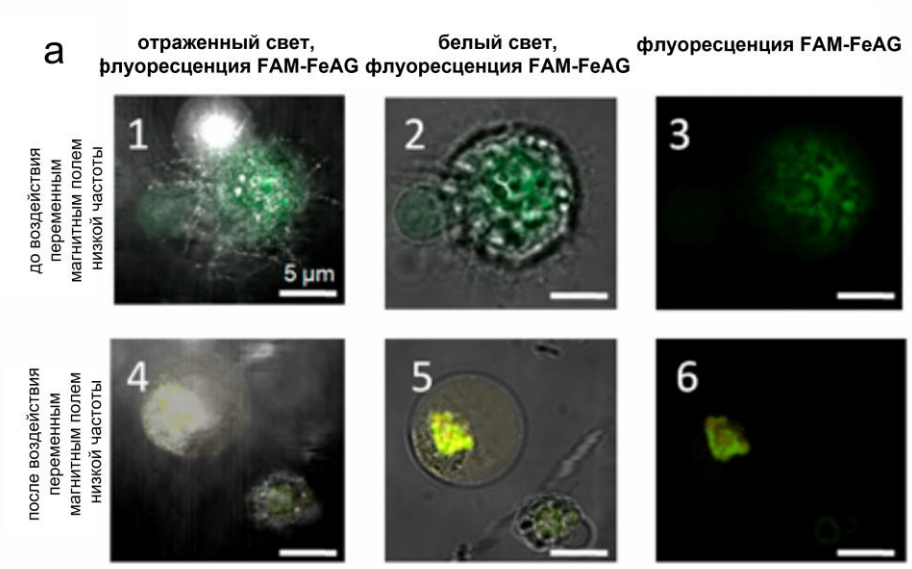


Рисунок 49 – Эффекты Апт-FeAГ и низкочастотного переменного магнитного поля *in vitro*. (a) Флуоресцентная микроскопия клеток Эрлиха с меченым FAM Апт-FeAГ до и после обработки переменным магнитным полем в течение 10 мин, представленных в отраженном свете с флуоресценцией (a1,4), белом свете с флуоресценцией (a2,5) и только флуоресценцией (a3, 6). Шкала: 5 мкм.

Для изучения пути клеточной гибели асцитных клеток карциномы Эрлиха до и после обработки переменным магнитным полем определяли количество клеток в состоянии апоптоза и состоянии некроза (Рис.50).

Показано, что жизнеспособность клеток после магнитомеханической терапии мало зависела от содержания железа. Тем не менее, Апт-FeAГ (6% Fe) оказался наиболее эффективным, поэтому был выбран для экспериментов *in vivo*.

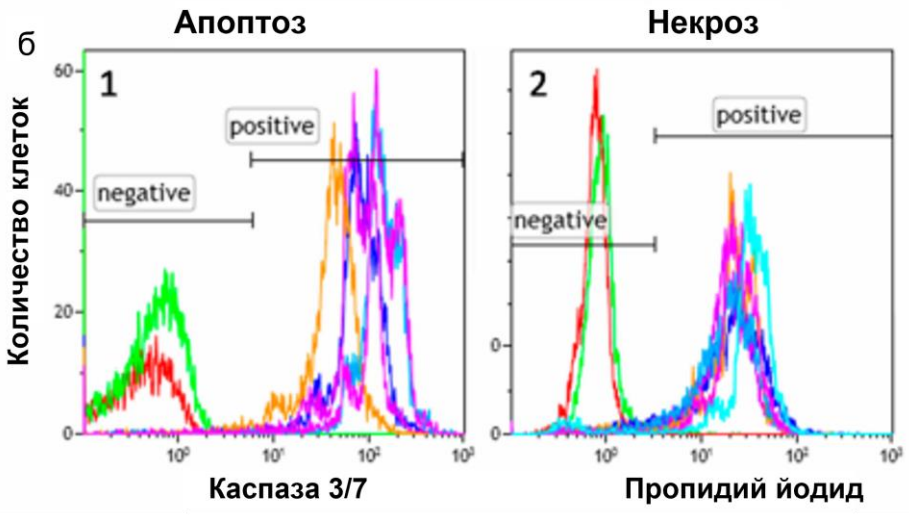


Рисунок 50 – Эффекты Апт-FeAГ и низкочастотного переменного магнитного поля *in vitro*. 1 –уровень апоптоза через 3 часа после воздействия переменного магнитного поля методом проточной цитометрии с использованием активности каспазы 3/7; (b2) уровень некроза через 3 часа после воздействия переменного магнитного поля по накоплению пропидия йодида в мертвых клетках. Красная кривая соответствует интактным клеткам без окрашивания; зеленая кривая представляет базовый уровень необработанных клеток; фиолетовый - к клеткам, обработанным FeAГ (6%); синий - к FeAГ (4,5%), темно-синий - к FeAG (6%), оранжевый - к FeAГ (4,7%).

3.4.2.2.2 Эффективность магнитомеханической терапии с помощью Апт-FeAГ *in vivo*

Эффективность противоопухолевой магнитомеханической терапии с помощью феррарабиногалактана, функционализированного адресной молекулой – ДНК-аптамером к асцитным клеткам оценивали с использованием модели асцитной карциномы Эрлиха. Для этого мышам

внутривенно вводили Апт-FeAГ (0,8 мкг/кг), FeAГ (1,6 мкг/кг), пул аптамеров AS-14 и AS-42 (0,4 мг/кг) (по 5 животных в каждой группе). Затем через 30 мин после инъекции животных помещали в переменное магнитное поле на 10 мин. Лечебные процедуры повторяли трижды. Животных, которых не помещали в магнитное поле, использовали в качестве контроля.

Результаты исследований показали, что противоопухолевая терапия ферроарабиногалактаном, функционализированным ДНК-аптамерами, вызывала воспалительную реакцию в месте опухоли и ее деградацию (Рис.51).

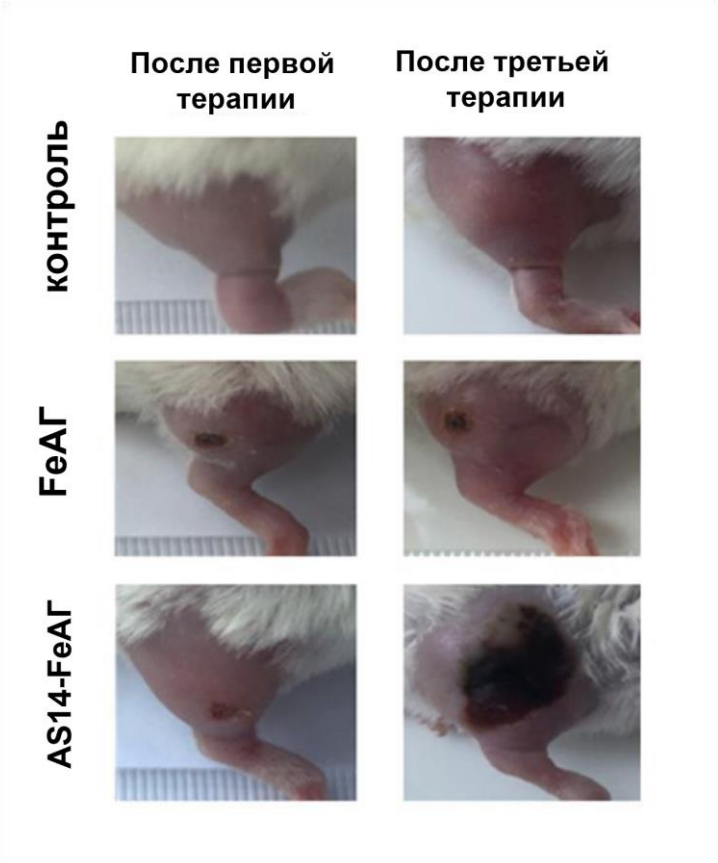


Рисунок 51 – Магнитомеханическая противоопухолевая терапия конъюгатами ферроарабиногалактанов с олигонуклеотидами вызывала воспаление, абсцессы и изъязвления по сравнению с контролем без какого-либо лечения.

Гистологические изменения в опухолевых тканях позволили сделать вывод, что нацеливание с помощью аптамеров усиливает терапевтические эффекты наночастиц Апт-FeAГ под влиянием переменного магнитного поля. Клетки карциномы Эрлиха в контрольной группе выглядели жизнеспособными; растущая опухоль разрушала мышечную ткань; никакого иммунного ответа зарегистрировано не было (Рис.52). Воздействие на мышей пула аптамеров и переменного магнитного поля вызвала воспалительную инфильтрацию сегментированными лейкоцитами (Рис.52). Терапия FeAГ вызвала частичный некроз опухолевых тканей (в основном вокруг кровеносных сосудов), нарушение клеточной адгезии, воспалительную инфильтрацию сегментированными лейкоцитами и отек (Рис.52). Эти результаты показали, что обработка наночастицами Апт-FeAГ в переменном магнитном поле вызывала разрушение опухоли и местный воспалительный ответ.

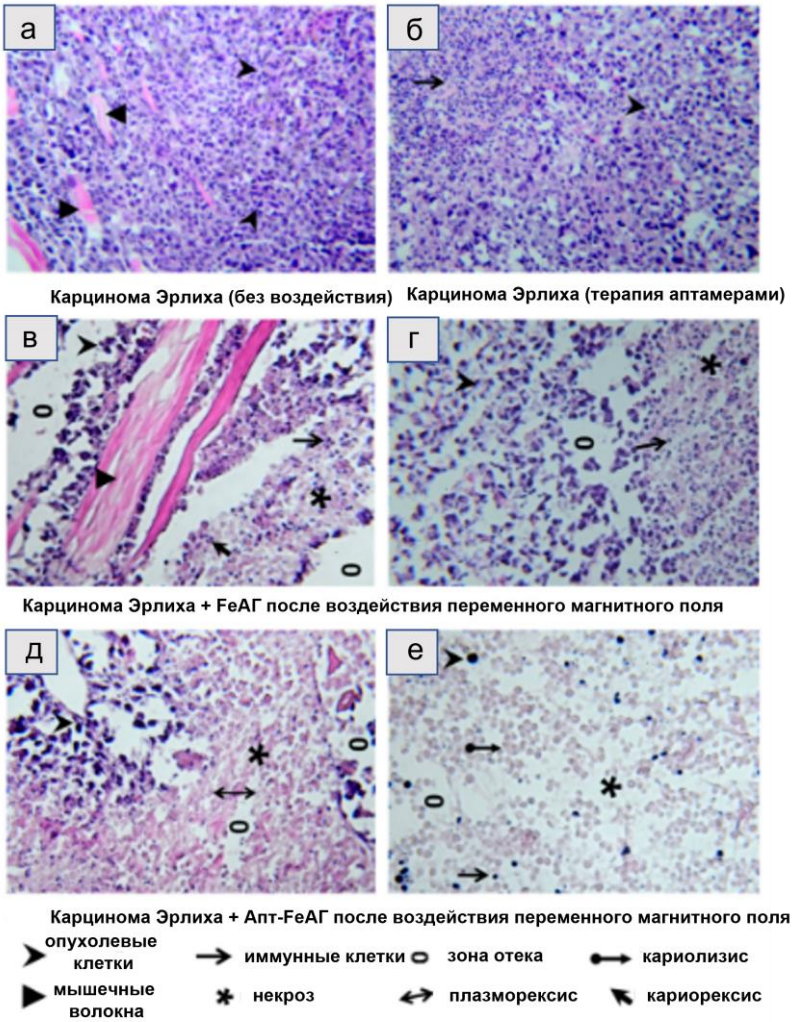


Рисунок 52 – Гистологические особенности опухолей различных экспериментальных групп. (а) Карцинома Эрлиха мышей контрольной группы (без воздействия). Инвазивная опухоль имеет прочную структуру, состоящую из атипичных клеток с плеоморфными гиперхроматическими ядрами разной формы и объема и прорастает в мышечную ткань. Иммунный ответ отсутствует. (б) Карцинома Эрлиха группы мышей, которым вводили пул аптамеров. Клетки карциномы имеют вакуолизацию цитоплазмы; лимфоцитарная инфильтрация умеренная. (в, г) Карцинома Эрлиха мышей, которым вводили FeAГ, после чего помещали в переменное магнитное поле. Распространение некроза опухоли среди оставшихся опухолевых клеток с воспалительной инфильтрацией вокруг них. (д, е) Карцинома Эрлиха мышей, которым вводили Апт-FeAГ, после чего помещали в переменное магнитное поле. Необратимые повреждения опухоли – карио и плазмолиз, а также карио и плазморексис. Обширная зона некроза опухоли, на периферии которой остается небольшое количество мертвых клеток карциномы с деструктивными изменениями микроокружения раковой ткани. Наблюдается видимая воспалительная инфильтрация сегментированных лейкоцитов и припухлости. Увеличение × 100.

Несмотря на то, что доза Апт-FeАГ была уменьшена в два раза по сравнению с FeАГ, терапевтический эффект был более значимым (Рис.52). В опухолевой ткани наблюдался тотальный некроз опухоли; оставшиеся небольшие количества клеток карциномы имели необратимые изменения: кариорексис, кариолизис, плазморексис. Такая терапия вызывала иммунную инфильтрацию сегментированных лейкоцитов, отек и деструктивные изменения внеклеточного матрикса опухолевой ткани. Обнаружены большие участки лизированных клеток без ядрышка с оставшимися спорадическими клетками и лимфоцитами (Рис.52).

3.4.2.2.3 Механизм противоопухолевого эффекта ферроарабиногалактана, функционализированного аптамерами

Покрытие из АГ повышает биосовместимость и способствует интернализации наночастиц клеток через рецепторы асиалогликопротеинов [251]. В отсутствие магнитного поля ориентация магнитных доменов суперпарамагнитных частиц случайна. Внешнее магнитное поле вызывает переориентацию магнитных доменов вдоль поля. Следовательно, низкочастотное (50 Гц) переменное магнитное поле вращает суперпарамагнитные частицы Апт-FeАГ по часовой стрелке вперед и назад.

Связывание частиц через аптамер AS14 с фибронектином и последующая обработка переменным магнитным полем нарушает клеточную адгезию и разрушает раковые клетки (Рис.53). Hsc70, мишень AS-42, локализуется в цитоплазме и лизосомах [260; 261] таким образом, нарушение целостности лизосом наночастицами, вращающимися в переменном магнитном поле, может вызвать лизис клеток изнутри.

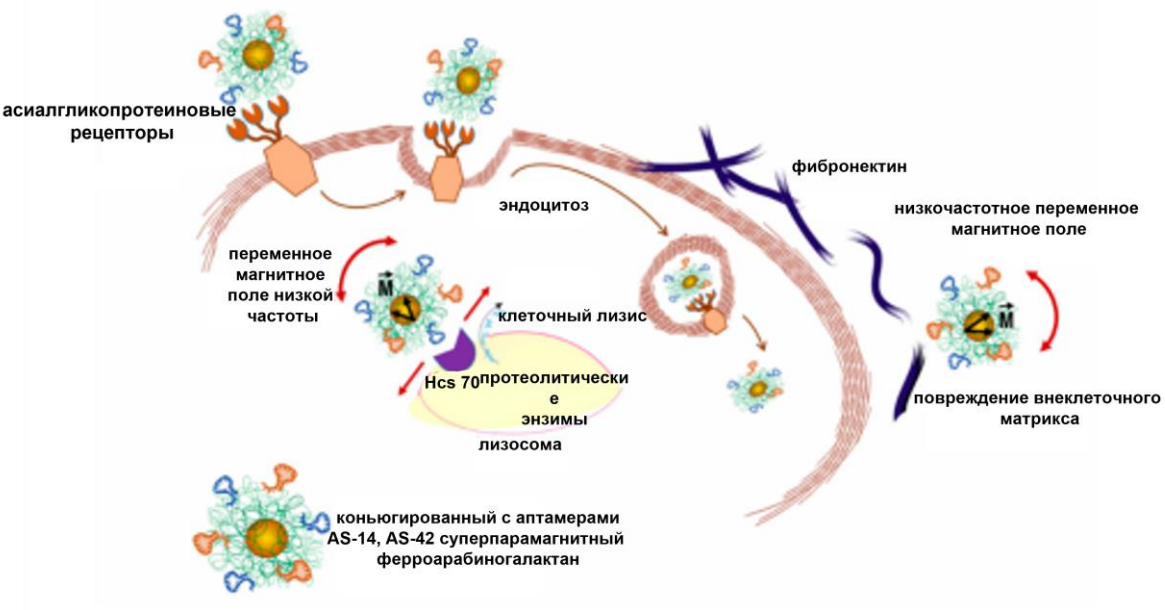


Рисунок 53 – Схематическое изображение опосредованной асиалогликопротеиновым рецептором доставки и повреждения клеток наночастицами AS-FrFeAG в слабом переменном магнитном поле. Благодаря магнитному моменту (M) наночастиц они колеблются в переменном магнитном поле. AS-rFeAG связывается с фибронектином через аптамер AS-14 и разрушает внеклеточный матрикс; AS-FrFeAG интернализуется через рецепторы асиалогликопротеинов и связывается с Hsc70 через аптамер AS-42, вызывая повреждение лизосом и утечку протеолитических ферментов, что приводит к лизису клеток.

3.4.2.3 Магнитомеханическая противоопухолевая терапия с помощью наноскальпеля (функционализированных ДНК-аптамерами трехслойных нано- и микродисков) в переменном магнитном поле

Злокачественные новообразования до настоящего времени остаются одной из лидирующих причин смертности трудоспособного населения, а ведущими методами терапии злокачественных новообразований остаются хирургия и лучевая терапия. Основным недостатком этих методов является

их высокая инвазивность, поскольку использование этих методов повреждает окружающие опухоль здоровые ткани, что особенно опасно при терапии глиальных опухолей головного мозга. Другим недостатком этих методов является невозможность радикального удаления всех опухолевых клеток, поскольку одиночные опухолевые клетки незаметны и впоследствии могут стать очагом формирования новой опухоли. Следовательно, для максимально радикального удаления опухоли с минимальным повреждением здоровой ткани должен быть предложен инструмент, способный находить и адресно удалять только опухолевые клетки, не повреждая при этом здоровые ткани. Создание такого инструмента возможно только с помощью нанотехнологий, использующих наноматериалы с уникальными электронными, оптическими и магнитными свойствами.

В работе впервые доказана эффективность модифицированных аптамером магнитных дисков (Au/Ni/Au) с магнитным моментом, параллельным его плоскости, для микрохирургии опухолей *in vitro* и *in vivo*.

3.4.2.3.1 Характеристика трехслойных дисков (Au/Ni/ Au) с магнитным моментом, параллельным его плоскости

Нано- и микродиски были изготовлены методом, сочетающим в себе литографию и физическое осаждение материала. Простота управления условиями изготовления дисков делает процесс автоматическим и воспроизводимым. Методы, используемые для изготовления магнитных дисков с плоской квазидипольной магнитной структурой, позволяют строго контролировать их форму, размер и состав, что позволяет осуществлять их процесс хорошо воспроизводимыми.

Трехслойные магнитные нанодиски (Au/Ni/Au) размером 600 нм и (Au/Co/Au) размером 250 нм (Рис.54) были получены по технологиям микро- и наноэлектроники, развиваемым на АО «НПП «Радиосвязь».

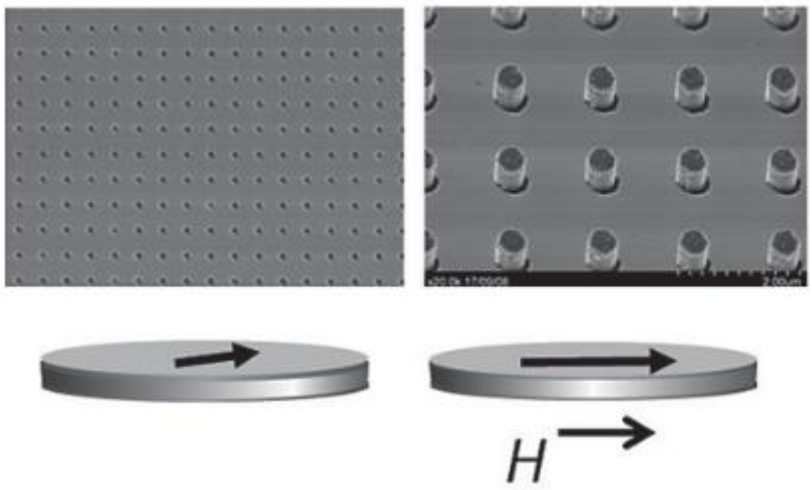


Рисунок 54 – Трехслойные магнитные нанодиски (Au/Ni/Au) с квазидипольной структурой, изготовленные методом электронной фотолитографии на АО «НПП «Радиосвязь». Сверху – магнитные нанодиски на подложке. Снизу – намагниченность дисков во внешнем магнитном поле.

Магнитные диски были получены методом штамповой нанолитографии. Изготовление магнитных Ni/Co нанодисков толщиной 50нм, покрытых с обеих сторон слоями Au толщиной 5нм, включало в себя:

1) формирование на подложке полимерного слоя толщиной 300нм;

2) разделение полимерного слоя с помощью штампа на островки диаметром 500/250 нм;

3) последовательное напыление слоев Au/Ni-/Au (Au/Co/Au) на островки;

4) освобождение напыленных Au/Ni/Au (Au/Co/Au) дисков при растворении полимерных островков и их перенос в ацетон при использовании ультразвуковой ванны.

Штамповка осуществлялась на установке штамповой нанолитографии Eitre 6 (Obducat) штампом, позволяющим получать на подложке площадью 30 квадратных см до 1 млрд. островков. Технология включала оптимизацию условий напыления, штамповки и растворения полимерных островков. Для измерения размеров и магнитных свойств дисков был использован сканирующий атомно-силовой микроскоп "SolverP47-Pro" (НТ-МДТ) с магнитными кантилеверами. На рис.55 слева видны светлые области, соответствующие нанодискам, расположенным на полимерных островках, справа представлены магнитные диполи дисков, сформировавшиеся после их намагничивания в параллельной плоскости дисков в магнитном поле с индукцией 0.5Тл. Минимальная величина поля, при котором происходило перенамагничивание нанодисков, составляла 0.3Тл.

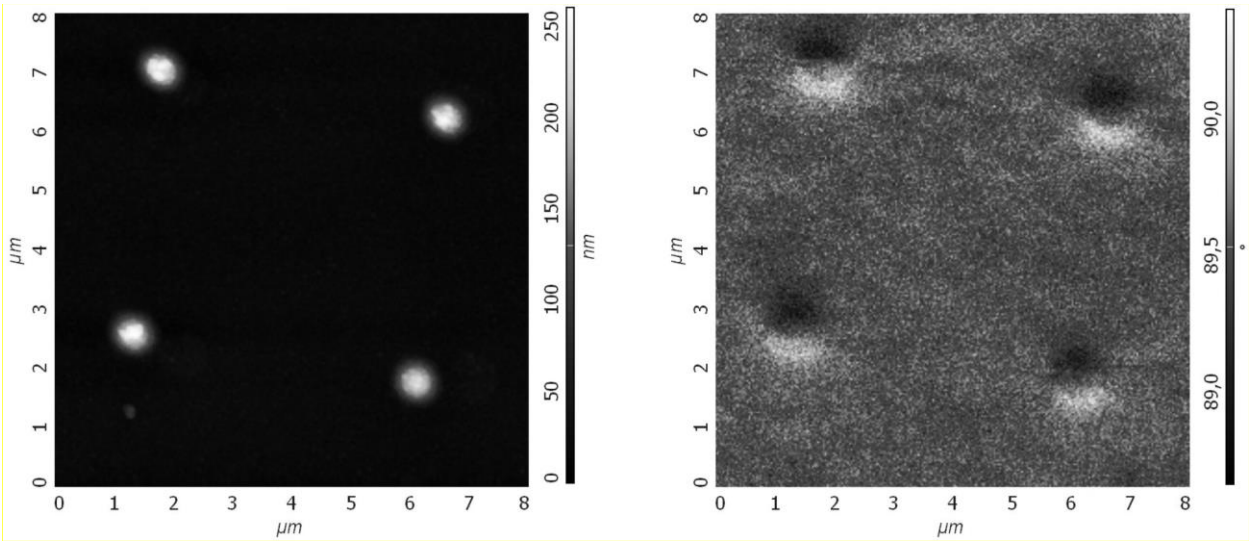


Рисунок 55 – Результаты исследования свойств магнитных дисков с помощью АСМ. Слева расположение и размеры дисков на полимерных островках; Справа магнитные диполи тех же дисков, сформировавшихся после их намагничивания в магнитном поле 0.5Тл.

С помощью сканирующего атомно-силового микроскопа выявлено, что магнитный момент дисков направлен параллельно его плоскости. Расчеты

показали, что модуль магнитного момента нанодиска составляет примерно 10-15А·м^2 и не изменяется слабым внешним магнитным полем. Во внешнем магнитном поле с индукцией 0.01Тл на диск действуют силы, момент которых равен примерно 10^{-17}Н·м.

Качество и размеры магнитных дисков были охарактеризованы с помощью электронной микроскопии (ЭМ), атомно-силовой микроскопии (АСМ) и магнитно-зондовой силовой микроскопии (Рис.56). Магнитные диски обладали высокой намагниченностью насыщения, отсутствием остаточного магнетизма из-за образования спиновых вихрей, собственный спиновой резонанс на низких частотах и способность модифицироваться химическими лигандами.

Магнитные никелевые микродиски диаметром 500 нм и толщиной 50 нм были покрыты слоем золота. Как показано на рис.56, магнитный диск состоит из никеля (синий) и золота (желтый) с расчетным процентным соотношением Ni:Au = 2,61%:1,02%, соответственно (Рис.56B). Магнитная структура магнитных дисков изучалась магнитными кантилеверами с помощью атомно-силовой микроскопии (Рис.56C,D). Этот метод использует два прохода через каждую строку растрового сканирования. На первом проходе топография записывалась в полуконтактном режиме работы. На втором проходе кантилевер поднимался над поверхностью на высоту 100 нм и повторял тот же топографический контур. Одновременно регистрировались фазовые сдвиги в колебаниях кантилевера, вызванные градиентами магнитной силы на острие. В этом исследовании магнитные свойства зондов проверялись с помощью твердых дисков, а пригодность зондов для магнитных измерений оценивалась по качеству изображения магнитных треков.

Выявлено, что магнитный момент магнитных дисков в постоянном магнитном поле 0,5 Тл параллелен его плоскости (Рис.56D).

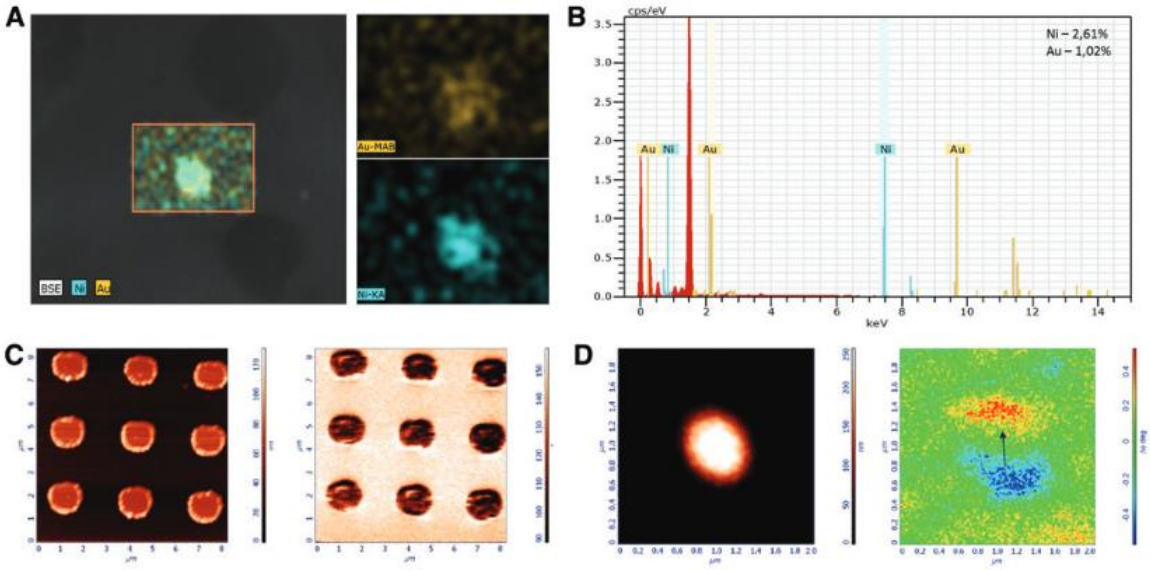


Рисунок 56 – (A) Элементный состав микродиска Au/Ni/Au (никель – голубого цвета, золото – желтого). (B) ЕМ спектр микродиска. (C) Атомно-силовая микроскопия и магнитно-зондовая силовая микроскопия микродисков. (D) Атомно-силовая микроскопия и магнитно-зондовая силовая микроскопия микродисков в постоянном магнитном поле (0,5 Т).

3.4.2.3.2 Исследование противоопухолевого эффекта магнитных микродисков, функционализированных ДНК-аптамерами, *in vitro*

Для генерации магнитного поля использовали установку, представленную на рис.57. Переменное низкочастотное поле малой амплитуды вызывало колебания дисков и магнитомеханическое возмущение клеточной мембраны. Специфичность магнитных дисков по отношению к опухолевым клеткам достигалась путем их адресной доставки с помощью аптамеров AS9 и AS14, высокоспецифичных и высокочувствительных асцитным клеткам аденокарциномы Эрлиха.

Рисунок 57 – Установка для магнитомеханической терапии злокачественных новообразований.

Для определения количества мертвых клеток использовали трипановый синий. Результаты исследования магнитомеханической деструкции асцитных клеток с помощью трехслойных магнитных нанодисков двух типов – Au/Ni/Au и Au/Co/Au, функционализированных аптамерами, показали, что магнитные нанодиски запускают в культуре асцитных клеток процессы клеточной гибели очень быстро – в течение двух часов, при этом в контрольных пробах гибели асцитных клеток не наблюдается (Табл.2). Количество мертвых клеток определяли с помощью камеры Горяева. В одной пробе (100 мкл) содержалось около 1,5 млн. асцитных клеток. В каждую пробу добавляли приблизительно по 8 тыс. нанодисков, функционализированных аптамерами. Таким образом, количество клеток в пробе было примерно в 180 раз больше, чем дисков.

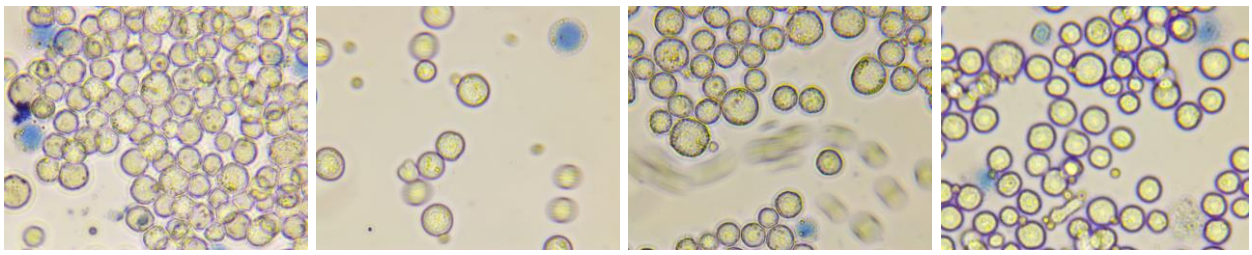
Таблица 2. Магнитомеханическое разрушение асцитных клеток с помощью магнитных нанодисков в услових переменного магнитного поля.

Диски	Контроль, мертвые клетки, %	Контроль +МП, мертвые клетки, %	Диски без МП, мертвые клетки, %	МП 150Э, 50Гц, мертвые клетки, %	МП 100 Э, 50Гц, мертвые клетки, %	МП 50 Э, 50Гц, мертвые клетки, %
Au/Ni/Au (600 нм) (n=3)	3±1	5±2	3±1	20±2	11±1	4±1
Au/Co/Au (250 нм) (n=3)	3±1	5±2	5±2	24±3	20±3	15±3

Результаты исследований показали, что магнитное поле не влияли на жизнеспособность асцитных клеток. Диски Au/Ni/Au (600 нм) и Au/Co/Au (250 нм) также не снижали жизнеспособность опухолевых клеток. При воздействии переменного магнитного поля (50 Гц), несмотря на небольшое количество дисков в пробе, происходило разрушение опухолевых клеток, зависимое от величины напряженности магнитного поля (Табл.2). При этом зависимость разрушения клеток от величины напряженности магнитного поля у дисков Au/Co/Au (250 нм) была ниже по сравнению с дисками Au/Ni/Au (600 нм).

В целом разрушение опухолевых клеток с помощью нанодисков может происходить в результате некроза или апоптоза. Некроз возникает в результате механического разрушения клеточной мембраны (магнитопорации) или разрушения всей клетки (магнитолиза). Для организма некроз представляет собой неблагоприятный способ деструкции опухолевых клеток, поскольку вызывает воспалительный процесс вследствие попадания лизосомальных ферментов в межклеточное пространство. Поэтому наиболее

благоприятным для организма способом гибели опухолевых клеток является апоптоз, который в раковых клетках подавлен из-за онкогенных мутаций. Апоптоз не сопровождается воспалительным процессом, поэтому необходимо подбирать такие характеристики магнитного поля, которые стимулируют апоптоз опухолевых клеток. В наших исследованиях эффект наноскальпеля был настолько велик, что приводил к разрушению клеточной мембраны, чем вызывал некротическую гибель клеток, что в целом приемлемо для интраоперационного вмешательства, после которого ткань отмывается от разрушенных клеток и магнитных нанодисков. Путь гибели клетки можно определить по морфологии клеток. Клетка в состоянии некроза увеличивает свой объем, при апоптозе объем клетки снижается и наблюдается блеббинг. Фотографии контрольных образцов асцитных клеток представлены на рис.58. Влияние магнитомеханической терапии на состояние асцитных клеток представлено на рис.59.

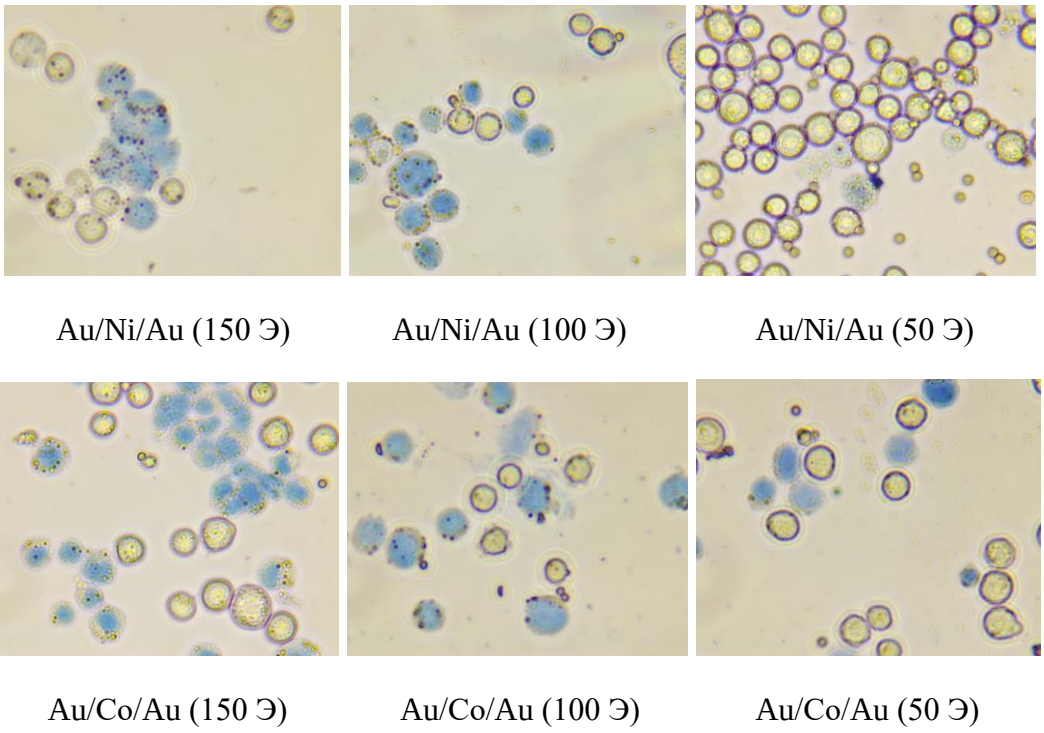


Контроль Контроль + МП Au/Ni/Au без МП Au/Co/Au без МП

Рисунок 58 – Асцитные клетки контрольных образцов.

Чтобы охарактеризовать функциональное состояние асцитных клеток после действия переменного магнитного поля в присутствии магнитных дисков, определяли уровни K^+ и Na^+ с помощью K^+ и Na^+-селективных флуоресцентных индикаторов, калий-связывающего изофталата бензофурана (PBFI) и связывающего натрий бензофурана изофталат (SBFI). Данные показали, что модифицированные аптамером магнитные диски после

воздействия переменного магнитного поля значительно снижали внутриклеточную концентрацию Na^+ и немного снижали внутриклеточную концентрацию K^+.



Au/Ni/Au (150 Э) Au/Ni/Au (100 Э) Au/Ni/Au (50 Э)

Au/Co/Au (150 Э) Au/Co/Au (100 Э) Au/Co/Au (50 Э)

Рисунок 59 – Влияние магнитодинамической терапии на жизнеспособность асцитных клеток. Вверху – диски Au/Ni/Au (600 нм). Напряженность магнитного поля – 150Э, 100Э и 50Э. Длительность воздействия магнитным полем – 15 мин. Снизу – диски Au/Co/Au (250 нм). Напряженность магнитного поля – 150Э, 100Э и 50Э. Длительность воздействия магнитным полем – 15 мин.

Для наблюдения за эффектом модифицированных аптамерами магнитных дисков с помощью конфокальной микроскопии мы инкубировали асцитные клетки с Au/Ni/Au-дисками, модифицированными FAM-меченными AS14 и AS9, и экспонировали их в переменном магнитном поле в течение 10 мин. Контрольные группы представляли собой: (1) интактные клетки асцита, (2) клетки асцита, на которые воздействовало переменное магнитное поле и (3) клетки асцита, проинкубированные с Au/Ni/Au-

дисками, модифицированными аптамерами, без воздействия магнитного поля (Рис.60A). Магнитные диски, модифицированные AS14 и AS9, связанные с асцитными клетками, наблюдали при сканировании с помощью электронной микроскопии, как показано на рис.60B. Разрушение асцитных клеток, инкубированных с Au/Ni/Au-дисками, модифицированными AS9 и AS14, начиналось в течение первого часа после воздействия переменного магнитного поля (Рис.60,2B).

