

На правах рукописи

Фахардо Анна Фабиовна

**Регуляция жизнеспособности клеток млекопитающих
в условиях воздействия наноструктур**

03.01.04 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург – 2020

Работа выполнена в Химико-биологическом кластере Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Национальный исследовательский университет ИТМО»

Научный руководитель – доктор химических наук **Виноградов Владимир Валентинович**

Научный консультант – доктор медицинских наук **Штиль Александр Альбертович**

Официальные оппоненты:

Гусев Александр Анатольевич, доктор биологических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тамбовский государственный университет имени Г.Р. Державина» (ТГУ имени Г.Р. Державина), директор НИИ экологии и биотехнологий

Шаройко Владимир Владимирович, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный университет» (СПбГУ), ведущий научный сотрудник межкафедральной лаборатории биомедицинской химии Института химии

Ведущая организация – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Защита состоится: «_____» _____ 2020 г. в _____ часов на заседании Диссертационного совета при ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» по адресу: 109240, г. Москва, Устьинский пр., 2/14

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии» (109240, г. Москва, Устьинский пр., 2/14) и на сайте <http://www.ion.ru/>.

Автореферат разослан « _____ » _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор биологических наук

Шилина Наталия Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Биомедицинские аспекты развития нанотехнологий приобрели решающее значение при практическом использовании наноингредиентов в медицине и фармацевтике. Исследованы многочисленные наноструктуры, однако на фармацевтическом рынке по-прежнему мало препаратов на их основе. Одной из основных проблем использования наноструктур в медицинских целях является их биосовместимость, токсичность, а также эффективность доставки. Открытие новых биологических приложений нанопрепаратов обосновывает необходимость исследования влияния наноматериалов на эффективность применения в новых областях.

Подходы к решению биомедицинских задач с помощью наноструктур можно разделить на два основных направления. В первом случае используют наночастицы (НЧ) на основе, как правило, металлов или оксидов металлов. При этом действие на ткани и клетки зачастую является неселективным, поэтому данные объекты нуждаются в дальнейшей модификации. Во втором подходе, более селективном, используют наноконструкции органического происхождения, зачастую представляющие собой ДНК- или РНК-олигонуклеотиды, для доставки и терапии. Используя ковалентную модификацию, гибридизацию нуклеиновых кислот, биотин-авидиновое взаимодействие и интеркаляцию в ДНК-дуплекс, возможно эффективно загружать функциональные молекулы в ДНК- наноструктуры для доставки в клетки.

Систематическое изучение биомедицинских аспектов использования оксидов металлов требует изучения их токсикологических характеристик. Существующие исследования токсичности таких систем не учитывают методы синтеза металлооксидных композиций и особенности формирования их поверхностного слоя, что затрудняет сопоставление данных, полученных в различных исследованиях. Аналогичная ситуация наблюдается и в области ДНК- и РНК- нанотехнологий: существует большое количество разрозненных данных о токсичности конструкций, однако мало внимания уделено исследованию влияния последовательного усложнения структуры на метаболизм клеток и общую токсичность.

Наиболее распространенными металлооксидными системами для создания лекарственных наноформуляций являются оксиды железа, титана, алюминия, гафния, циркония и тантала. Важен выбор методов синтеза, позволяющих получать в воспроизводимых условиях наночастицы с размером 10-20 нм. Таким образом, актуально исследование изменений метаболической активности клеток, а также общетоксического действия НЧ, полученных при близких условиях синтеза и обладающих сходными физико-химическими характеристиками. Токсикологические исследования НЧ целесообразно также проводить после их модификации для практических применений: адресной доставки лекарственных средств, использования в качестве адъювантов и радиосенсибилизаторов.

Развитие технологий редактирования генома открывает новое направление молекулярной медицины, использующей в качестве инструмента миРНК, антисмысловые РНК и систему CRISPR-Cas9. Наибольшим потенциалом обладают молекулы, которым можно не только придать одну терапевтическую функцию, но и создать на их основе многофакторные «умные» системы. Для этих целей перспективны ДНК-наноконструкции на основе дезоксирибозимов, для которых критическими параметрами являются эффективность доставки, стабильность внутри клеток, а также токсикологические характеристики, как требования к персонализированной медицине.

Степень разработанности темы исследования. В настоящее время опубликованы работы, посвященные влиянию наноструктур на метаболизм и выживаемость клеток. Изучена зависимость токсичности от размера и формы НЧ и эффективность проникновения в ткани. Недостаточное внимание уделено влиянию материала, из которого синтезированы наноструктуры, на метаболическую активность клеток, а также общую токсичность при единообразии физико-химических характеристик НЧ. Подобный пробел в данных исследованиях существует и для ДНК-наноконструкций: отсутствуют сопоставимые данные о влиянии последовательного усложнения наноструктуры на биохимические и токсикологические характеристики.

Функционализация лекарственных средств неорганическими НЧ приводит к появлению новых свойств препаратов. Описано пролонгирование действия лекарственных форм, заключённых в матрицы неорганических НЧ, а также адресная доставка лекарств к мишени при придании НЧ магнитных свойств. Созданы эффективные способы комбинирования химио- и радиотерапии с помощью мезопористых НЧ оксида тантала, нагруженных доксорубицином. ДНК-наноконструкции также могут служить для доставки лекарственных средств и в качестве самостоятельных препаратов, которые можно модифицировать для различных применений. На первоначальной стадии модификаций важным представляется изучение биосовместимости этих наноструктур.

Цели и задачи исследования

Целью диссертационной работы являлись исследования регуляции жизнеспособности клеток млекопитающих, включая изменения метаболической активности (активности дегидрогеназ митохондрий), маркеров апоптоза/некроза, генерации активных форм кислорода, при воздействии новых наноструктур на основе НЧ оксидов металлов и ДНК.

Для достижения поставленной цели решали следующие **задачи**:

1. В культуре клеток и *in vivo* исследовать молекулярные механизмы ответа на воздействия НЧ оксидов металлов, синтезированных унифицированным методом;
2. Исследовать параметры отдельных компонентов врожденного иммунитета при действии НЧ оксидов металлов;
3. Изучить влияние на метаболическую активность новых наноструктур на основе НЧ оксидов металлов;

4. Исследовать радиосенсибилизирующий потенциал НЧ оксидов гафния и тантала;

5. Провести анализ эффективности доставки и токсичности ДНК-наноконструкций различного размера и структуры.

Научная новизна работы. Впервые проведена сравнительная оценка метаболической активности клеток млекопитающих в присутствии НЧ, предназначенных для клинического применения, а также оценка их токсичности на уровне организма. Установлено, что НЧ оксидов железа, титана и тантала не вызывают значимых изменений метаболической активности клеток в концентрациях, позволяющих сохранить стабильность золей, не индуцируют гибель клеток и не вызывают симптомы токсичности у мышей при внутрижелудочном введении дозы 3 г/кг. Впервые охарактеризовано влияние новых НЧ для адресной доставки лекарств, а также имеющих потенциал радиосенсибилизаторов, на метаболическую активность клеток. Систематически исследована эффективность доставки и токсичность ДНК-наноконструкций различной сложности. Усложнение организации ДНК-наноконструкции не ухудшает эффективность доставки в клетку и не увеличивает цитотоксичность.

Теоретическая и практическая значимость работы. Работа представляет собой комплекс фундаментальных и прикладных исследований регуляции жизнеспособности, а также отдельных биохимических процессов на клеточном и организменном уровнях при действии различных нанобиоматериалов.

Проведена сравнительная оценка токсичности в системах *in vitro* и *in vivo* непокрытых НЧ оксидов металлов, перспективных для биомедицинских исследований. Эти исследования создают фундаментальные представления о применении их производных в качестве носителей лекарств или фармакологических субстанций. Результаты оценки влияния НЧ оксидов гафния и циркония, допированных редкоземельными ионами, на метаболическую активность клеток, будут использованы для разработки противоопухолевых радиосенсибилизаторов.

Результаты оценки эффективности внутриклеточной доставки, стабильности и токсичности ДНК-наноструктур различной сложности являются важными для использования в медицинских ДНК-нанотехнологиях.

Методология и методы исследования. В работе использовали неопухолевые и трансформированные перевиваемые клеточные линии человека и мышей линии Balb/c. Для оценки взаимодействия наноструктурированных материалов с клетками и влияния на метаболическую активность и выживаемость использовали цитологические, биохимические и молекулярно-биологические методы. Подробное описание методов исследования представлено в разделе «Материалы и методы».

Основные положения, выносимые на защиту

1. Метаболическая активность клеток (определяемая по активности дегидрогеназ) не подвергается значительным изменениям при воздействии немодифицированных НЧ AlOOH , TiO_2 , Fe_3O_4 , ZrO_2 , HfO_2 , Ta_2O_5 в

концентрациях, не нарушающих биосовместимые коллоидные свойства среды. НЧ AlOOH , TiO_2 , Fe_3O_4 , HfO_2 , Ta_2O_5 относятся к IV классу безопасности веществ по результатам определения острой токсичности у лабораторных мышей. НЧ оксида циркония вызывают гибель животных при внутривенном введении 3 г/кг.

2. НЧ Fe_3O_4 , AlOOH , TiO_2 вызывают статистически значимое увеличение экспрессии гена, кодирующего рецептор врожденного иммунитета TLR-6. НЧ AlOOH вызывают также индукцию экспрессии гена TLR-4.

3. Магнетитовые наноконтейнеры не вызывают формирования активных форм кислорода и угнетения метаболической активности клеток. Наночастицы бемита более токсичны по сравнению с алюминиевыми ксерогелевыми наноконтейнерами. Последние хорошо проникают в клетки и могут быть перспективны в качестве системы доставки лекарств.