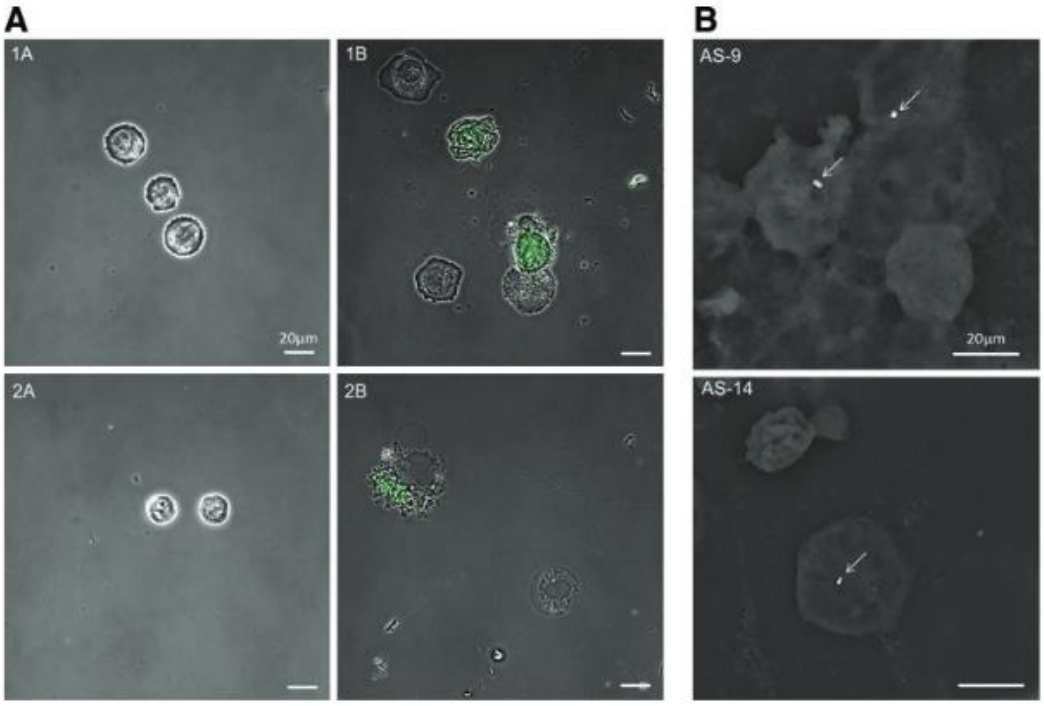


Рисунок 60 – (A) Конфокальная микроскопия интактных асцитных клеток (1A), асцитных клеток, проинкубированных с FAM-мечеными AS9 и AS14 микродисками (1B); асцитных клеток через 1 час после экспозиции в переменном магнитном поле (2A); асцитных клеток, проинкубированных с FAM-мечеными AS9 и AS14 микродисками через 1 час после экспозиции в переменном магнитном поле (2B).

Эффект магнитомеханической терапии на опухолевые клетки с помощью модифицированных аптамерами микродисков в переменном

магнитном поле представлен на рис.61. Из рисунка видно, что часть асцитных клеток, проинкубированных с аптамер-модифицированными Au/Ni/Au-дисками, подвергнутыми воздействию переменного магнитного поля, теряли свое ядро (Рис.61,2A) и уменьшались в размере, что указывало на гибель клеток. Оценку жизнеспособности клеток асцитные клетки определяли по изменению количества живых клеток и клеток в состоянии апоптоза, которое оценивали с помощью их окрашивания аннексином V-Cy3 и 6-CFDA (Рис.61,B). Принцип метода заключался в том, что нефлуоресцентное соединение 6-CFDA транспортируется в клетки и под действием присутствующих в живых клетках эстераз гидролизуется до флуоресцентного соединения 6-карбоксифлуоресцеина. Появление флуоресценции указывает на то, что эта клетка живая. Таким образом, комбинация аннексина V и 6-CFDA позволяет дифференцировать клетки с ранним апоптозом (положительный аннексин V, положительный 6-CFDA), некротические клетки (положительный аннексин V, отрицательный 6-CFDA) и жизнеспособные клетки (отрицательный аннексин V, 6-CFDA положительный). Этот метод оценки жизнеспособности клеток показал, что большинство асцитных клеток, обработанных аптамер-модифицированными Au/Ni/Au-дисками, через 40 мин после воздействия переменного магнитного поля погибает путем некроза и апоптоза (Рис.61,2B).

Все клетки асцита без воздействия магнитного поля оставались жизнеспособными (Рис.61,1B). Важно отметить, что модифицированные аптамером Au/Ni/Au диски были прикреплены к клеточным мембранам после воздействия переменного магнитного поля (Рис.61,2C). Для более детальной оценки механизма потери жизнеспособности опухолевых клеток через 40 мин после воздействия переменного магнитного поля методом проточной цитометрии с помощью зондов PBFI и SBFI определяли внутриклеточное содержание катионов натрия и калия. На рис.62,D представлены результаты проточной цитометрии клеток асцита без воздействия магнитного поля и

клеток асцита, инкубированных с дисками, модифицированными аптамером, окрашенными PBFI (Рис.62,1D) и SBFI (Рис.62,2D), которые показали, что переменное магнитное поле снижало уровни ионов натрия и калия на 33,4% и 7,1%, в клетках, проинкубированных с дисками, модифицированными аптамерами AS9 и AS14.

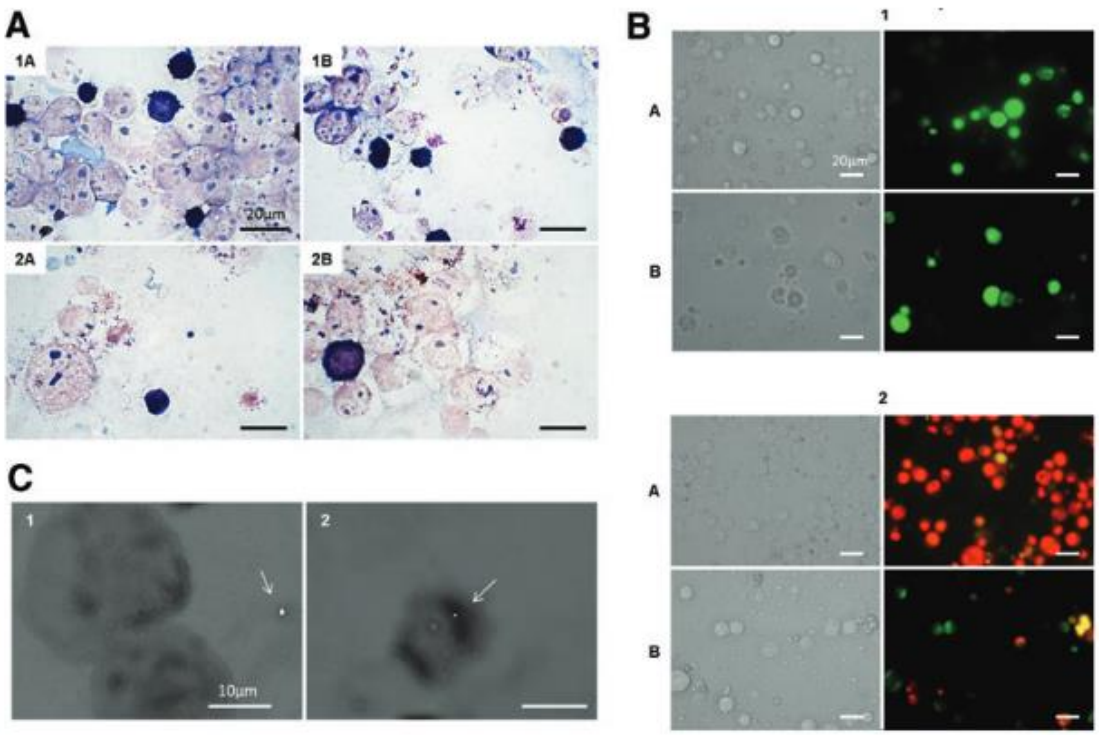


Рисунок 61 – Световая микроскопия интактных клеток (1A, 1B) и асцитных клеток, проинкубированных с модифицированными аптамерами AS9 и AS14 Au/Ni/Au микродисками через 40 мин после экспозиции в переменном магнитном поле (2A, 2B). (B) Флуоресцентная микроскопия интактных клеток (1A, 1B) и асцитных клеток, проинкубированных с модифицированными аптамерами AS9 и AS14 Au/Ni/Au микродисками через 40 мин после экспозиции в переменном магнитном поле (2A, 2B), окрашенных аннексином V-Cy3 (красный цвет) и CFDA (зеленый цвет). (C) Электронная микроскопия асцитных клеток, проинкубированных с немодифицированными микродисками (1C) и модифицированными аптамерами микродисками (2C) через 40 мин после экспозиции в переменном магнитном поле.

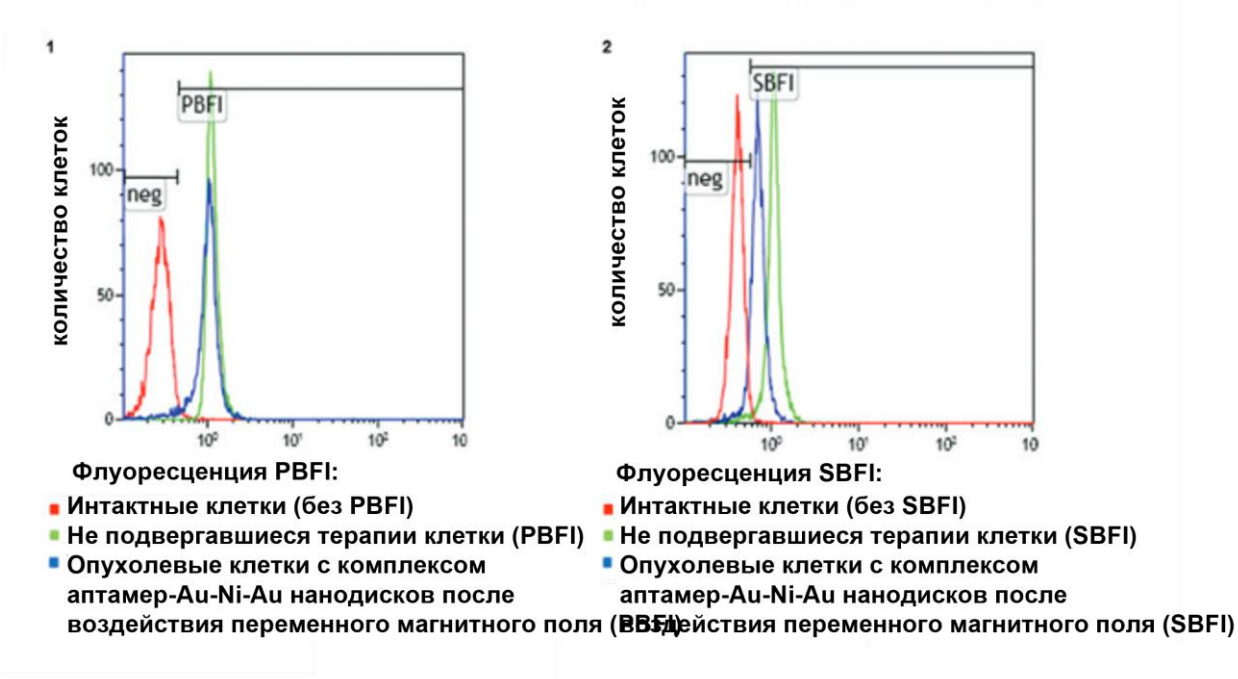


Рисунок 62 – Изменение содержания катионов натрия и калия в асцитных клетках после магнитомеханической терапии. Слева – изменение концентрации калия, справа – концентрации натрия.

Как правило, снижение концентрации натрия в асцитных клетках сопровождается уменьшением размера клеток, увеличением мембранного потенциала. Именно такие изменения характерны для запуска в клетках процесса апоптоза. AS14 и AS9 увеличивали эффективность воздействия дисков на асцитные клетки под влиянием переменного магнитного поля. Тем не менее, зависимости доли жизнеспособных и нежизнеспособных клеток от количества магнитных дисков в образцах клеток, инкубированных с дисками, модифицированными только тиолированным праймером, и дисками, при добавлении фосфатного буфера, AS-14 и AS-9, не выявлено. Даже один магнитный диск в клетке вызывал ее гибель так же, как 6 магнитных дисков. Интересно, что магнитные диски, модифицированные тиолированным праймером, оказывали меньшее влияние на гепатоциты, чем на клетки асцита. Тем не менее, AS14 и AS9 снижали нецелевой эффект магнитных

дисков на гепатоциты, что приводило к увеличению количества жизнеспособных клеток в образцах (Рис.63).

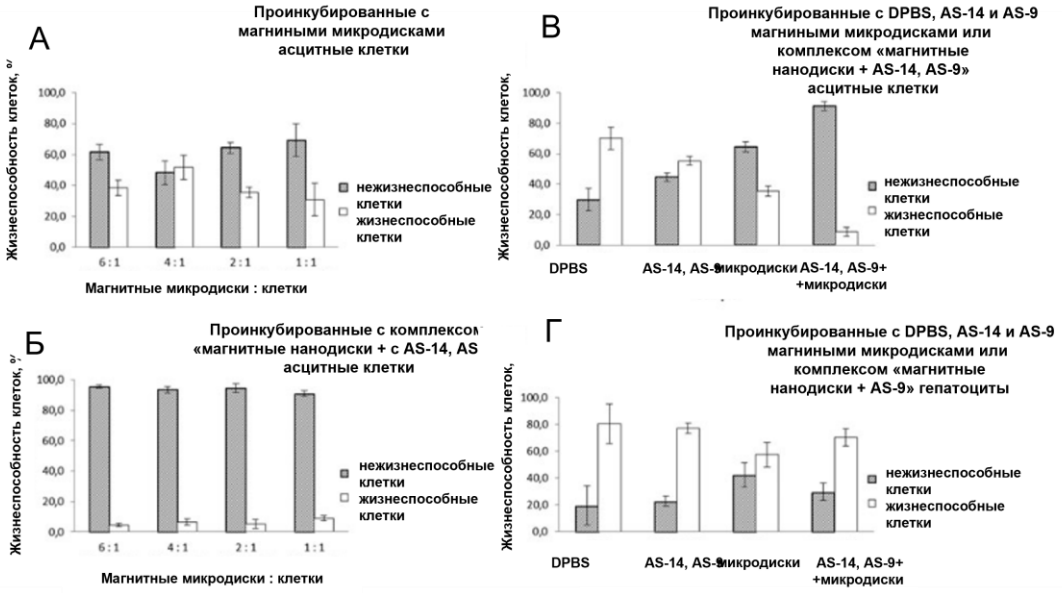


Рисунок 63 – Доля жизнеспособных и мертвых клеток асцитных, выявленных при окрашивании трипановым синим (А), после экспозиции в переменном магнитном поле при инкубации с немодифицированными микродисками. (В) Доля жизнеспособных и мертвых асцитных клеток, выявленных при окрашивании трипановым синим (А), после экспозиции в переменном магнитном поле при инкубации модифицированных аптамерами AS9 и AS14 микродисков. (С) Доля жизнеспособных и мертвых асцитрных клеток, выявленных при окрашивании трипановым синим (А), после экспозиции в переменном магнитном поле при инкубации с фосфатным буфером, аптамерами AS9 и AS14 и микродисками, модифицированными тиолированными аптамерами AS9 и AS14. (D) Доля жизнеспособных и мертвых гепатоцитов, выявленных при окрашивании трипановым синим (А), после экспозиции в переменном магнитном поле при инкубации с фосфатным буфером, аптамерами AS9 и AS14 и микродисками, модифицированными тиолированными аптамерами AS9 и AS14.

3.4.2.3.3 Исследование противоопухолевого эффекта магнитных микродисков, функционализированных ДНК-аптамерами, *in vivo*

Чтобы подтвердить противоопухолевый эффект магнитных дисков, модифицированных аптамерами, *in vivo*, клетки асцитной аденокарциномы Эрлиха трансплантировали в бедро экспериментальных мышей. Спустя 7 дней после трансплантации опухоли магнитные диски, модифицированные аптамерами, вводили внутрь опухоли. Результаты исследований показали, что опухолевые клетки через 10 мин воздействия переменного магнитного поля 50 Гц эффективно разрушались магнитными дисками.

Для оценки противоопухолевой эффективности магнитомеханической терапии магнитными дисками мы использовали гистологические исследования. Для подтверждения *in vivo* противоопухолевой эффективности магнитомеханической терапии магнитными дисками, модифицированными AS14 и AS9, у мышей с солидными опухолями проводили (1) терапию модифицированными аптамерами магнитными дисками в условиях воздействия магнитного поля, (2) терапию только магнитными дисками или (3) терапию фосфатным буфером. Через час после внутриопухолевых инъекций магнитных дисков мышей в течение 10 минут подвергали воздействию переменного магнитного поля (100 Гц, 100 Э). Важно отметить, что локального нагрева участка опухоли во время лечения и после него инфракрасная камера не фиксировала.

Через 4 часа после воздействия переменного магнитного поля опухолевую ткань от мышей всех групп изолировали и изготавливали из нее гистологические срезы. Результаты гистологических исследований, представленные на рис.64, показали, что опухолевая ткань мышей контрольной группы, которым вводили только фосфатный буфер, имела большое содержание межклеточной жидкости и была окружена деформированной мышечной тканью. Злокачественный процесс приводил

формированию многочисленных участков некроза (Рис.64,1A–C). Умеренно деформированная соединительная ткань наблюдается после воздействия на мышей переменного магнитного поля (Рис.64,1D). Опухолевые клетки, выделенные темно-синим цветом, присутствуют в большом количестве между деформированной соединительной тканью и мышцами. Введение только аптамеров вызывало некоторые видимые изменения в опухолевой ткани (Рис.64,2A–D), в частности, разрушение опухолевых клеток (Рис.64,2A,D).

Инъекция магнитных дисков, стабилизированных тиолированными праймерами, не меняла паттерна в гистологических срезах мышей с опухолями (Рис.64,3A–D). Сильно деформированная мышечная ткань и умеренно деформированная соединительная ткань с опухолевыми клетками вокруг и внутри ткани выявлена во всех контрольных образцах. Инъекция магнитных дисков, модифицированных AS14 и AS9, уменьшала количество опухолевых клеток в опухолевой ткани мышей даже без воздействия переменного магнитного поля (Рис.64,4A–D). На гистологических срезах наблюдаются соединительная ткань в состоянии умеренного некроза с опухолевыми инфильтратами и разрушенные опухолевые клетки.

В опухолевой ткани у мышей, которым вводили магнитные диски, модифицированные AS14 и AS9, после чего воздействовали переменным магнитным полем, выявлено более значительное снижение количества опухолевых клеток (Рис.64,5A–D), что явно указывает на их разрушение. Напротив, введение только магнитных дисков не уменьшало количество асцитных клеток в опухолях мышей. Следует отметить, что сами аптамеры AS14 и AS9 обладают противоопухолевым эффектом [248], поэтому введение модифицированных аптамерами дисков уже само по себе, без воздействия магнитного поля вызвало разрушение некоторой части опухолевых клеток.

Визуальный мониторинг лечения мышей показал эффективность лечения мышей магнитными дисками, модифицированными аптамерами, в переменном магнитном поле. Что касается магнитных дисков, модифицированных только тиолированным праймером, то они также разрушали опухоль, что привело к уменьшению их размера, но при этом в отсутствие адресного агента разрушались также мышцы и эпителиальная ткань (Рис.65,3), о чем свидетельствуют наличие некротических поражений тканей после первой лечебной процедуры. Аптамеры AS-14 и AS-9, введенные в опухоль сами по себе, не уменьшали размер опухоли (Рис.65,2), тем не менее, рост опухоли был не таким быстрым, как у контрольных животных, получавших фосфатный буфер (Рис.65,1).

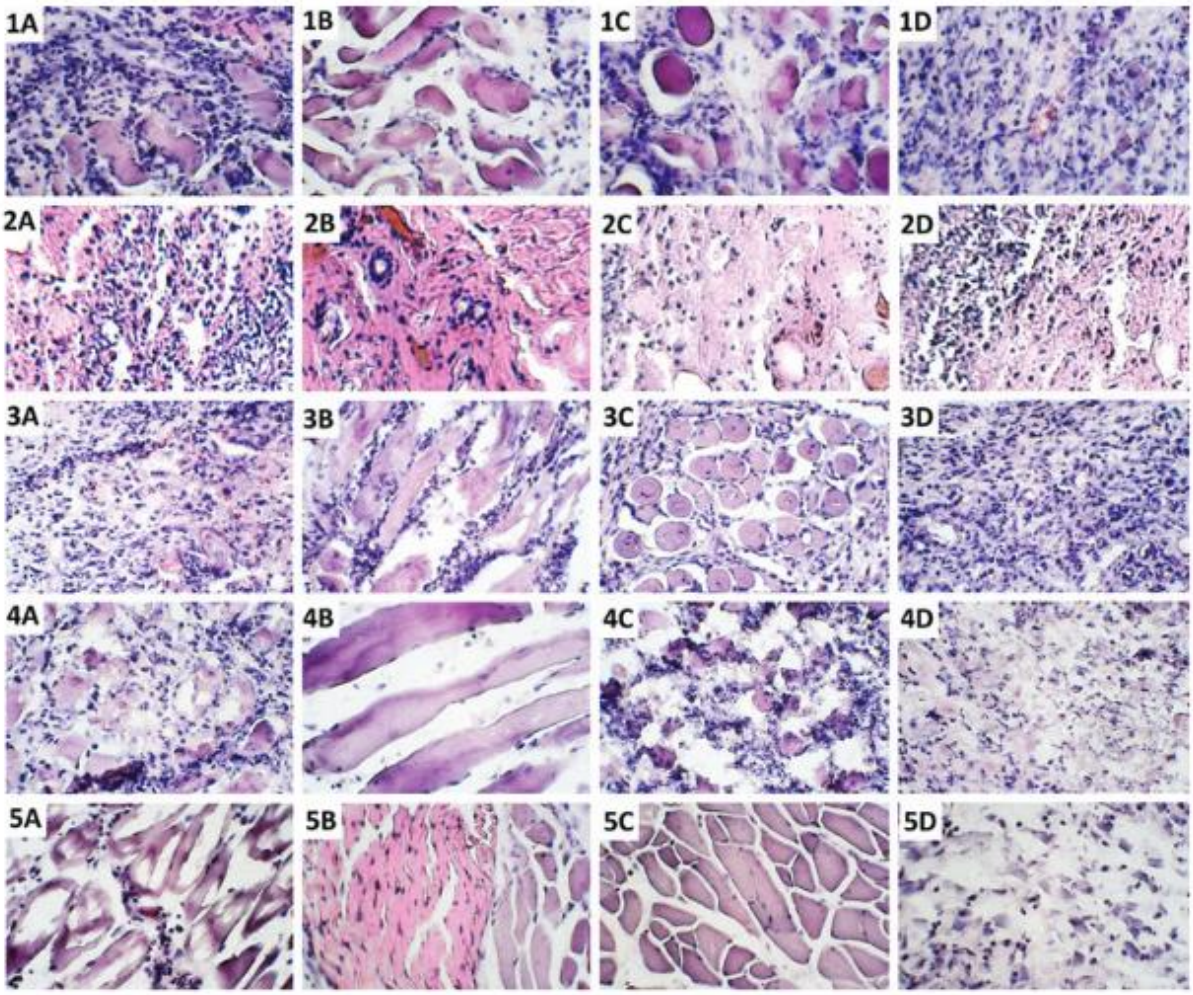


Рисунок 64 – (A-D) Световая микроскопия эозин и гематоксилин-окрашенных гистологических срезов опухолей, изолированных от мышей, которым вводили фосфатный буфер (1A-D); только аптамеров (2A-D), только микродисков (3A-D); аптамер-модифицированных микродисков без экспозиции в переменном магнитном поле (4A-D); аптамер-модифицированных микродисков после экспозиции в переменном магнитном поле через 4 часа (5A-D).

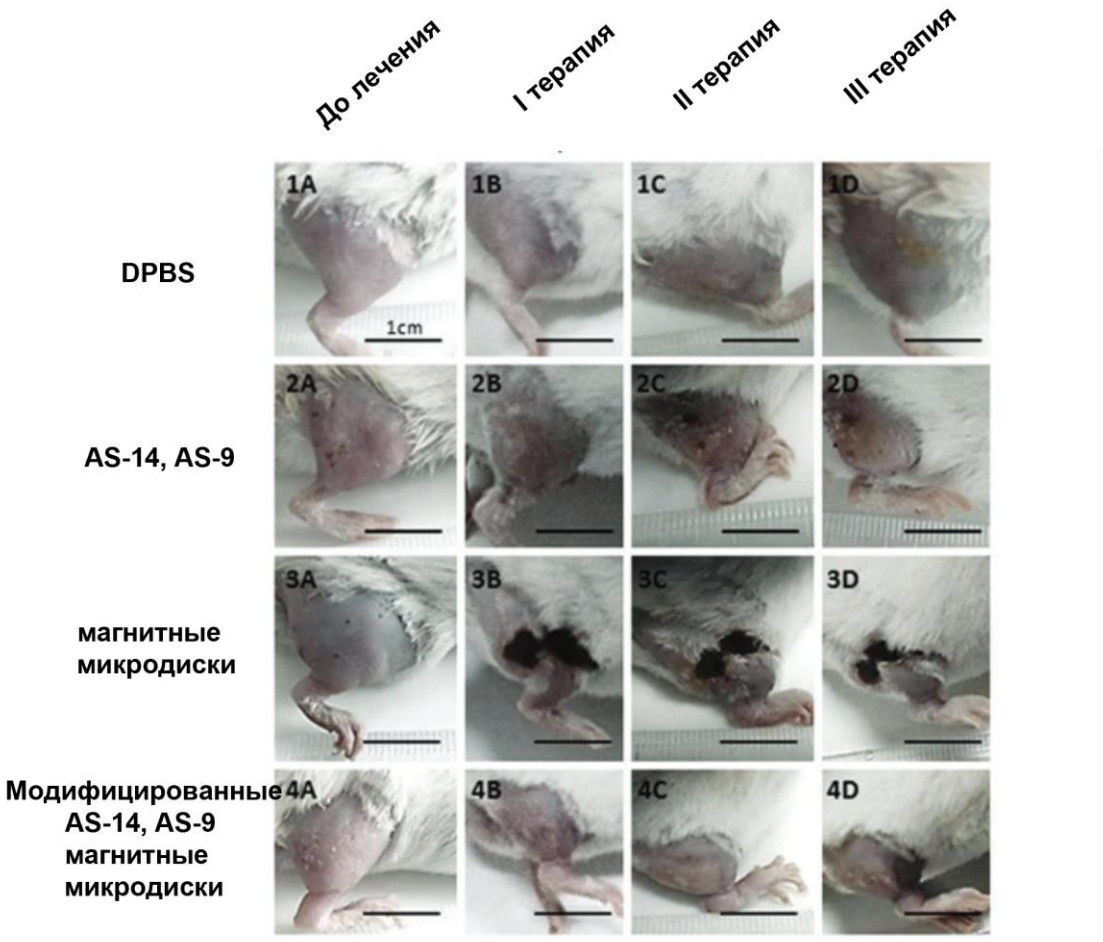


Рисунок 65 – Мониторинг лечения солидной опухоли. Мышам вводили фосфатный буфер (1A-D); аптамеры (2A-D), микродиски (3A-D); аптамер-модифицированные микродиски без экспозиции в переменном магнитном поле (4A-D); аптамер-модифицированные микродиски после экспозиции в переменном магнитном поле через 4 часа (5A-D).

Нефункционализированные аптамерами магнитные диски повреждали мембраны асцитных клеток и гепатоцитов через 10 мин воздействия переменного магнитного поля (Рис.63). Аптамеры AS14 и AS9 увеличивали эффективность магнитных дисков в отношении опухолевых клеток (рис.63A-B) и снижали их деструктивное влияние на гепатоциты (Рис.63D). Аптамеры AS14 и AS9 увеличивали количество нежизнеспособных клеток асцита

примерно в два раза по сравнению с контрольными образцами, инкубированными в фосфатном буфере (Рис.64C), тогда как аптамеры почти не оказывали никакого влияния на гепатоциты.

Через четыре часа у мышей-опухоленосителей, которым вводили Au/Ni/Au диски, модифицированные аптамерами, и воздействовали переменным магнитным полем, количество опухолевых клеток уменьшилось (Рис.64,5A–D). Мы предполагаем, что это может быть связано с активацией в опухолевых клетках процессов апоптоза, начавшимся под влиянием переменного магнитного поля. Магнитные диски, вводимые мышам, не уменьшали количество опухолевых клеток (Рис.64,3A–C). Благодаря противоопухолевым свойствам AS14 и AS9 было очевидно, что модифицированные аптамерами магнитные диски должны вызывать разрушение опухолевых клеток даже без влияния переменного магнитного поля (Рис.64,3A–C). Тем не менее, действие переменного магнитного поля на мышей, которым вводили магнитные диски, модифицированные AS14 и AS9, приводило к еще большему снижению количества опухолевых клеток (Рис.64, 5A).

Таким образом, наше исследование показало, что модифицированные аптамерами Au/Ni/Au диски запускают апоптоз асцитных клеток в течение 40 минут после 10 мин воздействия переменного магнитного поля (50Гц, 100Э). Более того, через 4 ч после воздействия переменного магнитного поля количество опухолевых клеток значительно уменьшается. Можно предположить, что противоопухолевые свойства аптамеров AS14 и AS9 стали возможными благодаря их сочетанию с магнитными Au/Ni/Au дисками при воздействии переменного магнитного поля.

В целом, результаты, полученные нами, демонстрируют перспективы микрохирургии на основе аптамеров для лечения онкологических заболеваний, а также необходимость определения правильного выбора лигандов для модификации магнитных дисков, поскольку только сильное

взаимодействие магнитных дисков с белками, участвующими в процессах апоптоза, роста и развития опухоли, может определять исход лечения. Очевидно, что магнитные диски, немодифицированные аптамерами, в переменном магнитном поле вызвали некроз опухолевых клеток, что привело к воспалению и образованию ран (Рис.65,3). Нацеливание магнитных дисков аптамерами AS-14 и AS-9, по-видимому, способствует апоптозу опухолевых клеток или, по крайней мере, значительному снижению некротических процессов наряду с запуском апоптоза.

Тот факт, что только AS14 и AS9 обладают ингибирующим действием на клетки асцита, предполагает, что эти аптамеры полезны не только в качестве агентов-мишеней, но также и в качестве терапевтических агентов. Таким образом, исследования показали, что применение магнитных дисков, модифицированных аптамерами, специфичными для опухолевых клеток и подавляющими рост опухоли, в низкочастотных магнитных полях является эффективным инструментом магнитомеханической терапии, которая может быть применима в клиниках в будущем.

Таким образом, можно заключить, что микрохирургия злокачественных опухолей с помощью наноскальпеля на основе функционализированных распознающими опухолевые сайты лигандов может быть использована для удаления одиночных опухолевых клеток во время оперативного вмешательства.

3.5 Адресная доставка лекарственных препаратов с помощью ДНК-аптамеров

Повышение эффективности и снижение токсичности традиционных противоопухолевых препаратов – одна из наиболее актуальных проблем онкологии. Лекарства, вводимые традиционными способами, как правило, оказывают системное воздействие, в том числе на непораженные органы,

поэтому концентрация препаратов в опухолевых тканях зачастую не достигает терапевтической.

3.5.1 Адресная доставка цисплатина с помощью ДНК-аптамеров

Арабиногалактан – высокогидрофильный полисахарид, экстрагируемый из лиственницы сибирской, легко биодеградирует и выводится из организма, имеет низкую полидисперсность и аккумулируется в опухолевых тканях, обладает гепатопротекторными, иммуномодулирующими и мембранотропными свойствами. Кроме того, в силу своих физико-химических характеристик он способен образовывать растворимые глобулы и связывать плохо растворимые фармакологические препараты, помещая их внутри сфероидальной глобулы (Рис.66). В составе конъюгатов с арабиногалактаном у цисплатина увеличивается время полураспада и повышается стабильность [262].

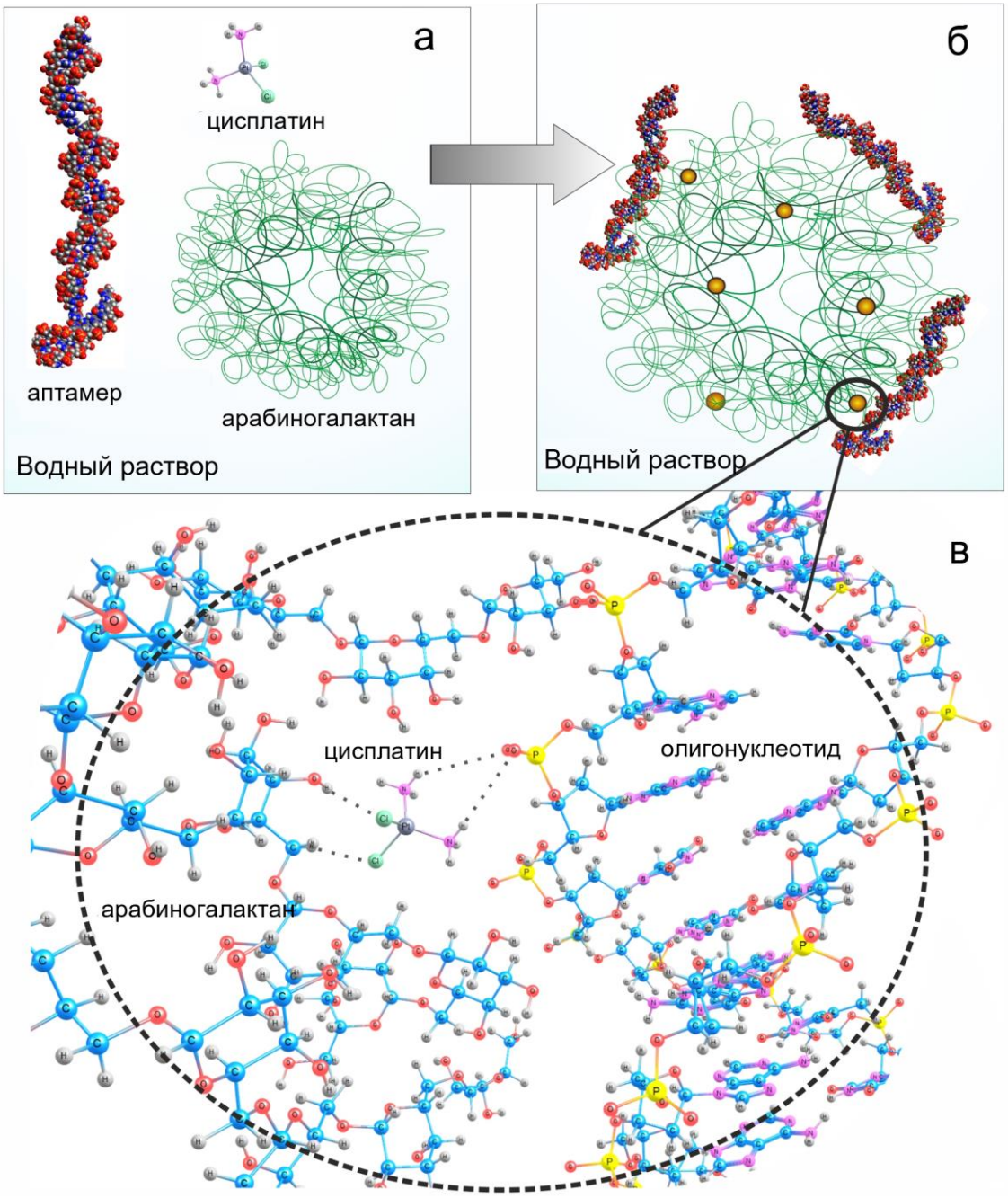


Рисунок 66 – Структура комплекса цисплатина с арабиногалактаном, функционализированного ДНК-аптамерами.

Цисплатин – комплексное соединение двухосновной платины, использующееся в онкологии в качестве эффективного противоопухолевого препарата для лечения различных видов рака. Особенно цисплатин эффективен для лечения заболевания на ранней стадии [263]. Однако применение цисплатина ограничено в силу его высокой токсичности,

вызывающей нарушения функции почек, анафилактические реакции, лейкопению, тромбоцитопению, анемию и нейропатии [264]. Токсический эффект цисплатина проявляется, в основном, его антипролиферативным действием на все быстро делящиеся клетки. Еще одним недостатком всех современных платиновых противоопухолевых препаратов является формирование к ним резистентности опухолей при длительном лечении [265; 266].

Механизм действия цисплатина заключается в том, что ДНК-аддукты цисплатина ингибируют репликацию и/или транскрипцию и активируют несколько сигнальных путей, вызывающих апоптоз [267]. Под влиянием цисплатина активируются проапоптотические гены PUMA, индуцирующие p53-зависимый путь апоптоза [268]; каспазы [269]; белок, активирующий p53 (PIDD) [81]; семейство MAP-киназ [264]. Активация этих белков причастна к индукции апоптоза клеток. Кроме того, цисплатин нарушает процессы репарации ДНК, ингибируя: 1) белки nucleotide excision repair (NER), 2) белки mismatch repair (MMR) и 3) ДНК-зависимую протеинкиназу.

Помимо этого цисплатин вызывает окислительный стресс, приводящий к увеличению в клетке уровня активных форм кислорода (АФК) и гидроксил-радикалов [270]. Увеличение уровня АФК активирует проапоптотические белки Bak1 и потенциал-зависимый анионный канал (VDAC1) [271]. Цисплатин снижает содержание восстановленного глутатиона GSH, ведет к окислению SH-групп в митохондриальных белках, что способствует увеличению входа кальция в митохондрии и, как следствие, падению митохондриального мембранного потенциала [273], способствует высвобождению цитохрома С из митохондрий, активирующего образование комплекса (Apaf-1) и каспаз 9 и 3 [273]. Кроме того, цисплатин повреждает митохондриальную ДНК [274], тем самым способствуя снижению энергообмена клетки в целом. Через фосфорилирование киназ Chk1 и Chk2 цисплатин вызывает арест клеточного цикла в фазу G2 [275].

В последнее время для снижения цитотоксического эффекта лекарственных препаратов, в том числе цисплатина, стали использовать некрахмальные полисахариды, многие из которых проявляют противоопухолевые и иммуномодулирующие свойства [276]. Ограничения применения таких полисахаридов связаны с тем, что они имеют высокую молекулярную массу и отличаются неоднородностью. Таких недостатков лишен арабиногалактан лиственницы сибирской, характеризующийся невысокой молекулярной массой (12–20 кДа) и низкой степенью полидисперсности. АГ из лиственницы может служить целенаправленным носителем для доставки диагностических и терапевтических агентов [277]. Таким образом, перспективным способом снижения токсичности и повышения биодоступности цисплатина может стать его модификация путем совместной механохимической обработки с арабиногалактаном, в результате которой происходит диспергирование цисплатина в матрице арабиногалактана без его химического взаимодействия.

Комплекс цисплатина с арабиногалактан уже показал свою противоопухолевую активность. Выдвинуто предположение, что адресная доставка в опухолевые клетки комплекса цисплатина с арабиногалактаном с помощью аптамеров снизит токсические эффекты цисплатина при сохранении его противоопухолевых свойств и позволит уменьшить его лечебную дозу.

Введение цисплатина и его конъюгатов начинали с 5-го дня после внутрибрюшинной трансплантации асцитных клеток мышам и продолжали в течение 2-х недель. За время терапии в группе мышей, которым вводили чистый цисплатин пали 60% животных (6 мышей из 10). В остальных группах падежа не происходило (Рис.67). У выживших после терапии цисплатином мышей асцитные клетки в брюшной полости отсутствовали. У 4-х мышей из группы, которой животным вводили комплекс цисплатина с арабиногалактаном, опухолевые клетки в брюшной полости также

отсутствовали. У остальных мышей содержание опухолевых клеток было меньше почти в 16 млн. раз (Табл.3). Противоопухолевый эффект наблюдался на фоне сниженного введения цисплатина. В составе комплекса цисплатина с арабиногалактаном содержание цисплатина составляло менее 10%. Таким образом, животным, которых лечили этим комплексом, цисплатина вводили в 10 раз меньше, чем животным, которым вводили терапевтическую дозу. Несмотря на сниженную в 10 дозу цисплатина мы наблюдали ярко выраженный противоопухолевый эффект на фоне резкого снижения токсического эффекта.

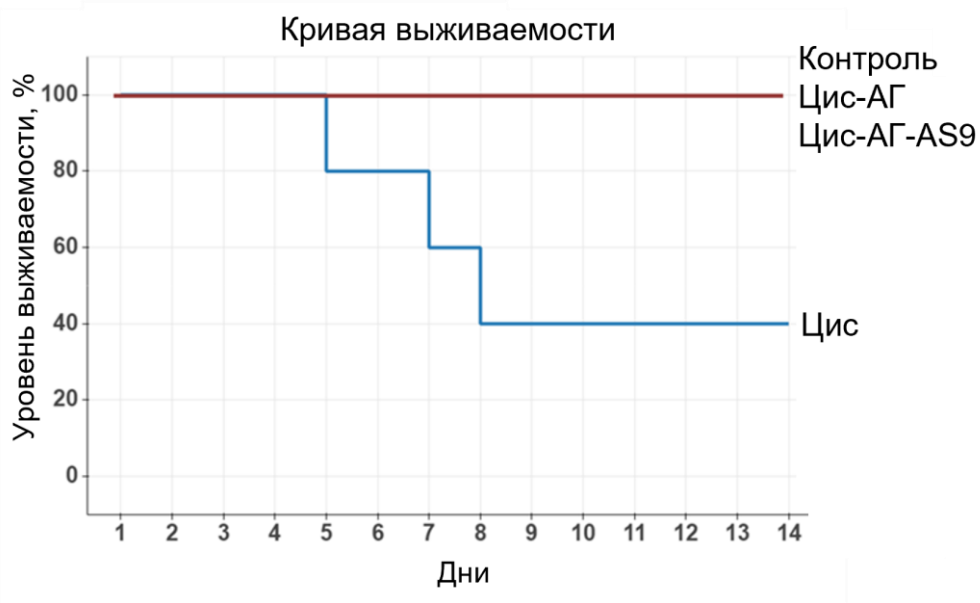


Рисунок 67 – Кривая выживаемости мышей при терапии цисплатином и его конъюгатами.

Цисплатин не обладает специфичностью по отношению к опухолевым клеткам и распределяется во всех биологических жидкостях и тканях организма равномерно. При этом основная часть цисплатина при попадании в организм сразу связывается с белками плазмы крови (альбумином и трансферином), в результате чего цисплатин инактивируется и не попадает в опухолевую ткань. Несвязавшийся с белками плазмы крови цисплатин

поступает в клетки путем простой диффузии и/или с помощью АТР-зависимого белка-транспортера CTR1 [277]. В клетке цисплатин связывается с белками цитоскелета, РНК и тиолсодержащими пептидами и белками. Основной мишенью для проявления цисплатином противоопухолевого эффекта является ДНК. Однако только около 1% внутриклеточного цисплатина связывается с ДНК [278]. Именно поэтому адресная доставка цисплатина в опухолевые клетки является крайне актуальной для увеличения его противоопухолевого эффекта.

Доставку цисплатина к опухолевым клеткам осуществляли с помощью аптамеров, мишенью которых были асцитные клетки карциномы Эрлиха [248]. Для оценки эффективности противоопухолевого эффекта цисплатина при адресной его доставке содержание вводимого цисплатина было снижено в 2 раза по сравнению с комплексом арабиногалактана с цисплатином. При адресной доставке эффективность цисплатина увеличилась, т.е. при сниженном в 2 раза содержании цисплатина 4 мыши из 10 полностью подавили опухолевый рост, у остальных мышей в среднем содержание асцитных клеток в брюшной полости было снижено в 18 млн. по сравнению с контролем, а объем асцитической жидкости был меньше в 32 раза, что свидетельствует об очень низкой плотности асцитных клеток в асцитической жидкости (Табл.3, рис.68).

Таблица 3. Биологический эффект цисплатина и его конъюгатов с арабиногалактаном

№	Экспериментальные группы животных	Асцитная опухоль, мл	Асцитные клетки, тыс.	Плотность клеток, кл/мкл
1	Контроль (n=8)	9,70±0,8*	14 400 000±256000*	1 484 536±356 00*
2	Cys (n=4)	0	0	0
3	Cys+АГ (n=10)	0,20±0,04	0,9±0,09	4,5±0,5
4	Cys+АГ+Апт (n=10)	0,30±0,05	0,8±0,08	2,7±0,3

Примечание: * P<0,01

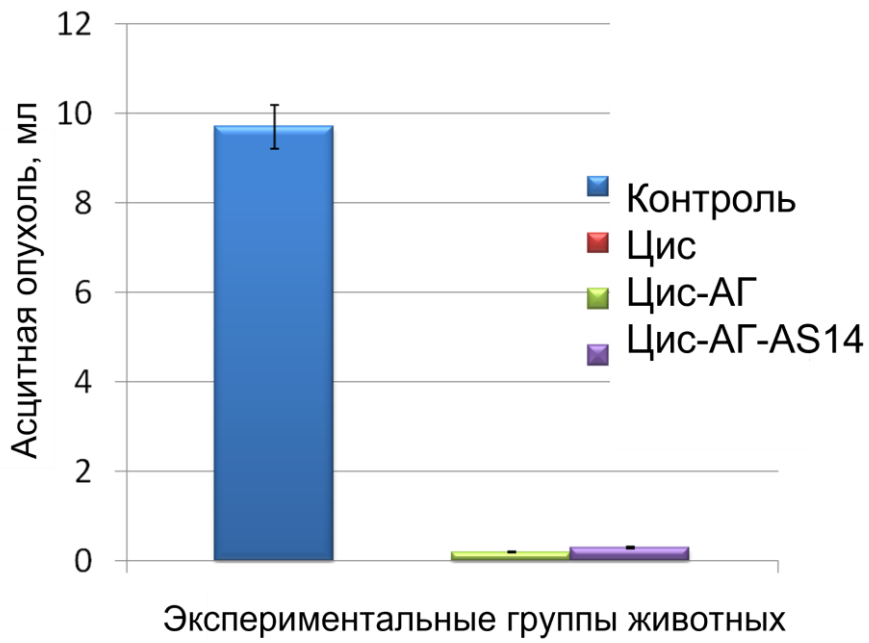


Рисунок 68 – Объем асцитической жидкости у мышей разных экспериментальных групп после 2-х недель терапии.

Морфологические различия асцитных клеток в опухолях мышей разных экспериментальных групп после 2-х недель терапии представлены на рис.69.

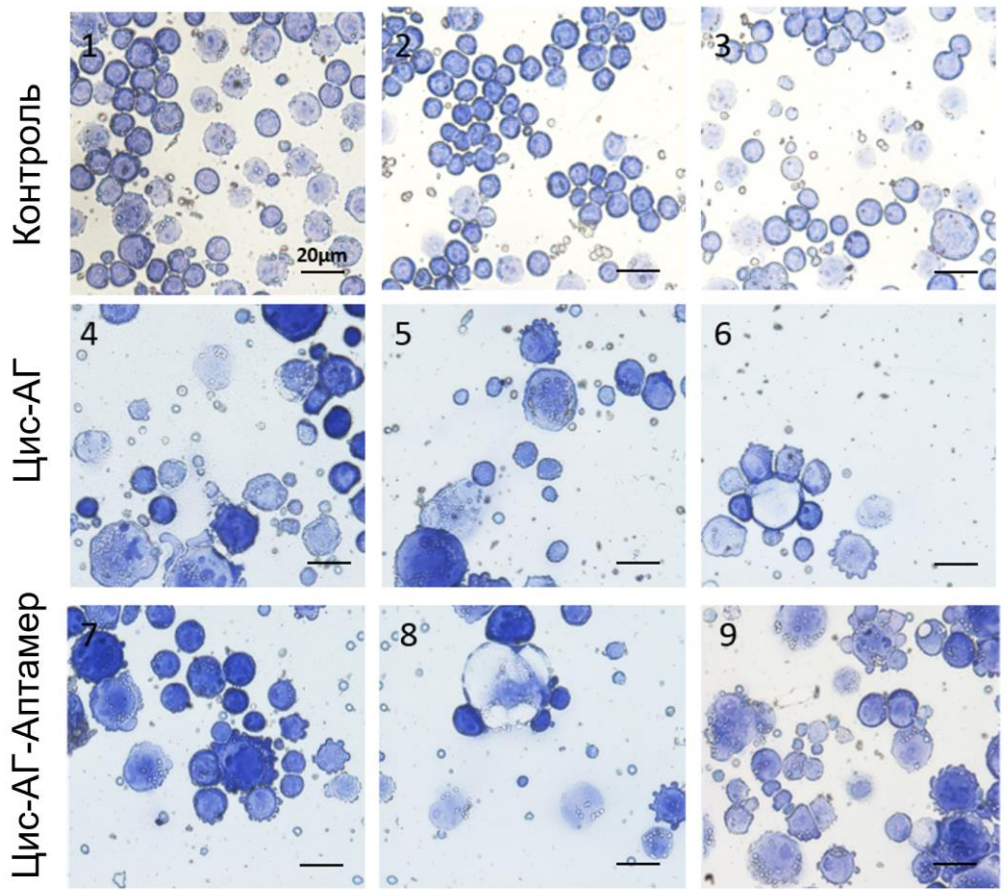


Рисунок 69 – Морфология клеток асцита на мазках интактной асцитной жидкости, выделенной из брюшной полости экспериментальных мышей, фиксированных метанолом и окрашенных красителем Романовского-Гимза. Увеличение × 40.

Во второй серии экспериментов мы изучали влияние цисплатина и его конъюгатов на уровень метастазирования. Для адресной доставки конъюгатов мы использовали аптамер AS42, специфичный для асцитных клеток. Цисплатин и его конъюгаты вводили 8 раз через день. Распределение метастазов и их масса после лечения показаны на рис.70.

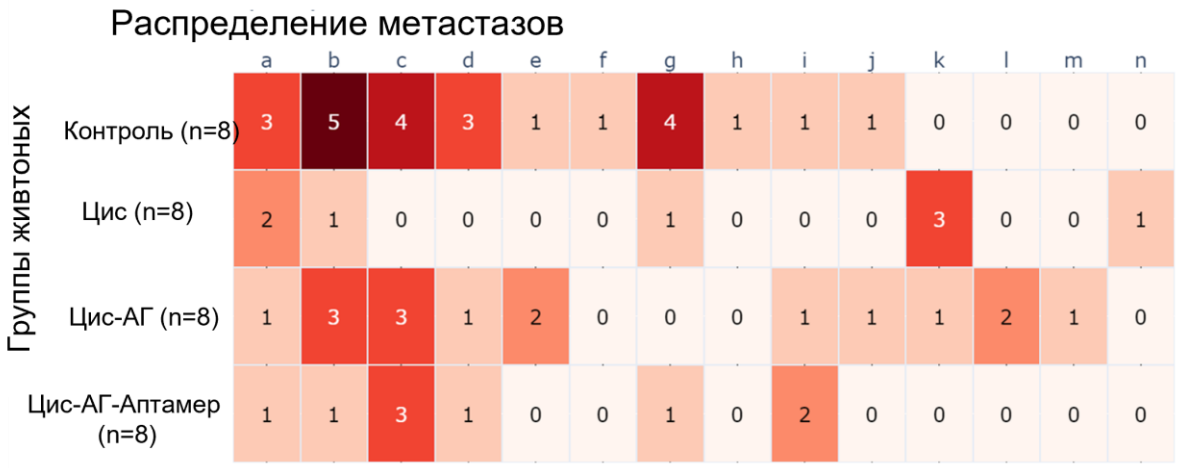


Рисунок 70 – Распределение метастазов у мышей, получавших цисплатин и его конъюгаты, где: а - щитовидная железа, б - тимус, в - хвост, г - печень, д - сердце, е - желудок, г - легкие, з - асцит, i - спина, j - почки, k - кишечник, l - горло, m - мочевой пузырь, n - грудина

После 8 инъекций цисплатина и его конъюгатов оценивали распределение метастазов в организме мышей и их общий вес (Рис.71). Наибольшее количество метастазов было определено в контрольной группе животных без лечения (24). Метастазы обнаружены в щитовидной железе, вилочковой железе, хвосте и легких. Общий вес метастазов у 8 мышей составил 6,9 г. У мышей, получавших цисплатин (Cis) и комплекс цисплатина с арабиногалактаном и AS42 (Cis-АГ-Апт), было в три раза меньше метастазов, тогда как общий вес метастазов был в 5,6 и 4,7 раза меньше, соответственно (Рис.70). Таким образом, можно сделать вывод, что конъюгаты цисплатина могут подавлять рост опухоли, как цисплатин, несмотря на низкий процент цисплатина в комплексах. Предполпгаемый механизм действия цисплатина и его конъюгатов представлен на рис.71.

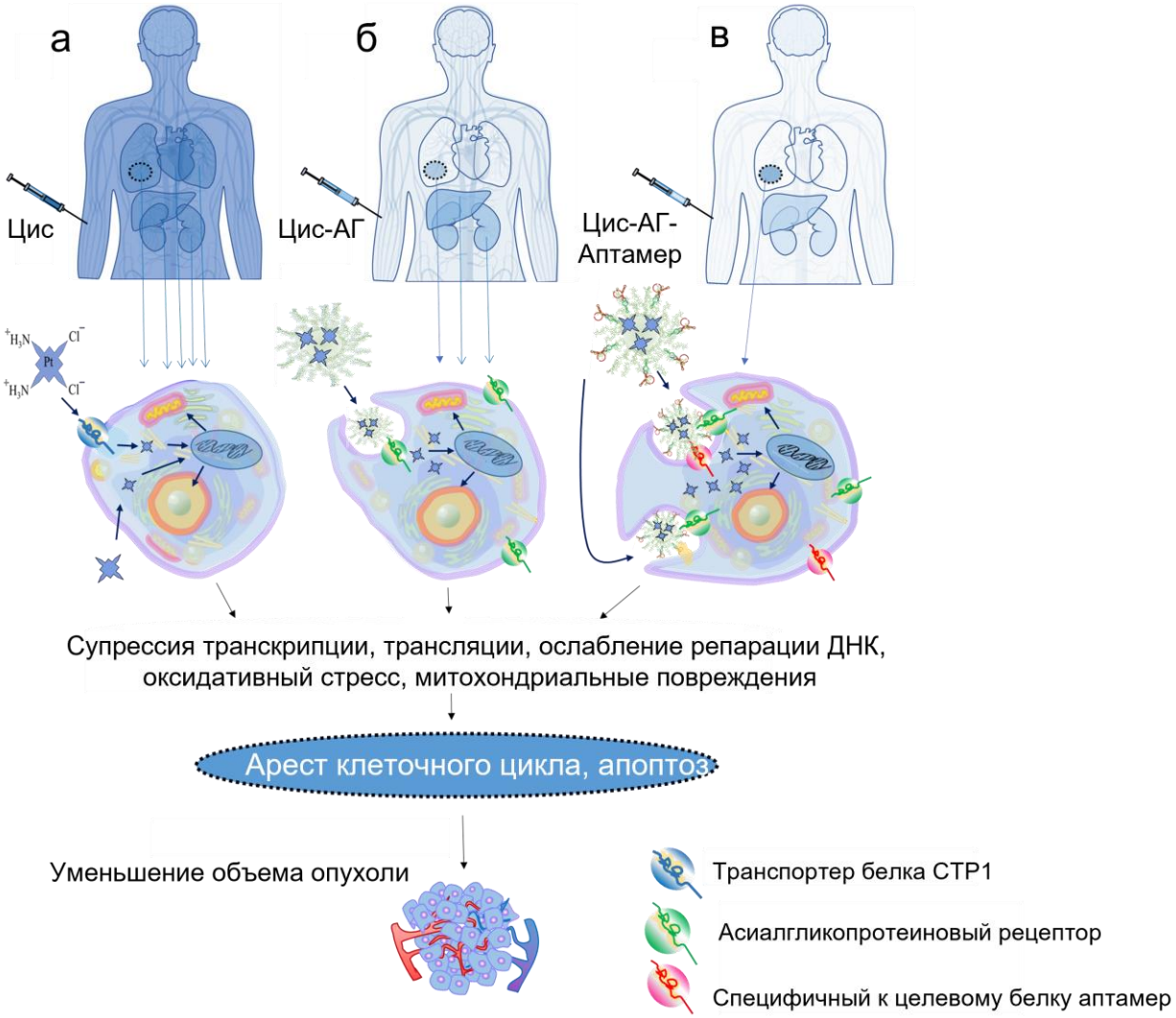


Рисунок 71 – Механизм действия цисплатина и его конъюгатов

3.5.2 Адресная доставка циклофосфамида и его конъюгатов с помощью аптамеров

К широко применяемым при злокачественных новообразованиях химиотерапевтическим препаратам относится циклофосфамид (ЦФА) (2-оксо-2-ди (β-хлорэтил) аминотетрагидро-2,1,3-фосфоксазин). Этот алкилирующий цитостатик является производным бис-(β-хлорэтил)-амина и обладает широким спектром противоопухолевой активности, однако

применение циклофосфамида ограничивается из-за широкого спектра его побочных эффектов, в том числе иммунодепрессивного [262], что делает актуальным разработку систем направленного транспорта этого препарата.

Выбор компонентов для создания систем адресной доставки – сложная проблема, поскольку все составляющие системы адресной доставки должны обладать определенными свойствами. Они должны быть биоразлагаемыми, нетоксичными, ограничивать взаимодействие лекарственного препарата со здоровыми тканями, адресно доставлять его к опухолевым тканям и переносить в опухолевые клетки. В качестве таких компонентов используют искусственные и натуральные полимеры, в числе которых находится арабиногалактан лиственницы сибирской. Совместная механохимическая обработка ЦФА с арабиногалактаном (АГ), в результате которой происходит диспергирование лекарственных веществ в матрице АГ без их химического взаимодействия, способствующая снижению токсичности и повышению биодоступности лекарственных средств, является перспективным способом модификации лекарственных препаратов, в том числе ЦФА. АГ в отличие от других полимеров однороден, имеет низкую молекулярную массу, хорошо растворяется в воде и способен образовывать конъюгаты с лекарственными препаратами, увеличивая их эффективность [262]. Помимо этого, АГ обладает иммуномодулирующими свойствами, что может нейтрализовать иммунодепрессивное действие циклофосфамида. АГ можно использовать для доставки диагностических и терапевтических средств к тем клеткам, которые имеют на своей поверхности асиалогликопротеиновые рецепторы, лигандом для которых являются углеводы. Связывание углеводов с рецепторами индуцирует эндоцитоз [263], в результате которого лекарственный препарат оказывается внутри клетки, поэтому эффективность использования АГ для адресной доставки обусловлена его способностью к рецептор-опосредованному эндоцитозу.

Таким образом, АГ может стать подходящим кандидатом для создания системы адресной доставки ЦФА в опухолевые ткани, поскольку опухолевые клетки имеют на своей поверхности асиалогликопротеиновые рецепторы. Однако, несмотря на ряд несомненных преимуществ, АГ крайне редко используют для создания систем адресной доставки лекарственных препаратов, что можно объяснить одним его важным недостатком. АГ является лигандом для асиалогликопротеиновых рецепторов, которые в большом количестве располагаются на мембранах гепатоцитов [280] и поэтому, несмотря на наличие этих рецепторов на лимфоцитах, опухолевых и других клетках, основное количество конъюгатов лекарственных препаратов с АГ связывается печенью и там метаболизируется, не доходя до опухолевой ткани.

Для снижения связывания механокомпозитов лекарственных препаратов на основе АГ с печенью необходимо замаскировать углеводные концы конъюгатов, т.е. модифицировать поверхность композитов молекулами, адресно связывающимися с белками опухолевых клеток, что позволит скрыть углеводные концы АГ. В качестве таких маскирующих функциональных молекул могут быть использованы антитела, пептиды, фолиевая кислота, аптамеры и др. молекулы. К настоящему времени разработано множество подходов к адресной доставке лекарств, некоторые из которых уже используются в качестве лекарственных препаратов для терапии рака, в частности, средство на основе антитела — muromonab-CD3. На настоящий момент наиболее популярными средствами адресной доставки являются антитела. Однако в связи с тем, что использование антител в качестве лигандов для адресной доставки имеет ряд ограничений, вызванных их большими размерами, высокой себестоимостью, значительной вариабельностью между партиями, большой иммуногенностью, низкой термической стабильностью и трудностями в проведении их химических

модификаций [281], стал актуален поиск новых кандидатов в качестве узнающих лигандов для адресной доставки.

Одними из таких кандидатов стали аптамеры, представляющие собой искусственные олигонуклеотиды, получаемые с помощью технологии систематической эволюции лигандов путем экспоненциального обогащения (SELEX). Их специфичность по отношению к своей мишени сравнима или превосходит антитела. Кроме того, аптамеры обладают дополнительными преимуществами – имеют малый размер, небольшую себестоимость, низкую иммуногенность, высокую химическую стабильность, отсутствие токсичности, они быстро проникают в ткани, их легко химически модифицировать. Из-за этих преимуществ аптамеры привлекли огромное внимание в областях биозамещения, визуализации и доставки лекарств [282]. В качестве лигандов для адресной доставки стали использовать высокоаффинные аптамеры, полученные к белковым молекулам, включая цитокины, протеазы, киназы, рецепторы клеточной поверхности, молекулы клеточной адгезии др.

В работе *in vitro* и *in vivo* оценивалась противоопухолевая активность механокомпозита ЦФА с АГ, функционализированного аптамерами к асцитным клеткам карциномы Эрлиха. Аптамеры к асцитным клеткам карциномы Эрлиха были получены с помощью технологии SELEX. В качестве лиганда для адресной доставки был взят аптамер As42 [256], мишенью для которого является белок виментин.

Механокомпозит ЦФА с АГ, полученный с помощью механообработки, обладал хорошей растворимостью в воде. ИК и ЯМР ^{31}P и ^{13}C спектры показали, что при длительной механообработке химических превращений циклофосфамида не происходило [283]. При механохимической обработке смеси ЦФА с АГ химического взаимодействия между этими компонентами не наблюдалось, но происходило разупорядочение кристаллической структуры ЦФА и его молекулярное

диспергирование в матрице АГ. Связывание аптамеров с АГ проводили путем пассивной адгезии, в результате которой формировались прочные водородные связи между ОН-группами моносахаридов и фосфатными группами в нуклеотидах [284].

Исследование биологической активности несвязанного ЦФА и механокомпозитов ЦФА с АГ *in vitro* проводили на клеточных культурах асцитных клеток карциномы Эрлиха. Результаты исследования показали, что оба препарата обладают противоопухолевой активностью, однако у механокомпозита противоопухолевая эффективность в отношении опухолевых клеток была выражена выше. Инкубация асцитных клеток с ЦФА в дозе 5 мкг/мл течение 24 часов приводила к гибели 70% асцитных клеток в клеточной культуре, в то время как под влиянием механокомпозита АГ и ЦФА в дозе 5 мкг/мл все асцитные клетки погибали (Рис.72). Исходя из того, что в составе механокомпозита доля ЦФА составляет только 10% (ЦФА:АГ = 1:10), очевидно, что эффективность механокомпозита ЦФА с АГ была на порядок выше по сравнению с несвязанным ЦФА. Таким образом, использование механокомпозита ЦФА с АГ позволяло снизить терапевтическую дозу ЦФА за счет увеличения его противоопухолевой эффективности. Можно предположить, что такой эффект ЦФА был связан с механизмом его действия.

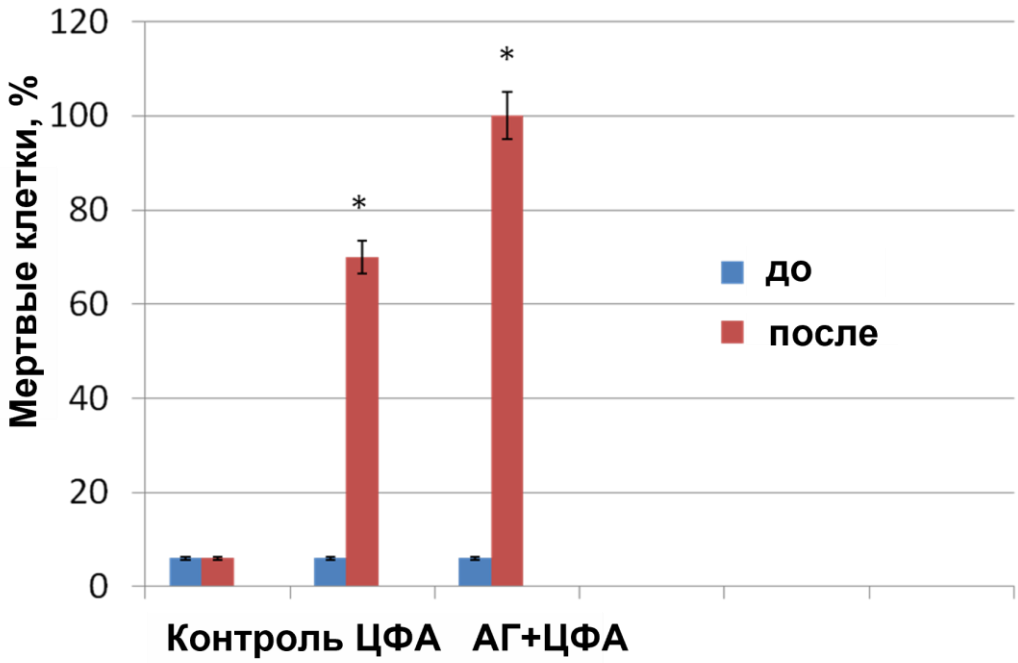


Рисунок 72 – Влияние ЦФА и механокомпозита ЦФА с АГ на выживаемость асцитных клеток карциномы Эрлиха. Контроль (n=5), ЦФА (n=5) , АГ+ЦФА (n=5). * P<0,01.

ЦФА является неактивной транспортной формой противоопухолевого препарата. В клетках опухоли, где наблюдается высокая активность фосфатаз, он распадается с образованием активных компонентов, воздействующих на нуклеофильные центры белковых молекул. Активное производное ЦФА в клетке нарушает синтез ДНК и РНК, блокирует митоз и вызывает необратимое повреждение клеток. Поскольку противоопухолевый эффект ЦФА реализуется внутри клетки, следовательно, увеличение эффективности противоопухолевого эффекта механокомпозита, скорее всего, связано с ускорением его транспорта через клеточную мембрану. Опухолевые клетки экспрессируют асиалогликопротеиновые рецепторы, лигандом для которых являются углеводы. АГ, воздействуя на асиалогликопротеиновые рецепторы, способствует индукции процессов эндоцитоза, увеличивая транспорт ЦФА в клетку. Из этого следует, что ЦФА в составе механокомпозита с АГ входит в клетки эффективнее, чем

гидрофильный ЦФА, быстрее распадается на активные компоненты с помощью внутриклеточных фосфатаз и повреждает внутриклеточные белки, способствуя гибели опухолевых клеток.

Для определения механизма гибели опухолевых клеток в условиях воздействия механокомпозита ЦФА с АГ изучали параметры клеток, однозначно свидетельствующие о пути гибели клеток. В частности, хорошо известно, что некроз характеризуется клеточным набуханием и увеличением содержания в клетках катионов натрия, что является важным признаком некроза. При апоптозе в клетках увеличивается содержание катионов калия. Изучение уровня катионов натрия в опухолевых клетках при воздействии механокомпозита ЦФА-АГ показало, что в большинстве опухолевых клетках произошло значительное увеличение содержания катионов натрия (Рис.73). Вместе с тем, в популяции асцитных клеток появилась также группа клеток с повышенным содержанием катионов калия, что предполагает индукцию в этих клетках процесса апоптоза. Таким образом, исходя из полученных результатов, можно предположить, что механокомпозиты ЦФА-АГ способствуют в основном некротическим изменениям в опухолевых клетках.

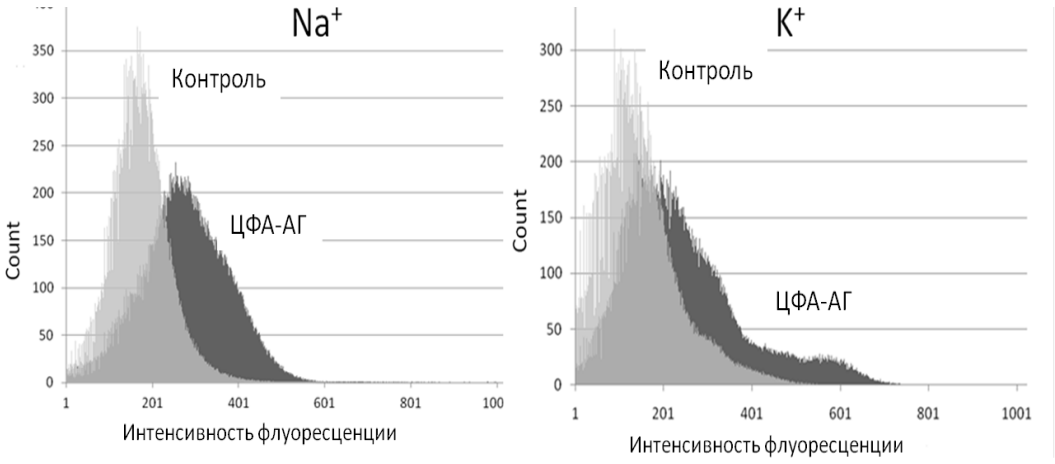


Рисунок 73 – Изменение концентрации натрия и калия в асцитных клетках карциномы Эрлиха под влиянием комплекса ЦФА-АГ.

Для изучения противоопухолевой активности механокомпозита ЦФА с АГ *in vivo* использовали солидную модель перевиваемой асцитной карциномы Эрлиха, которую получали путем трансплантации 5 млн. асцитных клеток в бедро мыши. Терапию начинали на 5-ые сутки после трансплантации опухолевых клеток. Рост опухоли определяли по увеличению объема бедра, в которое трансплантировали опухоль. Исследования показали, что объемы опухолей у мышей в течение 7 дней от начала трансплантации опухолевых клеток во всех группах увеличивались примерно одинаково (Рис.74). Однако уже на 9-ый день скорость роста опухоли у мышей, которым проводили терапию ЦФА, стала ниже, чем у мышей других групп, в результате чего к 18 суткам объем бедра у мышей этой группы был меньше на 27% ($P<0.01$).

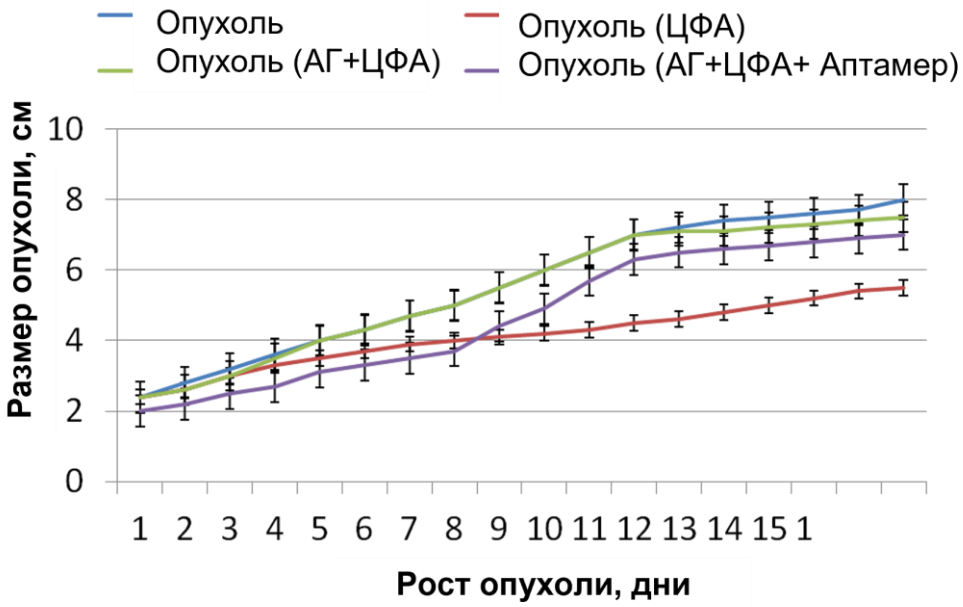


Рисунок 74 – Увеличение объема опухоли у мышей в процессе ее роста и проводимой противоопухолевой терапии ЦФА, механокомпозитами (ЦФА-АГ) и механокомпозитами, функционализированными аптамерами к асцитным клеткам (ЦФА-АГ-AS42).

Гистологическое исследование показали, что все противоопухолевые препараты на основе ЦФА проявляли цитотоксический эффект, несмотря на то, что в коньюгатах с АГ действующего вещества – ЦФА было всего 10%. При лечении ЦФА-АГ и ЦФА-АГ-AS42 в тканях опухоли наблюдались обширные некрозы (Рис.75). Опухоль у животных без лечения характеризовалась инвазивным ростом, который распространялся между мышечными волокнами в виде широких полей. При терапии ЦФА и его производными наблюдались некоторые особенности (Рис.76). В частности, при терапии ЦФА в опухоли видны очаги некроза с умеренно выраженной перифокальной воспалительной реакцией. При терапии ЦФА-АГ виден обширный очаг некроза опухолевой ткани с воспалительной клеточной инфильтрацией. На срезах опухолевой ткани при терапии комплексом ЦФА-АГ-AS42 видна большая часть площади опухоли в состоянии некроза с отчетливым перифокальным воспалением и явлениями выраженного лизиса погибших тканей. Жизнеспособные опухолевые клетки сохранены в виде небольших «островков». Следует отметить, что объем опухоли у мышей после терапии ЦФА был достоверно меньше, чем при терапии его коньюгатом с арабиногалактаном (ЦФА-АГ) и аптамером ЦФА-АГ-AS42, что, видимо, связано с большим объемом инфильтрата в опухоли мышей, которым проводили терапию производными ЦФА.

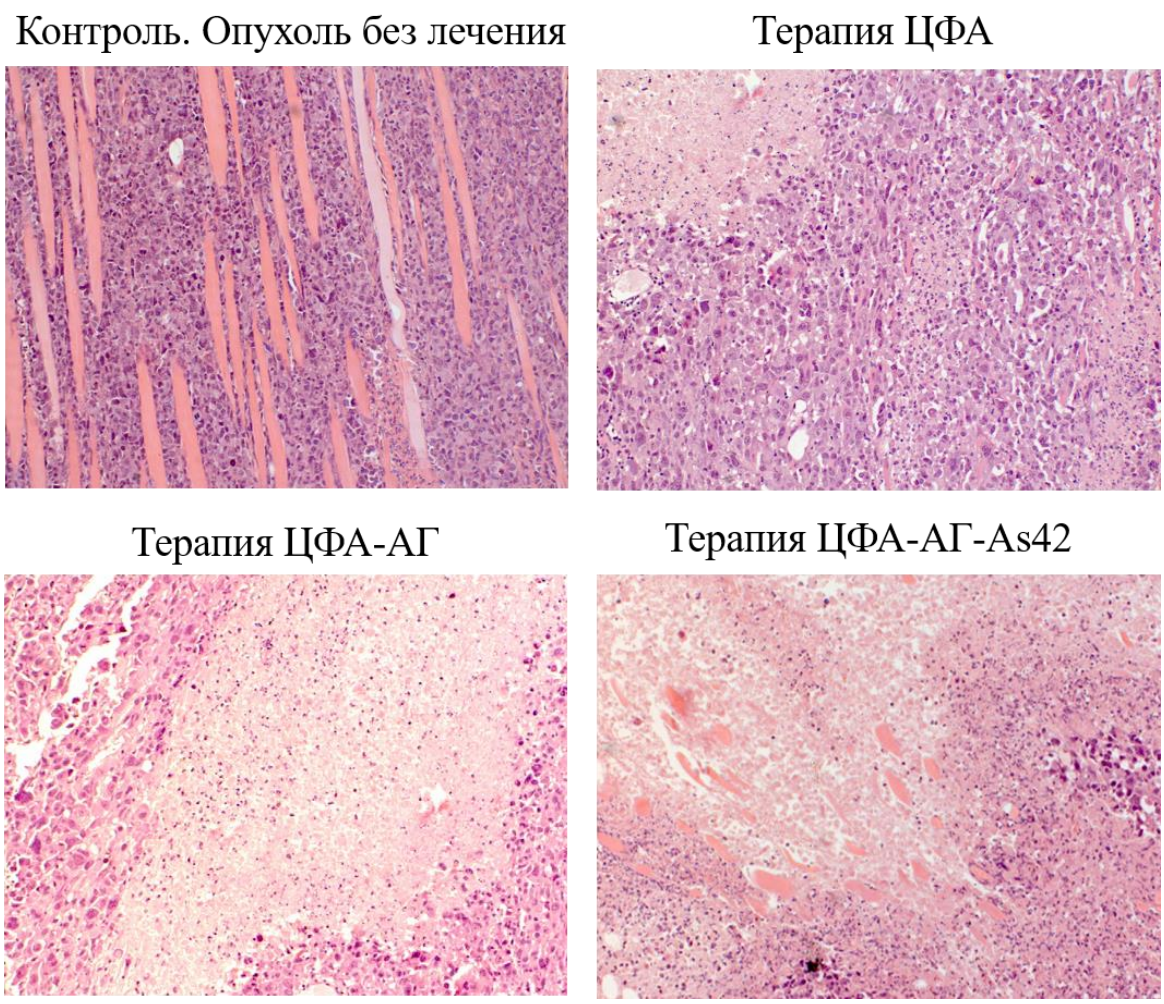


Рисунок 75 – Общий вид гистологических срезов опухоли у мышей без лечения и при терапии ЦФА, механокомпозитами (ЦФА-АГ) и механокомпозитами, функционализированными аптамерами к асцитным клеткам (ЦФА-АГ-AS42).