4. Метаболическая активность клеток не претерпевает значительных изменений при воздействии немодифицированных и допированных НЧ оксида гафния (<0.5 мг/мл). При допировании HfO_2 тербием и иттербием увеличение доли лантаноидов ведет к подавлению метаболической активности клеток и индукции гибели клеток. При сравнении радиосенсибилизации НЧ HfO_2 и Ta_2O_5 , последний оказывал более сильное подавляющее действие на колониеобразование клеток.

5. Метаболическая активность клеток не подвергается значительным изменениям при воздействии ДНК-наноконструкций, состоящих из комплементарных цепей ДНК-олигонуклеотидов с присоединенным дезоксирибозимом, катализирующим РНК. Усложнение структуры ДНК-конструкции не увеличивает ее токсичность и эффективность доставки в клетки.

6. Усложнение уровня организации наноструктур на основе оксидов металлов и ДНК- наноконструкций, рассмотренных в данном исследовании, не приводит к увеличению их токсического действия на изученные биологические системы.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты исследований, представленные в работе, получены на современном оборудовании, с использованием общепринятых биологических моделей. Достоверность полученных результатов подтверждается первичными данными, а также статистической обработкой данных.

Материалы диссертационного исследования были представлены на 7 конференциях: «Конгресс молодых ученых» (Санкт- Петербург, 2017 г.); Фундаментальная наука и клиническая медицина: 20-я Международная медико-биологическая конференция молодых ученых (Санкт-Петербург, 2017 г.); X Международная конференция молодых ученых "МЕНДЕЛЕЕВ-2017" (Санкт-Петербург, 2017); 1-я международная школа-конференция "Умные наносистемы для трансляционной медицины" (Санкт- Петербург, 2017 г.); Научно-учебно-методическая конференция Университета ИТМО

(Санкт-Петербург, 2018 и 2019 г.); XXVII Зимняя научная школа для молодых ученых «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2018 г.).

Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования РФ (проект 075-15-2019-1896).

Личный вклад автора заключался в проведении анализа литературных источников, создании дизайна экспериментов, описанных в диссертации. Все изложенные в работе результаты, описанные на моделях культур клеток и *in vivo*, получены автором самостоятельно или при его непосредственном участии. Данные по физико-химическим характеристикам наночастиц и исследованию их влияния на конъюгативный перенос плазмид мультирезистентности получены совместно с соавторами статей, опубликованных по теме работы. Результаты исследований и сделанные по ним выводы были подвергнуты статистической обработке, оформлению и описанию автором лично и обсуждены с научными руководителями и соавторами статей при подготовке публикаций.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, использованных в работе, описания результатов исследования, заключения, обсуждения полученных результатов, списка обозначений и сокращений, а также списка использованных источников. Текст диссертации изложен на 122 печатных страницах, проиллюстрирован 31 рисунком, 10 таблицами. Список литературы содержит 199 литературных источников, из них 4 отечественных и 195 иностранных. Диссертация изложена в соответствии с общими требованиями к оформлению кандидатских и докторских диссертаций, утверждёнными в ГОСТ Р 7.0.11–2011.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы рассмотрены основные аспекты применения нанотехнологий в терапии и диагностике. Проведен анализ биохимических изменений и цитотоксичности при воздействии НЧ оксидов металлов на клетки. Приведены данные об использовании наноструктур для адресной доставки лекарств, терапии с использованием радиосенсибилизаторов на основе НЧ, тераностики и генной терапии. Проанализировано современное состояние технологий, используемых в регуляции экспрессии генов, а также проблема внутриклеточной доставки генно-терапевтических конструкций.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Синтез золей непокрытых НЧ. Стабильные 2 мас. % гидрозоли получали с помощью ультразвуковой коллоидизации.

Клеточные линии. Для экспериментов были использованы фибробласты легкого эмбриона человека (ФЛЭЧ), мезенхимальные стволовые клетки человека (МСК), клетки карциномы шейки матки (линия HeLa), постнатальные фибробласты человека (ПФЧ), клетки карциномы легкого A549, нейробластомы человека IMR-32 и клетки хронического

миелоидного лейкоза K562. В экспериментах использованы клетки в логарифмической фазе роста.

МТТ тест. Для исследования влияния на метаболическую активность непокрытых и модифицированных НЧ и ДНК-конструкций был использован МТТ-тест. Количество выживших клеток определяли по оптической плотности раствора восстановленного МТТ (3-(4,5-диметил-2-тиазолил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолийбромида) красителя НАДФ-Н-зависимыми оксидоредуктазами при длине волны 570 нм.

Олигонуклеотиды. Олигонуклеотиды синтезированы в компании «ДНК-синтез».

Трансфекция. Клетки HeLa рассеяны в 24-луночные планшеты по $6 \cdot 10^4$ клеток/лунку в 1 мл культуральной среды и инкубируются 24 ч для прикрепления. Клетки K562 в эквивалентном количестве помещали в лунки непосредственно перед трансфекцией. Комплексы ДНК-цепей с Липофектамином 2000 вносили согласно протоколу Invitrogen в среду без антибиотиков.

Проточная цитофлуориметрия. Эффективность трансфекции ДНК-цепей оценивали с использованием проточной цитофлуориметрии. Для определения эффективности трансфекции ДНК конъюгировали с флуоресцеина амидитом (FAM). Эффективность трансфекции определяли через 24-72 ч на проточном цитометре CytoFLEX, измеряя флуоресценцию FAM в клетках относительно контрольного фона при возбуждении лазером 488 нм в канале FITC (525/40 нм).

Выделение РНК, обратная транскрипция и количественная ПЦР в режиме реального времени (ОТ-qПЦР). Тотальную РНК выделяли гуанидин-фенол-хлороформной экстракцией с помощью реактивов Extract RNA по стандартному протоколу. Для обратной транскрипции (2 мкг тотальной РНК) использовали протокол компании «Евроген» (Россия; обратная транскриптаза MMLV). Анализ экспрессии генов проводили с использованием набора qPCRmix- HS SYBR+LowROX в соответствии с протоколом производителя. Для нормализации экспрессии использовали праймеры для детекции мРНК бета-2-микроглобулина. Для количественного определения экспрессии использовали метод $2^{-\Delta\Delta CT}$, принимая за единицу нормализованный уровень соответствующей мРНК в необработанных образцах и рассчитывая относительные изменения для образцов, обработанных НЧ.

Определение гибели клеток (тест с аннексином V - FITC и 7AAD). Клетки HeLa рассеивали (6×10^4 на лунку) в 24-луночные планшеты. Через 16 ч вносили НЧ на 24 ч до конечной концентрации 200 мкг/мл. Через 24 ч 100 мкл взвеси клеток в физиологическом буфере смешивали с 100 мкл реагента Muse™ Annexin V и инкубировали 20 мин в темноте. Транслокация фосфатидилсерина на внешнюю поверхность плазматической мембраны является признаком раннего апоптоза и детектируется с помощью белка аннексина V, конъюгированного с FITC (флуоресцеина изотиоционатом), в то же время 7AAD (7-аминоактиномицин D) проникает только через

поврежденную мембрану (некроз) и связывается с ДНК, что является признаком позднего апоптоза или некроза. Результаты получали с использованием анализатора клеток Muse™ (Merck Millipore).

Окрашивание активных форм кислорода (АФК). Диацетат 2', 7'-дихлордигидрофлуоресцеина (DCFDA) использовали для окрашивания АФК в клетках нейробластомы IMR-32. Клетки инкубировали с исследуемыми соединениями 4 ч, удаляли культуральную среду и добавляли DCFDA в физиологическом буфере (конечная концентрация 1 мкМ). Клетки визуализировали с использованием МИБ-Р (Ломо Микросистемы, Россия).

Облучение культур клеток и анализ способности к колониеобразованию. Клетки линии НСТ-116 инкубировали с радиомодификаторами- НЧ оксида гафния и тантала в концентрации 250 мкг/мл в течение суток, после чего облучали рентгеновским излучением с максимальной энергией фотонов в спектре 200 кэВ в дозах 0,5-10 Гр. Затем проводили клоногенный анализ. 500 клеток растили на чашках 10 см в течение 14 дней, после чего клетки фиксировали метанолом и окрашивали 0,5% раствором кристаллического фиолетового. Число колоний в контрольных чашках, не подвергавшихся облучению, принималось за 100%, относительно него вычислялся процент колониеобразования в остальных чашках эксперимента.

Животные. Самцов мышей Balb/c содержали в виварии Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина. Животные получали свободный доступ к питьевой воде и стандартным диетическим гранулам *ad libitum*.

Оценка острой токсичности. Мышей разделили на группы (контрольная и 6 экспериментальных групп) по 4 животных в группе. 4 % золи TiO_2 , ZrO_2 , HfO_2 , Ta_2O_5 , Fe_3O_4 и $AlOOH$ (неразбавленными) вводили через желудочный зонд несколько раз в течение 8 ч в объеме 1.5-1.8 мл, содержащем суммарную дозу 3 г/кг массы тела животного. Контрольная группа получала деионизированную воду в равном объеме. Поскольку все животные, которым вводили 3 г/кг ZrO_2 , погибли, были исследованы также дозы 500 мг/кг и 2000 мг/кг для расчета значений LD_{50} . Масса тела, состояние волосяного покрова, пищевое и общее поведение контролировались ежедневно до 14 дней; после этого интервала времени мышей выводили из эксперимента дислокацией шейных позвонков. Печень, почки, селезенка, мозг, сердце, тимус, яичко, легкие с трахеей исследовали макроскопически и взвешивали. Относительную массу отдельных органов рассчитывали как отношение массы органа к массе животного.