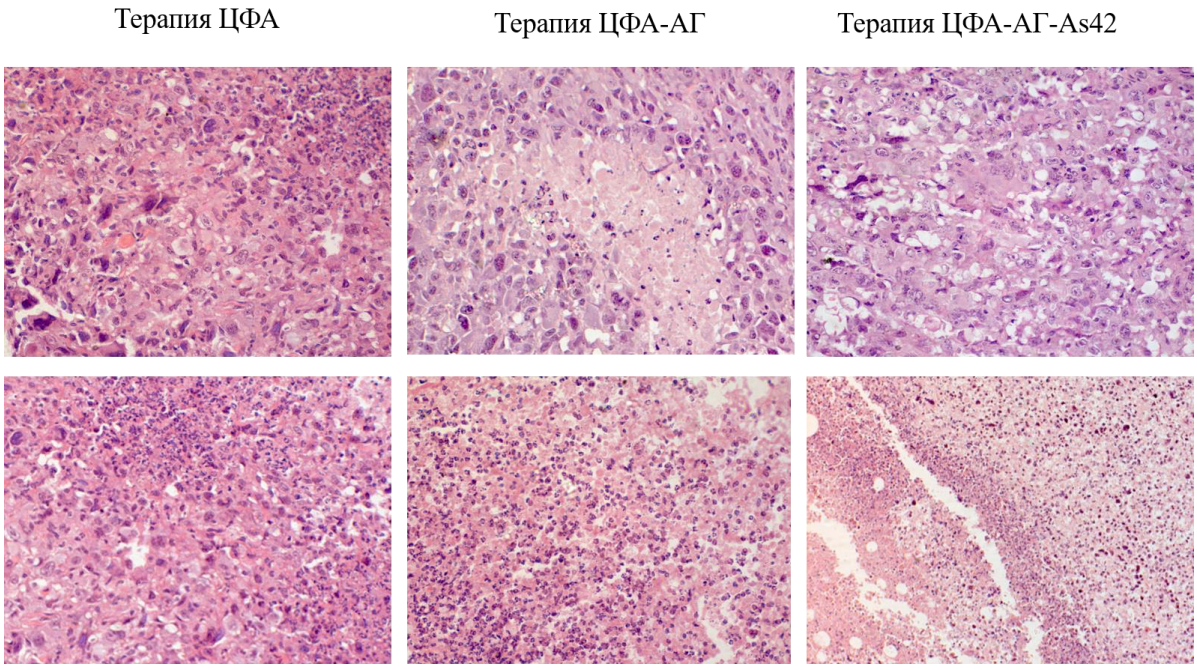


Рисунок 76 – Особенности опухолей мышей при терапии противоопухолевыми препаратами разных композиций циклофосфомида. При лечении композитами ЦФА видны обширные участки некроза и воспаления. В инфильтратах повышено содержание сегментоядерных лейкоцитов и лимфоцитов.

Наибольшей информативностью в отношении противоопухолевой активности препаратов является кривая выживаемости мышей при терапии этими препаратами (Рис.77). Исследования показали, что мыши, которым не проводили противоопухолевую терапию, начинали погибать уже на 13 день после трансплантации опухоли. Максимальная продолжительность жизни мышей без лечения составила 20 суток. Стандартная терапия ЦФА увеличила максимальную продолжительность жизни мышей до 29 суток. Терапия мышей с асцитной карциномой Эрлиха механокомпозитом АГ с ЦФА способствовала увеличению максимальной продолжительности их жизни более чем в 2 раза по сравнению с терапией несвязанной ЦФА и составила 59 дней. Функционализация механокомпозитов аптамерами обеспечила максимальное увеличение продолжительности жизни мышей-

опухоленосителей и составила 73 дня, что оказалось в 3,5 раза больше, чем у мышей без терапии; в 2,5 больше, чем при лечении ЦФА; в 1,2 раза больше, чем при лечении нефункционализированным механокомпозитом.

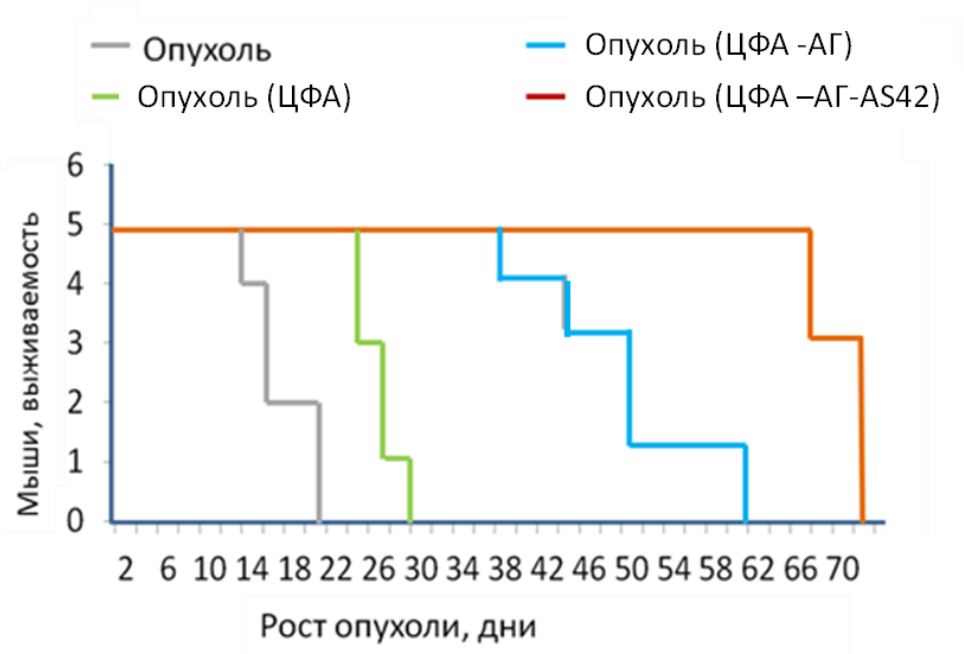


Рисунок 77 – Кривая смерности мышей при терапии ЦФА, механокомпозитами (ЦФА-АГ) и механокомпозитами, функционализированными аптамерами к асцитным клеткам (ЦФА-АГ-AS42).

С помощью механической обработки ЦФА с АГ были получены механокомпозиты с соотношением ЦФА:АГ = 1:10, которые были функционализированы аптамерами к асцитным клеткам AS42. Механическая обработка АГ с ЦФА не изменяла химическую структуру ЦФА и не приводила к образованию с АГ химической связи, но при этом увеличивала противоопухолевую активность ЦФА *in vitro* и *in vivo*. Несмотря на то, что доза ЦФА, которая вводилась в клеточную культуру *in vitro* и мышам в качестве противоопухолевой терапии в составе механокомпозита была в 10 раз ниже, его противоопухолевая активность в целом была выше. При этом, как было показано, механокомпозиты не обладали токсическим эффектом и увеличивали продолжительность жизни мышей-опухоленосителей в 3,5 раза.

ЦФА является очень эффективным противоопухолевым средством, однако он не обладает специфичностью по отношению только к опухолевым клеткам и распределяется во всех биологических жидкостях и тканях организма равномерно. Примерно 12-14% препарата связывается с белками плазмы крови, большое количество препарата накапливается в селезенке, почках, печени и других органах и тканях. Около 20% от общего ЦФА выделяется из организма в неизменённом виде, что свидетельствует о том, что 5-ая часть ЦФА введённого препарата не оказывает терапевтического эффекта, поскольку противоопухолевым эффектом обладают только метаболиты ЦФА.

В опухолевых клетках ЦФА метаболизируется, превращаясь в акролеин и активный метаболит фосфамид иприт (Рис.78). Акролеин способствует образованию активных форм кислорода, приводя к апоптозу, а фосфамид иприт алкилирует белки и нуклеиновые кислоты, вызывая сшивки ДНК и РНК и способствуя остановке клеточного цикла в фазах G1 и S, апоптозу и некрозу [285-287].

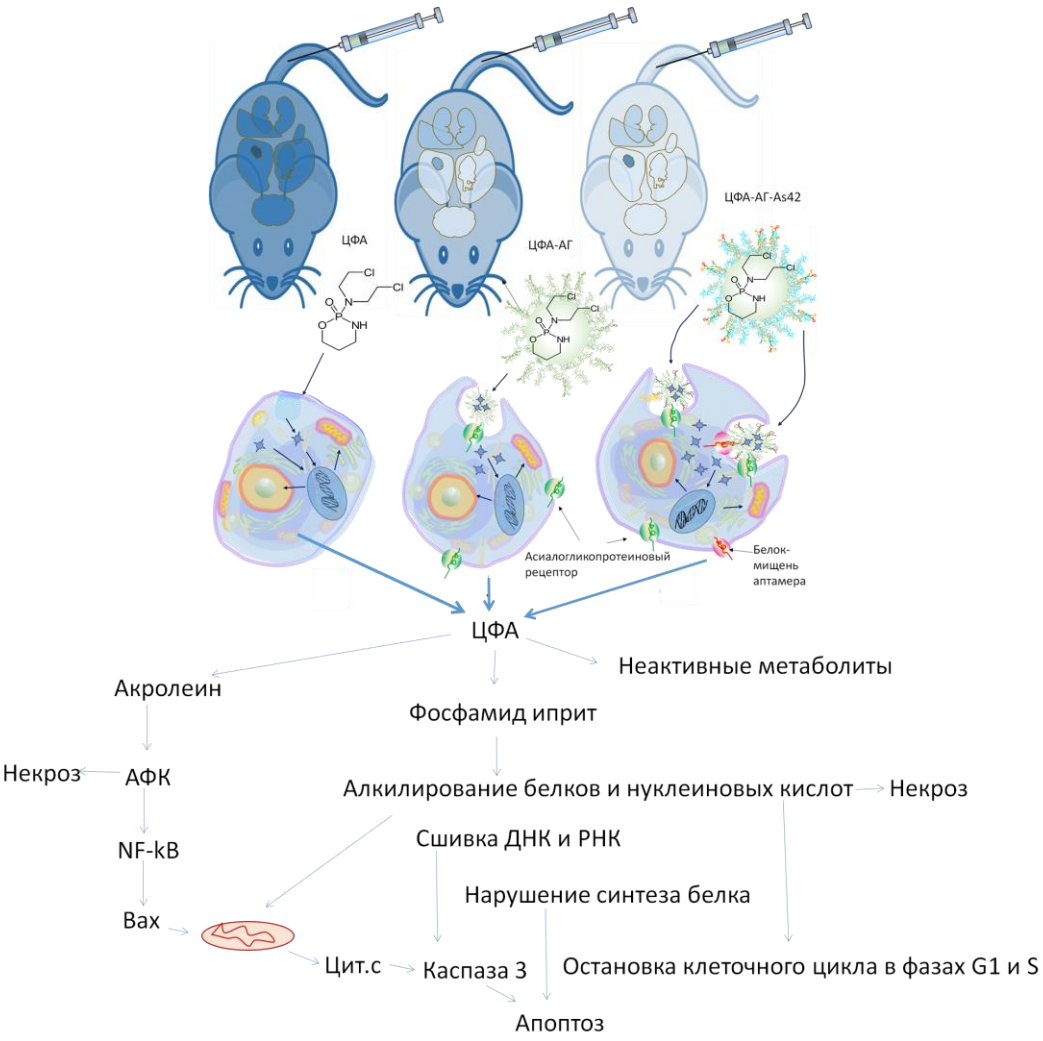


Рисунок 78 – Механизм действия ЦФА и его производных.

Такие множественные эффекты ЦФА оказывает не только на опухолевые клетки, но и на здоровые, что объясняет его значительный токсический эффект, поэтому адресная доставка этого препарата в опухолевые клетки является крайне актуальной для увеличения его противоопухолевого эффекта и снижения токсичности. Для повышения эффективности ЦФА необходимо использовать направленные на опухоль наноносители, в том числе аптамеры. Аптамеры представляют собой ДНК- или РНК-олигонуклеотиды, высокоспецифичные и высокоаффинные к своим мишеням. Аптамеры могут быть модифицированы и конъюгированы с

различными молекулами (например, NP, siRNA, агентами визуализации и терапевтическими препаратами), что делает их перспективными средствами для таргетной терапии рака. Аптамеры относительно новы для медицинских применений, однако их методы скрининга таковы, что в ближайшем будущем они могут быть получены для любой индивидуальной опухоли, что важно для развития персонализированной медицины [288].

Таким образом, наше исследование показало, что использование аптамеров для адресной доставки ЦФА в опухоль является перспективной стратегией для противоопухолевой терапии. Аптамеры AS42 доставляли ЦФА к опухолевым клеткам, что снижало его накопление в здоровых тканях. Арабиногалактан, связываясь с асиалогликопротеиновыми рецепторами, индуцировал поглощение конъюгатов ЦФА-АГ опухолевыми клетками путем эндоцитоза, снижая его содержание в межклеточном пространстве.

3.6 Биобезопасность бионаноматериалов на основе ДНК-аптамеров для адресной противоопухолевой терапии

Необходимым условием применения средств терапии социально-значимых заболеваний, в том числе онкологических является их биобезопасность, что особенно значимо при их длительном приеме. Изучение биологической активности лекарственных препаратов и биологически активных веществ на первом этапе всегда предполагает оценку их токсичности. Для наноматериалов, которые будут служить средств терапии в обязательном порядке должна быть оценена их токсичность, поскольку, несмотря на то, что зачастую эти материалы (наночастицы золота, суперпарамагнитные наночастицы) являются биосовместимыми и условно нетоксичными, существует проблема их выведения, так как они способны накапливаться в организме.

В научной литературе однозначного ответа на вопрос о токсичности наноматериалов (магнитных и золотых наночастиц) не существует. Есть данные о том, что аптамеры увеличивают биосовместимость магнитных наночастиц и снижаю их токсичность [190]. Биораспределение и различные благоприятные и негативные эффекты, оказываемые на организм для разных типов конъюгатов, отличаются. Известно, что на токсичность влияют материал, размер, форма, поверхностный заряд, функционализация поверхности и др. [289-291].

Традиционно для оценки токсичности используют экспериментальных животных. Материалом для оценки токсичности препаратов служит плазма, содержащая все метаболиты, изменение содержания которых может отражать патологические процессы, развивающиеся в организме под влиянием ксенобиотиков, в том числе, золотых и суперпарамагнитных наночастиц, магнитных микродисков и конъюгатов аптамеров с противоопухолевыми препаратами.

Оценку токсичности проводили по содержанию холестерина, общего белка и билирубина и активности аланинаминотрансферазы и щелочной фосфатазы. Эти метаболиты и ферменты были выбраны потому, что они характеризуют функцию печени, поскольку именно печень играет основную роль в обезвреживании ксенобиотиков, и, кроме того, печень вляется местом синтеза важных для организма соединений.

Холестерин – липид, имеющий ключевое значение для нормального функционирования организма, 80% которого образуется в печени. Холестерина регулирует проницаемость клеточных мембран, является предшественником стероидных гормонов, кальциферола и желчных кислот, синтез стероидных гормонов, желчных кислот, участвует в метаболизме жирорастворимых витаминов. При снижении синтеза холестерина может развиваться угнетение любого из этих процессов.

Общий белок плазмы, основная масса которого состоит из альбумина, синтезирующегося в печени, характеризует обмен белков в организме в целом. Альбумины плазмы участвуют в поддержании осмотического давления, обеспечивают питательную и транспортную функции и др. Отклонение уровня общего белка от нормы может быть вызвано рядом физиологических состояний (не патологического характера) или являться симптомом различных заболеваний. К заболеваниям, связанным с уменьшением количества альбуминов крови, относятся некоторые нарушения в работе печени (снижение синтеза белка в ней), почек (потеря альбуминов с мочой в результате нарушения механизма фильтрации крови в почках), определенные эндокринные расстройства (нарушения гормональной регуляции белкового обмена).

Билирубин – желчный пигмент, образуется в результате расщепления белков, содержащих гем (гемоглобин, миоглобин, цитохром). Распад происходит в клетках ретикуломакрофагальной системы костного мозга, селезенки, лимфатических узлов и печени, откуда конечные продукты попадают в жёлчь и выводятся из организма. Повышение содержания билирубина может свидетельствовать как об избыточном разрушении эритроцитов (гемолитическая желтуха и пр.), так и о нарушенном выведении билирубина из организма.

Щелочная фосфатаза – группа ферментов, содержащихся практически во всех тканях организма, с преимущественной локализацией в печени, костях и плаценте. Фосфатазы в клетках участвуют в реакциях отщепления остатка фосфорной кислоты от ее органических соединений. Активность общей щелочной фосфатазы повышается при целом ряде заболеваний, сопровождающихся повреждением ткани печени, костей, почек и других органов.

Аланинаминотрансфераза (АЛТ) – фермент из группы трансфераз, подгруппы аминотрансфераз (трансаминаз), широко используемый в

медицинской практике для лабораторной диагностики повреждений печени. Аланинаминотрансфераза синтезируется в цитозоле, в норме небольшое его количество попадает в кровь. При повреждении в результате цитолиза (разрушения клеток) этот фермент попадает в кровь. Повышение активности АЛТ может быть вызвано действием ксенобиотиков, вследствие токсического влияния на печень.

3.6.1 Биобезопасность золотых наночастиц, функционализированных аффинными и специфичными к асцитным клеткам карциномы Эрлиха ДНК-аптамерами

Гепатотоксичность AuНЧ-AS42 контролировали путем измерения стандартных биохимических параметров сыворотки крови, таких как холестерин, сывороточная аланин-аминотрансфераза (АЛТ), щелочная фосфатаза (ЩФ) и билирубин (Табл.4). АЛТ участвует в энергетическом метаболизме в печени, общий билирубин является маркером гепатобилиарного поражения и гемолиза, а ЩФ указывает на повреждение гепатоцитов.

Для определения токсичности золотых наночастиц были использованы здоровые самцы и самки мышей, которым через день было проведено три процедуры обработки AuНЧ-AS42. Результаты исследований не выявили значительных изменений биохимических показателей крови по сравнению с контрольной группой, получавшей фосфатный буфер, и не зависело от пола. Состояние воспаления и гидратации после обработки наночастицами оценивали по концентрации общего белка (Табл.4). Все протестированные параметры показали, что лечение AuНЧ-AS42 безопасно и не вызывает нежелательных гепатотоксических эффектов.

Таблица 4. Биохимические показатели сыворотки крови мышей (самки и самцы) при терапии золотыми наночастицами, функционализированными аптамером AS42.

Образцы	Холестерол, мМ	Общий белок, г/л	АЛТ, отн.ед./л	ЩФ, отн.ед./л	Общий билирубин, мкМ
AuНЧ-AS42					
Самцы (n=4)	1,70±0,01	49,75±3,32	22,40±3,67	299,50±84,81	5,90±0,38
Самцы (n=5)	1,76±0,48	48,97±6,21	22,90±13,17	280,87±32,29	5,95±0,21
Фосфатный буфер					
Самцы (n=5)	2,30±0,2	55,70±2,27	17,45±4,78	202,87±27,13	6,27±0,60
Самцы (n=5)	2,32±0,26	53,80±1,76	18,93±6,9	205,30±71,13	6,17±0,59

3.6.2 Биобезопасность функционализированных ДНК-аптамерами покрытых золотом суперпарамагнитных наночастиц

Для определения токсичности магнитных наночастиц исследовали изменения холестерина, сывороточной аланин-аминотрансферазы (АЛТ), щелочной фосфатазы (ЩФ) и билирубина – стандартных параметров гепатотоксичности лекарств. Оценка гепатотоксичности проводилась на здоровых масках и самцах мышей, которым в течение недели проводили 3 инъекции МНЧ-AS14. Исследования показали, что конъюгаты магнитных наночастиц, покрытых золотом, с аптамерами не вызывают изменений этих стандартных параметров (Табл.5). Все протестированные параметры показали, что МНЧ-AS14 безопасны и не вызывают гепатотоксичности.

Таблица 5. Биохимические параметры сыворотки крови мышей (самки и самцы) при введении им магнитных наночастиц, покрытых золотом, с аптамерами (МНЧ-AS14).

Образцы	Холестерол, мМ	Общий белок, г/л	АЛТ, отн.ед./л	ЩФ, отн.ед./л	Общий билиру-бин, мкМ
МНЧ-AS14					
Самцы (n=5)	1,45±0,01	50,75±3,32	18,40±3,67	214,50±74,81	5,47±0,38
Самцы (n=5)	1,56±0,48	53,97±6,21	31,90±13,17	254,87±22,29	6,05±0,21
Фосфатный буфер					
Самцы (n=5)	2,90±0,2	53,90±1,27	13,45±4,78	177,67±27,13	6,25±0,70
Самцы (n=5)	2,32±0,26	55,90±2,76	20,93±6,9	251,40±71,13	6,20±0,53

3.6.3 Биобезопасность функционализированных ДНК-аптамерами трехслойных магнитных микродисков

Для оценки токсичности магнитных микродисков и золотых наночастиц нами было использован 3 группы мышей (по 9-10 животных в каждой группе). В первую группу входили особи, которым вводили конъюгаты наночастиц золота с аптамерами, вторая группа получала инъекции связанных с аптамерами магнитных микродисков. 3-я группа выступала в качестве контрольной, животным из этой группы вводили физиологический раствор.

Результаты влияния конъюгатов магнитных микродисков и золотых наночастиц с аптамерами на уровень билирубина, холестерина, общего белка, активность аланинаминотрансферазы и щелочной фосфатазы в плазме крови представлены в табл.6.

Таблица 6. Биохимические параметры сыворотки крови мышей (самки и самцы) при введении им магнитных трехслойных никелевых микродисков, покрытых золотом (Au/Ni/Au), функционализированных аптамерами AS14.

Образцы	Холесте-рол, мМ	Общий белок, г/л	АЛТ, отн.ед./л	ЩФ, отн.ед./л	Общий билиру-бин, мкМ
Au/Ni/Au-AS14					
Самцы (n=4)	1,5±0,02	54,7±3,2	26,40±3,70	240,70±65,91	5,8±0,5
Самцы (n=5)	1, 6±0,08	54,0±6,6	27,90±10,2	239,75±20,63	5,9±0,5
Фосфатный буфер					
Самцы (n=5)	2,90±0,2	53,90±1,27	13,455±4,78	177,67±27,13	6,25±0,70
Самцы (n=5)	2,32±0,26	55,90±2,76	20,93±6,9	251,40±71,13	6,20±0,53

Результаты исследования показали, что уровень холестерина, билирубина, общего белка и активность щелочной фосфатазы и аланинаминотрансферазы в группах особей, получавших инъекции комплексов магнитных трехслойных никелевых микродисков, покрытых золотом (Au/Ni/Au), функционализированных аптамерами AS14, практически не изменился, что свидетельствует о потенциальной безопасности их использования в качестве наноскальпеля во время оперативного вмешательства.

Таким образом, исследования показали, что магнитные микродиски, использовавшиеся нами для противоопухолевой терапии, не оказывают заметного токсического воздействия на организм, поскольку основные показатели функционального состояния печени (холестерин, общий белок и билирубин) в условиях воздействия магнитных микродисков соответствовали норме. Следовательно, можно заключить, что конъюгаты никелевых магнитных микродисков, покрытых золотом не вызывают патологических нарушений функционирования печени.

3.6.4 Биобезопасность цисплатина и его конъюгатов с арабиногалактаном и ДНК-аптамерами

Токсичность препаратов цисплатина и его конъюгатов с арабиногалактаном, оценивали в течение 2-х недель на здоровых мышах. После четырех инъекций чистого цисплатина 2 мыши погибло. В остальных группах гибели мышей не наблюдалось. Значения основных стандартных биохимических показателей плазмы крови представлены на рис. 79,80.

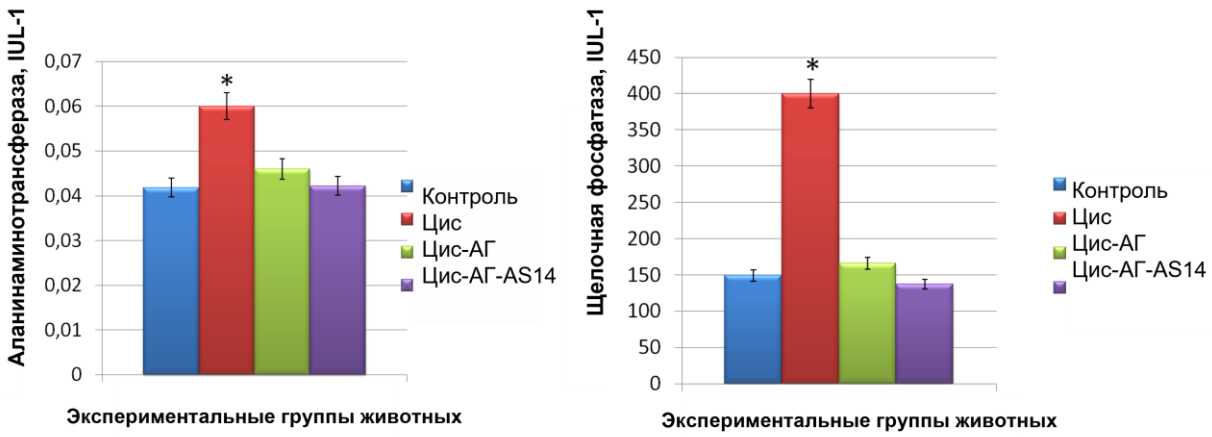


Рисунок 79 – Влияние цисплатина и его конъюгатов с арабиногалактаном на активность ферментов аланинаминотрасферазы и щелочной фосфатазы в крови мышей. Примечание: * P<0,01

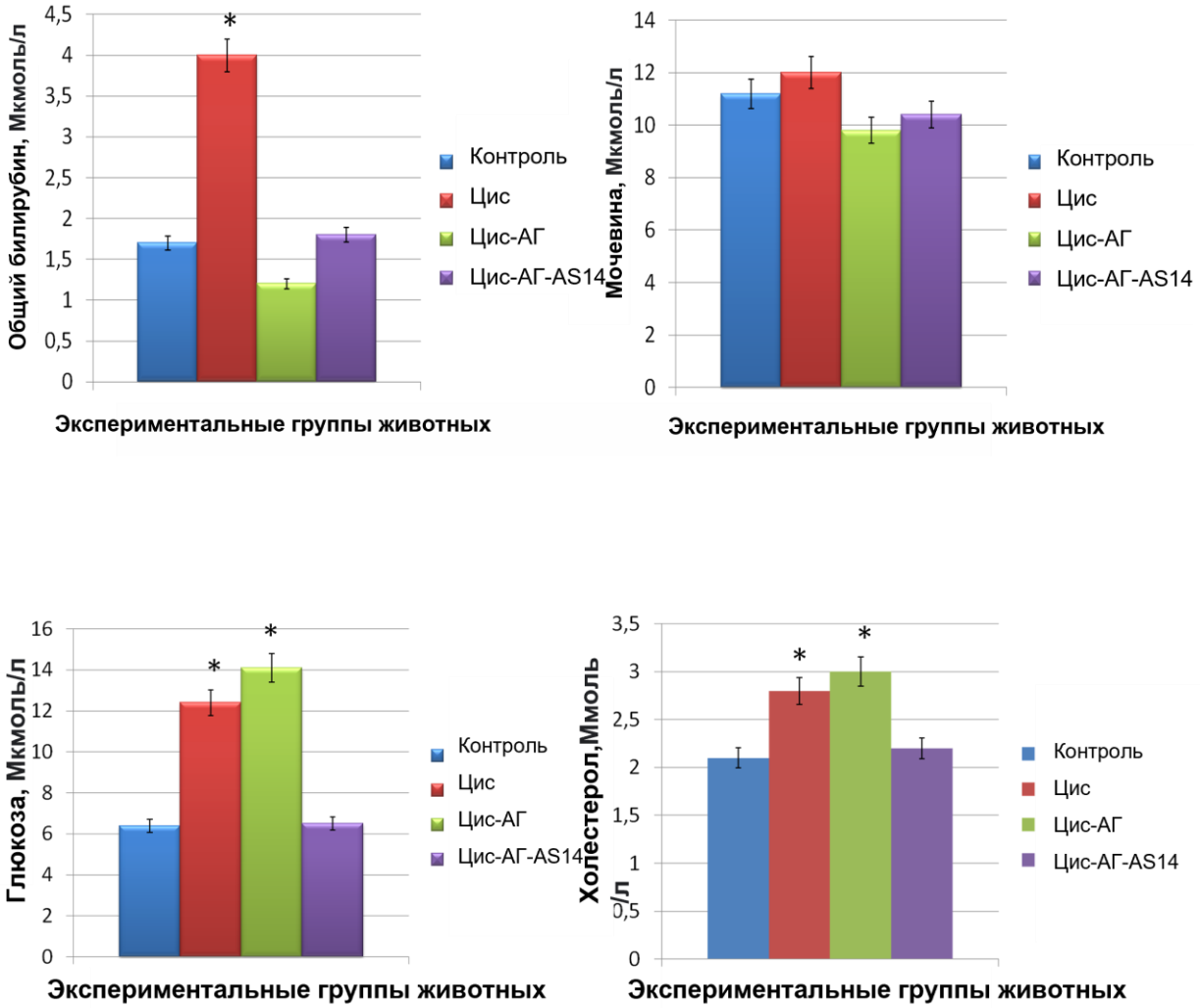


Рисунок 80 – Влияние цисплатина и его конъюгатов с арабиногалактаном на содержание в плазме крови у мышей билирубина, мочевины, глюкозы и холестерола. Примечание: * P<0, 01.

Исследования показали, что цисплатин значительно увеличивал содержание общего билирубина, глюкозы и холестерола и повышал активность аланинаминотрансферазы и щелочной фосфаты в плазме крови, что свидетельствовало о его ярко выраженном токсическом эффекте. Конъюгаты цисплатина с арабиногалактаном и аптамерами не изменяли активность ферментов и содержание общего билирубина и мочевины. Однако содержание глюкозы и холестерола было таким же высоким, как и

при введении чистого цисплатина. По нашему мнению, это может быть вызвано тем, что арабиногалактан является лигандом для асиалогликопротеиновых рецепторов, количество которых в гепатоцитах очень велико, и поэтому его конъюгаты с цисплатином в большом количестве попадают в печень, где гидролизуются до гексоз, избыточное количество которых либо выходит в кровяное русло, либо окисляется до ацетил-КоА и используется в синтезе холестерола.

Важно отметить, что введение функционализированных конъюгатов цисплатина с арабиногалактаном аптамерами к асцитным клеткам не вызывало повышения содержания глюкозы и холестерола в плазме крови, что является еще одним подтверждением адресной доставки конъюгатов к асцитным клеткам.

Таким образом, исследования показали, что конъюгация цисплатина арабиногалактаном и его адресная доставка к опухолевым клеткам существенно снижает токсичность такого высокотоксичного препарата противоопухолевой терапии, как цисплатин.

3.6.5 Биобезопасность циклофосфамида и его конъюгатов с арабиногалактаном и ДНК-аптамерами

Токсичность циклофосфамида (ЦФА) и его производных определяли по содержанию лимфоцитов, нейтрофилов и моноцитов и некоторым биохимическим показателям крови – уровню общего билирубина и холестерина, активности ферментов щелочной фосфатазы и аланинаминотрансферазы (АЛТ). Для оценки токсичности использовали здоровых мышей-самцов, которые были разделены на 4 группы. Первая группа – контрольная, мышам второй группы внутривенно вводили ЦФА, мышам третьей группы вводили механокомпозиты ЦФА с АГ, мышам

четвертой группы – механокомпозиты ЦФА с АГ, функционализированные аптамерами. Препараты вводили через день в течение 10 дней.

Исследования показали, что после 5 инъекций ЦФА доля нейтрофилов и моноцитов в периферической крови мышей снижалась на 27%, содержание лимфоцитов также было ниже нормы. ЦФА в составе механокомпозитов практически не влиял на содержание нейтрофилов, моноцитов и лимфоцитов (Рис.81).

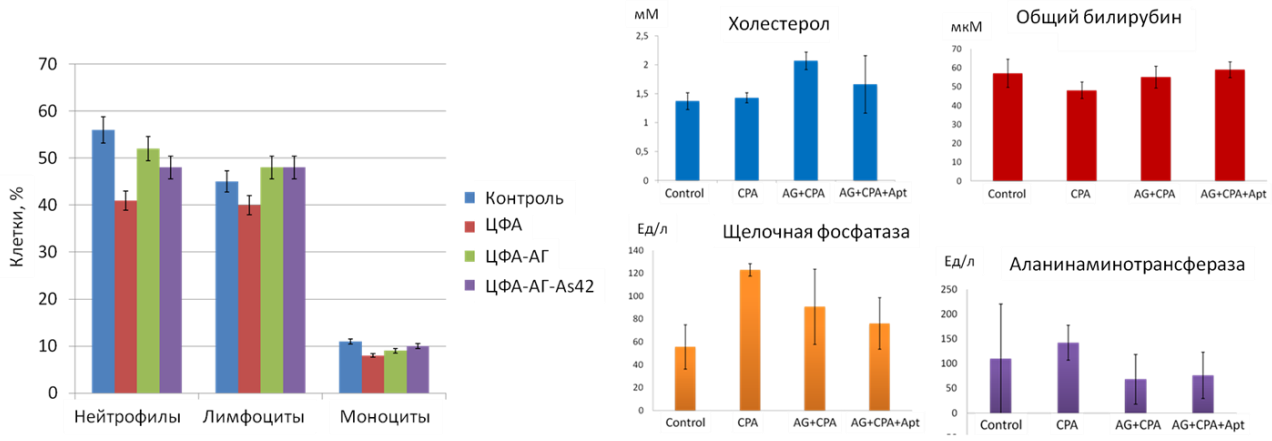


Рисунок 81 – Содержание нейтрофилов, лимфоцитов, моноцитов и некоторых биохимических показателей крови у мышей при терапии ЦФА, механокомпозитами (ЦФА-АГ) и механокомпозитами, функционализированными аптамерами к асцитным клеткам (ЦФА-АГ-As42).

5-ти кратное внутривенное введение ЦФА не изменяло на содержание холестерина и общего билирубина и активность АЛТ, однако увеличивало активность щелочной фосфатазы более чем в 2 раза (Рис.82). У мышей, которым вводился механокомпозит ЦФА с АГ, функционализированный аптамерами, содержание всех показателей было на уровне контроля, т.е. функционализированный аптамерами механокомпозит не обладал токсическим действием. Интересная особенность наблюдалась при введении нефункционализированного аптамерами механокомпозита ЦФА с АГ. Этот

механокомпозит не влиял на содержание общего билирубина и активность ферментов АЛТ и щелочной фосфатазы, однако увеличивал содержание холестерина в 1,5 раза. На первый взгляд такой характер ответа на введение механокомпозита может показаться необычным. Но, исходя из того, что арабиногалактан является лигандом для асиалогликопротеиновых рецепторов, расположенных на гепатоцитах, можно предположить, что большое количество конъюгатов АГ связываются с рецепторами и входят в клетку, где подвергаются гидролизу с образованием большого количества моносахаридов. Моносахариды в гепатоцитах используются для синтеза гликогена, часть транспортируется в кровь, а избыток моносахаридов окисляется до Ацетил-КоА. Ацетил-КоА является предшественником холестерина, синтез которого осуществляется в гепатоцитах. Таким образом, избыточное содержание углеводов в печени вследствие поглощения конъюгатов могло явиться причиной повышенного синтеза холестерина и увеличения его содержания у мышей после введения механокомпозитов ЦФА и АГ. У фукционализированного аптамерами механокомпозита углеводные концы АГ замаскированы аптамерами, что снижает связывание этого препарата с гепатоцитами.

3.6.6 Биобезопасность радиофармпрепарата $^{11}CH_3$-AS14

Исследование острой токсичности радиофармпрепарата на здоровых мышах показало нетоксичность этого препарата. При внутримышечном введении $^{11}CH_3$-AS14 неспецифически накапливается в разных органах. Его радиоактивность, измеренная с помощью калибратора доз, была обнаружена в органах мыши только через 20 мин после введения. Доза радиоактивности, накопленной в органе, была нормализована на 1 г ткани (Рис.82). Остаточной радиоактивности в мышце, куда была сделана инъекция, не обнаружено. Эти

данные подтверждают данные ПЭТ/СТ о быстром выведении радиофармпрепарата в течение 20 минут.

Токсичность $^{11}CH_3$-AS14 оценивали по изменению биохимических показателей крови: уровня общего белка и билирубина; активность аланинаминотрансферазы, щелочной фосфатазы и альфа-амилазы. Эти показатели были выбраны потому, что они отражают функции поджелудочной железы, почек и печени. Общие белки плазмы и альбумин описывают белковый обмен в организме и печени. Потеря альбумина с мочой указывает на проблему с фильтрацией крови в почках.

Исследования показали, что содержание общего белка в сыворотке мышей через 20, 40 и 24 часа введения радиофармпрепарата не отличалось от контрольных мышей (Рис.83). Билирубин – желчный пигмент, образующийся при расщеплении белков, содержащих гем (гемоглобин, миоглобин, цитохром). Повышение билирубина свидетельствует как о чрезмерном разрушении эритроцитов (гемолитическая желтуха и др.), Так и о нарушении выведения билирубина из организма. В этом эксперименте наблюдалось небольшое увеличение билирубина через 40 минут после инъекции, но это увеличение было статистически незначимым (Рис.82). Амилаза – это пищеварительный фермент, который преимущественно секретируется поджелудочной железой и слюнными железами и в минимальных количествах содержится в других тканях. Изменение активности амилазы может наблюдаться при отравлении, нарушении функции поджелудочной железы и слюнных желез, почечной недостаточности. Введение $^{11}CH_3$-AS14 не привело к значительному изменению активности амилазы (Рис.83). Щелочная фосфатаза относится к ферментам, обнаруженным почти во всех тканях организма, с преимущественной локализацией в печени, костях и плаценте. Активность общей щелочной фосфатазы увеличивается при повреждении тканей печени, костей и почек. В наших экспериментах активность щелочной фосфатазы была нормальной. Он показал, что все

органы, упомянутые выше, остались в безопасности после введения $^{11}CH_3$-AS14 (Рис.82). Аланинаминотрансфераза относится к подгруппе аминотрансфераз (трансаминаз). Он широко используется в медицинской практике для лабораторной диагностики поражения печени. Активность аланинаминотрансферазы существенно не изменилась после введения $^{11}CH_3$-AS-14 по сравнению с контролем (Рис.82).

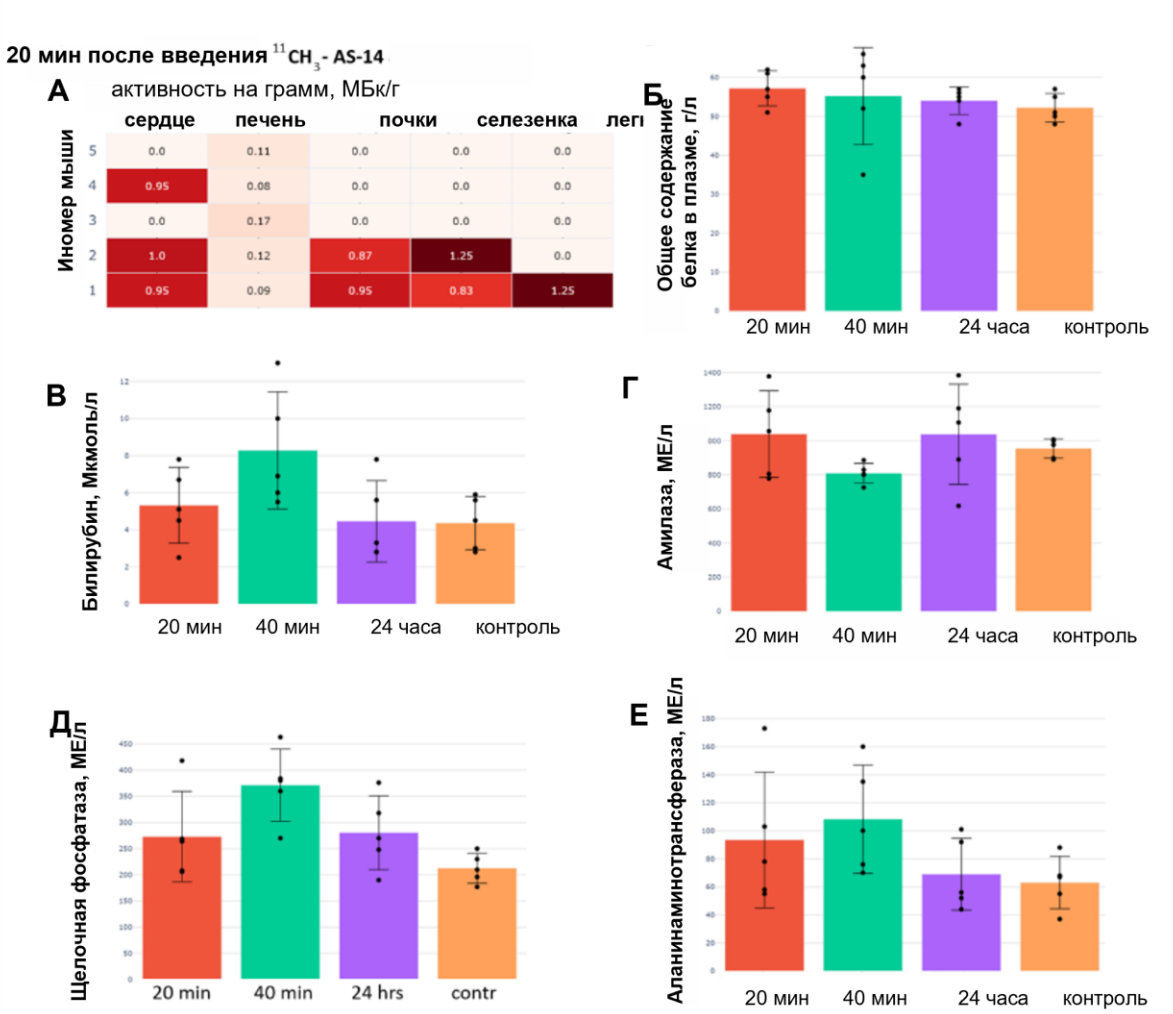


Рисунок 82 – Исследование острой токсичности $^{11}CH_3$-AS14. Накопление радиоактивности в различных органах мыши после 20 минут внутримышечного введения $^{11}CH_3$-AS-14 (А). Биохимические показатели сыворотки крови через 20, 40 мин и 24 ч внутримышечного введения $^{11}CH_3$-AS-14: уровни общего белка плазмы (В) и билирубина (С), активности амилазы (Д), щелочной фосфатазы (Е) и аланинаминотрансферазы (Ф).

Гистологический анализ соответствующих мышей не выявил различий между группами. В ткани печени гистологическая структура сохранилась (Рис.83). Портальные тракты без признаков склероза, с очаговой минимальной лимфоплазмоцитарной инфильтрацией, ограниченной стромой портального тракта, не доходящей до паренхимы. Признаков воспаления или склероза желчных протоков и холестаза не выявлено. Центральные вены содержали эритроциты или были пустыми, не расширенными.

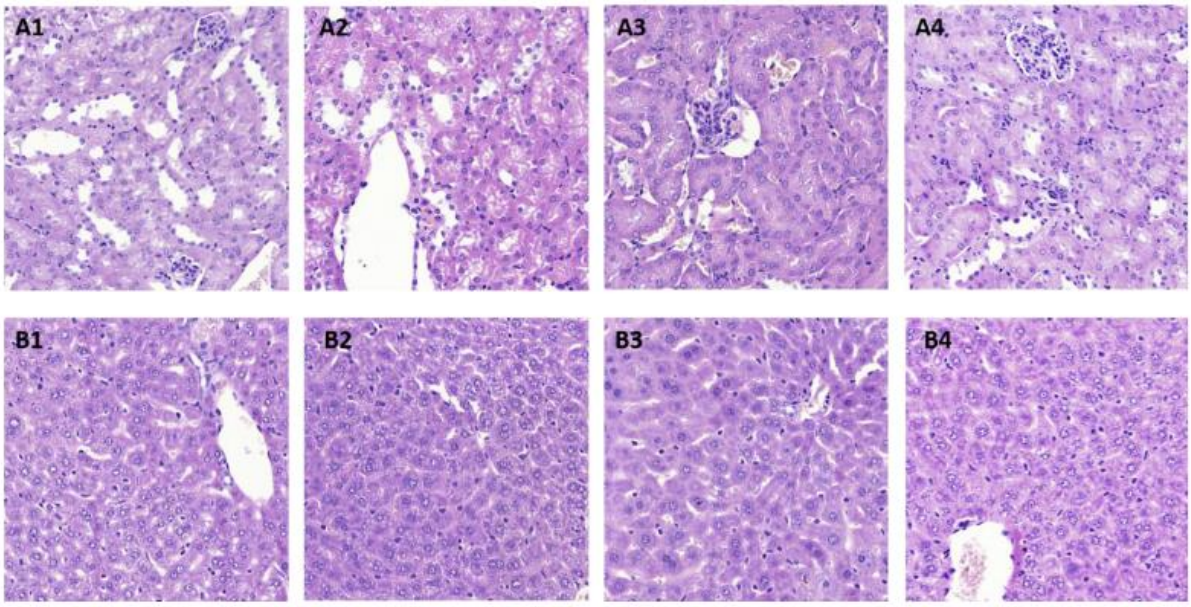


Рисунок 83 – Гистологические исследования почек и печени мышей после внутримышечного введения $^{11}CH_3$-AS14. Почки (A) и печень (B) через 20 (1), 40 (2) минут и 24 часа (3) по сравнению с контрольной группой, которой вводили DPBS (4).

В паренхиме долек печени в цитоплазме гепатоцитов диффузно определялись везикулы малых и средних размеров. Везикулы располагались преимущественно по периферии клетки, на базальной мембране, а иногда и в центре, ближе к ядру. В центре клеток располагались ядра гепатоцитов разного размера, с несколькими небольшими ядрышками. Дегенерации гепатоцитов не обнаружено. Одиночные разбросанные гепатоциты

находились в состоянии апоптоза или некроза. Количество клеток Купфера не увеличивалось. Та же гистологическая картина была повторена в срезах тканей всех мышей из всех четырех групп (Рис.83). Введение $^{11}CH_3$-AS-14не влияло на морфологию почек (Рис.83). В почечной ткани клубочки нормального размера и клеточности. Склеротизированные клубочки не определялись. Зон тубулярной атрофии отсутствовали. Эпителий канальцев сохранился; ядра одинакового размера с едва заметными ядрышками; цитоплазма эозинофильная, негранулярная. В разрозненных эпителиальных клетках определяли единичные внутрицитоплазматические вакуоли. Признаков воспаления или склероза не было. В просвете сосудов были эритроциты.

Таким образом, исследование биобезопасности противоопухолевых препаратов с адресной доставкой для диагностики и терапии онкологических заболеваний является практически биобезопасным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Злокачественные новообразования являются одними из наиболее распространенных заболеваний и основной причиной смерти [289-291]. По данным Всемирной организации здравоохранения к 2030 году около 26 миллионов человек будут страдать от рака, а уровень смертности во всем мире увеличится до 17 миллионов [292]. Широко используемые в настоящее время в качестве средств и методов лечения онкологических заболеваний хирургия, лучевая терапия и химиотерапия вызывают у онкологических больных длительные побочные эффекты [293-297]. Недостатки и ограничения традиционной противоопухолевой терапии стимулировали появление нового направления в медицине – наномедицины, в рамках которой в последнее время разработаны бионанотехнологии, использующие наноразмерные или наноструктурированные материалы размером от 10 до 1000 нм, которые способны увеличить эффективность и снизить токсичность стандартной противоопухолевой терапии [289].

Основной вектор развития наномедицины направлен на обеспечение эффективного неинвазивного/малоинвазивного и доступного персонализированного лечения, что предполагает, с одной стороны, совершенствование существующих медицинских препаратов, изделий и технологий, а, с другой, разработку новых способов получения и применения инновационных медицинских препаратов, изделий и технологий. В частности, наномедицина разрабатывает биологически высокосовместимые материалы, высокоспецифичные лекарства, специальные системы доставки лекарств к опухолям, сверхчувствительные датчики состояния организма, наночастицы для клеточной диагностики, нанороботы для выполнения медицинских микроманипуляций внутри тела, молекулярные нанокаркасы для тканевой инженерии и др.

Целью работы стала разработка нового перспективного направления эффективной и малоинвазивной терапии и диагностики онкологических

заболеваний, основанного на нанотехнологиях, использующих многофункциональные молекулярные конструкции на основе адресных распознающих элементов – ДНК-аптамеров.

Одной из наиболее острых проблем наномедицины является проблема адресного (активного) нацеливания на патологическую молекулярную мишень, поскольку пассивное нацеливание связано с накоплением наночастиц в опухолевых тканях, благодаря повышенной проницаемости сосудов опухоли и нарушению лимфооттока, а также уникальному микроокружению опухолевых клеток. Именно поэтому бионаноматериалы накапливаются и удерживаются в опухолевых тканях дольше, чем в нормальных. Типичный размер таких наноматериалов колеблется от 5 до 200 нм, что позволяет избежать почечной фильтрации. Размер наноматериалов может влиять на скорость проникновения в солидные опухоли, биораспределение и характер накопления опухоли *in vivo*. Активное нацеливание усиливает накопление терапевтических бионаноматериалов в опухоли. Сейчас для адресного нацеливания используются разнообразные низкомолекулярные соединения, в том числе пептиды, антитела и аптамеры.

ДНК- и РНК-аптамеры уже продемонстрировали огромный терапевтический потенциал в качестве агентов для молекулярного распознавания [298]. Они стали идеальными кандидатами для терапии в качестве средств доставки из-за высокой селективности и низкой иммуногенности [298; 299]. С помощью эволюции *in vitro* аптамеры можно подобрать за несколько дней к любой мишени, в частности, к низкомолекулярные веществам, вирусам, бактериям, белкам, живым клеткам и тканям [36-39; 73; 298-300]. Аптамеры являются синтетическим химическим продуктом, а не биологическим, синтез которых осуществляется химически с высокой чистотой с помощью автоматизированной процедуры. Аптамеры улучшают биосовместимость противоопухолевых препаратов, в том числе золотых и магнитных наночастиц, улучшают коллоидную

стабильность и увеличивает время циркуляции терапевтических наноструктур *in vivo* [145; 301; 302].

В нашей работе с помощью технологии cell-SELEX получены ДНК-аптамеры, высокоселективные и высокочувствительные клеткам экспериментальной опухоли лабораторных животных – асцитной карциноме Эрлиха, константы диссоциации которых находятся в наномолярном диапазоне (от 1,25 до 3.91 нМ). Показано, что ДНК-аптамеры связываются с различными молекулярными мишенями и вызывают на уровне клетки различные биологические эффекты. В частности, аптамер AS9, вероятной мишенью которого являются компоненты цитоскелета, а, именно, филамин А и миозин 9, незначительно увеличивает уровень апоптоза, но подавляет клеточное деление. Филамин А – структурный компонент цитоскелета [221], представляет собой хорошо известный белок, сшивающий актин. Он служит каркасом для более, чем 90 белков и участвует во многих клеточных функциях, особенно важными из которых являются миграция и адгезия клеток, играет важную роль в клеточной сигнализации [223; 224]. Участвует в образовании метастазов, пролиферации и развитии опухолевого процесса [28; 226-229; 231]. Филамин А рассматривается в качестве возможной мишени для терапии рака [28; 231], что полностью подтверждается нашими данными. Миозин 9 представляет собой актиновый мотор, движущийся в направлении, противоположном всем остальным миозинам. Играет важную роль в эндоцитозе [303], секреции [303], клеточной миграции [225], межклеточном транспорте макромолекул, регуляции сигнальной трансдукции [304], участвует в образовании метастазов [230], поддержании злокачественного фенотипа [305], регуляции секреции белка [306]. Экспрессия зависит от типа рака. Таким образом, само воздействие аптамеров на эти молекулярные мишени может способствовать подавлению опухолевого роста

Аптамер AS14, потенциальными мишенями которого являются гельзолин, α- и β-субъединицы ATP-синтазы, увеличивает долю клеток с транслокацией фосфатидилсерина, что свидетельствует о стимуляции этими аптамерами процесса апоптоза, и почти не влияет на скорость клеточного деления. Гельзолин – актинсвязывающий белок – белок цитоскелета, содержащий три участка для связывания актина [307]. Гельзолин имеет (1) Ca-чувствительный актин-связывающий сайт на С-конце, принимающий участие в нуклеации; (2) участок для связывания Ca^{2+}; (3) высокоаффинный участок связывания мономеров актина на Т-конце и (4) участок для связывания полимера активна. При связывании с полифосфоинозитидами разрезающая активность гельзолина ингибируется [308]. Гельзолин участвует в сплайсинге пре-мРНК и регуляции альтернативного сплайсинга [308; 309], гиперэкспрессирован в глиобластоме, влияет на рост опухоли [309]. Компоненты внутренней мембраны митохондрий α- и β-субъединицы ATP-синтазы ответственны за синтез ATP, и, таким образом, воздействие на эти молекулярные мишени может подавлять энергообмен опухолевых клеток.

Потенциальными мишенями аптамера AS42 являются молекулярные шапероны, родственные тепловому шоку 71 кДа (Hspa8) и HSP 90-бета (Hsp90ab1). В клеточной культуре этот аптамер не изменял скорость удвоения клеток, но значительно уменьшал долю клеток с транслокацией фосфатидилсерина. Таким образом, очевидно, что аптамер AS42 не обладает противоопухолевой активностью.

Как и другие биологически активные вещества аптамеры, проявляющие высокий уровень специфичности и чувствительности в клеточных культурах, могут не проявлять высокой селективности и чувствительности в условиях организма. Поэтому при разработке терапевтических противоопухолевых бионаноконструкций с адресной доставкой необходимо подтвердить чувствительность и специфичность аптамеров к клеткам-мишеням *in vivo*. Оценку чувствительности и

специфичности аптамеров к асцитным клеткам карциномы Эрлиха на уровне организма проводили с помощью методов, использующих стандартное медицинское оборудование – ПЭТ/КТ и ЯМР-томографию.

Для оценки чувствительности и специфичности аптамеров к асцитным клеткам карциномы Эрлиха методом ПЭТ/КТ был использован радиофармпрепарат (РФП) на основе аптамера AS14 – $^{11}CH_3$-AS14, синтезированный в центре Ядерной медицины ФМБА России. Исследования показали, что РФП на основе аптамера AS14 в организме успешно связывался с асцитными клетками, выявляя даже очень мелкие метастазы, в то время как стандартный РФП ^{18}F-FDG оказался менее чувствительным и не позволил выявить все опухолевые очаги в организме мыши.

Ферроарабиногалактаны, функционализированные аптамерами (Апт-FeАГ), использованные в качестве контрастного вещества опухолей при магнитно-резонансной томографии (МРТ), также оказались способными выявлять солидные опухоли у мышей, что стало ещё одним свидетельством высокой чувствительности и специфичности аптамеров. Аналогичные результаты были получены при использовании аптамеров, меченных флуоресцентной меткой.

Таким образом, наши исследования показали, что полученные аптамеры являются чувствительными и специфичными опухолевым клеткам карциномы Эрлиха и способны выступать в качестве нацеливающих на опухоль молекул в условиях организма.

Вторым компонентом бионаноконструкций с противоопухолевой активностью, используемых в наномедицине, помимо адресно нацеливающих молекул, являются наноматериалы, обладающие противоопухолевой активностью.

Одними из таких наноматериалов в наших исследованиях стали золотые сферические наночастицы, способные выполнять роль «оптических нагревателей». Фототермическая терапия (ФТТ) – малоинвазивный метод

лечения рака, основанный на способности наночастиц золота поглощать свет и преобразовывать его с помощью плазмонного резонанса в тепло, нагревающее опухолевые клетки до критической температуры и разрушающие их. Суть фототермической терапии заключается в том, что нагрев опухоли до +43,5ºС вызывает необратимое нарушение конформации белков из-за более высокой кислотности, характерной для опухолевой ткани, в то время как белки нормальных тканей к этой температуре нечувствительны. Применение наночастиц золота, обладающих уникальными оптическими свойствами, позволяет увеличить термосенсибилизацию опухолевых клеток за счет возбуждения плазмонного резонанса. Облучение опухоли, меченной золотыми наночастицами, лазером на длине волны, попадающей в полосу плазмонного резонанса наночастиц, способствует клеточной гибели.

В нашей работе мы показали фототермическую активность сферических золотых наночастиц размером 37 нм, функционализированных аптамерами AS42 (AS42-AuНЧ), на клетках асцитной карциномы Эрлиха *in vivo*. Для оценки эффективности гипертермии в разрушении опухолевых клеток был использован метод позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) с компьютерной томографией (КТ) и гистологический анализ опухолевой ткани. Результаты исследований показали, что в условиях гипертермии, вызванной плазмонным резонансом золотых наночастиц, основная масса опухоли у мышей (от 60 до 70%) подверглась некрозу. В некоторых областях это сопровождалось заметной пролиферацией фиброзных тканей. Таким образом, фототермическая терапия с помощью наночастиц золота, которые адресно доставлялись к опухолевым клеткам аптамерами, разрушала опухоль, но не оказывала никакого воздействия на окружающие опухоль здоровые ткани.

Плазмонная ФТТ представляет собой наименее инвазивный метод лечения злокачественных новообразований. Этот метод использует

преобразование энергии фотона в тепловую энергию, достаточную для разрушения опухоли. Использование гипертермии наиболее перспективно в случаях, когда хирургическое удаление опухоли затруднено. Наше исследование показывает фототермическое разрушение клеток асцитной карциномы Эрлиха с использованием AuНЧ, функционализированных ДНК-аптамерами. Использование опухолеспецифических аптамеров обеспечивает точную доставку AuНЧ к мембране клеток-мишеней и повышает специфичность фототермотерапии. Лазерное излучение резонансно возбуждает плазмонный резонанс и производит эффект нагрева AuНЧ, вызывая повреждение раковых клеток-мишеней, оставляя здоровые клетки нетронутыми.

Можно ожидать, что функционализированные аптамером AuНЧ будут избирательно связываться с раковыми клетками и приводить к локализации AuНЧ в опухоли, что необходимо для повышения эффективности терапевтического лечения и подавления латеральных негативных эффектов, таких как возможный перегрев здоровых клеток и ткани. AuНЧ, функционализированные аптамером, обладают рядом дополнительных преимуществ; в частности, они устойчивы к агрегации отрицательными зарядами олигонуклеотидов и не образуют конгломератов внутри кровеносных сосудов. Более того, в отличие от белковых антител аптамеры практически неиммуногенны. Схема селективного уничтожения раковых клеток *in vivo* с использованием As42-AuНЧ в плазмонной фототермической терапии представлена на рис.84.

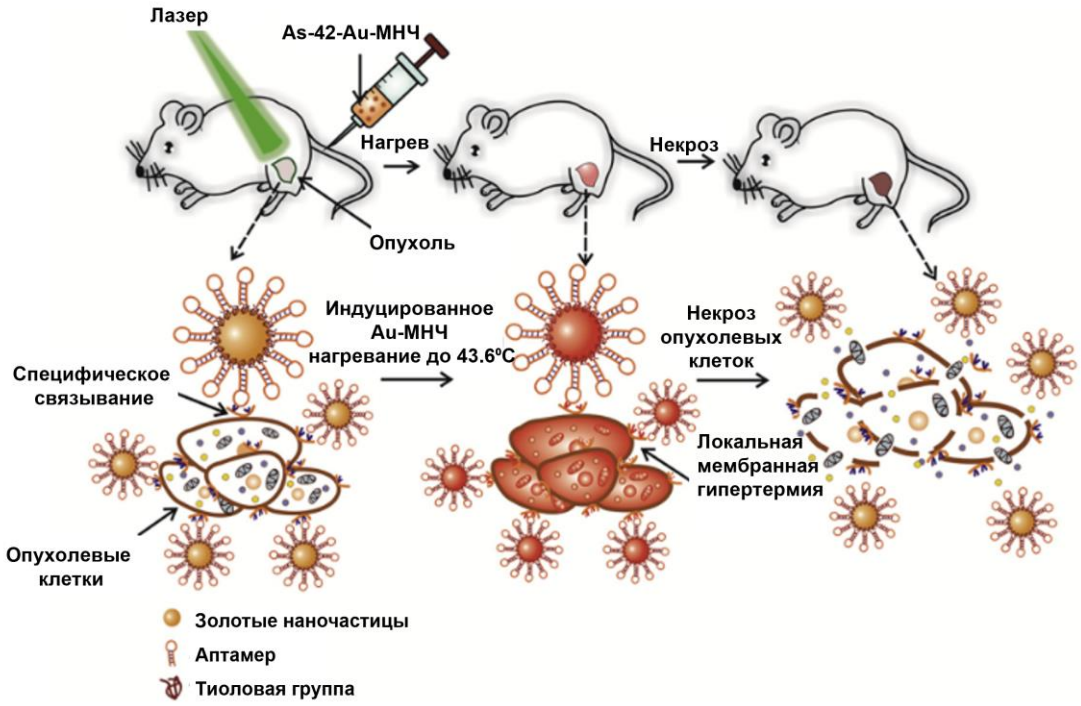


Рисунок 84 – Схема селективного уничтожения раковых клеток *in vivo* с использованием AS42-AuНЧ в плазмонной фототермической терапии. AS42-AuНЧ локализуются на опухолевых клетках после инъекции в хвостовую вену мыши. Локальное облучение опухоли зеленым лазером вызывает нагрев наночастиц и гибель клеток с последующим уничтожением опухоли.

Другим перспективным направлением, развиваемым в последнее время в наномедицине, стало направление, использующее дистанционное управление магнитными наночастицами с помощью магнитного поля. Эта область наномедицины получила развитие после исследования мембранных механочувствительных рецепторов, связанных с белками внутриклеточных сигнальных путей, которые показали, что стимуляция механочувствительных рецепторов в зависимости от типа рецептора и величины поля способна активировать или подавлять такие клеточные функции, как апоптоз, сокращение, дифференциацию, миграцию, пролиферацию, секрецию, а процесс механотрансдукции, в котором происходит преобразование механической энергии в биохимический сигнал, играет важную роль в

развитии патологии у человека [310; 311]. Это обстоятельство обусловило интерес к способу управления клеткой путем воздействия на эти рецепторы, которые в перспективе могут стать мишенью для терапевтического воздействия [312].

Возможность дистанционного управления клеткой в магнитном поле стимулировала разработку и исследование физико-химических свойств наночастиц, подходящих для наномедицины, и оценку их взаимодействия с клетками-мишенями. Выяснилось, что сила, которую внешнее магнитное поле может оказывать на частицу, варьирует от 10 пиконьютонов до 10 наноньютонов, а силы такого порядка сопоставимы с силами, которые клетки испытывают *in vivo* [313]. В этой концепции магнитные наночастицы исполняют роль преобразователя энергии магнитного поля в деформацию прикрепленных к ним функционально значимых макромолекул [70]. Разработка магнитомеханического дистанционного управления клетками была дополнительно стимулирована исследованиями, показавшими, что магнитомеханическая трансдукция с использованием магнитных частиц способна стимулировать пролиферацию, дифференцировку и миграцию стволовых клеток [314], а магнитные наночастицы (МНЧ) могут быть использованы в качестве эффективных медиаторов тепла, переносчиков лекарств и контрастных агентов [35; 315].

В последнее время МНЧ применяют в различных областях биомедицины. МНЧ используют для МРТ-визуализации патологических очагов, адресной доставки средств терапии, магнитомеханической стимуляции регенерации костной ткани и т.д. [88; 165; 203; 314; 316-326]. Применение технологий на основе биомагнитных наночастиц позволило разработать методы дифференцировки человеческих остеобластов внешним переменным магнитным полем [130; 314]. Следует отметить, что МНЧ являются естественными компонентами живых систем, они синтезируются в клетках бактерий, рыб, птиц и человека. У людей МНЧ обнаружены в

клетках разных типов – мозге, сердце, селезенке, печени, костной ткани и опухолях [327-330], однако их точная роль, а также причина их возникновения до конца не поняты [331]. Можно предположить, что эндогенные магнитные наночастицы представляют собой клеточное депо железа и, кроме того, участвуют в дифференцировке клеток путем изменения ее мембранного потенциала.

Применение экзогенных биомагнитных наночастиц ограничивается их потенциальной токсичностью [178; 191], которая обусловлена их биосовместимостью, зависящей от химической природы, покрытия, способности к биодеградации, совместимости поверхностно-активных веществ МНЧ с окружающей средой, растворимости, фармакокинетики, механизма адресной доставки в ткани-мишени, химии поверхностных явлений, структуры, стабильности коллоидных растворов наночастиц, количества вводимых МНЧ и способности встраиваться в организм пациента, не вызывая побочных клинических проявлений и индуцируя клеточный или тканевой ответ, необходимый для достижения оптимального терапевтического эффекта [189; 332], формой [333-336] (Рис.85). При отсутствии биосовместимости наночастицы нарушают клеточный и тканевой метаболизм, вызывая токсические эффекты. Следовательно, биосовместимость МНЧ должна рассматриваться в качестве основного первичного требования для их применения в биомедицине.

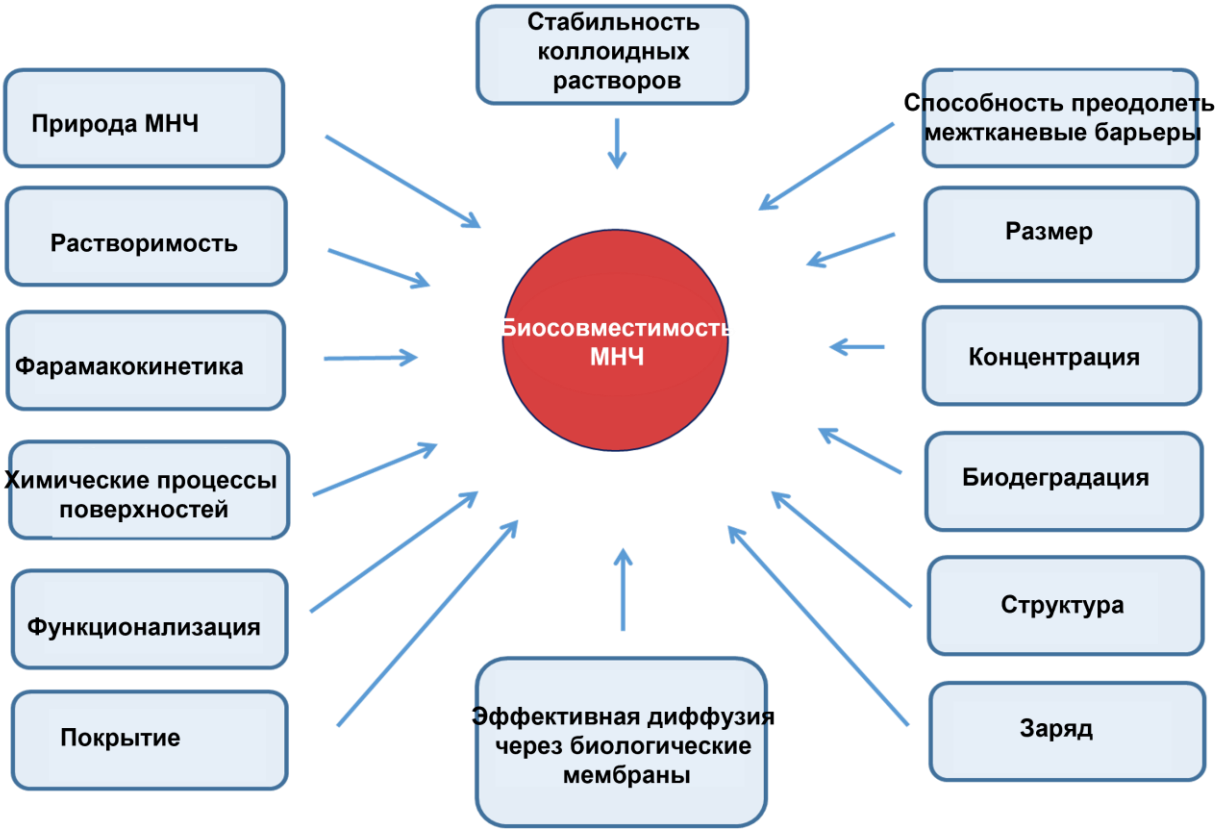


Рисунок 85 – Физические и химические свойства магнитных наночастиц, определяющие их биосовместимость [190].

Главным недостатком использования магнитных наночастиц в наномедицине является то, что они могут накапливаться в здоровых тканях, оказывая вредное воздействие [333; 337]. Однако данная проблема может быть снята функционализацией магнитных наночастиц распознающими адресными [197; 337]. Наиболее предпочтительными молекулами для распознавания патологических мишеней являются аптамеры, поскольку они имеют ряд преимуществ по сравнению с другими кандидатами [62; 338]. Именно поэтому функционализированные аптамерами магнитные наночастицы становятся важными инструментами для таргетной и малоинвазивной терапии онкологических заболеваний [339; 340]. К настоящему времени несколько ферромагнитных и суперпарамагнитных наночастиц уже нашли медицинское применение [341-342]. К тому же

выяснилось, что суперпарамагнитные частицы предпочтительнее ферромагнитных, потому что в отсутствие магнитного поля они не имеют магнитного момента и действуют только при приложении магнитного поля. Такие частицы используют для магнитно-резонансной томографии (МРТ), индукции гипертермии и механического разрушения клеток.

Наиболее интересными и перспективными в наномедицине могут стать используемые нами в противоопухолевой терапии, железосодержащие ферроарабиногалактаны (FeАГ), в которых железо стабилизировано арабиногалактаном (АГ), представляющим собой растительный полисахарид, выделенный из древесины лиственницы сибирской. Железо в этих конъюгатах находится в форме гидратированного оксида железа с общей формулой $Fe_3O_4 \times nH_2O$, что является аналогом минералов магнетита-маггемита или ферригидритов [344]. Преимуществами FeАГ являются их низкая токсичность, антиоксидантные, иммуномодулирующие и детоксикационные свойства. Избыток АГ способствует выведению продуктов распада опухоли.

В нашей работе мы исследовали противоопухолевую активность не только ферроарабиногалактанов, функционализированных молекулярными распознающими элементами, но и сферические суперпарамагнитные наночастицы с золотой оболочкой NITmagoldCit 50nm, в результате чего получали нацеленные на опухоль суперпарамагнитные наночастицы двух типов, которые имели высокую специфичность и высокую чувствительность к асцитными клеткам карциномы Эрлиха *in vivo*, что подтверждалось методом ЯМР-томографии.

Эффективность противоопухолевой магнитомеханической терапии с помощью феррарабиногалактана и магнитных наночастиц, покрытых золотом, функционализированных адресной молекулой – ДНК-аптамером к асцитным клеткам оценивали с помощью модели асцитной карциномы Эрлиха. Результаты исследований показали, что противоопухолевая терапия

ферроарабиногалактанами и покрытыми золотом магнитными наночастицами, функционализированными ДНК-аптамерами, вызывала воспалительную реакцию в месте опухоли и деградацию опухоли. В опухолевой ткани после магнитомеханической терапии этими наночастицами наблюдался тотальный некроз, а оставшиеся в небольшом количестве клетки карциномы имели необратимые изменения: кариорексис, кариолизис, плазморексис. Такая терапия вызывала иммунную инфильтрацию сегментированных лейкоцитов, отек и деструктивные изменения внеклеточного матрикса опухолевой ткани.

Таким образом, магнитомеханическая терапия в низкочастотном магнитном поле с помощью функционализированных ДНК-аптамерами магнитных наночастиц двух типов показала высокую противоопухолевую активность.

В целом успешность терапии онкологических заболеваний определяется эффективностью удаления из организма всех трансформированных клеток, отличающихся неконтролируемым ростом и делением. Кроме того, многие опухоли дают метастазы, вызывающие появление вторичных опухолей. Одним из наиболее распространенных методов лечения онкологических заболеваний является хирургия, однако при использовании этого метода терапии зачастую происходят рецидивы вследствие недостаточно радикального удаления всех опухолевых клеток. Для максимально радикального удаления опухоли с минимальным повреждением здоровой ткани необходим инструмент, способный находить и адресно удалять только опухолевые клетки, не повреждая при этом здоровые ткани. Все это диктует потребность в разработке хирургического инструмента с новыми свойствами («умного наноскальпеля»), работающему по принципу – «найти и обезвредить». Наиболее перспективным инструментом для разрушения клеток злокачественных опухолей могут стать магнитные диски, представляющие собой диски с прикрепленными к нему

узнающими лигандами, аффинными опухолевой клетке, благодаря чему диски способны избирательно связываться с опухолевой клеткой (или входить в нее) и разрушать ее под влиянием переменного магнитного поля.

«Умный наноскальпель» должен быть наноразмерным (для разрушения отдельных опухолевых клеток), дистанционно управляемым с помощью безопасных для организма сил и адресным (разрушать только целевые опухолевые клетки, не повреждая здоровые).

Наиболее перспективным наноскальпелем, уже показавшим свою эффективность, может стать конструкция, состоящая из магнитных нанодисков, обладающих анизотропией и способных преобразовывать магнитный момент в механический крутящий момент под влиянием безопасного низкочастотного переменного или вращающего магнитного поля низкой интенсивности, адресно связывающаяся с опухолевыми клетками, благодаря распознающему лиганду (антителу или аптамеру). Одним из важных преимуществ нанодисков по сравнению со сферическими наночастицами является их анизотропия, способствующая их току по периферии сосуда, благодаря чему вероятность их перехода через эндотелий в опухоль увеличивается.

Наше исследование показало, что модифицированные аптамерами трёхслойные магнитные нанодиски Au/Ni/Au запускают апоптоз асцитных клеток в течение 40 минут после воздействия переменного магнитного поля. Более того, через 4 ч после воздействия переменного магнитного поля количество опухолевых клеток значительно уменьшается. В целом, результаты, полученные нами, демонстрируют перспективы микрохирургии с использованием нанодисков, функционализированных аптамерами, для лечения онкологических заболеваний, а также необходимость определения правильного выбора лигандов для модификации магнитных дисков, поскольку только сильное взаимодействие магнитных дисков с белками, участвующими в процессах апоптоза, роста и развития опухоли, может

определять исход лечения. Магнитные диски, немодифицированные аптамерами, в переменном магнитном поле вызвали некроз опухолевых клеток, что привело к воспалению и образованию ран. Нацеливание магнитных дисков аптамерами привело к апоптозу опухолевых клеток или, по крайней мере, значительному снижению некротических процессов наряду с запуском апоптоза.

Нетоксичность и биосовместимость магнитных дисков – необходимое условие для создания наноскальпеля для микрохирургии опухолей. Многочисленные исследования показали, что интернализованные в клетку магнитные нано- и микродиски независимо от их количества в отсутствие магнитного поля не проявляют цитотоксичность и не влияют на жизнеспособность клеток [133; 345; 346], хотя данные о влиянии магнитных дисков на пролиферацию клеток неоднозначны [161].

Таким образом, можно заключить, что микрохирургия злокачественных опухолей с помощью наноскальпеля на основе функционализированных распознающими опухолевые сайты лигандов – ДНК-аптамеров является нетоксичной или малотоксичной.

Основное требование персонализированной биомедицины – адресное воздействие на патологический очаг. Биосовместимость и токсичность любых лекарственных препаратов зависит от их воздействия на здоровые ткани, а, следовательно, от их распределения и накопления в органах и тканях. Аптамеры, аффинные в своей молекулярной мишени, способствуют активному переносу МНЧ только в органы-мишени. Активная стратегия переноса МНЧ, по сравнению с пассивным переносом, обеспечивает высокую специфичность и эффективность доставки МНЧ к клеткам-мишеням, избегая неспецифического связывания и накопления частиц в здоровых тканях. В целом активная доставка ограничивает контакт МНЧ с моноцитами и макрофагами, минимизирует задержку и поглощение МНЧ ретикуло-эндотелиальной системой. Таким образом, адресная доставка

магнитных частиц с помощью аптамеров снижает их потенциальную токсичность и увеличивает биологическую эффективность [35; 69; 284; 347].

Управляемые и контролируемые магнитными полями магнитные наночастицы, функционализированные биологически активными молекулами, чувствительными к биомишеням молекулярно-клеточной терапии, представляют собой основу получения дистанционно управляемых лекарств адресного действия и медицинского оборудования, которые в совокупности обеспечивают возможность выполнения неинвазивных лечебно-диагностических манипуляций внутри организма. Большое разнообразие вариантов получения магнитного ядра, защитной оболочки и биологически активного покрытия МНЧ предоставляет возможности реализации набора физических и биологических свойств, пригодных для лечения многих заболеваний, что подтверждается многочисленными примерами в научной литературе. Эта область быстро развивается и пока еще мало дала для клинической практики. Помимо временных ограничений на разработку и внедрение медицинских изделий, одной из возможных причин, сдерживающих их внедрение в практику, является необходимость согласованной разработки и совместного продвижения в клиническую практику персонализированной медицины одновременно лекарственных препаратов и медицинского оборудования магнитной терапии.

Преимущества фототермической терапии (ФТТ) с использованием золотых наночастиц включают менее инвазивный характер световой терапии по сравнению с хирургическим вмешательством и возможность многократно проводить облучение в одном и том же месте. Однако к недостаткам ФТТ относятся ограниченная доступность, поскольку они могут обрабатывать только те области, которые могут быть достигнуты светом. Следовательно, световая терапия не может быть успешно использована для лечения рака, глубоко прорастающего в кожу или другие органы, или рака с метастазами. И, кроме того, невозможно точно установить температуру, способную

разрушать опухолевые клетки, и при этом не нарушать целостность здоровых. В нашем исследовании продемонстрирован метод альтернативной магнитомеханической терапии для уничтожения опухоли у мышей (Рис.86).