Гистопатологическая оценка. Образцы тканей обрабатывали стандартными методами световой микроскопии: фиксация, окрашивание гематоксилином и эозином (Г&Э) и окрашивание крезоловым фиолетовым (окрашивание по Нисслю).

Статистика. Каждый эксперимент на культуре клеток проводился в трех повторностях. Данные представлены в виде среднего значения величины \pm стандартная ошибка среднего (СОШ). Статистический анализ

проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента или критерия Манна-Уитни (MS Office Excel и Statistica Software). Статистическая значимость рассматривалась при $p < 0,05$. LD₅₀ рассчитывали с использованием пробит-теста.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Метаболическая активность клеток в присутствии непокрытых НЧ. В настоящее время НЧ используются в биомедицине, однако недостаточно информации о жизнеспособности клеток в присутствии НЧ оксидов металлов, синтезированных в одинаковых условиях, обладающих схожими размерами. Изучена метаболическая активность клеток HeLa и ПФЧ после 72 ч инкубации с НЧ AlOOH, TiO₂, Fe₃O₄, ZrO₂, HfO₂, Ta₂O₅. Клетки HeLa наиболее чувствительны к НЧ Ta₂O₅ при воздействии 200 мкг/мл, в то время как ПФЧ продемонстрировали максимальное снижение метаболической активности в присутствии НЧ оксида железа (Рисунок 1).

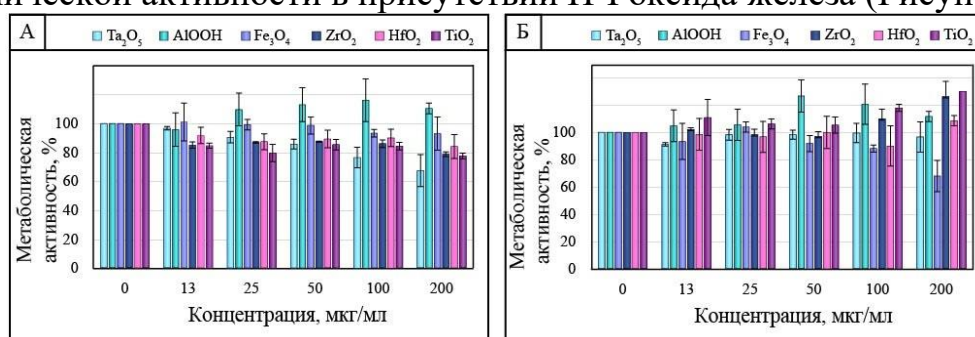


Рисунок 1 – Метаболическая активность клеток после 72-часового воздействия НЧ AlOOH, TiO₂, Fe₃O₄, ZrO₂, HfO₂, Ta₂O₅ (МТТ- тест) А) HeLa; Б) ПФЧ.

Для изучения индукции апоптоза или некроза в клетках HeLa произведена окраска Аннексином V/7-ААД, позволяющими разделить популяции клеток на ранние/поздние апоптотические или некротические, после 24 ч инкубации с НЧ. Доля апоптотических и некротизированных клеток во всех образцах сопоставима с контрольными значениями (Рисунок 2).

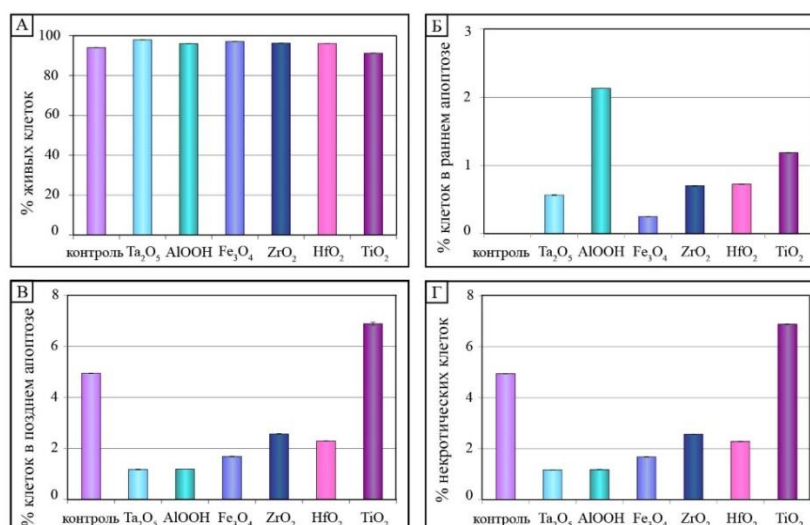


Рисунок 2 – Жизнеспособность клеток HeLa, обработанных золями AlOOH , TiO_2 , ZrO_2 , HfO_2 , Ta_2O_5 , Fe_3O_4 в течение 24 часов. (А) Процент живых клеток, (Б) Ранние апоптотические клетки, (В) Поздние апоптотические клетки, (Г) Некротические клетки.

3.2 Острая токсичность непокрытых НЧ. Для изучения токсичности синтезированных НЧ, золи вводили внутрижелудочно мышам в дозе 3 г/кг. В случае гибели животных, наблюдавшейся только при введении НЧ оксида циркония, также исследовали меньшие дозы. Введение 3 г/кг зольей НЧ TiO_2 , HfO_2 , Ta_2O_5 , Fe_3O_4 и AlOOH не вызывало видимых признаков интоксикации или же являлось причиной обратимых (в течение нескольких часов) изменений. Расчетная LD_{50} для ZrO_2 составила 2277,8 мг / кг, поэтому НЧ были классифицированы как малотоксичные. За животными наблюдали в течение 14 дней, после чего проводили аутопсию, макроскопическое и микроскопическое исследование внутренних органов. Массовые коэффициенты органов животных представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Относительная масса органов после введения 4 % зольей НЧ TiO_2 , ZrO_2 , HfO_2 , Ta_2O_5 , Fe_3O_4 и AlOOH . Данные представлены как средние значения \pm СОШ.

| Орган | Контроль | Ta_2O_5 3 г/кг | AlOOH 3 г/кг | Fe_3O_4 3 г/кг | ZrO_2 2 г/кг | HfO_2 3 г/кг | TiO_2 3 г/кг |
|------------------|------------------|-----------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Сердце | 4.61 \pm 0.30 | 4.63 \pm 0.19 | 5.15 \pm 0.16 | 4.84 \pm 0.12 | 4.98 \pm 0.18 | 5.02 \pm 0.18 | 4.92 \pm 0.13 |
| Легкие | 9.63 \pm 0.42 | 12.23 \pm 0.72 | 10.32 \pm 0.88 | 9.07 \pm 1.00 | 8.33 \pm 0.88 | 12.79 \pm 0.72 | 10.16 \pm 1.31 |
| Тимус | 1.81 \pm 0.18 | 1.76 \pm 0.09 | 1.99 \pm 0.09 | 1.78 \pm 0.13 | 1.50 \pm 0.14 | 1.89 \pm 0.14 | 2.47 \pm 0.28 |
| Печень | 55.39 \pm 0.99 | 52.19 \pm 1.47 | 51.90 \pm 0.47* | 53.18 \pm 1.89 | 45.30 \pm 1.98* | 52.67 \pm 0.55 | 47.03 \pm 1.91* |
| Селезенка | 4.87 \pm 0.21 | 4.95 \pm 0.27 | 4.16 \pm 0.12* | 4.26 \pm 0.25 | 3.47 \pm 0.18* | 4.35 \pm 0.11 | 4.61 \pm 0.33 |
| Почка (левая) | 6.42 \pm 0.36 | 6.62 \pm 0.21 | 6.61 \pm 0.13 | 7.03 \pm 0.33 | 6.67 \pm 0.18 | 6.95 \pm 0.23 | 6.54 \pm 0.22 |
| Головной мозг | 18.12 \pm 0.19 | 18.50 \pm 0.39 | 13.75 \pm 4.36 | 18.21 \pm 0.40 | 18.64 \pm 0.53 | 18.16 \pm 0.53 | 19.11 \pm 0.11* |
| Яички | 7.03 \pm 0.18 | 7.02 \pm 0.06 | 6.70 \pm 0.50 | 7.53 \pm 0.07 | 6.29 \pm 0.46 | 7.49 \pm 0.10 | 6.80 \pm 0.26 |

* Статистически значимые отличия от контрольной группы. $P < 0.05$

Не выявлено статистически значимых изменений в массовых коэффициентах внутренних органов мышей, получавших НЧ HfO_2 , Ta_2O_5 , Fe_3O_4 . Наблюдали значительное снижение массовых коэффициентов печени и селезенки у мышей после введения НЧ ZrO_2 и AlOOH . Учитывая гибель животных при введении высоких доз ZrO_2 , изменения внутренних органов дополняют общую картину интоксикации. Что касается результатов, полученных при анализе массовых коэффициентов органов после введения НЧ AlOOH , они позволяют предположить, что несмотря на отсутствие внешних токсических проявлений интоксикации, соединение в высоких дозах все же обладает небольшим токсическим эффектом, выраженном в снижении массовых коэффициентов печени и селезенки. У животных, которым были введены НЧ TiO_2 , наблюдалось снижение массового коэффициента печени, и обнаруживалась гипертрофия головного мозга.