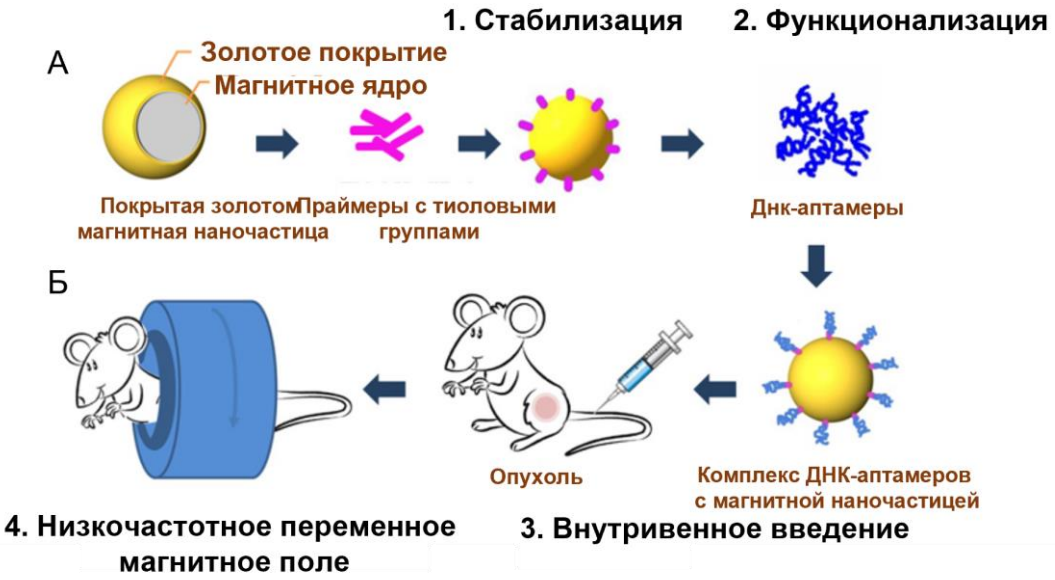


Рисунок 86 – Схема магнитомеханической противоопухолевой терапии.

На сегодняшний день, несмотря на успехи медицины и биотехнологии, лечение рака по-прежнему остается актуальной проблемой. Число онкологических больных с каждым годом увеличивается, а это требует создания новых эффективных методов лечения. Микрохирургия под действием магнитного поля – одно из новых перспективных направлений в лечении злокачественных новообразований. В нашем исследовании впервые показана возможность дипольных магнитных Au/Ni/Au дисков, модифицированных аптамерами, управляемых переменным магнитным полем, для целевого разрушения опухолевых клеток. Аптамеры AS9 и AS14 с высокой селективностью к клеткам асцитной аденокарциномы Эрлиха были использованы для создания функциональной поверхности магнитных дисков. Ранее мы продемонстрировали, что эти аптамеры проявляют

противоопухолевые свойства, вызывая апоптоз в клетках аденокарциномы мыши *in vitro* [248]. Одной из вероятных мишеней AS9 является филамин А, вовлеченный в пролиферацию опухолевых клеток, образование метастазов и прогрессирование опухоли. Аптамер AS14 связывается с фибронектином, участвует в клеточной адгезии, миграции, эмбриогенезе, заживлении ран, свертывании крови и метастазировании. Здесь мы использовали эти аптамеры в качестве линкеров для связывания магнитных дисков с асцитными клетками для их разрушения.

Математическое моделирование, использованное для объяснения взаимодействия магнитных дисков, модифицированных аптамерами, с опухолевыми клетками показано, что аптамеры, связанные с магнитными дисками, способны отрывать белки-мишени от клеточной мембраны в условиях воздействия на них переменного магнитного поля. Поскольку таких белковых молекул на диске всего несколько, отделение целевых белков от клеточной мембраны будет более вероятным, чем механическое повреждение самой мембраны. Эксперименты даже с небольшим количеством магнитных дисков, модифицированных аптамерами, показали эффективность разрушения опухолевых клеток. Аптамеры прочно прикрепляются к дискам и белкам-мишеням, а затем вытягивают белки-мишени из мембраны, что приводит к ее повреждению.

Гибель клеток может осуществляться разными способами: апоптозом, пироптозом, онкозом, аутофагией и некрозом [348]. Все эти процессы связаны с изменением объема клетки, вызванным модификацией потоков ионов и, прежде всего, модификацией потоков натрия и калия. Апоптоз, в частности, характеризующийся сжатием клеток, происходит из-за значительной потери клеткой натрия, калия и хлора, необходимых для активации каспаз и нуклеаз [349]. Апоптоз может быть вызван различными факторами: лигандами, такими как CD95L (FASL) и фактором некроза опухоли (TNF), или увеличением внутриклеточной концентрации кальция и

активных форм кислорода. Чтобы определить способы гибели клеток, вызванной действием Au/Ni/Au дисков, модифицированных аптамерами, управляемых переменным магнитным полем, мы оценили изменение внутриклеточного натрия и калия с помощью зондов SBFI и PBFI, соответственно, методом проточной цитометрии. Данные показали, что концентрация натрия в популяции опухолевых клеток значительно снизилась в первые 40 мин после воздействия переменного магнитного поля, тогда как концентрация калия практически не изменилась. Следует отметить, что индукция апоптоза опухолевых и нормальных клеток происходит по-разному, поскольку опухолевые клетки характеризовались деполяризацией мембраны [350], вызванной увеличением внутриклеточного натрия. В наших исследованиях концентрация натрия в асцитных клетках, инкубированных с магнитными дисками, модифицированными AS14 и AS9, снижалась сразу после воздействия переменного магнитного поля, тогда как концентрация калия оставалась практически неизменной. Это приводило к уменьшению размера клеток, увеличению мембранного потенциала и, следовательно, стимулировало апоптоз. Хорошо известно, что уменьшение объема клеток, наблюдаемое в наших экспериментах, способствует гибели клеток в результате апоптоза.

Математическое моделирование, проведенное нами, показало, что конформация целевых белков, связанных с Au/Ni/Au дисками, модифицированными аптамером, должна изменяться под действием переменного магнитного поля. В нашем исследовании мы использовали аптамеры AS9 и AS14, специфичные для филамина А и фибронектина, соответственно. Оба эти белка связаны с функцией натриевых каналов [248]. Белок цитоскелета, филамин А, связывается с натриевыми каналами и подавляет их активность [351], что может вызывать снижение внутриклеточной концентрации натрия. Фибронектин также может влиять на внутриклеточную концентрацию натрия, поскольку натриевые каналы и

внеклеточный домен субъединицы b2 специфически связываются с фибронектином типа III [352]. Таким образом, можно предположить, что магнитные диски, модифицированные AS14 и AS9, могут изменять конформацию целевых белков фибронектина и филамина А, что, в свою очередь, изменяет их функциональное состояние, что приводит к снижению концентрации натрия в клетках и уменьшению размеров клеток, гиперполяризаци мембран и, наконец, к апоптозу.

Помимо разработки инновационных методов, в том числе, фототермической и магнитомеханической терапии важным направлением наномедицины является модификация использования стандартных препаратов противоопухолевой терапии, адресно доставляемых в опухолевый очаг, поскольку низкая эффективность и высокая токсичность традиционных лекарственных препаратов связана с тем, что лекарства, вводимые традиционными способами, как правило, распределяются в организме равномерно, проникая в различные органы и ткани, в том числе здоровые. Концентрация лекарственных препаратов в патологических очагах оказывается гораздо ниже терапевтической, поскольку лекарства распространяются пассивно во всех органах путем системного кровообращения без какого-либо конкретного механизма. В большинстве случаев лишь небольшая часть терапевтических препаратов достигает целевого органа. Это обстоятельство побуждает повышать объем вводимых в организм лекарств, что увеличивает их содержание не только в целевых органах и тканях, но и в здоровых, что и приводит к неблагоприятным эффектам на уровне организма. Особенно это актуально для противоопухолевых препаратов, которые подавляют деление как опухолевых, так и здоровых клеток. Поэтому предпочтительным методом введения лекарственных средств является их целевая доставка, которая позволяет увеличивать концентрацию лекарственных средств только в целевых тканях, снижая их токсическое воздействие на здоровые органы и

ткани. Для этих целей в последнее время разрабатываются методы создания систем их направленного транспорта в организме с помощью различных носителей и адресных молекул. Одним из перспективных носителей лекарственных препаратов является арабиногалактан лиственницы сибирской, благодаря своим уникальным физико-химическим и биологическим свойствам. Арабиногалактан может служить целенаправленным носителем для доставки диагностических и терапевтических средств к гепатоцитам, лимфоцитам, опухолевым и другим клеткам, имеющим на своей поверхности лектины. В целом, эффективность АГ обусловлена его способностью к рецептор-опосредованному эндоцитозу.

Мы исследовали эффективность адресной доставки двух стандартных препаратов противоопухолевой терапии – цисплатина и циклофосфамида. Предварительно эти препараты были конъюгированы с арабиногалактаном, что увеличивало растворимость препаратов и ограничивало взаимодействие токсических противоопухолевых препаратов – циклофосфамида и цисплатина со здоровыми тканями.

Результаты исследований показали, что адресная доставка противоопухолевых препаратов конъюгатов циклофосфамида и цисплатина с арабиногалактаном ДНК-аптамерами позволила увеличить эффективность терапии и снизить ее токсичность. В частности, адресная доставка к опухоли с помощью ДНК-аптамеров стандартного противоопухолевого препарата циклофосфамида, в комплексе с арабиногалактаном, увеличивала продолжительность жизни животных почти в 3 раза по сравнению с животными, проходившими терапию стандартным препаратом циклофосфамида. Цисплатин в комплексе с арабиногалактаном, адресно доставляемый к опухоли, практически полностью подавлял рост опухоли в дозе в 20 раз меньшей по сравнению со стандартным высокотоксичным препаратом цисплатин и значительно снижал количество метастазов.

Важно отметить, что все бионанокомплексы противоопухолевой терапии с адресной доставкой, функционализированные ДНК-аптамерами (FeАГ-AS9, $^{11}CH_3$-AS14, AuНЧ-AS9, NITmagoldCit50nm-AS14, Au/Ni/Au-AS9-AS14, АГ-Cis-AS42, АГ-ЦФА-AS42) отличались высоким уровнем биобезопасности и биосовместимости.

Таким образом, в процессе выполнения работы был разработан комплекс технологий получения нетоксичных биосовместимых бионаноконструкций, нацеленных на опухолевую ткань, и методов их использования, легко масштабируемый на различные типы онкологических заболеваний, позволяющих: (1) увеличить эффективность и снизить токсичность стандартных препаратов противоопухолевой химиотерапии путем адресной доставки препаратов к опухолевым очагам; (2) осуществить адресную деструкцию опухоли с помощью золотых наночастиц, нацеленных на опухоль, путем гипертермии, вызванной плазмонным резонансом золотых наночастиц; (3) осуществить адресную деструкцию опухоли методом магнитомеханической терапии в низкочастотном переменном магнитном поле с помощью суперпарамагнитных наночастиц, покрытых арабиногалактаном и золотом; (4) осуществить адресное разрушение опухоли методом магнитомеханической терапии в низкочастотном переменном магнитном поле с помощью магнитных трехслойных (Au/Ni/Au) дисков (наноскальпеля) (Рис.87).

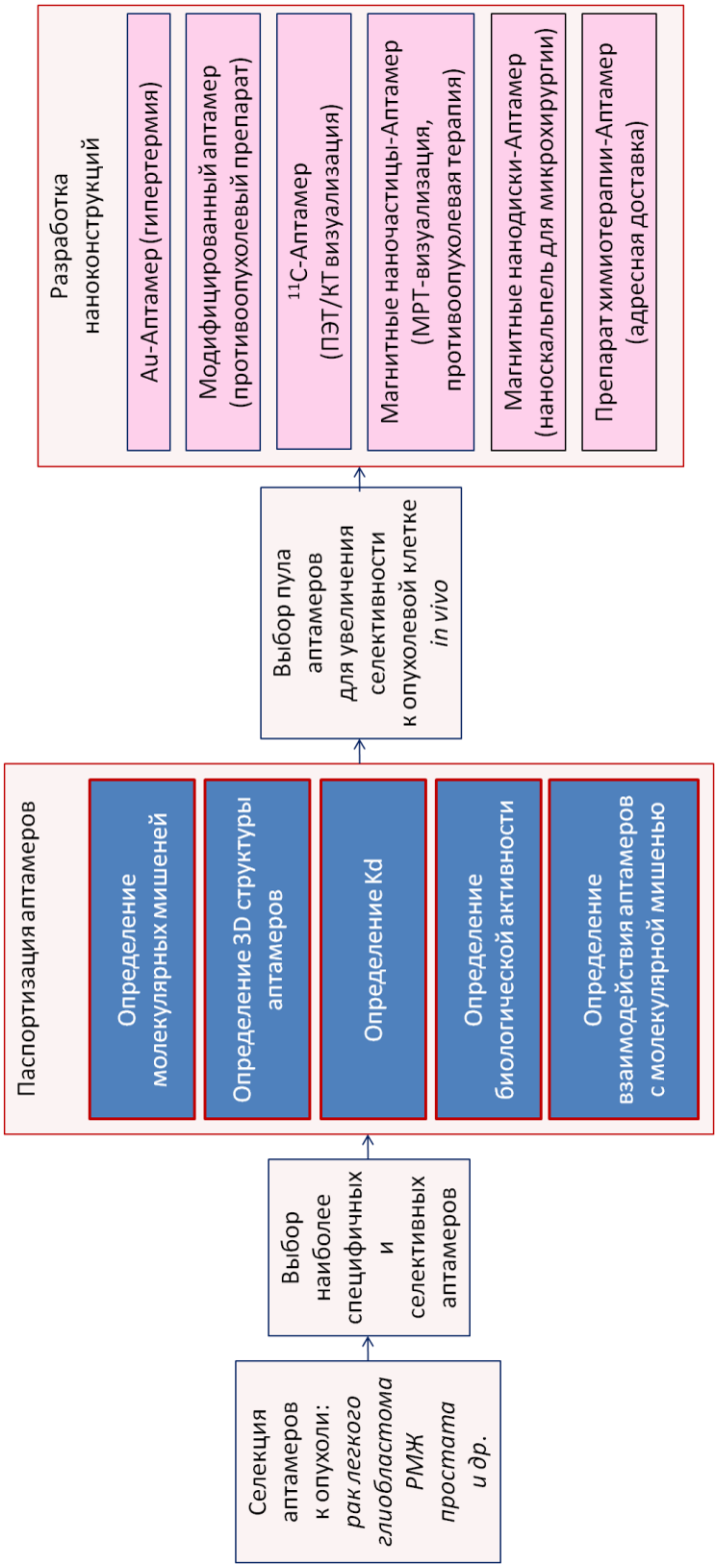


Рисунок 87 – Схема комплекса наноконструкций на основе ДНК-аптамеров для диагностики и лечения онкологических заболеваний.

ВЫВОДЫ

1. В результате селекции получены ДНК-аптамеры, высокочувствительные и высокоселективные асцитным клеткам карциномы Эрлиха с константами диссоциации в наномолярном диапазоне. Константа диссоциации (Kd) аптамера AS9 составила 1.25 нМ, константа диссоциации (Kd) аптамера AS42 – 3.91 нМ.

2. Установлено, что вероятными молекулярными мишенями для аптамера AS9 являются структурные компоненты цитоскелета филамин А и миозин 9; для аптамера AS14 кандидатами в молекулярные мишени являются белки гельзолин, α- и β-субъединицы АТР-синтазы; а для аптамера AS42 – молекулярные шапероны Hspa8 и Hsp90ab1.

3. Аптамеры, связывающиеся с разными молекулярными мишенями вызывают различные биологические эффекты на уровне клетки. Аптамер AS9, вероятными молекулярными мишенями которого являются структурные компоненты цитоскелета, увеличивает уровень апоптоза и полностью подавляет клеточное деление. Аптамеры AS14 и AS18 увеличивают долю клеток с транслокацией фосфатидилсерина, что свидетельствовует о стимуляции ими апоптоза. Аптамер AS42, селективный к молекулярным шаперонам, уменьшает долю клеток с транслокацией фосфатидилсерина, предотвращая апоптоз клеток.

4. ДНК-аптамеры адресно связываются со своими молекулярными мишенями in vivo, что подтверждается стандартными методами, использующимися в медицине, а именно, ПЭТ-КТ с использованием радиофармпрепарата на основе ДНК-аптамера 11CH3-AS14 и МРТ с использованием функционализированных ДНК-аптамерами суперпарамагнитных наночастиц, покрытых арабиногалактаном (ферроарабиногалактанов).

5. Плазмонный резонанс функционализированных ДНК-аптамерами золотых наночастиц (Au-AS42), идуцированный лазером на длине волны, попадающей в полосу плазмонного резонанса наночастиц, вызывает гипертермию опухолевой ткани и ее разрушение in vivo путем некроза, не оказывая разрушительного воздействия на окружающие опухоль здоровые ткани.

6. Дистанционное управление магнитными наночастицами NITmagoldCit 50nm и покрытыми арабиногалактаном суперпарамагнитными наночастицами (ферроарабиногалактанми), функционализированными ДНК-аптамерами, с помощью низкочастотного переменного магнитного поля, вызывает адресное магнитомеханическое разрушение опухолевой ткани путем апоптоза асцитных клеток, что подтверждается активацией в них каспаз.

7. Наноразмерный комплекс, состоящий из магнитных нанодисков (Au/Ni/Au) и ДНК-аптамеров, способен адресно связываться с белками клеточных мембран опухолевых клеток и под влиянием низкочастотного переменного магнитного поля осуществлять деструкцию опухолевых клеток.

8. Адресная доставка к опухоли с помощью ДНК-аптамеров стандартного противоопухолевого препарата циклофосфамида в комплексе с арабиногалактаном снижает токсичность и улучшает эффективность циклофосфамида, что увеличивает продолжительность жизни животных почти в 3 раза по сравнению с животными, проходившими терапию стандартным циклофосфамидом.

9. Цисплатин в комплексе с арабиногалактаном, адресно доставлемый к опухоли ДНК-аптамерами, практически полностью подавляет рост опухоли в дозе в 20 раз меньшей по сравнению со стандартным высокотоксичным препаратом цисплатина.

10. Целевые противоопухолевые бионаноконструкции на основе молекулярных распознающих элементов – ДНК-аптамеров для диагностики и

терапии асцитной карциномы Эрлиха – $^{11}CH_3$-AS14, АuНЧ, магнитные наночастицы, магнитные диски и конъюгаты стандартных препаратов химиотерапии нетоксичны и биобезопасны.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ferlay J., Colombet M., Soerjomataram I., Dyba T., Randi G., Bettio M., Gavin A., Visser O., Bray F. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries and 25 major cancers in 2018//European Journal of Cancer, 2018, Vol. 103, Cancer incidence and mortality patterns in Europe, P. 356-387.

2. Siegel R.L., Miller K.D., Jemal A. Cancer statistics, 2020//CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2020, Vol. 70, No. 1, P. 7-30.

3. Sales A.H.A., Beck J., Schnell O., Fung C., Meyer B., Gempt J. Surgical Treatment of Glioblastoma: State-of-the-Art and Future Trends//Journal of Clinical Medicine, 2022, Vol. 11, 5354.

4. Ventola C.L. The nanomedicine revolution//part 2: current and future clinical applications, 2012, Vol. 37, No. 10, P. 582-91.

5. Арчаков А. И. Нанобиотехнологии в медицине: нанодиагностика и нанолекарства//Биомедицинская химия, 2010, Vol. 56, No. 1, P. 7-25.

6. Hamilton G.S. (September). Antibody-drug conjugates for cancer therapy: The technological and regulatory challenges of developing drug-biologic hybrids// Biologicals, 2015, Vol. 43, No. 5, P. 318-332.

7. Ellington A., Szostak J. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands//Nature, 1990, Vol. 346, P. 818-822.

8. Кульбачинский А.В. Методы отбора аптамеров к белковым мишеням//Успехи биологической химии, 2006, Т. 46, С. 193-224.

9. Aljohani M.M., Cialla-May D., Popp J., Chinnappan R., Al-Kattan K., Zourob M. Aptamers: Potential Diagnostic and Therapeutic Agents for Blood Diseases// Molecules, 2022, Vol. 27. No. 2, P. 383.

10. Basu D., Chakraborty S., Pal R., Sharma T.K., Sarkar S. Identification and Engineering of Aptamers for Theranostic Application in Human Health and Disorders//International Journal Molecular Scinces, 2021, Vol. 22, No. 18, P. 9661

11. Golovin Y.I., Klyachko N.L., Majouga A.G., Sokolsky M., Kabanov A.V. Theranostic multimodal potential of magnetic nanoparticles actuated by non-heating low frequency magnetic field in the new-generation nanomedicine//Journal of Nanoparticle Research, 2017, Vol. 19, No. 2, P. 63.
12. Jin R., Lin B., Li D., Ai H. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MR imaging and therapy: design considerations and clinical applications//Current Opinion in Pharmacology, 2014, Vol. 18, Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MR imaging and therapy, P. 18-27.
13. Hola K., Markova Z., Zoppellaro G., Tucek J., Zboril R. Tailored functionalization of iron oxide nanoparticles for MRI, drug delivery, magnetic separation and immobilization of biosubstances//Biotechnology Advances, 2015, Vol. 33, No. 6, P. 1162-1176.
14. Fuentes M., Mateo C., Rodriguez A., Casqueiro M., Tercero J.C., Riese H.H., Fernández-Lafuente R., Guisán J.M. Detecting minimal traces of DNA using DNA covalently attached to superparamagnetic nanoparticles and direct PCR-ELISA//Biosensors and Bioelectronics, 2006, Vol. 21, No. 8, P. 1574-1580.
15. He X., Wang K., Tan W., Liu B., Lin X., He C., Li D., Huang S., Li J. Bioconjugated Nanoparticles for DNA Protection from Cleavage//Journal of the American Chemical Society, 2003, Vol. 125, No. 24, P. 7168-7169.
16. Hong J., Gong P., Xu D., Dong L., Yao S. Stabilization of α-chymotrypsin by covalent immobilization on amine-functionalized superparamagnetic nanogel//Journal of Biotechnology, 2007, Vol. 128, No. 3, P. 597-605.
17. Liao M.-H., Chen D.-H. Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase on magnetic nanoparticles for improving its stability//Biotechnology Letters, 2001, Vol. 23, No. 20, P. 1723-1727.
18. Kouassi G.K., Irudayaraj J., McCarty G. Activity of glucose oxidase functionalized onto magnetic nanoparticles//BioMagnetic Research and Technology, 2005, Vol. 3, No. 1, P. 1.

19. Agemy L., Sugahara K.N., Kotamraju V.R., Gujraty K., Girard O.M., Kono Y., Mattrey R.F., Park J.-H., Sailor M.J., Jimenez A.I., Cativiela C., Zanuy D., Sayago F.J., Aleman C., Nussinov R., Ruoslahti E. Nanoparticle-induced vascular blockade in human prostate cancer//Blood, 2010, Vol. 116, No. 15, P. 2847-2856.

20. Hamilton A.M., Aidoudi-Ahmed S., Sharma S., Kotamraju V.R., Foster P.J., Sugahara K.N., Ruoslahti E., Rutt B.K. Nanoparticles coated with the tumor-penetrating peptide iRGD reduce experimental breast cancer metastasis in the brain//Journal of Molecular Medicine, 2015, Vol. 93, No. 9, P. 991-1001.

21. Hu C., Chen X., Huang Y., Chen Y. Co-administration of iRGD with peptide HPRP-A1 to improve anticancer activity and membrane penetrability//Scientific Reports, 2018, Vol. 8, No. 1, P. 2274.

22. Mccarthy J., Weissleder R. Multifunctional magnetic nanoparticles for targeted imaging and therapy☆//Advanced Drug Delivery Reviews, 2008, Vol. 60, No. 11, P. 1241-1251.

23. Yu M.K., Park J., Jon S. Targeting Strategies for Multifunctional Nanoparticles in Cancer Imaging and Therapy//Theranostics, 2012, Vol. 2, No. 1, P. 3-44.

24. Shen Z., Wei W., Tanaka H., Kohama K., Ma G., Dobashi T., Maki Y., Wang H., Bi J., Dai S. A galactosamine-mediated drug delivery carrier for targeted liver cancer therapy//Pharmacological Research, 2011, Vol. 64, No. 4, P. 410-419.

25. Kim E.-M., Jeong H.-J., Park I.-K., Cho C.-S., Moon H.-B., Yu D.-Y., Bom H.-S., Sohn M.-H., Oh I.-J. Asialoglycoprotein receptor targeted gene delivery using galactosylated polyethylenimine-graft-poly(ethylene glycol): In vitro and in vivo studies//Journal of Controlled Release, 2005, Vol. 108, No. 2-3, P. 557-567.

16. Yang C.Y., Best J.A., Knell J., Yang E., Sheridan A.D., Jesionek A.K., Li H.S., Rivera R.R., Lind K.C., D'Cruz L.M., Watowich S.S., Murre C., Goldrath A.W. The transcriptional regulators Id2 and Id3 control the formation of distinct memory CD8+ T cell subsets//Nature Immunology, 2011, Vol. 12, No. 12, P. 1221-1229.

27. McCarthy J.R., Bhaumik J., Karver M.R., Sibel Erdem S., Weissleder R. Targeted nanoagents for the detection of cancers//Molecular Oncology, 2010, Vol. 4, No. 6, P. 511-528.
28. Leung R., Wang Y., Cuddy K., Sun C., Magalhaes J., Grynpas M., Glogauer M. Filamin A Regulates Monocyte Migration Through Rho Small GTPases During Osteoclastogenesis//Journal of Bone and Mineral Research, 2009, P. 091123192444063-36.
29. Parker N., Turk M.J., Westrick E., Lewis J.D., Low P.S., Leamon C.P. Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay//Analytical Biochemistry, 2005, Vol. 338, No. 2, P. 284-293.
30. Montenegro J.-M., Grazu V., Sukhanova A., Agarwal S., de la Fuente J.M., Nabiev I., Greiner A., Parak W.J. Controlled antibody/(bio-) conjugation of inorganic nanoparticles for targeted delivery//Advanced Drug Delivery Reviews, 2013, Vol. 65, No. 5, P. 677-688.
31. Bloemen, M., C. Denis, M. Peeters, L. De Meester, A. Gils, N. Geukens and T. Verbiest (2015). Antibody-modified iron oxide nanoparticles for efficient magnetic isolation and flow cytometric determination of L-pneumophila, 2015, Vol. 182, No. 7-8, P. 1439-1446.
32. Jacobin-Valat M.-J., Laroche-Traineau J., Larivière M., Mornet S., Sanchez S., Biran M., Lebaron C., Boudon J., Lacomme S., Cérutti M., Clofent-Sanchez G. Nanoparticles functionalised with an anti-platelet human antibody for in vivo detection of atherosclerotic plaque by magnetic resonance imaging//Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2015, Vol. 11, No. 4, P. 927-937.
33. Kanazaki K., Sano K., Makino A., Shimizu Y., Yamauchi F., Ogawa S., Ding N., Yano T., Temma T., Ono M., Saji H. Development of anti-HER2 fragment antibody conjugated to iron oxide nanoparticles for in vivo HER2-targeted photoacoustic tumor imaging//Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2015, Vol. 11, No. 8, P. 2051-2060.

34. Scott A.M., Wolchok J.D., Old L.J. Antibody therapy of cancer//Nature Reviews Cancer, 2012, Vol. 12, No. 4, P. 278-287.
35. Liu J.K.H. Anti-cancer vaccines - a one-hit wonder?//The Yale Journal of Biology and Medicine, 2014, Vol. 87, No. 4, P. 481-489.
36. Muharemagic D., Zamay A., Ghobadloo S.M., Evgin L., Savitskaya A., Bell J.C., Berezovski M.V. Aptamer-facilitated Protection of Oncolytic Virus from Neutralizing Antibodies//Molecular Therapy - Nucleic Acids, 2014, Vol. 3,
P. e167.
37. Muharemagic D., Labib M., Ghobadloo S.M., Zamay A.S., Bell J.C., Berezovski M.V. Anti-Fab Aptamers for Shielding Virus from Neutralizing Antibodies//Journal of the American Chemical Society, 2012, Vol. 134, No. 41, P. 17168-17177.
38. Kolovskaya O.S., Savitskaya A.G., Zamay T.N., Reshetneva I.T., Zamay G.S., Erkaev E.N., Wang X., Wehbe M., Salmina A.B., Perianova O.V., Zubkova O.A., Spivak E.A., Mezko V.S., Glazyrin Y.E., Titova N.M., Berezovski M.V., Zamay A.S. Development of Bacteriostatic DNA Aptamers for Salmonella//Journal of Medicinal Chemistry, 2013, Vol. 56, No. 4, P. 1564-1572.
39. Zamay G.S., Kolovskaya O.S., Zamay T.N., Glazyrin Y.E., Krat A.V., Zubkova O., Spivak E., Wehbe M., Gargaun A., Muharemagic D., Komarova M., Grigorieva V., Savchenko A., Modestov A.A., Berezovski M.V., Zamay A.S. Aptamers Selected to Postoperative Lung Adenocarcinoma Detect Circulating Tumor Cells in Human Blood//Molecular Therapy, 2015, Vol. 23, No. 9,
P. 1486-1496.
40. Lee H., Shin T.-H., Cheon J., Weissleder R. Recent Developments in Magnetic Diagnostic Systems//Chemical Reviews, 2015, Vol. 115, No. 19, P.10690-10724.
41. Lakhin A.V., Tarantul V.Z., Gening L.V. Aptamers: problems, solutions and prospects//Acta Naturae, 2013, Vol.5, Aptamers, No. 4, P. 34-43.
42. Brody E.N., Gold L. Aptamers as therapeutic and diagnostic agents//Reviews in Molecular Biotechnology, 2000, Vol. 74, No. 1, P. 5-13.

43. Spiridonova V.A., Novikova T.M., Nikulina D.M., Shishkina T.A., Golubkina E.V., Dyukareva O.S., Trizno N.N. Complex formation with protamine prolongs the thrombin-inhibiting effect of DNA aptamer in vivo//Biochimie, 2018, Vol. 145, P.158-162.

44. Volk D., Lokesh G. Development of Phosphorothioate DNA and DNA Thioaptamers//Biomedicines, 2017, Vol. 5, No. 3, P.41.

45. Kruspe S., Giangrande P. Aptamer-siRNA Chimeras: Discovery, Progress, and Future Prospects//Biomedicines, 2017, Vol. 5, Aptamer-siRNA Chimeras, No.4, P. 45.

46. Seo H.B., Gu M.B. Aptamer-based sandwich-type biosensors//Journal of Biological Engineering, 2017, Vol. 11, No. 1, P. 11.

47. Zhou Y.-Y., Zhu G.-Q., Wang Y., Zheng J.-N., Ruan L.-Y., Cheng Z., Hu B., Fu S.-W., Zheng M.-H. Systematic review with network meta-analysis: statins and risk of hepatocellular carcinoma//Oncotarget, 2016, Vol. 7, Systematic review with network meta-analysis, No. 16, P. 21753-21762.

48. Yoon S., Rossi J.J. Emerging cancer-specific therapeutic aptamers//Current Opinion in Oncology, 2017, Vol. 29, No. 5, P. 366-374.

49. Berg K., Lange T., Mittelberger F., Schumacher U., Hahn U. Selection and Characterization of an α6β4 Integrin blocking DNA Aptamer//Molecular Therapy - Nucleic Acids, 2016, Vol. 5, P. e294.

50. Dunn M.R., Jimenez R.M., Chaput J.C. Analysis of aptamer discovery and technology//Nature Reviews Chemistry, 2017, Vol. 1, No. 10, P. 0076.

51. Ashrafuzzaman Md. Aptamers as Both Drugs and Drug-Carriers//BioMed Research International, 2014, Vol. 2014, P. 1-21.

52. Morrissey D.V., Blanchard K., Shaw L., Jensen K., Lockridge J.A., Dickinson B., McSwiggen J.A., Vargeese C., Bowman K., Shaffer C.S., Polisky B.A., Zinnen S. Activity of stabilized short interfering RNA in a mouse model of hepatitis B virus replication//Hepatology, 2005, Vol. 41, No.6, P.1349-1356.

53. Abeydeera N.D., Egli M., Cox N., Mercier K., Conde J.N., Pallan P.S., Mizurini D.M., Sierant M., Hibti F.-E., Hassell T., Wang T., Liu F.-W., Liu H.-M., Martinez C., Sood A.K., Lybrand T.P., Frydman C., Monteiro R.Q., Gomer R.H., Nawrot B., Yang X. Evoking picomolar binding in RNA by a single phosphorodithioate linkage//Nucleic Acids Research, 2016, Vol. 44, No. 17, P. 8052-8064.

54. Ni S., Yao H., Wang L., Lu J., Jiang F., Lu A., Zhang G. Chemical Modifications of Nucleic Acid Aptamers for Therapeutic Purposes//International Journal of Molecular Sciences, 2017, Vol. 18, No. 8, P. 1683.

55. Ashley S.L., Xia M., Murray S., O'Dwyer D.N., Grant E., White E.S., Flaherty K.R., Martinez F.J., Moore B.B. Six-SOMAmer Index Relating to Immune, Protease and Angiogenic Functions Predicts Progression in IPF//PLOS ONE, 2016, Vol. 11, No. 8, P. e0159878.

56. Gilbert J.C., DeFeo-Fraulini T., Hutabarat R.M., Horvath C.J., Merlino P.G., Marsh H.N., Healy J.M., BouFakhreddine S., Holohan T.V., Schaub R.G. First-in-Human Evaluation of Anti–von Willebrand Factor Therapeutic Aptamer ARC1779 in Healthy Volunteers//Circulation, 2007, Vol. 116, No. 23, P. 2678-2686.

57. Hoellenriegel J., Zboralski D., Maasch C., Rosin N.Y., Wierda W.G., Keating M.J., Kruschinski A., Burger J.A. The Spiegelmer NOX-A12, a novel CXCL12 inhibitor, interferes with chronic lymphocytic leukemia cell motility and causes chemosensitization//Blood, 2014, Vol. 123, No. 7, P. 1032-1039.

58. Kaur H., Bruno J.G., Kumar A., Sharma T.K. Aptamers in the Therapeutics and Diagnostics Pipelines//Theranostics, 2018, Vol. 8, No. 15, P. 4016-4032.

59. Chen C.T., Kesselheim A.S. Journey of Generic Imatinib: A Case Study in Oncology Drug Pricing//Journal of Oncology Practice, 2017, Vol. 13, Journey of Generic Imatinib, No. 6, P. 352-355.

60. Grissom C.B. Magnetic Field Effects in Biology: A Survey of Possible Mechanisms with Emphasis on Radical-Pair Recombination//Chemical Reviews, 1995, Vol. 95, Magnetic Field Effects in Biology, No. 1, P. 3-24.

61. Sahoo S.K., Labhasetwar V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging//Drug Discovery Today, 2003, Vol. 8, No. 24, P. 1112-1120.
62. Veiseh O., Gunn J.W., Zhang M. Design and fabrication of magnetic nanoparticles for targeted drug delivery and imaging//Advanced Drug Delivery Reviews, 2010, Vol. 62, No. 3, P. 284-304.
63. Mornet S., Vasseur S., Grasset F., Veverka P., Goglio G., Demourgues A., Portier J., Pollert E., Duguet E. Magnetic nanoparticle design for medical applications//Progress in Solid State Chemistry, 2006, Vol. 34, No. 2-4, P. 237-247.
64. Wankhede M., Bouras A., Kaluzova M., Hadjipanayis C.G. Magnetic nanoparticles: an emerging technology for malignant brain tumor imaging and therapy//Expert Review of Clinical Pharmacology, 2012, Vol. 5, Magnetic nanoparticles, No. 2, P. 173-186.
65. Kim D.-H., Rozhkova E.A., Ulasov I.V., Bader S.D., Rajh T., Lesniak M.S., Novosad V. Biofunctionalized magnetic-vortex microdiscs for targeted cancer-cell destruction//Nature Materials, 2010, Vol. 9, No. 2, P. 165-171.
66. Kim P.D., Zamay S.S., Zamay T.N., Prokopenko V.S., Kolovskaya O.S., Zamay G.S., Princ V.Ya., Seleznev V.A., Komonov A.I., Spivak E.A., Rudenko R.Yu., Dubinina A.V., Komarov A.V., Denisenko V.V., Komarova M.A., Sokolov A.E., Narodov A.A., Zjivaev V.P., Zamay A.S. The antitumor effect of magnetic nanodisks and DNA aptamer conjugates//Doklady Biochemistry and Biophysics, 2016, Vol. 466, No. 1, P. 66-69.
67. Zamay T.N., Zamay G.S., Belyanina I.V., Zamay S.S., Denisenko V.V., Kolovskaya O.S., Ivanchenko T.I., Grigorieva V.L., Garanzha I.V., Veprintsev D.V., Glazyrin Y.E., Shabanov A.V., Prinz V.Y., Seleznev V.A., Sokolov A.E., Prokopenko V.S., Kim P.D., Gargaun A., Berezovski M.V., Zamay A.S. Noninvasive Microsurgery Using Aptamer-Functionalized Magnetic Microdisks for Tumor Cell Eradication//Nucleic Acid Therapeutics, 2017, Vol. 27, No.2, P. 105-114.

68. Hughes S., McBain S., Dobson J., El Haj A.J. Selective activation of mechanosensitive ion channels using magnetic particles//Journal of The Royal Society Interface, 2008, Vol. 5, No. 25, P.855-863.

69. Belyanina I.V., Zamay T.N., Zamay G.S., Zamay S.S., Kolovskaya O.S., Ivanchenko T.I., Denisenko V.V., Kirichenko A.K., Glazyrin Y.E., Garanzha I.V., Grigorieva V.V., Shabanov A.V., Veprintsev D.V., Sokolov A.E., Sadovskii V.M., Gargaun A., Berezovski M.V., Kichkailo A.S. *In Vivo* Cancer Cells Elimination Guided by Aptamer-Functionalized Gold-Coated Magnetic Nanoparticles and Controlled with Low Frequency Alternating Magnetic Field//Theranostics, 2017, Vol. 7, No. 13, P. 3326-3337.

70. Klyachko N.L., Sokolsky-Papkov M., Pothayee N., Efremova M.V., Gulin D.A., Pothayee N., Kuznetsov A.A., Majouga A.G., Riffle J.S., Golovin Y.I., Kabanov A.V. Changing the Enzyme Reaction Rate in Magnetic Nanosuspensions by a Non-Heating Magnetic Field//Angewandte Chemie, 2012, Vol. 124, No. 48, P. 12182-12185.

71. Nappini S., Bonini M., Ridi F., Baglioni P. Structure and permeability of magnetoliposomes loaded with hydrophobic magnetic nanoparticles in the presence of a low frequency magnetic field//Soft Matter, 2011, Vol. 7, No. 10, P. 4801.