Микроструктура органов животных после введения 4% зольей НЧ TiO_2 , HfO_2 , Ta_2O_5 , Fe_3O_4 и AlOOH не отличалась от контрольной когорты, за исключением группы, получившей ZrO_2 в дозах 2000 мг/кг и 3000 мг/кг. Тимус, сердце, легкие, печень, селезенка, почки, мозг, яички мышей после внутрижелудочного введения зольей НЧ TiO_2 , HfO_2 , Ta_2O_5 , Fe_3O_4 и AlOOH , имели нормальную морфологию.

Тимус, печень, селезенка, почки, ткани яичек животных после введения НЧ ZrO_2 были без существенных изменений. В микропрепаратах миокарда у животных, умерших после введения ZrO_2 , наблюдались контрактуры кардиомиоцитов, что, возможно, вызвало нарушения сердечного ритма. Слабое кровоснабжение чередуется с очагами венозного полнокровия и эритростаза (рисунки 3А-С). В ткани легкого наблюдались диффузное полнокровие и эритростаз. Частичный альвеолярный коллапс был обнаружен в паренхиме. Альвеолярные перегородки утолщены из-за отека. Многочисленные эритроциты в альвеолярном просвете указывали на повышенную проницаемость гематоэнцефалического барьера. Значительных изменений не наблюдалось в бронхах (рисунок 3D). В мозге гибель нейронов сопровождалась микроглиальной реакцией, коллапсом мелких сосудов и отеком (рисунки 3F,G). Большие сосуды содержали скопления эритроцитов. Эти гистологические признаки позволили предположить, что гибель животных вызвана значительным снижением функции сердца, по-видимому, связанного с аритмией, отеком легких и ишемией головного мозга.

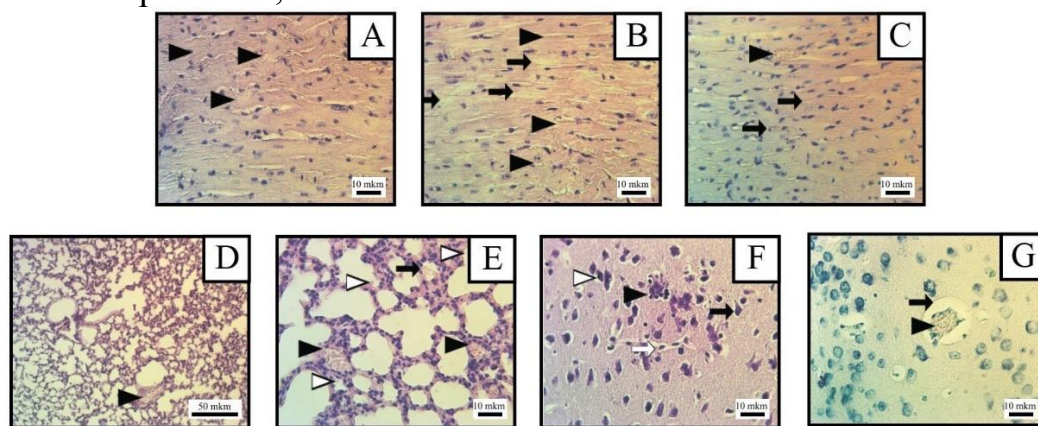


Рисунок 3 – А-С: Миокард. Г&Э окрашивание. D, E: легкие. Г&Э окрашивание. F: кора головного мозга прецентральной извилины мозга. Г&Э окрашивание. То же, что F, окрашивание по Нисслю.

Предполагаемый механизм токсического действия НЧ ZrO_2 представлен на рисунке 4.

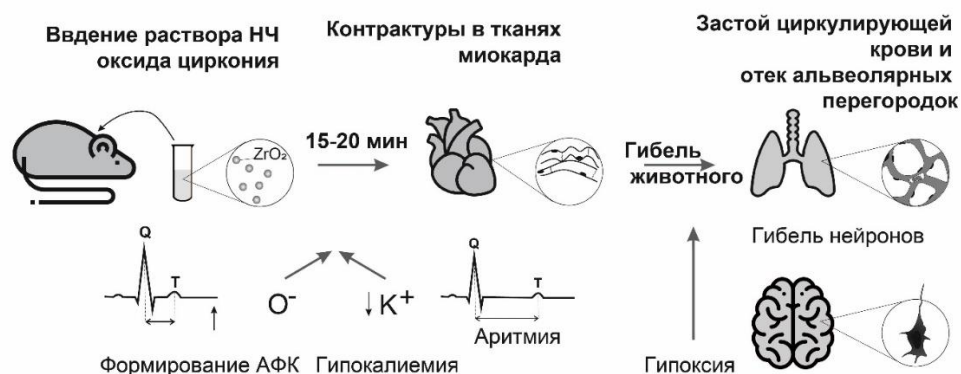


Рисунок 4 – Механизм токсического действия НЧ ZrO₂

3.3 Изменения компонентов врожденного иммунитета в присутствии НЧ. Другим важным параметром оценки безопасности наноматериалов является их взаимодействие с иммунной системой. На введение НЧ в организм реагирует врожденный иммунитет (поглощение НЧ макрофагами). В данной части работы изучены НЧ Fe₃O₄, TiO₂ и AlOOH, предполагаемые для системного введения. Для исследования влияния НЧ на компоненты врожденного иммунитета, первоначально потребовалось подобрать субтоксические дозы соответствующих НЧ, не вызывающие значительной гибели культур клеток. НЧ Fe₃O₄, TiO₂ и AlOOH не оказывали цитотоксического воздействия на моноцитарные клетки человека (линия THP-1) в диапазоне концентраций 0,234-30 мкг / мл в течение 72 ч: выживаемость клеток не опускалась ниже 80%.

Для оценки влияния НЧ на относительную экспрессию TLR 4 и -6 в моноцитах THP-1 использовали концентрации, при которых жизнеспособность клеток составляла не менее 80% в МТТ-тесте: 30 мкг/мл для Fe₃O₄ и AlOOH, 25 мкг/мл для TiO₂. Клетки инкубировали с этими НЧ или с 1 мкг/мл ЛПС в качестве индуктора TLR-ответа в течение 24 ч. Наибольшую индукцию TLR-4 наблюдали под влиянием НЧ AlOOH, при воздействии которых экспрессия увеличивалась в 1,6 раза. Следует отметить, что уровень TLR-4 после инкубации с AlOOH сопоставим с эффектом ЛПС (рисунок 5).

Экспрессия TLR-6 наиболее индуцирована также НЧ AlOOH (в 1,6 раза). НЧ TiO₂ повышали индукцию экспрессии в 1,5 раза. Наименьший сравнительный эффект проявляли НЧ Fe₃O₄, увеличившие экспрессию в 1,4 раза. Таким образом, наиболее мощным индуктором TLR являются НЧ AlOOH.

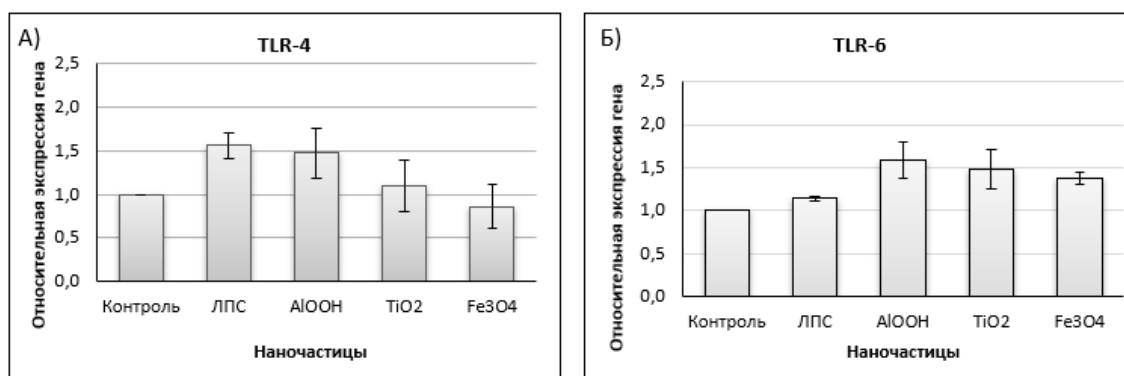


Рисунок 5 – Относительная экспрессия генов TLR-4 (А) и TLR-6 (Б) в клетках THP-1 после 24-часового воздействия НЧ или ЛПС.

3.4 Метаболические изменения клеток в присутствии соединений на основе магнетита. НЧ оксида железа широко используются в биомедицине - от контрастных агентов и гипертермии до лекарств с возможностью адресной доставки. Таким образом, важна оценка влияния соединений на основе магнетита на метаболическую активность культур клеток, как первая проверка биосовместимости новых “кандидатов” для медицинского применения.

Метаболическая активность клеток в присутствии стабильного золя магнетита. Результаты исследований метаболической активности клеток в присутствии НЧ магнетита представлены на рисунке 6. Выбор максимальной концентрации обусловлен концентрацией НЧ оксида железа в стабильном золе. НЧ магнетита (12,5-200 мкг/мл) не проявляют цитотоксического действия на клетки HeLa и ФЛЭЧ после 72-часового воздействия. Метаболическая активность клеток (по восстановлению тетразолиевой соли) составляла 80,8% от контрольных значений (для клеток ФЛЭЧ) и 87,6% (для клеток HeLa), что указывает на то, что НЧ магнетита не вызвали значительной гибели клеток.