72. Kim D.-H., Karavayev P., Rozhkova E.A., Pearson J., Yefremenko V., Bader S.D., Novosad V. Mechanoresponsive system based on sub-micron chitosan-functionalized ferromagnetic disks//Journal of Materials Chemistry, 2011, Vol. 21, No. 23, P. 8422.

73. Zamay T.N., Zamay G.S., Belyanina I.V., Zamay S.S., Denisenko V.V., Kolovskaya O.S., Ivanchenko T.I., Grigorieva V.L., Garanzha I.V., Veprintsev D.V., Glazyrin Y.E., Shabanov A.V., Prinz V.Y., Seleznev V.A., Sokolov A.E., Prokopenko V.S., Kim P.D., Gargaun A., Berezovski M.V., Zamay A.S. Noninvasive Microsurgery Using Aptamer-Functionalized Magnetic Microdisks for Tumor Cell Eradication//Nucleic Acid Therapeutics, 2017, Vol. 27, No. 2,

P. 105-114.
74. Nikiforov V.N., Ignatenko A.N., Irhin V.Yu. Magnetism of magnetite nanoparticles: Effects of finite size and coating//Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics, 2014, Vol. 78, Magnetism of magnetite nanoparticles, No. 10, P. 1081-1085.
75. Hurd C.M. Varieties of magnetic order in solids//Contemporary Physics, 1982, Vol. 23, No. 5, P. 469-493.
76. Berry C.C., Curtis A.S.G. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine//Journal of Physics D: Applied Physics, 2003, Vol. 36, No. 13, P. R198-R206.
77. Lu H.M., Zheng W.T., Jiang Q. Saturation magnetization of ferromagnetic and ferrimagnetic nanocrystals at room temperature//Journal of Physics D: Applied Physics, 2007, Vol. 40, No. 2, P. 320-325.
78. Park J.-H., von Maltzahn G., Zhang L., Derfus A.M., Simberg D., Harris T.J., Ruoslahti E., Bhatia S.N., Sailor M.J. Systematic Surface Engineering of Magnetic Nanoworms for In vivo Tumor Targeting//Small, 2009, Vol. 5, No. 6, P. 694-700.
79. Petit C., Russier V., Pileni M.P. Effect of the Structure of Cobalt Nanocrystal Organization on the Collective Magnetic Properties//The Journal of Physical Chemistry B, 2003, Vol. 107, No. 38, P. 10333-10336.
80. Gao N., Wang H., Yang E.-H. An experimental study on ferromagnetic nickel nanowires functionalized with antibodies for cell separation//Nanotechnology, 2010, Vol. 21, No. 10, P. 05107.
81. Lin W.-S., Lin H.-M., Chen H.-H., Hwu Y.-K., Chiou Y.-J. Shape Effects of Iron Nanowires on Hyperthermia Treatment//Journal of Nanomaterials, 2013, Vol. 2013, P. 1-6.
82. Banerjee I.A., Yu L., Shima M., Yoshino T., Takeyama H., Matsunaga T., Matsui H. Magnetic Nanotube Fabrication by Using Bacterial Magnetic Nanocrystals//Advanced Materials, 2005, Vol. 17, No. 9, P. 1128-1131.

83. Balaev D.A., Dubrovskii A.A., Krasikov A.A., Stolyar S.V., Iskhakov R.S., Ladygina V.P., Khilazheva E.D. Mechanism of the formation of an uncompensated magnetic moment in bacterial ferrihydrite nanoparticles//JETP Letters, 2013, Vol. 98, No. 3, P. 139-142.
84. Nair M., Guduru R., Liang P., Hong J., Sagar V., Khizroev S. Externally controlled on-demand release of anti-HIV drug using magneto-electric nanoparticles as carriers//Nature Communications, 2013, Vol. 4, No. 1, P. 1707.
85. Guduru R., Liang P., Runowicz C., Nair M., Atluri V., Khizroev S. Magneto-electric Nanoparticles to Enable Field-controlled High-Specificity Drug Delivery to Eradicate Ovarian Cancer Cells//Scientific Reports, 2013, Vol. 3, No. 1, P. 2953.
86. Kaushik A., Jayant R.D., Nikkhah-Moshaie R., Bhardwaj V., Roy U., Huang Z., Ruiz A., Yndart A., Atluri V., El-Hage N., Khalili K., Nair M. Magnetically guided central nervous system delivery and toxicity evaluation of magneto-electric nanocarriers//Scientific Reports, 2016, Vol. 6, No. 1, P. 25309.
87. Yu M.K., Jeong Y.Y., Park J., Park S., Kim J.W., Min J.J., Kim K., Jon S. Drug Loaded Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Combined Cancer Imaging and Therapy In Vivo//Angewandte Chemie International Edition, 2008, Vol. 47, No. 29, P. 5362-5365.
88. Markides H., Rotherham M., El Haj A.J. Biocompatibility and Toxicity of Magnetic Nanoparticles in Regenerative Medicine//Journal of Nanomaterials, 2012, Vol. 2012, P. 1-11.
89. Kayal S., Ramanujan R.V. Anti-Cancer Drug Loaded Iron–Gold Core–Shell Nanoparticles (FeAu) for Magnetic Drug Targeting//Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2010, Vol.10, No. 9, P. 5527-5539.
90. Likhitkar S., Bajpai A.K. Magnetically controlled release of cisplatin from superparamagnetic starch nanoparticles//Carbohydrate Polymers, 2012, Vol. 87, No. 1, P. 300-308.

91. Reddy L.H., Arias J.L., Nicolas J., Couvreur P. Magnetic Nanoparticles: Design and Characterization, Toxicity and Biocompatibility, Pharmaceutical and Biomedical Applications//Chemical Reviews, 2012, Vol. 112, Magnetic Nanoparticles, No. 11, P. 5818-5878.
92. Xie J., Yan C., Yan Y., Chen L., Song L., Zang F., An Y., Teng G., Gu N., Zhang Y. Multi-modal Mn–Zn ferrite nanocrystals for magnetically-induced cancer targeted hyperthermia: a comparison of passive and active targeting effects//Nanoscale, 2016, Vol. 8, Multi-modal Mn–Zn ferrite nanocrystals for magnetically-induced cancer targeted hyperthermia, No. 38, P. 16902-16915.
93. Wu W., Wu Z., Yu T., Jiang C., Kim W.-S. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications//Science and Technology of Advanced Materials, 2015, Vol. 16, Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles, No. 2, P. 023501.
94. Pankhurst Q.A., Connolly J., Jones S.K., Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine//Journal of Physics D: Applied Physics, 2003, Vol. 36, No. 13, P. R167-R181.
95. Cheraghipour E., Tamaddon A.M., Javadpour S., Bruce I.J. PEG conjugated citrate-capped magnetite nanoparticles for biomedical applications//Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2013, Vol. 328, P. 91-95.
96. Wainaina J., Kim N.H., Kim J., Jin M., Park S.H. Synthesis of Magnetite/Amphiphilic Polymer Composite Nanoparticles as Potential Theragnostic Agents//Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2012, Vol. 12, No. 7, P. 5920-5924.
97. Clement J.H., Schwalbe M., Buske N., Wagner K., Schnabelrauch M., Görnert P., Kliche K.O., Pachmann K., Weitschies W., Höffken K. Differential interaction of magnetic nanoparticles with tumor cells and peripheral blood cells//Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2006, Vol. 132, No. 5, P. 287-292.

98. Zhang Y., Zhang J. Surface modification of monodisperse magnetite nanoparticles for improved intracellular uptake to breast cancer cells//Journal of Colloid and Interface Science, 2005, Vol. 283, No. 2, P. 352-357.
99. Bhattarai S.R., Kc R.B., Kim S.Y., Sharma M., Khil M.S., Hwang P.H., Chung G.H., Kim H.Y. N-hexanoyl chitosan stabilized magnetic nanoparticles: Implication for cellular labeling and magnetic resonance imaging//Journal of Nanobiotechnology, 2008, Vol. 6, N-hexanoyl chitosan stabilized magnetic nanoparticles, No. 1, P. 1.
100. Kim J.-S., Yoon T.-J., Yu K.-N., Noh M.S., Woo M., Kim B.-G., Lee K.-H., Sohn B.-H., Park S.-B., Lee J.-K., Cho M.-H. Cellular uptake of magnetic nanoparticle is mediated through energy-dependent endocytosis in A549 cells//Journal of Veterinary Science, 2006, Vol. 7, No. 4, P. 321.
101. Nicolás P., Saleta M., Troiani H., Zysler R., Lassalle V., Ferreira M.L. Preparation of iron oxide nanoparticles stabilized with biomolecules: Experimental and mechanistic issues//Acta Biomaterialia, 2013, Vol. 9, Preparation of iron oxide nanoparticles stabilized with biomolecules, No. 1, P. 4754-4762.
102. Shen K., Wang J., Li Y., Wang Y., Li Y. Preparation of magnetite core–shell nanoparticles of Fe3O4 and carbon with aryl sulfonyl acetic acid//Materials Research Bulletin, 2013, Vol. 48, No. 11, P. 4655-4660.
103. Fajaroh F., Setyawan H., Nur A., Lenggoro I.W. Thermal stability of silica-coated magnetite nanoparticles prepared by an electrochemical method//Advanced Powder Technology, 2013, Vol. 24, No. 2, P. 507-511.
104. Iglesias-Silva E., Rivas J., León Isidro L.M., López-Quintela M.A. Synthesis of silver-coated magnetite nanoparticles//Journal of Non-Crystalline Solids, 2007, Vol. 353, No. 8-10, P. 829-831.
105. Harris J.M., Chess R.B. Effect of pegylation on pharmaceuticals//Nature Reviews Drug Discovery, 2003, Vol. 2, No. 3, P. 214-221.

106. Zhang Y., Kohler N., Zhang M. Surface modification of superparamagnetic magnetite nanoparticles and their intracellular uptake//Biomaterials, 2002, Vol. 23, No. 7, P. 1553-1561.
107. Maslakci N.N., Ulusoy S., Uygun E., Çevikbaş H., Oksuz L., Can H.K., Uygun Oksuz A. Ibuprofen and acetylsalicylic acid loaded electrospun PVP-dextran nanofiber mats for biomedical applications//Polymer Bulletin, 2017, Vol. 74, No. 8, P. 3283-3299.
108. Sun C., Lee J.S.H., Zhang M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery//Advanced Drug Delivery Reviews, 2008, Vol. 60, No. 11, P. 1252-1265.
109. Fortin-Ripoche J.-P., Martina M.S., Gazeau F., Ménager C., Wilhelm C., Bacri J.-C., Lesieur S., Clément O. Magnetic Targeting of Magnetoliposomes to Solid Tumors with MR Imaging Monitoring in Mice: Feasibility//Radiology, 2006, Vol. 239, Magnetic Targeting of Magnetoliposomes to Solid Tumors with MR Imaging Monitoring in Mice, No. 2, P. 415-424.
110. Tiwari P., Vig K., Dennis V., Singh S. Functionalized Gold Nanoparticles and Their Biomedical Applications//Nanomaterials, 2011, Vol. 1, No. 1, P. 31-63.
111. Silva S.M., Sampaio K.A., Ceriani R., Verhé R., Stevens C., De Greyt W., Meirelles A.J.A. Adsorption of carotenes and phosphorus from palm oil onto acid activated bleaching earth: Equilibrium, kinetics and thermodynamics//Journal of Food Engineering, 2013, Vol. 118, Adsorption of carotenes and phosphorus from palm oil onto acid activated bleaching earth, No. 4, P. 341-349.
112. Shah B.P., Pasquale N., De G., Tan T., Ma J., Lee K.-B. Core–Shell Nanoparticle-Based Peptide Therapeutics and Combined Hyperthermia for Enhanced Cancer Cell Apoptosis//ACS Nano, 2014, Vol. 8, No. 9, P. 9379-9387.
113. Xing Y., Zhao J., Conti P.S., Chen K. Radiolabeled Nanoparticles for Multimodality Tumor Imaging//Theranostics, 2014, Vol. 4, No. 3, P. 290-306.
114. Gleich B., Weizenecker J. Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles//Nature, 2005, Vol. 435, No. 7046, P. 1214-1217.

115. Goodwill P.W., Saritas E.U., Croft L.R., Kim T.N., Krishnan K.M., Schaffer D.V., Conolly S.M. X-Space MPI: Magnetic Nanoparticles for Safe Medical Imaging//Advanced Materials, 2012, Vol. 24, X-Space MPI, No. 28, P. 3870-3877.

116. Gleich B. Principles and Applications of Magnetic Particle Imaging. – Wiesbaden: Springer Fachmedien Wiesbaden, 2014.

117. Panagiotopoulos N., Vogt F., Barkhausen J., Buzug T.M., Duschka R.L., Lüdtke-Buzug K., Ahlborg M., Bringout G., Debbeler C., Gräser M., Kaethner C., Stelzner J., Medimagh H., Haegele J. Magnetic particle imaging: current developments and future directions//International Journal of Nanomedicine, 2015, Magnetic particle imaging, P. 3097.

118. Gilchrist R.K., Medal R., Shorey W.D., Hanselman R.C., Parrott J.C., Taylor C.B. Selective Inductive Heating of Lymph Nodes://Annals of Surgery, 1957, Vol. 146, Selective Inductive Heating of Lymph Nodes, No. 4, P. 596-606.

119. Kumar C.S.S.R., Mohammad F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery//Advanced Drug Delivery Reviews, 2011, Vol. 63, No. 9, P. 789-808.

120. Hergt R., Dutz S. Magnetic particle hyperthermia—biophysical limitations of a visionary tumour therapy//Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2007, Vol. 311, No. 1, P. 187-192.

121. Gazeau F., Lévy M., Wilhelm C. Optimizing magnetic nanoparticle design for nanothermotherapy//Nanomedicine, 2008, Vol. 3, No. 6, P. 831-844.

122. Gordon R.T., Hines J.R., Gordon D. Intracellular hyperthermia a biophysical approach to cancer treatment via intracellular temperature and biophysical alterations//Medical Hypotheses, 1979, Vol. 5, No.1, P. 83-102.

123. Xu Y., Mahmood M., Li Z., Dervishi E., Trigwell S., Zharov V.P., Ali N., Saini V., Biris A.R., Lupu D., Boldor D., Biris A.S. Cobalt nanoparticles coated with graphitic shells as localized radio frequency absorbers for cancer therapy//Nanotechnology, 2008, Vol. 19, No. 43, P. 435102.

124. Gupta A., Kane R.S., Borca-Tasciuc D.-A. Local temperature measurement in the vicinity of electromagnetically heated magnetite and gold nanoparticles//Journal of Applied Physics, 2010, Vol. 108, No.6, P. 064901.
125. Astefanoaei I., Dumitru I., Chiriac H., Stancu A. Thermofluid Analysis in Magnetic Hyperthermia Using Low Curie Temperature Particles//IEEE Transactions on Magnetics, 2016, Vol. 52, No. 7, P.1-5.
126. Pankhurst Q.A., Thanh N.T.K., Jones S.K., Dobson J. Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine//Journal of Physics D: Applied Physics, 2009, Vol. 42, No. 22, P. 224001.
127. Dobson J. Remote control of cellular behaviour with magnetic nanoparticles//Nature Nanotechnology, 2008, Vol. 3, No. 3, P. 139-143.
128. Hu B., Haj A., Dobson J. Receptor-Targeted, Magneto-Mechanical Stimulation of Osteogenic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells//International Journal of Molecular Sciences, 2013, Vol. 14, No.9, P. 19276-19293.
129. Hu B., Dobson J., El Haj A.J. Control of smooth muscle α-actin (SMA) up-regulation in HBMSCs using remote magnetic particle mechano-activation//Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2014, Vol. 10, No. 1, P. 45-55.
130. Kanczler J.M., Sura H.S., Magnay J., Green D., Oreffo R.O.C., Dobson J.P., El Haj A.J. Controlled Differentiation of Human Bone Marrow Stromal Cells Using Magnetic Nanoparticle Technology//Tissue Engineering Part A, 2010, Vol. 16, No. 10, P. 3241-3250.
131. Golovin Yu.I., Klyachko N.L., Golovin D.Yu., Efremova M.V., Samodurov A.A., Sokolski-Papkov M., Kabanov A.V. A new approach to the control of biochemical reactions in a magnetic nanosuspension using a low-frequency magnetic field//Technical Physics Letters, 2013, Vol. 39, No. 3, P. 240-243.

132. Vitol E.A., Novosad V., Rozhkova E.A. Microfabricated magnetic structures for future medicine: from sensors to cell actuators//Nanomedicine, 2012, Vol. 7, Microfabricated magnetic structures for future medicine, No. 10, P. 1611-1624.
133. Vitol E.A., Yefremenko V.G., Jain S., Pearson J., Rozhkova E.A., Bader S.D., Novosad V. Optical transmission modulation by disk-shaped ferromagnetic particles//Journal of Applied Physics, 2012, Vol. 111, No.ь 7, P. 07A945.
134. Cullity B.D. Introduction to magnetic materials. – Reading (Mass.) [etc.]: Addison-Wesley publ, 1972.
135. Орлов В.А., Прокопенко В.С., Руденко Р.Ю., Орлова И.Н. Влияние механических напряжений на структуру намагниченности трехслойных наноразмерных дисков//Физика металлов и металловедение, 2020, Vol. 121, No. 11, P. 1135-1141.
136. Zugazagoitia J., Guedes C., Ponce S., Ferrer I., Molina-Pinelo S., Paz-Ares L. Current Challenges in Cancer Treatment//Clinical Therapeutics, 2016, Vol. 38, No. 7, P. 1551-1566.
137. Kim B., Yang J., Lee Y.H., Kim M.-H., Heo D., Lee E., Suh J.-S., Haam S., Huh Y.-M. Compensatory UTE/T2W Imaging of Inflammatory Vascular Wall in Hyperlipidemic Rabbits//PLOS ONE, 2015, Vol. 10, No. 5, P. e0124572.
138. Engel B.N., Akerman J., Butcher B., Dave R.W., DeHerrera M., Durlam M., Grynkewich G., Janesky J., Pietambaram S.V., Rizzo N.D., Slaughter J.M., Smith K., Sun J.J., Tehrani S. A 4-Mb toggle MRAM based on a novel bit and switching method//IEEE Transactions on Magnetics, 2005, Vol. 41, No. 1, P. 132-136.
139. Hu W., Wilson R.J., Koh A., Fu A., Faranesh A.Z., Earhart C.M., Osterfeld S.J., Han S.-J., Xu L., Guccione S., Sinclair R., Wang S.X. High-Moment Antiferromagnetic Nanoparticles with Tunable Magnetic Properties//Advanced Materials, 2008, Vol. 20, No. 8, P. 1479-1483.
140. Hu W., Wilson R.J., Earhart C.M., Koh A.L., Sinclair R., Wang S.X. Synthetic antiferromagnetic nanoparticles with tunable susceptibilities//Journal of Applied Physics, 2009, Vol. 105, No. 7, P. 07B508.

141. Joisten H., Courcier T., Balint P., Sabon P., Faure-Vincent J., Auffret S., Dieny B. Self-polarization phenomenon and control of dispersion of synthetic antiferromagnetic nanoparticles for biological applications//Applied Physics Letters, 2010, Vol. 97, No. 25, P. 253112.
142. Courcier T., Joisten H., Sabon P., Leulmi S., Dietsch T., Faure-Vincent J., Auffret S., Dieny B. Tumbling motion yielding fast displacements of synthetic antiferromagnetic nanoparticles for biological applications//Applied Physics Letters, 2011, Vol. 99, No. 9, P. 093107.
143. Vemulkar T., Mansell R., Petit D.C.M.C., Cowburn R.P., Lesniak M.S. Highly tunable perpendicularly magnetized synthetic antiferromagnets for biotechnology applications//Applied Physics Letters, 2015, Vol. 107, No. 1, P. 012403.
144. Goiriena-Goikoetxea M., Muñoz D., Orue I., Fernández-Gubieda M.L., Bokor J., Muela A., García-Arribas A. Disk-shaped magnetic particles for cancer therapy//Applied Physics Reviews, 2020, Vol. 7, No. 1, P. 011306.
145. Kim D.-H., Rozhkova E.A., Ulasov I.V., Bader S.D., Rajh T., Lesniak M.S., Novosad V. Biofunctionalized magnetic-vortex microdiscs for targeted cancer-cell destruction//Nature Materials, 2010, Vol. 9, No. 2, P. 165-171.
146. Cowburn R.P., Koltsov D.K., Adeyeye A.O., Welland M.E., Tricker D.M. Single-Domain Circular Nanomagnets//Physical Review Letters, 1999, Vol. 83, No. 5, P. 1042-1045.
147. Guslienko K.Yu., Novosad V., Otani Y., Shima H., Fukamichi K. Field evolution of magnetic vortex state in ferromagnetic disks//Applied Physics Letters, 2001, Vol. 78, No. 24, P. 3848-3850.
148. Wong D.W., Gan W.L., Liu N., Lew W.S. Magneto-actuated cell apoptosis by biaxial pulsed magnetic field//Scientific Reports, 2017, Vol. 7, No. 1, P. 10919.
149. Leulmi S., Joisten H., Dietsch T., Iss C., Morcrette M., Auffret S., Sabon P., Dieny B. Comparison of dispersion and actuation properties of vortex and

synthetic antiferromagnetic particles for biotechnological applications//Applied Physics Letters, 2013, Vol. 103, No. 13, P. 132412.
150. Goiriena-Goikoetxea M., García-Arribas A., Rouco M., Svalov A.V., Barandiaran J.M. High-yield fabrication of 60 nm Permalloy nanodiscs in well-defined magnetic vortex state for biomedical applications//Nanotechnology, 2016, Vol. 27, No. 17, P. 175302.
151. Scholz W., Guslienko K.Y., Novosad V., Suess D., Schrefl T., Chantrell R.W., Fidler J. Transition from single-domain to vortex state in soft magnetic cylindrical nanodots//Journal of Magnetism and Magnetic Materials, 2003, Vol. 266, No. 1-2, P. 155-163.
152. Koh A.L., Hu W., Wilson R.J., Earhart C.M., Wang S.X., Sinclair R. Structural and magnetic characterizations of high moment synthetic antiferromagnetic nanoparticles fabricated using self-assembled stamps//Journal of Applied Physics, 2010, Vol. 107, No. 9, P. 09B522.
153. Moritz J., Dieny B., Nozières J.P., Landis S., Lebib A., Chen Y. Domain structure in magnetic dots prepared by nanoimprint and e-beam lithography//Journal of Applied Physics, 2002, Vol. 91, No. 10, P. 7314.
154. Illi B., Scopece A., Nanni S., Farsetti A., Morgante L., Biglioli P., Capogrossi M.C., Gaetano C. Epigenetic Histone Modification and Cardiovascular Lineage Programming in Mouse Embryonic Stem Cells Exposed to Laminar Shear Stress//Circulation Research, 2005, Vol. 96, No. 5, P. 501-508.
155. Stolberg S., McCloskey K.E. Can shear stress direct stem cell fate?//Biotechnology Progress, 2009, Vol. 25, No. 1, P. 10-19.
156. Engler A.J., Sen S., Sweeney H.L., Discher D.E. Matrix Elasticity Directs Stem Cell Lineage Specification//Cell, 2006, Vol. 126, No. 4, P. 677-689.
157. Rozhkova E.A., Novosad V., Kim D.-H., Pearson J., Divan R., Rajh T., Bader S.D. Ferromagnetic microdisks as carriers for biomedical applications//Journal of Applied Physics, 2009, Vol. 105, No. 7, P. 07B306.

158. Leulmi S., Chauchet X., Morcrette M., Ortiz G., Joisten H., Sabon P., Livache T., Hou Y., Carrière M., Lequien S., Dieny B. Triggering the apoptosis of targeted human renal cancer cells by the vibration of anisotropic magnetic particles attached to the cell membrane//Nanoscale, 2015, Vol. 7, No. 38, P. 15904-15914.
159. Cheng Y., Muroski M.E., Petit D.C.M.C., Mansell R., Vemulkar T., Morshed R.A., Han Y., Balyasnikova I.V., Horbinski C.M., Huang X., Zhang L., Cowburn R.P., Lesniak M.S. Rotating magnetic field induced oscillation of magnetic particles for in vivo mechanical destruction of malignant glioma//Journal of Controlled Release, 2016, Vol. 223, P. 75-84.
160. Muroski M.E., Morshed R.A., Cheng Y., Vemulkar T., Mansell R., Han Y., Zhang L., Aboody K.S., Cowburn R.P., Lesniak M.S. Controlled Payload Release by Magnetic Field Triggered Neural Stem Cell Destruction for Malignant Glioma Treatment//PLOS ONE, 2016, Vol. 11, No. 1, P. e0145129.
161. Goiriena-Goikoetxea M., Guslienko K.Y., Rouco M., Orue I., Berganza E., Jaafar M., Asenjo A., Fernández-Gubieda M.L., Fernández Barquín L., García-Arribas A. Magnetization reversal in circular vortex dots of small radius//Nanoscale, 2017, Vol. 9, No. 31, P. 11269-11278.
162. Mansell R., Vemulkar T., Petit D.C.M.C., Cheng Y., Murphy J., Lesniak M.S., Cowburn R.P. Magnetic particles with perpendicular anisotropy for mechanical cancer cell destruction//Scientific Reports, 2017, Vol. 7, No. 1, P. 4257.
163. Sigurdson W., Ruknudin A., Sachs F. Calcium imaging of mechanically induced fluxes in tissue-cultured chick heart: role of stretch-activated ion channels//American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 1992, Vol. 262, Calcium imaging of mechanically induced fluxes in tissue-cultured chick heart, No. 4, P.H1110-H1115.
164. Martinac B. Mechanosensitive ion channels: molecules of mechanotransduction//Journal of Cell Science, 2004, Vol. 117, Mechanosensitive ion channels, No. 12, P. 2449-2460.

165. Ingber D.E. Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton//Journal of Cell Science, 1993, Vol. 104, Cellular tensegrity, No. 3, P. 613-627.
166. Wilhelm S., Tavares A.J., Dai Q., Ohta S., Audet J., Dvorak H.F., Chan W.C.W. Analysis of nanoparticle delivery to tumours//Nature Reviews Materials, 2016, Vol. 1, No. 5, P. 16014.
167. Decuzzi P., Godin B., Tanaka T., Lee S.-Y., Chiappini C., Liu X., Ferrari M. Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles//Journal of Controlled Release, 2010, Vol. 141, No. 3, P. 320-327.
168. Zamay G.S., Zamay T.N., Lukyanenko K.A., Kichkailo A.S. Aptamers Increase Biocompatibility and Reduce the Toxicity of Magnetic Nanoparticles Used in Biomedicine//Biomedicines, 2020, Vol. 8, No. 3, P. 59.
169. Carboni E., Tschudi K., Nam J., Lu X., Ma A.W.K. Particle Margination and Its Implications on Intravenous Anticancer Drug Delivery//AAPS PharmSciTech, 2014, Vol. 15, No. 3, P. 762-771.
170. Chauhan V.P., Popović Z., Chen O., Cui J., Fukumura D., Bawendi M.G., Jain R.K. Fluorescent Nanorods and Nanospheres for Real-Time In Vivo Probing of Nanoparticle Shape-Dependent Tumor Penetration//Angewandte Chemie International Edition, 2011, Vol. 50, No. 48, P. 11417-11420.
171. Ye H., Shen Z., Yu L., Wei M., Li Y. Manipulating nanoparticle transport within blood flow through external forces: an exemplar of mechanics in nanomedicine//Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 2018, Vol. 474, Manipulating nanoparticle transport within blood flow through external forces, No. 2211, P. 20170845.
172. Mody V.V., Cox A., Shah S., Singh A., Bevins W., Parihar H. Magnetic nanoparticle drug delivery systems for targeting tumor//Applied Nanoscience, 2014, Vol. 4, No. 4, P. 385-392.
173. Andrews N.C. Disorders of Iron Metabolism//New England Journal of Medicine, 1999, Vol. 341, No. 26, P. 1986-1995.

174. Mazuel F., Espinosa A., Luciani N., Reffay M., Le Borgne R., Motte L., Desboeufs K., Michel A., Pellegrino T., Lalatonne Y., Wilhelm C. Massive Intracellular Biodegradation of Iron Oxide Nanoparticles Evidenced Magnetically at Single-Endosome and Tissue Levels//ACS Nano, 2016, Vol. 10, No.8, P.7627-7638.

175. Magro M., Baratella D., Bonaiuto E., de A. Roger J., Vianello F. New Perspectives on Biomedical Applications of Iron Oxide Nanoparticles//Current Medicinal Chemistry, 2018, Vol. 25, No. 4, P. 540-555.

176. Aggarwal P., Hall J.B., McLeland C.B., Dobrovolskaia M.A., McNeil S.E. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy//Advanced Drug Delivery Reviews, 2009, Vol. 61, No. 6, P. 428-437.

177. Monopoli M.P., Walczyk D., Campbell A., Elia G., Lynch I., Baldelli Bombelli F., Dawson K.A. Physical−Chemical Aspects of Protein Corona: Relevance to *in Vitro* and *in Vivo* Biological Impacts of Nanoparticles//Journal of the American Chemical Society, 2011, Vol. 133, Physical−Chemical Aspects of Protein Corona, No. 8, P. 2525-2534.

178. Mahmoudi M., Azadmanesh K., Shokrgozar M.A., Journeay W.S., Laurent S. Effect of Nanoparticles on the Cell Life Cycle//Chemical Reviews, 2011, Vol. 111, No. 5, P. 3407-3432.

179. Begley D.J. Delivery of therapeutic agents to the central nervous system: the problems and the possibilities//Pharmacology & Therapeutics, 2004, Vol. 104, Delivery of therapeutic agents to the central nervous system, No. 1, P. 29-45.

180. Bareford L., Swaan P. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery☆//Advanced Drug Delivery Reviews, 2007, Vol. 59, No. 8, P. 748-758.

181. Wang J., Yang J., Yu K., Lv F., Huang T., Gong Y. Locality-constrained Linear Coding for image classification//2010 IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition 2010 IEEE Conference on Computer

Vision and Pattern Recognition (CVPR). – San Francisco, CA, USA: IEEE, 2010. – P. 3360-3367.

182. Kumar C.C., Madison V. AKT crystal structure and AKT-specific inhibitors//Oncogene, 2005, Vol. 24, No. 50, P. 7493-7501.

183. Horev-Azaria L., Baldi G., Beno D., Bonacchi D., Golla-Schindler U., Kirkpatrick J.C., Kolle S., Landsiedel R., Maimon O., Marche P.N., Ponti J., Romano R., Rossi F., Sommer D., Uboldi C., Unger R.E., Villiers C., Korenstein R. Predictive Toxicology of cobalt ferrite nanoparticles: comparative in-vitro study of different cellular models using methods of knowledge discovery from data//Particle and Fibre Toxicology, 2013, Vol. 10, Predictive Toxicology of cobalt ferrite nanoparticles, No. 1, P. 32.

184. Kumar Prabhakar P., Vijayaraghavan S., Philip J., Doble M. Biocompatibility Studies of Functionalized CoFe2O4 Magnetic Nanoparticles//Current Nanoscience, 2011, Vol. 7, No. 3, P. 371-376.

185. Feng Q., Liu Y., Huang J., Chen K., Huang J., Xiao K. Uptake, distribution, clearance, and toxicity of iron oxide nanoparticles with different sizes and coatings//Scientific Reports, 2018, Vol. 8, No. 1, P. 2082.

186. Kang S.J., Kim B.M., Lee Y.J., Chung H.W. Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes//Environmental and Molecular Mutagenesis, 2008, Vol. 49, No. 5, P. 399-405.

187. Xia T., Kovochich M., Brant J., Hotze M., Sempf J., Oberley T., Sioutas C., Yeh J.I., Wiesner M.R., Nel A.E. Comparison of the Abilities of Ambient and Manufactured Nanoparticles To Induce Cellular Toxicity According to an Oxidative Stress Paradigm//Nano Letters, 2006, Vol. 6, No. 8, P. 1794-1807.

188. Voinov M.A., Pagán J.O.S., Morrison E., Smirnova T.I., Smirnov A.I. Surface-Mediated Production of Hydroxyl Radicals as a Mechanism of Iron Oxide Nanoparticle Biotoxicity//Journal of the American Chemical Society, 2011, Vol. 133, No. 1, P.35-41.

189. Singh N., Jenkins G.J.S., Asadi R., Doak S.H. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION)//Nano Reviews, 2010, Vol. 1, No. 1, P. 5358.

190. Zamay G.S., Zamay T.N., Lukyanenko K.A., Kichkailo A.S. Aptamers Increase Biocompatibility and Reduce the Toxicity of Magnetic Nanoparticles Used in Biomedicine//Biomedicines, 2020, Vol. 8, No. 3, P. 59.

191. Mahmoudi M., Simchi A., Imani M., Shokrgozar M.A., Milani A.S., Häfeli U.O., Stroeve P. A new approach for the in vitro identification of the cytotoxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles//Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010, Vol. 75, No. 1, P. 300-309.

192. Kleibert A., Bulut F., Gebhardt R.K., Rosellen W., Sudfeld D., Passig J., Bansmann J., Meiwes-Broer K.H., Getzlaff M. Correlation of shape and magnetic anisotropy of supported mass-filtered Fe and FeCo alloy nanoparticles on W(110)//Journal of Physics: Condensed Matter, 2008, Vol. 20, No. 44, P. 445005.

193. Solanki A., Kim J.D., Lee K.-B. Nanotechnology for regenerative medicine: nanomaterials for stem cell imaging//Nanomedicine, 2008, Vol. 3, Nanotechnology for regenerative medicine, No. 4, P. 567-578.

194. Tadjiki S., Assemi S., Deering C.E., Veranth J.M., Miller J.D. Detection, separation, and quantification of unlabeled silica nanoparticles in biological media using sedimentation field-flow fractionation//Journal of Nanoparticle Research, 2009, Vol. 11, No. 4, P. 981-988.

195. Auffan M., Rose J., Bottero J.-Y., Lowry G.V., Jolivet J.-P., Wiesner M.R. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective//Nature Nanotechnology, 2009, Vol. 4, No. 10, P. 634-641.

196. Xue Y., Liu J., Chen H., Wang R., Li D., Qu J., Dai L. Nitrogen-Doped Graphene Foams as Metal-Free Counter Electrodes in High-Performance Dye-Sensitized Solar Cells//Angewandte Chemie International Edition, 2012, Vol. 51, No. 48, P. 12124-12127.

197. Wu P., Gao Y., Lu Y., Zhang H., Cai C. High specific detection and near-infrared photothermal therapy of lung cancer cells with high SERS active aptamer–silver–gold shell–core nanostructures//The Analyst, 2013, Vol. 138, No. 21, P. 6501.

198. Shin T.H., Lee D.Y., Ketebo A.A., Lee S., Manavalan B., Basith S., Ahn C., Kang S.H., Park S., Lee G. Silica-Coated Magnetic Nanoparticles Decrease Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cell Migratory Activity by Reducing Membrane Fluidity and Impairing Focal Adhesion//Nanomaterials, 2019, Vol. 9, No. 10, P. 1475.

199. Keshtkar M., Shahbazi-Gahrouei D., Khoshfetrat S.M., Mehrgardi M.A., Aghaei M. Aptamer-conjugated Magnetic Nanoparticles as Targeted Magnetic Resonance Imaging Contrast Agent for Breast Cancer//Journal of Medical Signals and Sensors, 2016, Vol. 6, No. 4, P. 243-247.

200. Naqvi, Naqvi, Samim M., Abdin M.Z, Ahmad F.J, prashant C.K, Dinda A. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress//International Journal of Nanomedicine, 2010, P. 983.

201. Heymer A., Haddad D., Weber M., Gbureck U., Jakob P.M., Eulert J., Nöth U. Iron oxide labelling of human mesenchymal stem cells in collagen hydrogels for articular cartilage repair//Biomaterials, 2008, Vol. 29, No. 10, P. 1473-1483.

202. Salado J., Insausti M., Lezama L., Gil de Muro I., Moros M., Pelaz B., Grazu V., de la Fuente J.M., Rojo T. Functionalized Fe_3O_4 Au superparamagnetic nanoparticles: *in vitro* bioactivity//Nanotechnology, 2012, Vol. 23, Functionalized Fe_3O_4 Au superparamagnetic nanoparticles, No. 31, P. 315102.

203. Ito A., Shinkai M., Honda H., Kobayashi T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles//Journal of Bioscience and Bioengineering, 2005, Vol. 100, No. 1, P. 1-11.

204. Mahmoudi M., Simchi A., Milani A.S., Stroeve P. Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles//Journal of Colloid and Interface Science, 2009, Vol. 336, No. 2, P. 510-518.

205. You X.-G., Tu R., Peng M.-L., Bai Y.-J., Tan M., Li H.-J., Guan J., Wen L.-J. Molecular magnetic resonance probe targeting VEGF165: preparation and *in vitro* and *in vivo* evaluation: MOLECULAR MRI PROBE TARGETING VEGF165//Contrast Media & Molecular Imaging, 2014, Vol. 9, Molecular magnetic resonance probe targeting VEGF165, No. 5, P. 349-354.

206. Azhdarzadeh M., Atyabi F., Saei A.A., Varnamkhasti B.S., Omidi Y., Fateh M., Ghavami M., Shanehsazzadeh S., Dinarvand R. Theranostic MUC-1 aptamer targeted gold coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging and photothermal therapy of colon cancer//Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2016, Vol. 143, P. 224-232.

207. Chen K.H., Choi J.H. Nanoparticle-Aptamer: An Effective Growth Inhibitor for Human Cancer Cells//Volume 2: Biomedical and Biotechnology Engineering ASME 2009 International Mechanical Engineering Congress and Exposition. – Lake Buena Vista, Florida, USA: ASMEDC, 2009. – Nanoparticle-Aptamer. – P. 271-272.

208. Gabbasov R.R., Cherepanov V.M., Chuev M.A., Polikarpov M.A., Nikitin M.P., Deyev S.M., Panchenko V.Y. Study of Nature of Paramagnetic Doublet in Mössbauer Spectra of Mice Liver Using External Magnetic Field//Solid State Phenomena, 2012, Vol. 190, P. 729-732.

209. Jain T.K., Reddy M.K., Morales M.A., Leslie-Pelecky D.L., Labhasetwar V. Biodistribution, Clearance, and Biocompatibility of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles in Rats//Molecular Pharmaceutics, 2008, Vol. 5, No. 2, P. 316-327.

210. Yan L., Zhang S., Chen P., Liu H., Yin H., Li H. Magnetotactic bacteria, magnetosomes and their application//Microbiological Research, 2012, Vol. 167, No. 9, P. 507-519.

211. Opanasopit P., Sakai M., Nishikawa M., Kawakami S., Yamashita F., Hashida M. Inhibition of liver metastasis by targeting of immunomodulators using

mannosylated liposome carriers//Journal of Controlled Release, 2002, Vol. 80, No. 1-3, P. 283-294.
212. Hare D., Ayton S., Bush A., Lei P. A delicate balance: Iron metabolism and diseases of the brain//Frontiers in Aging Neuroscience, 2013, Vol. 5, A delicate balance.
213. Weissleder R., Stark D., Engelstad B., Bacon B., Compton C., White D., Jacobs P., Lewis J. Superparamagnetic iron oxide: pharmacokinetics and toxicity//American Journal of Roentgenology, 1989, Vol. 152, Superparamagnetic iron oxide, No. 1, P. 167-173.
214. Bourrinet P., Bengele H.H., Bonnemain B., Dencausse A., Idee J.-M., Jacobs P.M., Lewis J.M. Preclinical Safety and Pharmacokinetic Profile of Ferumoxtran-10, an Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Magnetic Resonance Contrast Agent://Investigative Radiology, 2006, Vol. 41, Preclinical Safety and Pharmacokinetic Profile of Ferumoxtran-10, an Ultrasmall Superparamagnetic Iron Oxide Magnetic Resonance Contrast Agent, No. 3, P. 313-324.
215. Poller W.C., Pieber M., Boehm-Sturm P., Ramberger E., Karampelas V., Möller K., Schleicher M., Wiekhorst F., Löwa N., Wagner S., Schnorr J., Taupitz M., Stangl K., Stangl V., Ludwig A. Very small superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Long-term fate and metabolic processing in atherosclerotic mice//Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, 2018, Vol. 14, Very small superparamagnetic iron oxide nanoparticles, No. 8, P. 2575-2586.
216. Mejías R., Gutiérrez L., Salas G., Pérez-Yagüe S., Zotes T.M., Lázaro F.J., Morales M.P., Barber D.F. Long term biotransformation and toxicity of dimercaptosuccinic acid-coated magnetic nanoparticles support their use in biomedical applications//Journal of Controlled Release, 2013, Vol. 171, No. 2, P. 225-233.
217. Kolosnjaj-Tabi J., Gibot L., Fourquaux I., Golzio M., Rols M.-P. Electric field-responsive nanoparticles and electric fields: physical, chemical, biological

mechanisms and therapeutic prospects//Advanced Drug Delivery Reviews, 2019, Vol. 138, Electric field-responsive nanoparticles and electric fields, P. 56-67.
218. Kreyling W.G., Abdelmonem A.M., Ali Z., Alves F., Geiser M., Haberl N., Hartmann R., Hirn S., de Aberasturi D.J., Kantner K., Khadem-Saba G., Montenegro J.-M., Rejman J., Rojo T., de Larramendi I.R., Ufartes R., Wenk A., Parak W.J. In vivo integrity of polymer-coated gold nanoparticles//Nature Nanotechnology, 2015, Vol. 10, No. 7, P. 619-623.
219. Briceño S., Suarez J., Gonzalez G. Solvothermal synthesis of cobalt ferrite hollow spheres with chitosan//Materials Science and Engineering: C, 2017, Vol. 78, P. 842-846.
220. Berezovski M.V., Lechmann M., Musheev M.U., Mak T.W., Krylov S.N. Aptamer-Facilitated Biomarker Discovery (AptaBiD)//Journal of the American Chemical Society, 2008, Vol. 130, No. 28, P. 9137-9143.
221. Popowicz G.M., Schleicher M., Noegel A.A., Holak T.A. Filamins: promiscuous organizers of the cytoskeleton//Trends in Biochemical Sciences, 2006, Vol. 31, Filamins, No. 7, P. 411-419.
222. Ohta Y., Hartwig J.H., Stossel T.P. FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling//Nature Cell Biology, 2006, Vol. 8, No. 8, P. 803-814.
223. Stossel T.P., Condeelis J., Cooley L., Hartwig J.H., Noegel A., Schleicher M., Shapiro S.S. Filamins as integrators of cell mechanics and signalling//Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2001, Vol. 2, No. 2, P. 138-145.
224. Feng Y., Walsh C.A. The many faces of filamin: A versatile molecular scaffold for cell motility and signalling//Nature Cell Biology, 2004, Vol. 6, The many faces of filamin, No. 11, P. 1034-1038.
225. Geisbrecht E.R., Montell D.J. Myosin VI is required for E-cadherin-mediated border cell migration//Nature Cell Biology, 2002, Vol. 4, No. 8, P. 616-620.
226. Nallapalli R.K., Ibrahim M.X., Zhou A.X., Bandaru S., Sunkara S.N., Redfors B., Pazooki D., Zhang Y., Borén J., Cao Y., Bergo M.O., Akyürek L.M. Targeting

filamin A reduces K-RAS–induced lung adenocarcinomas and endothelial response to tumor growth in mice//Molecular Cancer, 2012, Vol. 11, No. 1, P. 50.

227. Alper Ö., Stetler-Stevenson W.G., Harris L.N., Leitner W.W., Özdemirli M., Hartmann D., Raffeld M., Abu-Asab M., Byers S., Zhuang Z., Oldfield E.H., Tong Y., Bergmann-Leitner E., Criss W.E., Nagasaki K., Mok S.C., Cramer D.W., Karaveli F.S., Goldbach-Mansky R., Leo P., Stromberg K., Weil R.J. Novel anti-filamin-A antibody detects a secreted variant of filamin-A in plasma from patients with breast carcinoma and high-grade astrocytoma//Cancer Science, 2009, Vol. 100, No. 9, P. 1748-1756.

228. Bedolla R.G., Wang Y., Asuncion A., Chamie K., Siddiqui S., Mudryj M.M., Prihoda T.J., Siddiqui J., Chinnaiyan A.M., Mehra R., de Vere White R.W., Ghosh P.M. Nuclear versus Cytoplasmic Localization of Filamin A in Prostate Cancer: Immunohistochemical Correlation with Metastases//Clinical Cancer Research, 2009, Vol. 15, Nuclear versus Cytoplasmic Localization of Filamin A in Prostate Cancer, No. 3, P. 788-796.

229. Yue J., Huhn S., Shen Z. Complex roles of filamin-A mediated cytoskeleton network in cancer progression//Cell & Bioscience, 2013, Vol. 3, No. 1, P. 7.

230. Yoshida H., Cheng W., Hung J., Montell D., Geisbrecht E., Rosen D., Liu J., Naora H. Lessons from border cell migration in the *Drosophila* ovary: A role for myosin VI in dissemination of human ovarian cancer//Proceedings of the National Academy of Sciences, 2004, Vol. 101, Lessons from border cell migration in the *Drosophila* ovary, No. 21, P. 8144-8149.

231. Cheng Z., Ristow M. Mitochondria and Metabolic Homeostasis//Antioxidants & Redox Signaling, 2013, Vol. 19, No. 3, P. 240-242.

232. Bories D., Raynal M.-C., Solomon D.H., Darzynkiewicz Z., Cayre Y.E. Down-regulation of a serine protease, myeloblastin, causes growth arrest and differentiation of promyelocytic leukemia cells//Cell, 1989, Vol. 59, No. 6, P. 959-968.

233. Gerke V., Moss S.E. Annexins: From Structure to Function//Physiological Reviews, 2002, Vol. 82, Annexins, No. 2, P. 331-371.
234. Dai Z. Advances in nanotheranostics. – Singapore; [Heidelberg: Springer, 2016.
235. Wafaie A.M., Moussa K.M., Ebeid E.M. Cancer of unknown primary origin: Can FDG PET/CT have a role in detecting the site of primary?//The Egyptian Journal of Radiology and Nuclear Medicine, 2018, Vol. 49, Cancer of unknown primary origin, No. 1, P. 190-195.
236. Peck M., Pollack H.A., Friesen A., Muzi M., Shoner S.C., Shankland E.G., Fink J.R., Armstrong J.O., Link J.M., Krohn K.A. Applications of PET imaging with the proliferation marker [18F]-FLT//The quarterly journal of nuclear medicine and molecular imaging: official publication of the Italian Association of Nuclear Medicine (AIMN) [and] the International Association of Radiopharmacology (IAR), [and] Section of the Society of..., 2015, Vol. 59, No. 1, P. 95-104.
237. Bollineni V.R., Kramer G.M., Jansma E.P., Liu Y., Oyen W.J.G. A systematic review on [18F]FLT-PET uptake as a measure of treatment response in cancer patients//European Journal of Cancer, 2016, Vol. 55, P. 81-97.
238. Khalid U., Vi C., Henri J., Macdonald J., Eu P., Mandarano G., Shigdar S. Radiolabelled Aptamers for Theranostic Treatment of Cancer//Pharmaceuticals, 2018, Vol. 12, No. 1, P. 2.
239. Gijs M., Aerts A., Impens N., Baatout S., Luxen A. Aptamers as radiopharmaceuticals for nuclear imaging and therapy//Nuclear Medicine and Biology, 2016, Vol. 43, No. 4, P. 253-271.
240. Yoon S., Rossi J. Targeted Molecular Imaging Using Aptamers in Cancer//Pharmaceuticals, 2018, Vol. 11, No. 3, P. 71.
241. Kryza D., Debordeaux F., Azéma L., Hassan A., Paurelle O., Schulz J., Savona-Baron C., Charignon E., Bonazza P., Taleb J., Fernandez P., Janier M., Toulmé J.J. Ex Vivo and In Vivo Imaging and Biodistribution of Aptamers

Targeting the Human Matrix MetalloProtease-9 in Melanomas//PLOS ONE, 2016, Vol. 11, No. 2, P. e0149387.

242. Zhu G., Zhang H., Jacobson O., Wang Z., Chen H., Yang X., Niu G., Chen X. Combinatorial Screening of DNA Aptamers for Molecular Imaging of HER2 in Cancer//Bioconjugate Chemistry, 2017, Vol. 28, No. 4, P. 1068-1075.

243. Groman E.V., Enriquez P.M., Jung C., Josephson L. Arabinogalactan for Hepatic Drug Delivery//Bioconjugate Chemistry, 1994, Vol. 5, No. 6, P. 547-556.

244. Luo Y.-L., Shiao Y.-S., Huang Y.-F. Release of Photoactivatable Drugs from Plasmonic Nanoparticles for Targeted Cancer Therapy//ACS Nano, 2011, Vol. 5, No. 10, P. 7796-7804.

245. Shi H., Ye X., He X., Wang K., Cui W., He D., Li D., Jia X. Au@Ag/Au nanoparticles assembled with activatable aptamer probes as smart “nano-doctors” for image-guided cancer thermotherapy//Nanoscale, 2014, Vol. 6, No. 15, P. 8754.

246. Huang Y.-F., Sefah K., Bamrungsap S., Chang H.-T., Tan W. Selective Photothermal Therapy for Mixed Cancer Cells Using Aptamer-Conjugated Nanorods//Langmuir, 2008, Vol. 24, No. 20, P. 11860-11865.

247. Zharov V.P., Galitovskaya E.N., Johnson C., Kelly T. Synergistic enhancement of selective nanophotothermolysis with gold nanoclusters: Potential for cancer therapy//Lasers in Surgery and Medicine, 2005, Vol. 37, Synergistic enhancement of selective nanophotothermolysis with gold nanoclusters, No. 3, P. 219-226.

248. Kolovskaya O.S., Zamay T.N., Zamay A.S., Glazyrin Y.E., Spivak E.A., Zubkova O.A., Kadkina A.V., Erkaev E.N., Zamay G.S., Savitskaya A.G., Trufanova L.V., Petrova L.L., Berezovski M.V. DNA-aptamer/protein interaction as a cause of apoptosis and arrest of proliferation in Ehrlich ascites adenocarcinoma cells//Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology, 2014, Vol. 8, No. 1, P. 60-72.

249. Zardi L., Siri A., Carnemolla B., Santi L., Gardner W.D., Hoch S.O. Fibronectin: a chromatin-associated protein?//Cell, 1979, Vol. 18, Fibronectin, No. 3, P. 649-657.

250. Hynes R.O. The emergence of integrins: a personal and historical perspective//Matrix Biology, 2004, Vol. 23, The emergence of integrins, No. 6, P. 333-340.

251. Campbell I.D., Humphries M.J. Integrin Structure, Activation, and Interactions//Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2011, Vol. 3, No. 3, P. a004994-a004994.

252. Luo B.-H., Carman C.V., Takagi J., Springer T.A. Disrupting integrin transmembrane domain heterodimerization increases ligand binding affinity, not valency or clustering//Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005, Vol. 102, No. 10, P. 3679-3684.

253. Takagi J., Springer T.A. Integrin activation and structural rearrangement: Takagi & Springer · Integrin activation and structural rearrangement//Immunological Reviews, 2002, Vol. 186, Integrin activation and structural rearrangement, No. 1, P. 141-163.

254. Puklin-Faucher E., Sheetz M.P. The mechanical integrin cycle//Journal of Cell Science, 2009, Vol. 122, No. 2, P. 179-186.

255. Puklin-Faucher E., Gao M., Schulten K., Vogel V. How the headpiece hinge angle is opened: new insights into the dynamics of integrin activation//Journal of Cell Biology, 2006, Vol. 175, How the headpiece hinge angle is opened, No. 2, P. 349-360.

256. Joshi M.D., Patravale V., Prabhu R. Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights//International Journal of Nanomedicine, 2015, Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology, P. 1001.

257. Ridi F., Bonini M., Baglioni P. Magneto-responsive nanocomposites: Preparation and integration of magnetic nanoparticles into films, capsules, and

gels//Advances in Colloid and Interface Science, 2014, Vol. 207, Magneto-responsive nanocomposites, P. 3-13.

258. Zhu N., Ji H., Yu P., Niu J., Farooq M., Akram M., Udego I., Li H., Niu X. Surface Modification of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles//Nanomaterials, 2018, Vol. 8, No. 10, P. 810.

259. Zamay T.N., Kolovskaya O.S., Glazyrin Y.E., Zamay G.S., Kuznetsova S.A., Spivak E.A., Wehbe M., Savitskaya A.G., Zubkova O.A., Kadkina A., Wang X., Muharemagic D., Dubynina A., Sheina Y., Salmina A.B., Berezovski M.V., Zamay A.S. DNA-Aptamer Targeting Vimentin for Tumor Therapy *In Vivo*//Nucleic Acid Therapeutics, 2014, Vol. 24, No. 2, P. 160-170.

260. Majeski A.E., Fred Dice J. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy//The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2004, Vol. 36, No. 12, P. 2435-2444.

261. Xie W., Zhang L., Jiao H., Guan L., Zha J., Li X., Wu M., Wang Z., Han J., You H. Chaperone-mediated autophagy prevents apoptosis by degrading BBC3/PUMA//Autophagy, 2015, Vol. 11, No. 9, P. 1623-1635.

262. Pinhassi R.I., Assaraf Y.G., Farber S., Stark M., Ickowicz D., Drori S., Domb A.J., Livney Y.D. Arabinogalactan−Folic Acid−Drug Conjugate for Targeted Delivery and Target-Activated Release of Anticancer Drugs to Folate Receptor-Overexpressing Cells//Biomacromolecules, 2010, Vol. 11, No. 1, P. 294-303.

253. Wang D., Lippard S.J. Cellular processing of platinum anticancer drugs//Nature Reviews Drug Discovery, 2005, Vol. 4, No. 4, P. 307-320.

264. Dasari S., Bernard Tchounwou P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action//European Journal of Pharmacology, 2014, Vol. 740, Cisplatin in cancer therapy, P. 364-378.

265. Milosavljevic N., Duranton C., Djerbi N., Puech P.H., Gounon P., Lagadic-Gossmann D., Dimanche-Boitrel M.T., Rauch C., Tauc M., Counillon L., Poët M. Nongenomic Effects of Cisplatin: Acute Inhibition of Mechanosensitive

Transporters and Channels without Actin Remodeling//Cancer Research, 2010, Vol. 70, Nongenomic Effects of Cisplatin, No. 19, P. 7514-7522.
266. Schaefer S.D., Wright C.G., Post J.D., Frenkel E.P. Cis-platinum vestibular toxicity//Cancer, 1981, Vol. 47, No. 5, P. 857-859.
267. Yen H.-C., Tang Y.-C., Chen F.-Y., Chen S.-W., Majima H.J. Enhancement of Cisplatin-Induced Apoptosis and Caspase 3 Activation by Depletion of Mitochondrial DNA in a Human Osteosarcoma Cell Line//Annals of the New York Academy of Sciences, 2005, Vol. 1042, No. 1, P. 516-522.
268. Jeffers J.R., Parganas E., Lee Y., Yang C., Wang J., Brennan J., MacLean K.H., Han J., Chittenden T., Ihle J.N., McKinnon P.J., Cleveland J.L., Zambetti G.P. Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways//Cancer Cell, 2003, Vol. 4, No. 4, P. 321-328.
269. Salvesen G.S., Dixit V.M. Caspases: Intracellular Signaling by Proteolysis//Cell, 1997, Vol. 91, Caspases, No. 4, P. 443-446.
270. Masuda H., Tanaka T., Takahama U. Cisplatin Generates Superoxide Anion by Interaction with DNA in a Cell-Free System//Biochemical and Biophysical Research Communications, 1994, Vol. 203, No. 2, P. 1175-1180.
271. Sharaf el dein O., Gallerne C., Brenner C., Lemaire C. Increased expression of VDAC1 sensitizes carcinoma cells to apoptosis induced by DNA cross-linking agents//Biochemical Pharmacology, 2012, Vol. 83, No. 9, P. 1172-1182.
272. Saad S.Y., Najjar T.A., Alashari M. Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats//Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2004, Vol. 31, No. 12, P. 862-867.
273. Petrovic M., Todorovic D. Apoptosis and cell cycle//Racionalna terapija, 2014, Vol. 6, No. 1, P. 21-32.
274. Kohno K., Wang K.-Y., Takahashi M., Kurita T., Yoshida Y., Hirakawa M., Harada Y., Kuma A., Izumi H., Matsumoto S. Mitochondrial Transcription Factor A and Mitochondrial Genome as Molecular Targets for Cisplatin-Based Cancer

Chemotherapy//International Journal of Molecular Sciences, 2015, Vol. 16, No. 8, P. 19836-19850.
275. Jamieson E.R., Lippard S.J. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin−DNA Adducts//Chemical Reviews, 1999, Vol. 99, No. 9, P. 2467-2498.
276. Nangia-Makker P., Hogan V., Honjo Y., Baccarini S., Tait L., Bresalier R., Raz A. Inhibition of Human Cancer Cell Growth and Metastasis in Nude Mice by Oral Intake of Modified Citrus Pectin//JNCI Journal of the National Cancer Institute, 2002, Vol. 94, No. 24, P. 1854-1862.
277. Ishida S., Lee J., Thiele D.J., Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals//Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002, Vol. 99, No. 22, P. 14298-14302.
278. Fuertes M.A., Alonso C., Pérez José.M. Biochemical Modulation of Cisplatin Mechanisms of Action: Enhancement of Antitumor Activity and Circumvention of Drug Resistance//Chemical Reviews, 2003, Vol. 103, Biochemical Modulation of Cisplatin Mechanisms of Action, No. 3, P. 645-662.
279. Pranatharthiharan S., Patel M.D., Malshe V.C., Pujari V., Gorakshakar A., Madkaikar M., Ghosh K., Devarajan P.V. Asialoglycoprotein receptor targeted delivery of doxorubicin nanoparticles for hepatocellular carcinoma//Drug Delivery, 2017, Vol. 24, No. 1, P. 20-29.
280. Tanaka T., Abo Y., Hamano S., Fujishima Y., Kaneo Y. Intracellular disposition of arabinogalactan and asialofetuin in HepG2 cells//Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2013, Vol. 23, No. 5, P. 435-438.
281. Chames P., Van Regenmortel M., Weiss E., Baty D. Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future: Therapeutic antibodies: an update//British Journal of Pharmacology, 2009, Vol. 157, Therapeutic antibodies, No. 2, P. 220-233.

282. Wang T., Chen C., Larcher L.M., Barrero R.A., Veedu R.N. Three decades of nucleic acid aptamer technologies: Lessons learned, progress and opportunities on aptamer development//Biotechnology Advances, 2019, Vol. 37, Three decades of nucleic acid aptamer technologies, No. 1, P. 28-50.
283. Неверова Н.А., Медведева Е.Н., Бабкин В.А., Ларина Л.И., Сапожников А.Н., Левчук А.А., Кузьмин С.Г. Синтез и исследование физико-химических свойств механокомпозитов арабиногалактана с циклофосфамидом.
284. Kolovskaya O.S., Zamay T.N., Zamay G.S., Babkin V.A., Medvedeva E.N., Neverova N.A., Kirichenko A.K., Zamay S.S., Lapin I.N., Morozov E.V., Sokolov A.E., Narodov A.A., Fedorov D.G., Tomilin F.N., Zabluda V.N., Alekhina Y., Lukyanenko K.A., Glazyrin Y.E., Svetlichnyi V.A., Berezovski M.V., Kichkailo A.S. Aptamer-Conjugated Superparamagnetic Ferroarabinogalactan Nanoparticles for Targeted Magnetodynamic Therapy of Cancer//Cancers, 2020, Vol.12, No.1, P. 216.
285. Schwartz P.S., Waxman D.J. Cyclophosphamide Induces Caspase 9-Dependent Apoptosis in 9L Tumor Cells//Molecular Pharmacology, 2001, Vol. 60, No. 6, P. 1268-1279.
286. Lee J.H., Park J.H., Yang M.H. The effect of cyclophosphamide on Fas-mediated apoptosis//Journal of Korean Medical Science, 1997, Vol. 12, No. 3, P. 185.
287. Singh N., Nigam M., Ranjan V., Sharma R., Balapure A.K., Rath S.K. Caspase Mediated Enhanced Apoptotic Action of Cyclophosphamide- and Resveratrol-Treated MCF-7 Cells//Journal of Pharmacological Sciences, 2009, Vol. 109, No. 4, P. 473-485.
288. Zununi Vahed S., Fathi N., Samiei M., Maleki Dizaj S., Sharifi S. Targeted cancer drug delivery with aptamer-functionalized polymeric nanoparticles//Journal of Drug Targeting, 2019, Vol. 27, No. 3, P. 292-299.
289. Mahase E. Cancer overtakes CVD to become leading cause of death in high income countries//BMJ, 2019, P. l5368.

290. You W., Henneberg M. Cancer incidence increasing globally: The role of relaxed natural selection//Evolutionary Applications, 2018, Vol. 11, Cancer incidence increasing globally, No. 2, P. 140-152.
291. Shi J., Kantoff P.W., Wooster R., Farokhzad O.C. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities//Nature Reviews Cancer, 2017, Vol. 17, Cancer nanomedicine, No. 1, P. 20-37.
292. Thun M.J., DeLancey J.O., Center M.M., Jemal A., Ward E.M. The global burden of cancer: priorities for prevention//Carcinogenesis, 2010, Vol. 31, The global burden of cancer, No. 1, P. 100-110.
293. Adjiri A. Identifying and Targeting the Cause of Cancer is Needed to Cure Cancer//Oncology and Therapy, 2016, Vol. 4, No. 1, P. 17-33.
294. Bajaj A., Miranda O.R., Phillips R., Kim I.-B., Jerry D.J., Bunz U.H.F., Rotello V.M. Array-Based Sensing of Normal, Cancerous, and Metastatic Cells Using Conjugated Fluorescent Polymers//Journal of the American Chemical Society, 2010, Vol. 132, No. 3, P. 1018-1022.
295. Bertrand N., Wu J., Xu X., Kamaly N., Farokhzad O.C. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology//Advanced Drug Delivery Reviews, 2014, Vol. 66, Cancer nanotechnology, P. 2-25.
296. Rosenblum D., Joshi N., Tao W., Karp J.M., Peer D. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics//Nature Communications, 2018, Vol. 9, No. 1, P. 1410.
297. Chauhan V.P., Jain R.K. Strategies for advancing cancer nanomedicine//Nature Materials, 2013, Vol. 12, No. 11, P. 958-962.
298. Sun H., Zhu X., Lu P.Y., Rosato R.R., Tan W., Zu Y. Oligonucleotide Aptamers: New Tools for Targeted Cancer Therapy//Molecular Therapy - Nucleic Acids, 2014, Vol. 3, Oligonucleotide Aptamers, P. e182.
299. Kruspe S., Mittelberger F., Szameit K., Hahn U. Aptamers as Drug Delivery Vehicles//ChemMedChem, 2014, Vol. 9, No. 9, P. 1998-2011.

300. Zamay A.S., Zamay T.N. Change in Physicochemical Parameters of Membranes of Ehrlich Ascite Adenocarcinoma in the Course of Tumor Growth//Doklady Biochemistry and Biophysics, 2005, Vol. 402, No. 1-6, P. 197-199.

301. Zhong Y., Meng F., Deng C., Zhong Z. Ligand-Directed Active Tumor-Targeting Polymeric Nanoparticles for Cancer Chemotherapy//Biomacromolecules, 2014, Vol. 15, No. 6, P. 1955-1969.

302. Engelberg S., Modrejewski J., Walter J.G., Livney Y.D., Assaraf Y.G. Cancer cell-selective, clathrin-mediated endocytosis of aptamer decorated nanoparticles//Oncotarget, 2018, Vol. 9, No. 30, P. 20993-21006.

303. Ménétrey J., Bahloul A., Wells A.L., Yengo C.M., Morris C.A., Sweeney H.L., Houdusse A. The structure of the myosin VI motor reveals the mechanism of directionality reversal//Nature, 2005, Vol. 435, No. 7043, P. 779-785.

304. Wu X., Jung G., Hammer J.A. Functions of unconventional myosins//Current Opinion in Cell Biology, 2000, Vol. 12, No. 1, P. 42-51.

305. Dunn T.A., Chen S., Faith D.A., Hicks J.L., Platz E.A., Chen Y., Ewing C.M., Sauvageot J., Isaacs W.B., De Marzo A.M., Luo J. A Novel Role of Myosin VI in Human Prostate Cancer//The American Journal of Pathology, 2006, Vol. 169, No. 5, P. 1843-1854.

306. Puri C., Chibalina M.V., Arden S.D., Kruppa A.J., Kendrick-Jones J., Buss F. Overexpression of myosin VI in prostate cancer cells enhances PSA and VEGF secretion, but has no effect on endocytosis//Oncogene, 2010, Vol. 29, No. 2, P. 188-200.

307. Isenberg G. Actin binding proteins — lipid interactions//Journal of Muscle Research and Cell Motility, 1991, Vol. 12, No. 2, P. 136-144.

308. Matsudaira P. Pieces in the actin-severing protein puzzle//Cell, 1988, Vol. 54, No. 2, P. 139-140.

309. Jin W., Bruno I.G., Xie T.-X., Sanger L.J., Cote G.J. Polypyrimidine tract-binding protein down-regulates fibroblast growth factor receptor 1 alpha-exon inclusion//Cancer Research, 2003, Vol. 63, No. 19, P. 6154-6157.

310. Hahn C., Schwartz M.A. Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis//Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2009, Vol. 10, No. 1, P. 53-62.

311. Butcher D.T., Alliston T., Weaver V.M. A tense situation: forcing tumour progression//Nature Reviews Cancer, 2009, Vol. 9, A tense situation, No. 2, P. 108-122.

312. Tavi P., Laine M., Weckström M., Ruskoaho H. Cardiac mechanotransduction: from sensing to disease and treatment//Trends in Pharmacological Sciences, 2001, Vol. 22, Cardiac mechanotransduction, No. 5, P. 254-260.

313. Orr A.W., Helmke B.P., Blackman B.R., Schwartz M.A. Mechanisms of Mechanotransduction//Developmental Cell, 2006, Vol. 10, No. 1, P. 11-20.

314. Sniadecki N.J. Minireview: A Tiny Touch: Activation of Cell Signaling Pathways with Magnetic Nanoparticles//Endocrinology, 2010, Vol. 151, Minireview, No. т2, P. 451-457.

315. Malik M.T., O'Toole M.G., Casson L.K., Thomas S.D., Bardi G.T., Reyes-Reyes E.M., Ng C.K., Kang K.A., Bates P.J. AS1411-conjugated gold nanospheres and their potential for breast cancer therapy//Oncotarget, 2015, Vol. 6, No. 26, P. 22270-22281.

316. Cartmell S.H., Dobson J., Verschueren S.B., El Haj A.J. Development of magnetic particle techniques for long-term culture of bone cells with intermittent mechanical activation//IEEE Transactions on Nanobioscience, 2002, Vol. 1, No. 2, P. 92-97.

317. Zhang H., Li C., Piszcz M., Coya E., Rojo T., Rodriguez-Martinez L.M., Armand M., Zhou Z. Single lithium-ion conducting solid polymer electrolytes:

advances and perspectives//Chemical Society Reviews, 2017, Vol. 46, Single lithium-ion conducting solid polymer electrolytes, No. 3, P. 797-815.
318. Heidari F., Bahrololoom M.E., Vashaee D., Tayebi L. In situ preparation of iron oxide nanoparticles in natural hydroxyapatite/chitosan matrix for bone tissue engineering application//Ceramics International, 2015, Vol. 41, No. 2, P. 3094-3100.
319. Luciani N., Du V., Gazeau F., Richert A., Letourneur D., Le Visage C., Wilhelm C. Successful chondrogenesis within scaffolds, using magnetic stem cell confinement and bioreactor maturation//Acta Biomaterialia, 2016, Vol. 37, P. 101-110.
320. Souza G.R., Molina J.R., Raphael R.M., Ozawa M.G., Stark D.J., Levin C.S., Bronk L.F., Ananta J.S., Mandelin J., Georgescu M.-M., Bankson J.A., Gelovani J.G., Killian T.C., Arap W., Pasqualini R. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation//Nature Nanotechnology, 2010, Vol. 5, No. 4, P. 291-296.
321. Fayol D., Frasca G., Le Visage C., Gazeau F., Luciani N., Wilhelm C. Use of Magnetic Forces to Promote Stem Cell Aggregation During Differentiation, and Cartilage Tissue Modeling//Advanced Materials, 2013, Vol. 25, No. 18, P. 2611-2616.
322. Hasan A., Moin S., Karim A., Shamshirband S. Machine Learning-Based Sentiment Analysis for Twitter Accounts//Mathematical and Computational Applications, 2018, Vol. 23, No. 1, P. 11.
323. Vieira S., Pinaya W.H.L., Mechelli A. Using deep learning to investigate the neuroimaging correlates of psychiatric and neurological disorders: Methods and applications//Neuroscience & Biobehavioral Reviews, 2017, Vol. 74, Using deep learning to investigate the neuroimaging correlates of psychiatric and neurological disorders, P. 58-75.
324. Fathi-Achachelouei M., Knopf-Marques H., Ribeiro da Silva C.E., Barthès J., Bat E., Tezcaner A., Vrana N.E. Use of Nanoparticles in Tissue Engineering and

Regenerative Medicine//Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2019, Vol. 7, P. 113.

325. Tan H.L., Abdi F.F., Ng Y.H. Heterogeneous photocatalysts: an overview of classic and modern approaches for optical, electronic, and charge dynamics evaluation//Chemical Society Reviews, 2019, Vol. 48, Heterogeneous photocatalysts, No. 5, P. 1255-1271.

326. Bouvier-Müller A., Ducongé F. Application of aptamers for in vivo molecular imaging and theranostics//Advanced Drug Delivery Reviews, 2018, Vol. 134, P. 94-106.

327. Kirschvink J.L., Kobayashi-Kirschvink A., Woodford B.J. Magnetite biomineralization in the human brain.//Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992, Vol. 89, No. 16, P. 7683-7687.

328. Brem F., Hirt A.M., Winklhofer M., Frei K., Yonekawa Y., Wieser H.-G., Dobson J. Magnetic iron compounds in the human brain: a comparison of tumour and hippocampal tissue//Journal of The Royal Society Interface, 2006, Vol. 3, Magnetic iron compounds in the human brain, No. 11, P. 833-841.

329. Kobayashi A., Freeman M.A.R., Bonfield W., Kadoya Y., Yamac T., Al-Saffar N., Scott G., Revell P.A. Number of polyethylene particles and osteolysis in total joint replacement: a study using atissue-digesting method //The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume, 1997, Vols. 79-B, Number of polyethylene particles and osteolysis in total joint replacement, No. 5, P. 844-848.

330. Sant'Ovaia H., Marques G., Santos A., Gomes C., Rocha A. Magnetic susceptibility and isothermal remanent magnetization in human tissues: a study case//BioMetals, 2015, Vol. 28, Magnetic susceptibility and isothermal remanent magnetization in human tissues, No. 6, P. 951-958.

331. Gieré R. Magnetite in the human body: Biogenic vs. anthropogenic//Proceedings of the National Academy of Sciences, 2016, Vol. 113, Magnetite in the human body, No. 43, P. 11986-11987.

332. Fang C., Frontiera R.R., Tran R., Mathies R.A. Mapping GFP structure evolution during proton transfer with femtosecond Raman spectroscopy//Nature, 2009, Vol. 462, No. 7270, P. 200-204.

333. Banerjee R., Katsenovich Y., Lagos L., McIintosh M., Zhang X., Li C.-Z. Nanomedicine: Magnetic Nanoparticles and their Biomedical Applications//Current Medicinal Chemistry, 2010, Vol. 17, Nanomedicine, No. 27, P. 3120-3141.

334. Almeida J.P.M., Chen A.L., Foster A., Drezek R. *In vivo* biodistribution of nanoparticles//Nanomedicine, 2011, Vol. 6, No. 5, P. 815-835.

335. Clift M.J.D., Foster E.J., Vanhecke D., Studer D., Wick P., Gehr P., Rothen-Rutishauser B., Weder C. Investigating the Interaction of Cellulose Nanofibers Derived from Cotton with a Sophisticated 3D Human Lung Cell Coculture//Biomacromolecules, 2011, Vol. 12, No. 10, P. 3666-3673.

336. Xie W., Guo Z., Gao F., Gao Q., Wang D., Liaw B., Cai Q., Sun X., Wang X., Zhao L. Shape-, size- and structure-controlled synthesis and biocompatibility of iron oxide nanoparticles for magnetic theranostics//Theranostics, 2018, Vol. 8, No. 12, P. 3284-3307.

337. Dreaden E.C., Alkilany A.M., Huang X., Murphy C.J., El-Sayed M.A. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine//Chem. Soc. Rev., 2012, Vol. 41, The golden age, No. 7, P. 2740-2779.

338. Cole A.J., Yang V.C., David A.E. Cancer theranostics: the rise of targeted magnetic nanoparticles//Trends in Biotechnology, 2011, Vol. 29, Cancer theranostics, No. 7, P. 323-332.

339. Chu X., Yu J., Hou Y.-L. Surface modification of magnetic nanoparticles in biomedicine//Chinese Physics B, 2015, Vol. 24, No. 1, P. 014704.

340. Corot C., Robert P., Idee J., Port M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging //Advanced Drug Delivery Reviews, 2006, Vol. 58, No. 14, P. 1471-1504.

341. Angelakeris M. Magnetic nanoparticles: A multifunctional vehicle for modern theranostics//Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2017, Vol. 1861, Magnetic nanoparticles, No. 6, P. 1642-1651.
342. Gobbo O.L., Sjaastad K., Radomski M.W., Volkov Y., Prina-Mello A. Magnetic Nanoparticles in Cancer Theranostics//Theranostics, 2015, Vol. 5, No. 11, P. 1249-1263.
343. Mosayebi J., Kiyasatfar M., Laurent S. Synthesis, Functionalization, and Design of Magnetic Nanoparticles for Theranostic Applications//Advanced Healthcare Materials, 2017, Vol. 6, No. 23, P. 1700306.
344. Feoktistova L.P. [No title found]//Russian Journal of Applied Chemistry, 2002, Vol. 75, No. 12, P. 1911-1915.
345. Leulmi S., Chauchet X., Morcrette M., Ortiz G., Joisten H., Sabon P., Livache T., Hou Y., Carrière M., Lequien S., Dieny B. Triggering the apoptosis of targeted human renal cancer cells by the vibration of anisotropic magnetic particles attached to the cell membrane//Nanoscale, 2015, Vol. 7, No. 38, P. 15904-15914.
346. Zamay T.N., Zamay G.S., Belyanina I.V., Zamay S.S., Denisenko V.V., Kolovskaya O.S., Ivanchenko T.I., Grigorieva V.L., Garanzha I.V., Veprintsev D.V., Glazyrin Y.E., Shabanov A.V., Prinz V.Y., Seleznev V.A., Sokolov A.E., Prokopenko V.S., Kim P.D., Gargaun A., Berezovski M.V., Zamay A.S. Noninvasive Microsurgery Using Aptamer-Functionalized Magnetic Microdisks for Tumor Cell Eradication//Nucleic Acid Therapeutics, 2017, Vol. 27, No. 2, P. 105-114.
347. Lim E.-K., Kim B., Choi Y., Ro Y., Cho E.-J., Lee J.H., Ryu S.-H., Suh J.-S., Haam S., Huh Y.-M. Aptamer-conjugated magnetic nanoparticles enable efficient targeted detection of integrin αvβ3 via magnetic resonance imaging: Aptamer-Conjugated MNPs//Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2014, Vol. 102, Aptamer-conjugated magnetic nanoparticles enable efficient targeted detection of integrin αvβ3 via magnetic resonance imaging, No. 1, P. 49-59.

348. Bortner C.D., Cidlowski J.A. Ion channels and apoptosis in cancer//Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2014, Vol. 369, No. 1638, P. 20130104.
349. Bortner C.D., Cidlowski J.A. Uncoupling Cell Shrinkage from Apoptosis Reveals That Na+ Influx Is Required for Volume Loss during Programmed Cell Death//Journal of Biological Chemistry, 2003, Vol. 278, No. 40, P. 39176-39184.
350. Yang M., Brackenbury W.J. Membrane potential and cancer progression//Frontiers in Physiology, 2013, Vol. 4.
351. Wang Q., Dai X.-Q., Li Q., Tuli J., Liang G., Li S.S., Chen X.-Z. Filamin Interacts with Epithelial Sodium Channel and Inhibits Its Channel Function//Journal of Biological Chemistry, 2013, Vol. 288, No. 1, P. 264-273.
352. Srinivasan J., Schachner M., Catterall W.A. Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R//Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, Vol. 95, No. 26, P. 15753-15757.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю искреннюю благодарность нашему творческому коллективу, без постоянной помощи и поддержки которых, плодотворного обсуждения идей, планов экспериментов и полученных результатов эта работа не могла бы состояться. Выражаю свою искреннюю благодарность Марии Трусовой, Анастасии Кошмановой, Галине Замай, Щугоревой Ирине, Вепринцеву Дмитрию, Артюшенко Полине, Томилину Феликсу, Юрию Глазырину, Белугину Кириллу, Озерской Анастасии, Морозову Евгению, Алексею Соколову за помощь в проведении экспериментов, анализе данных, плодотворные обсуждения результатов, вдохновение и повсеместную поддержку. Особой благодарностью хотелось бы отметить Зукова Руслана Александровича, Максима Валентиновича Березовского, Татьяну Николаевну Замай, Анну Сергеевну Кичкайло, Хоржевского Владимира Алексеевича и Кириченко Андрея Константиновича без постоянной помощи и поддержки которых, обсуждения идей, планов экспериментов, полученных результатов, конструктивной критики, и добрых слов эта работа не могла бы состояться. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (16-42-240662), Российского научного фонда (14-15-00805).