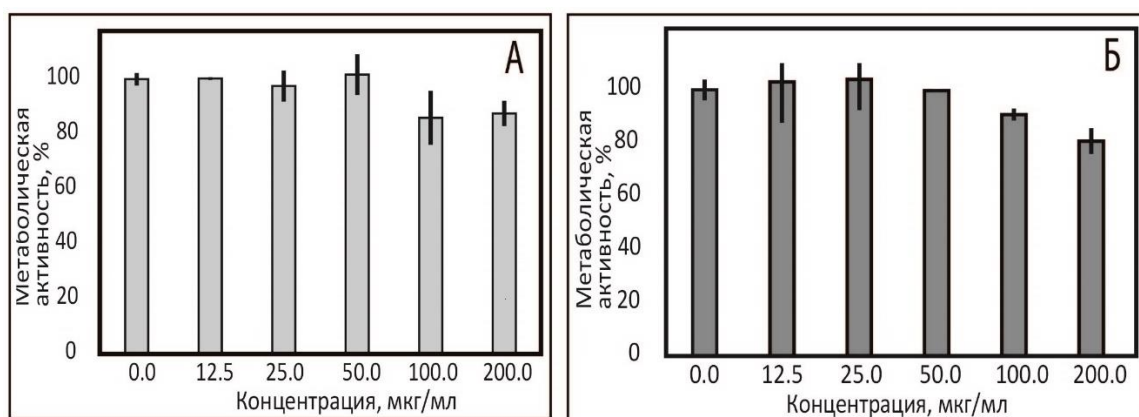


Рисунок 6 – Влияние магнетита на выживаемость (А) клеток HeLa и (Б) ФЛЭЧ после 72 ч воздействия.

Метаболическая активность клеток в присутствии геля магнетита и магнитных наноконтейнеров. Гидрогель магнетита уникален тем, что обладает высокой площадью поверхности и большой сорбционной емкостью. После 72-часовой экспозиции геля магнетита (17-270 мкг/мл) клетки МСК и HeLa не продемонстрировали какого-либо значительного снижения

метаболической активности (рисунки 7 А, Б). Гель магнетита проявляет эффект, аналогичный НЧ магнетита в равных дозах.

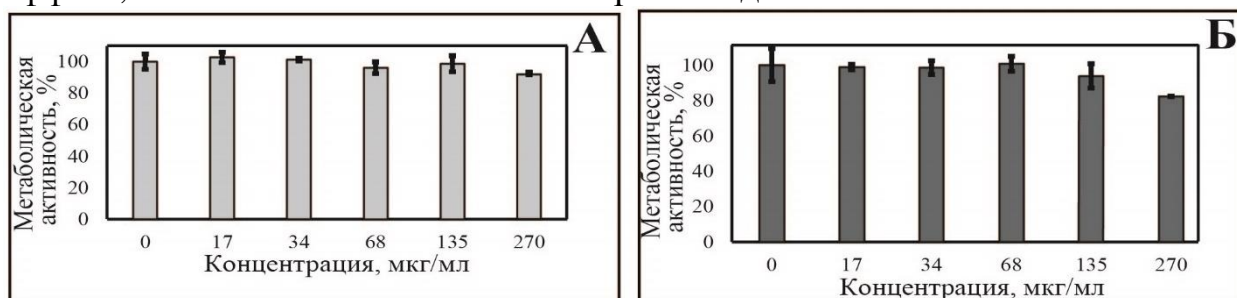


Рисунок 7 – Метаболическая активность клеток МСК (А) и HeLa (Б) после инкубации с гелем магнетита в течение 72 ч.

Магнитные наноконтейнеры (МНК) получены из гидрогеля магнетита методом микроэмульсионного синтеза. Количественный анализ показал незначительное снижение метаболической активности клеток через 72 ч инкубации с МНК в концентрациях 16- 260 мкг/мл (рисунок 8): цитотоксичность МНК сравнима с таковой для НЧ магнетита при воздействии эквивалентных доз.

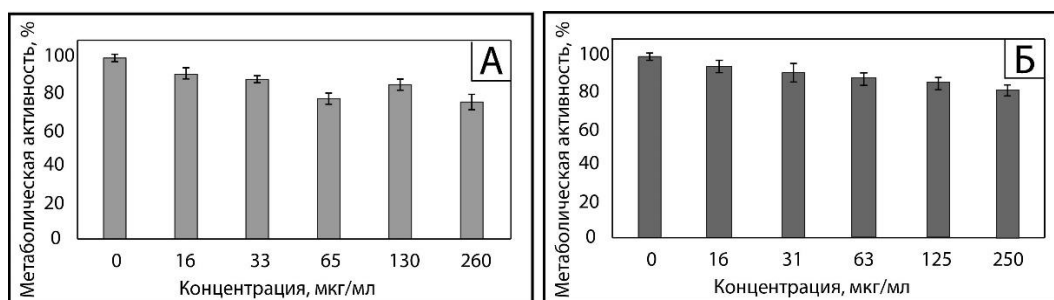


Рисунок 8 – Влияние МНК на метаболическую активность HeLa (А) и ПФЧ (Б) (72 часа инкубации).

НЧ способны индуцировать оксидативный стресс в клетках. Изучена динамика содержания активных форм кислорода (АФК) в клетках после инкубации с МНК. Клетки окрашивали DCFDA. После инкубации клеток линии IMR-32 с 250 мкг/мл МФК не было зафиксировано генерации активных форм кислорода. При наблюдении клеток IMR-32 методом фазово-контрастной микроскопии после 24 ч инкубации с МНК зафиксировано значительное накопление контейнеров в цитоплазме. Результаты подтверждают возможность использования МНК для адресной доставки благодаря их эффективному проникновению в клетки при минимальном влиянии на метаболизм.

3.5 Влияние оксигидроксида алюминия на метаболическую активность клеток. Оксигидроксид алюминия является соединением, одобренным для парентерального введения а также адьювантом вакцин. Исследование биосовместимости новых материалов для доставки лекарств на основе оксигидроксида алюминия перспективно для комбинирования доставки и стимуляции иммунной системы.

Действие НЧ оксигидроксида алюминия (бемита) на метаболическую активность клеток изучено на линиях HeLa и A549. Использовали 10% алюминиевые ксерогелевые наноконтейнеры (АКН) и порошок матрикса НЧ.

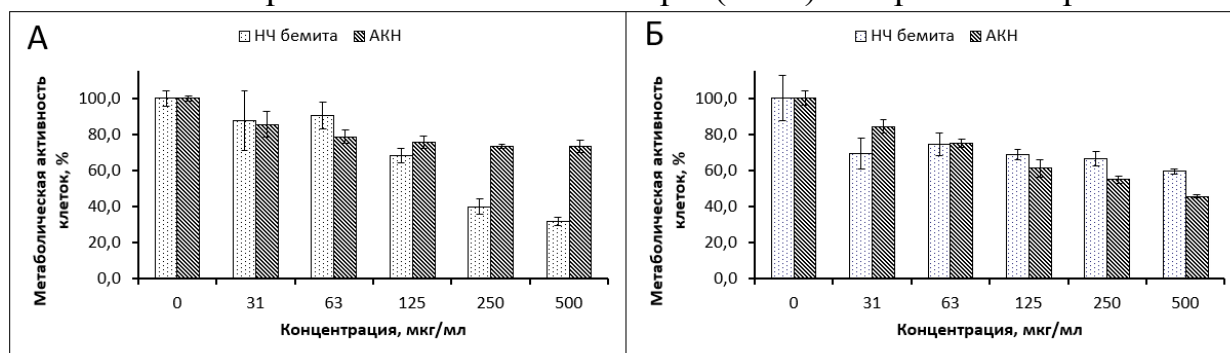


Рисунок 9 – Метаболическая активность клеток линии (А) HeLa и (Б) A549 после обработки АКН и НЧ бемита в течение 72 ч.

Для оценки биосовместимости АКН и НЧ бемита клетки HeLa и A549 обрабатывали различными концентрациями образцов (31-500 мкг / мл) в течение 72 ч и проводили МТТ-тест. На рисунке 9 показано, что в низких концентрациях (31 мкг/мл и 63 мкг/мл) метаболическая активность идентична для обеих клеточных линий. Для линии HeLa не наблюдали выраженной дозозависимой цитотоксичности АКН в диапазоне от 63 мкг/мл до 500 мкг/мл. Обнаружено значительное снижение выживаемости клеток после добавления НЧ бемита в концентрациях от 125 мкг/мл до 500 мкг/мл. В концентрациях 250 мкг/мл и 500 мкг/мл разница в метаболической активности была статистически значима. Для линии A549 наблюдали корреляцию цитотоксичности между АКН и НЧ бемита в концентрациях от 63 мкг/мл до 500 мкг/мл.

Для оценки влияния НЧ бемита на выживаемость клеток производили окраску пропидия иодидом линии A549, которая показала более высокую чувствительность по результатам МТТ-теста. Определение цитотоксичности БСА@ АКН представляло интерес в связи с перспективой использования в качестве адъюванта вакцин. Как модель белкового иммуногена был выбран БСА, присоединенный к АКН.

Клетки инкубировали с различными концентрациями НЧ бемита (рисунок 10А), чистыми АКН (рисунок 10Б) и бычьим сывороточным альбумином (БСА), энтрапированным в АКН (БСА@ АКН) (рис. 10В). Соединения инкубировали с клетками A549 в следующих концентрациях: 16 мкг/мл (D1), 32 мкг/мл (D2), 65 мкг/мл (D3), 130 мкг/мл (D4). На рисунке 10 представлено наложение гистограмм для всех концентраций (D1-D4) НЧ.

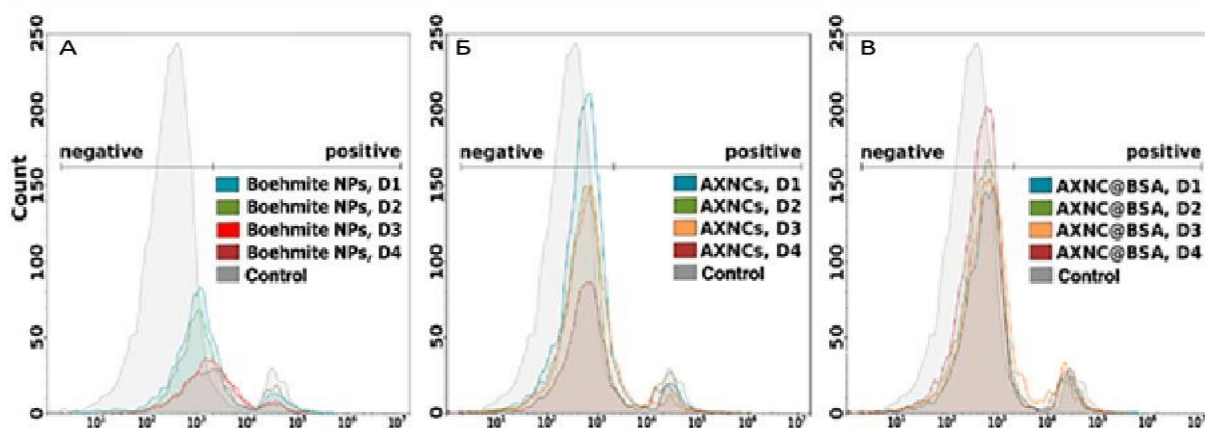


Рисунок 10 – Интенсивность флуоресценции клеток A549 в канале пропидия иодида, отражающая количество мертвых клеток после инкубации с различными концентрациями АКН и НЧ бемита. А) НЧ бемита Б) АКН В) БСА@АКН.

Наибольший процент PI-позитивных клеток выявлен после инкубации клеток A549 с НЧ бемита – 45%. Для АКН и БСА@АКН наблюдали сходную цитотоксичность в концентрациях D2 и D3. В концентрации D4 БСА@АКН обнаружено снижение цитотоксичности. Это может быть связано с образованием аддитивных агрегатов между БСА@АКН, не проникающих в клетки. Как ожидалось, цитотоксичность АКН в концентрации D4 увеличилась по сравнению с более низкими концентрациями.

На следующем этапе исследована эффективность проникновения потенциальных носителей лекарств - АКН - в клетки. Для этого клетки A549 инкубировали 72 ч в присутствии АКН, конъюгированных с родамином В (RdV @ АКН). Эффективность конъюгации оценивали в флуоресцентной микроскопии (рисунок 11А). Для оценки проникновения флуоресцентно меченных наноконтейнеров в клетки использовали проточную цитометрию. Полученные результаты дозозависимого проникновения RdV @ АКН в клетки A549 представлены на рисунке 11. С увеличением дозы наноконтейнеров происходит повышение флуоресценции (рисунок 11 Б), что свидетельствует о проникновении RdV @АКН в клетки. Эти данные демонстрируют высокий потенциал АКН в качестве средства доставки.

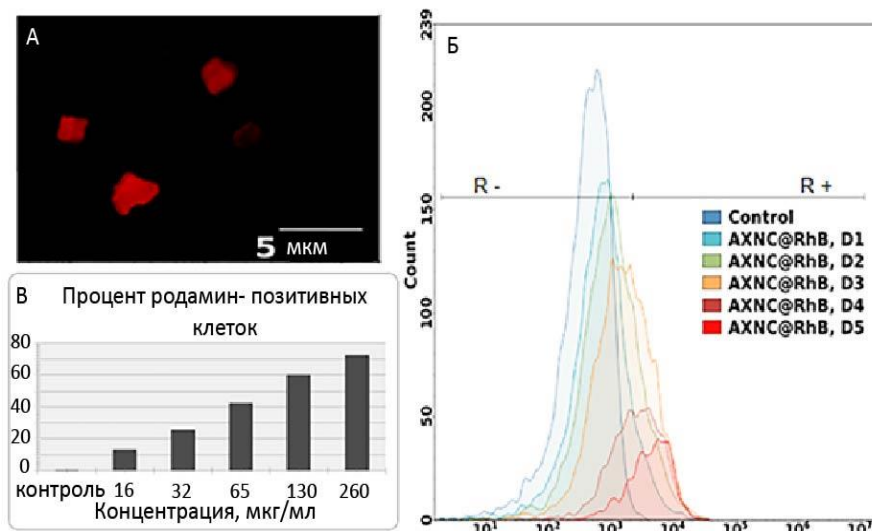


Рисунок 11 – Дозозависимое проникновение RdV @ АКН в клетки A549: А - Родамин В, энтрапированный в ксерогель оксида алюминия, флуоресцентная микроскопия, Б - интенсивность

флуоресценции клеток после 72-часовой инкубации с различной концентрацией RdB @ АКН (D1-D5), В – гистограмма флуоресценции клеток после инкубации с различными концентрациями НЧ.

3.6 Изменения метаболической активности клеток в присутствии НЧ оксидов гафния, циркония и тантала. Следующая глава данного исследования посвящена изучению влияния НЧ неорганических соединений, имеющих перспективы использования в качестве радиосенсибилизаторов, на метаболическую активность клеток.

Влияние немодифицированного оксида гафния и оксида гафния, допированного 5 % Lu + 5 % Eu на метаболическую активность клеток. Результаты МТТ-теста показали, что воздействие немодифицированных НЧ HfO_2 и $\text{HfO}_2:(5 \text{ mol } \% \text{ Lu} + 5 \text{ mol } \% \text{ Eu})$ в течение 24 часов приводило к дозозависимому снижению метаболической активности клеток ФЛЭЧ и демонстрировало цитотоксический эффект в дозе 2 мг/мл ($\text{HfO}_2:(5 \text{ mol } \% \text{ Lu} + 5 \text{ mol } \% \text{ Eu})$) и 0.5 мг/мл (чистый HfO_2) (рис. 12).

В тоже время МСК были менее чувствительны к воздействию НЧ в концентрациях ниже 0.5 мг/мл и более чувствительны в концентрациях больше 2 мг/мл, о чем свидетельствовало снижение метаболической активности клеток до 70.4% и 54.5 % после воздействия НЧ $\text{HfO}_2:(5 \text{ mol } \% \text{ Lu} + 5 \text{ mol } \% \text{ Eu})$ и HfO_2 , соответственно (рисунок 12).

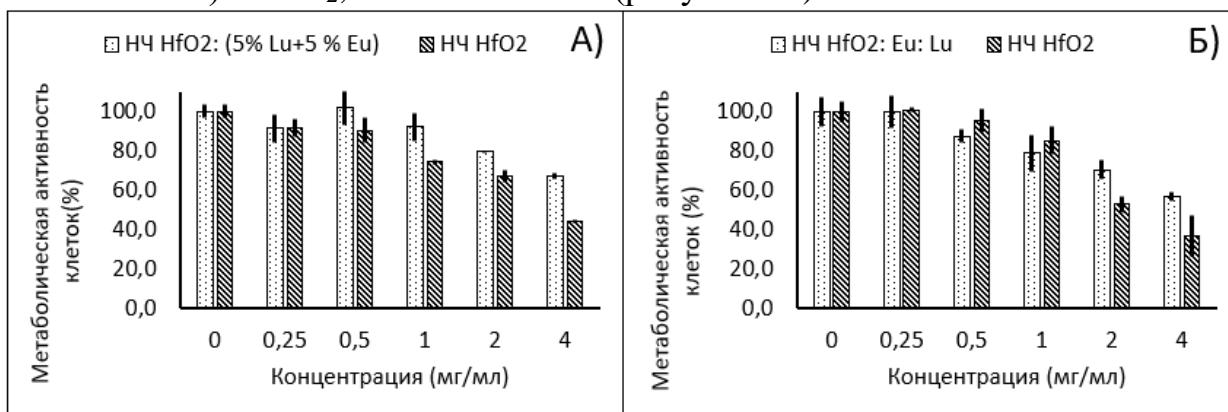


Рисунок 12 – Метаболическая активность фибробластов легкого эмбриона человека (ФЛЭЧ) (А) и мезенхимальных стволовых клеток (МСК) (Б) после 24 ч воздействия немодифицированных НЧ HfO_2 и $\text{HfO}_2:(5 \text{ моль}\% \text{ Lu} + 5 \text{ моль}\% \text{ Eu})$

Воздействие в течение 24 ч и 72 ч немодифицированных и допированных НЧ HfO_2 в дозах < 0.5 мг/мл, не приводило к токсическим эффектам. В более высоких концентрациях цитотоксичность возрастала; допированные НЧ HfO_2 демонстрировали меньшую токсичность, чем немодифицированные НЧ HfO_2 , что вероятно свидетельствует о том, что лантаний и европий прочно энтрапированы в кристаллическую решетку HfO_2 : высвобождение не происходит.

Влияние немодифицированных НЧ оксидов гафния и циркония, а также допированных иттербием (Yb) и эрбием (Er), на метаболическую активность неопухолевых и трансформированных клеток. Для сравнительного анализа эффектов НЧ изучено влияние НЧ на

метаболическую активность неопухолевых и трансформированных клеток. Наряду с НЧ HfO_2 исследован ZrO_2 – элемент с высоким атомным номером (Z). Для визуализации НЧ проведено допирование иттербием (Yb) и эрбием (Er) – апконверсионными флуорофорами.

На рисунке 13 (А, Б) показано, что в диапазоне концентраций 31-500 мкг/мл (выбранном в соответствии с результатами экспериментов, показавших отсутствие токсичности НЧ HfO_2 при концентрациях < 500 мкг/мл), немодифицированные НЧ HfO_2 не оказывали цитотоксического действия на клетки HeLa и ФЛЭЧ после 72 ч. Для допированных НЧ зафиксировано снижение метаболической активности клеток, зависимое от концентрации и процентного содержания лантаноидов: до 63 % и 52 % у клеток HeLa и ФЛЭЧ, соответственно. В то же время НЧ ZrO_2 были менее токсичны, чем НЧ HfO_2 : незначительное снижение метаболической активности (<25% у клеток HeLa и 10% у ФЛЭЧ после 72 ч (рисунки 13 (В, Г)). Влияние на метаболическую активность клеток было практически одинаково при действии немодифицированных и допированных образцов.

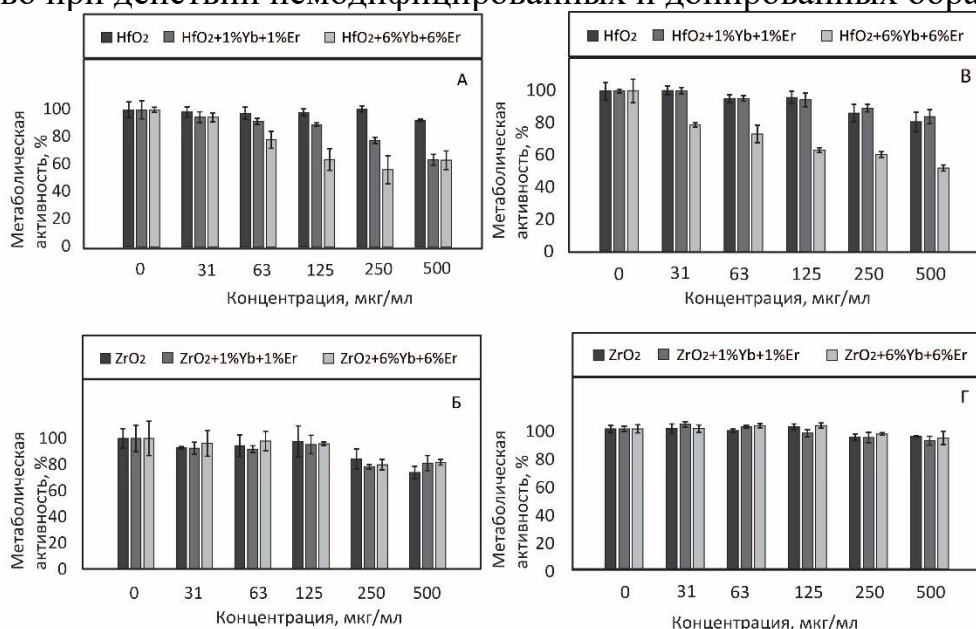


Рисунок 13 – Метаболическая активность клеток HeLa после 72 ч воздействия немодифицированных и допированных НЧ HfO_2 (А) и НЧ ZrO_2 (Б).

Радиосенсибилизация клеток в присутствии НЧ HfO_2 и TaO_2 . Для исследования радиосенсибилизации клеток наночастицами были выбраны НЧ HfO_2 и TaO_2 . По результатам наших исследований эти НЧ наименее токсичны *in vitro* и *in vivo*. НЧ TaO_2 в дозе 250 мкг/мл снижали способность клеток НСТ-116 образовывать колонии после облучения дозой 2 Гр, близкой к IC_{50} , в два раза по сравнению с контролем. НЧ оксида гафния также влияют на количество образованных колоний, однако в меньшей степени – количество колоний составляло 85% от уровня клеток, облученных без радиосенсибилизации.

3.7 Эффекты ДНК-наноструктур в культурах клеток человека

Для исследований был выбран дезоксирибозим 10-23, обладающий каталитической активностью в отношении РНК. Для изучения эффективности доставки, а также токсичности была выбрана последовательность, направленная на расщепление искусственной последовательности F субстрата – модельной РНК.

Для исследования влияния различных ДНК конструкций на жизнеспособность клеток, а также зависимости эффективности доставки от сложности конструкции, в клетки линии HeLa и K562 трансфецировали дезоксирибозим и ДНК-наноконструкции различного размера и сложности структуры, содержащие такой же дезоксирибозим (представлены на рисунке 14). Присоединение дезоксирибозима позволяет стабилизировать конструкцию - сделать ее устойчивой к эндогенным нуклеазам, а также дает возможность модификации и усложнения для обеспечения многофункциональности.

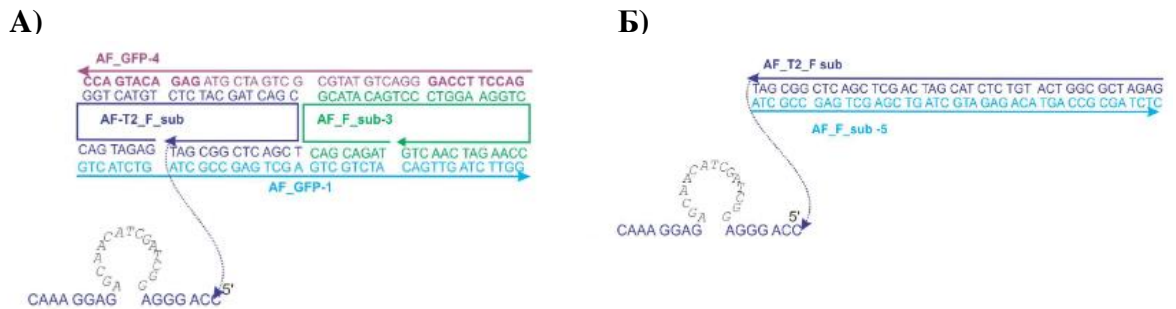


Рисунок 14 – Дизайн ДНК наноконструкций, трансфецированных в культуры клеток А) «Тяжелый» дизайн, состоящий из четырех олигонуклеотидных цепей Б) «Легкий» дизайн, состоящих из двух комплементарных олигонуклеотидных цепей.

Подбор оптимальных условий трансфекции. Для доставки ДНК-конструкций в клетку использовали липофектамин 2000. Определены нетоксичные концентрации липофектамина 2000 после 24 ч инкубации с использованием 100 нм олигонуклеотида (Дз), меченного флуорофором FAM (Дз FAM).

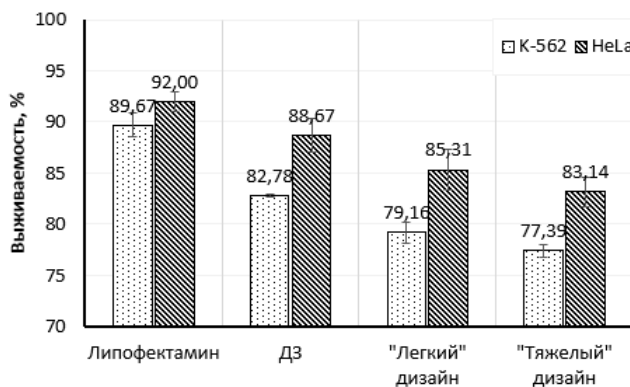
Влияние сложности организации ДНК конструкций на эффективность доставки в клетки. Важной характеристикой поведения ДНК-конструкций в культурах клеток, является предел насыщения. Для исследования данного критерия клетки K562 и HeLa трансфецировали возрастающими концентрациями Дз FAM и «тяжелого» дизайна ДНК-наноконструкции, затем оценивали процент светящихся клеток после 24 ч инкубации. В таблице 2 представлены данные, отражающие процент флуоресцирующих клеток.

Таблица 2 – Зависимость эффективности трансфекции Дз FAM и тяжелого дизайна ДНК-конструкции от концентрации олигонуклеотида.

| Концентрация олигонуклеотидов, нМ | Процент FAM позитивных клеток Линия K562 | | Процент FAM позитивных клеток Линия HeLa | |
|-----------------------------------|---|----------------------------------|---|----------------------------------|
| | Дз | «Тяжелый» дизайн ДНК-конструкции | Дз | «Тяжелый» дизайн ДНК-конструкции |
| 10 | 31 | 37 | 60 | 58 |
| 50 | 76 | 73 | 89 | 89 |
| 100 | 83 | 84 | 92 | 90 |
| 200 | 90 | 90 | 91 | 90 |

Для линии HeLa предел насыщения наступает при концентрации 100 нМ, трансфекция 200 нМ ДЗ FAM и «тяжелого» дизайна ДНК-наноконструкции не приводит к повышению количества флуоресцирующих клеток. В то же время для линии K562 увеличение процента флуоресцирующих клеток происходит вплоть до 200 нМ. Значительной разницы между эффективностью трансфекции дезоксирибозима и «тяжелого» дизайна ДНК-наноконструкции не наблюдалось, что свидетельствует о том, что усложнение организации и увеличение молярной массы трансфецируемого агента не ухудшают доставку (таблица 2).

Исследование токсичности ДНК конструкций на культурах клеток человека. Жизнеспособность клеток при введении ДНК-конструкций различного дизайна позволяет оценить степень токсичности вводимых компонентов. В клетки линий HeLa и K562 трансфецировали дезоксирибозим и ДНК-наноконструкции, содержащие такой же дезоксирибозим, и оценивали жизнеспособность после 24 ч инкубации по окраске клеток пропидия иодидом (рис.15). Выявлена более высокая чувствительность



клеток K562 к воздействию ДНК наноконструкций по сравнению с HeLa. По мере увеличения концентрации и сложности конструкций, токсичность возрастает, однако 100 нМ можно считать относительно безвредной концентрацией для всех типов конструкций.

Рисунок 15 – Сравнение цитотоксичности дезоксирибозима, «легкой» и «тяжелой» ДНК-наноконструкции после 24 часов инкубации. Представлены средние значения трех независимых экспериментов.

Таким образом, сложность ДНК-конструкции не оказывают существенного влияния на жизнеспособность клеток. Трансфекция конструкций «тяжелого» дизайна незначительно ухудшает выживаемость клеток в сравнении с «легкой» формой.

ВЫВОДЫ

1. Метаболическая активность культивируемых клеток, определяемая по активности дегидрогеназ, не подавляется при воздействии НЧ оксидов металлов TiO₂, HfO₂, Ta₂O₅, Fe₃O₄ с немодифицированной поверхностью;

также они не оказывают токсического действия на организм мыши в концентрациях, позволяющих получить биосовместимую суспензию. НЧ ZrO_2 проявляют токсичность для мышей в высоких дозах (LD_{50} 2277,8 мг/кг) из-за повреждений миокарда, развития отека легких и гипоксии головного мозга.

2. Экспрессия гена, кодирующего рецептор врожденного иммунитета TLR-6 в клетках линии THP-1, регулируется воздействием НЧ Fe_3O_4 , $AlOOH$, TiO_2 – исследованные концентрации вызывают статистически значимое увеличение экспрессии в 1,4-1,6 раз. НЧ $AlOOH$ также индуцируют экспрессию TLR-4 (увеличение в 1,5 раза по сравнению с контролем).

3. Модификации НЧ магнетита – гель магнетита и магнетитовые наноконтейнеры – не вызывают выраженной токсичности по сравнению с немодифицированными НЧ магнетита, что свидетельствует об их применимости в качестве биосовместимых носителей для доставки лекарств.

4. Метаболическая активность культур клеток статистически значимо сильнее угнетается НЧ $AlOOH$ по сравнению с алюминиевыми ксерогелевыми наноконтейнерами (АКН). На модели родамин@АКН показано, что последние могут проникать в клетки, что перспективно для разработки вакцин, упакованных в адьювантный материал.

5. Метаболическая активность клеток не претерпевает значительных изменений при воздействии немодифицированных и допированных НЧ оксида гафния (<0.5 мг/мл). Допированные Eu и Lu НЧ HfO_2 меньше влияют на метаболическую активность по сравнению с недопированными частицами. Допирование ZrO_2 тербием и иттербием не увеличивает цитотоксичность.

6. ДНК-наноконструкции на основе дезоксирибозимов доставляются в культуры клеток человека и практически нетоксичны. Усложнение организации и увеличение количества нуклеотидов в конструкции не ухудшают доставку и не увеличивают токсичность, что важно для развития терапевтических ДНК-нанотехнологий.

7. Определяющим фактором токсичности наноструктур, рассмотренных в исследовании, являются их химический состав и свойства поверхности, а не сложность организации, что доказано отсутствием токсического действия при усложнении уровня организации наноструктур – допировании лантаноидами, формировании наноконтейнеров из отдельных НЧ или создании ДНК- наноконструкций из нескольких комплементарных цепей, содержащих дезоксирибозим.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Vasilichin V. A. Effects of Metal Oxide Nanoparticles on Toll-Like Receptor mRNAs in Human Monocytes / V. A. Vasilichin, S. A. Tsymbal, A. F. Fakhardo, E. I. Anastasova, A. S. Marchenko, A. A. Shtil, V.V. Vinogradov, E. I. Koshel // *Nanomaterials* – 2020. – Т. 10. – №. 1. – С. 127.
2. Nedorezova, D. D. Deoxyribozyme-based DNA Machines for Cancer Therapy / D. D. Nedorezova, A. F. Fakhardo, T. Molden, D. M. Kolpashchikov // *ChemBioChem* – 2020.

3. Fakhardo A.F. Toxicity Patterns of Clinically Relevant Metal Oxide Nanoparticles / A.F. Fakhardo, E.I. Anastasova, S.R. Gabdullina, A.S. Soloveva, V.B. Saparova, V. V. Chrishtop, E.D. Koshevaya, E.F. Krivoshapkina, P.V. Krivoshapkin, G.O. Kiselev, P.A. Kalikina, E. I. Koshel, A. A. Shtil, V.V. Vinogradov // ACS Applied Bio Materials – 2019. – T. 2. – №. 10. – C. 4427-4435.
4. Kiseleva A. Optically active hybrid materials based on natural spider silk / A. Kiseleva, G.O. Kiselev, V. Kessler, G. Seisenbaeva, D. Gets, V. Rummyantseva, T. Lyalina, A.F. Fakhardo, P.V. Krivoshapkin, E.F. Krivoshapkina // ACS Applied Materials & Interfaces – 2019. – T. 11. – №. 26. – C. 22962-22972.
5. Nedorezova, D.D. Towards DNA Nanomachines for Cancer Treatment: Achieving Selective and Efficient Cleavage of Folded RNA / D. D. Nedorezova, A. F. Fakhardo, D. V. Nemirich, E. A. Bryushkova, D. M. Kolpashchikov // Angewandte Chemie – 2019. – T. 58. – №. 14. – C. 4654-4658.
6. Solovev Y. V. Sol-gel derived boehmite nanostructures is a versatile nanoplatform for biomedical applications / Y. V. Solovev, A. Y. Prilepskii, E. F. Krivoshapkina, A. F. Fakhardo, E. A. Bryushkova, P. A. Kalikina, E. I. Koshel, V. V. Vinogradov //Scientific reports. – 2019. – T. 9. – №. 1. – C. 1-14.
7. Prilepskii A. Y. Urokinase-conjugated magnetite nanoparticles as a promising drug delivery system for targeted thrombolysis: synthesis and preclinical evaluation / A. Y. Prilepskii, F A. Fakhardo, A. S. Drozdov, V. V. Vinogradov, I. P. Dudanov, A. A. Shtil, P. P. Bel'tyukov, A. M. Shibeko, E. M. Koltsova, D. Y. Nechipurenko, V.V. Vinogradov //ACS Applied Materials & Interfaces. – 2018. – T. 10. – №. 43. – C. 36764-36775.
8. Anastasova E. I. Magnetite nanocontainers: toward injectable highly magnetic materials for targeted drug delivery/ E. I. Anastasova, A. Y. Prilepskii, A. F. Fakhardo, A. S. Drozdov, V.V. Vinogradov //ACS applied materials & interfaces. – 2018. – T. 10. – №. 36. – C. 30040-30044.
9. Shabanova E. M. Thrombin@ Fe₃O₄ nanoparticles for use as a hemostatic agent in internal bleeding/ E. M. Shabanova, A. S. Drozdov, A. F. Fakhardo, I. P. Dudanov, M. S. Kovalchuk, V. V. Vinogradov //Scientific reports. – 2018. – T. 8. – №. 1. – C. 1-10.
10. Anastasova E. I. A pure magnetite hydrogel: synthesis, properties and possible applications/ E. I. Anastasova, V. Ivanovski, A. F. Fakhardo, A. I. Lepeshkin, S. Omar, A. S. Drozdov, V.V. Vinogradov //Soft matter. – 2017. – T. 13. – №. 45. – C. 8651-8660.
11. Andreeva Y. I. The controllable destabilization route for synthesis of low cytotoxic magnetic nanospheres with photonic response / Y. I. Andreeva, A. S. Drozdov, A. F. Fakhardo, N. A. Cheplagin, A. A. Shtil, V.V. Vinogradov //Scientific reports. – 2017. – T. 7. – №. 1. – C. 1-9.
12. Furasova A. D. Synthesis of a rare-earth doped hafnia hydrosol: Towards injectable luminescent nanocolloids / A. D. Furasova, A. F. Fakhardo, V. A. Milichko, E. Tervoort, M. Niederberger, V.V. Vinogradov //Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. – 2017. – T. 154. – C. 21-26.

Глава в монографии

1. Drozdov A. S. Sol-gel composites based on alumina and ferria for cardiovascular diseases treatment/ A. S. Drozdov, A. F. Fakhardo, V. V. Vinogradov //Biocompatible Hybrid Oxide Nanoparticles for Human Health. – Elsevier, 2019. – С. 149-179.

Патент

1. Пат. 2674032 Российская Федерация. Способ получения урокиназы, энтрапированной в коллоидный магнитный керамический нанокompозитный материал [Текст] / Виноградов В.В., Дуданов И.П., Фахардо А.Ф., Дроздов А.С., Виноградов В.В.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики" (Университет ИТМО). - N2018120809, заявл. 05.06.18; опубл. 04.12.18, Бюлл. N 34. – 21 с.: ил.

БЛАГОДАРНОСТЬ

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю, д.х.н. Виноградову Владимиру Валентиновичу и научному консультанту д.м.н. Штилю Александру Альбертовичу за руководство работой, наставничество, советы по постановке экспериментов и интерпретации результатов, к.х.н. Скворцовой Наталье Николаевне за советы по редакции текста диссертации.

Автор благодарит всех соавторов статей, главным образом к.б.н. Колпащикова Д.М. за руководство направлением работ по ДНК-наноконструкциям; к.х.н. Кривошапкину Е.Ф., к.х.н. Дроздова А.С., Анастасову Е.Я., Киселева Г.О., Фурасову А.Д. за синтез и характеристику наночастиц, использованных в исследовании; к.б.н Кошель Е.И. и Каликину П. А. помощь в исследовании переноса плазмид и студентов лаборатории молекулярной онкологии Химико-биологического кластера университета ИТМО за участие в экспериментах с животными и на культурах клеток.