МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ имени М.В. ЛОМОНОСОВА ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

ининая На правах рукописи

Власова Ксения Юрьевна

Магнитные наносистемы для контролируемого высвобождения лекарственных средств в условиях низкочастотного переменного магнитного поля: разработка и изучение свойств

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

ΑΒΤΟΡΕΦΕΡΑΤ

диссертации на соискание ученой степени кандидата химических наук

Москва – 2019

Работа выполнена на кафедре химической энзимологии химического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научные руководители: Кабанов Александр Викторович

доктор химических наук, профессор

Клячко Наталья Львовна

доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Штильман Михаил Исаакович

доктор химических наук, профессор,

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева», заведующий кафедрой биоматериалов

Гудилин Евгений Алексеевич

доктор химических наук, член-корр. РАН, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования МГУ имени М.В. Ломоносова, заместитель декана факультета наук о материалах, заведующий кафедрой наноматериалов

Водовозова Елена Львовна

доктор химических наук,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, заведующая лабораторией химии липидов

Защита диссертации состоится «29» октября 2019 года в 15 часов на заседании диссертационного совета МГУ.02.08 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва, Ленинские горы д.1, стр.11Б, аудитория 202.

E-mail: d50100159@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект, д.27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: https://istina.msu.ru/dissertations/236366785/

Автореферат разослан «27» сентября 2019 года.

Ученый секретарь диссертационного совета МГУ.02.08

кандидат химических наук

Cany

Сакодынская И.К.

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования. На сегодняшний день существует большое количество наноразмерных систем для доставки лекарств (СДЛ) таких, как, например, мицеллы, блок-иономерные комплексы (БИК), липосомы (Лип), нанотрубки, функционализированные магнитные наночастицы (МНЧ) и т.д. Данные СДЛ обладают побочных преимуществами, как, например, сокращение эффектов такими И пролонгированная циркуляция лекарственного средства (ЛС) в кровотоке. При этом указанные преимущества зачастую нивелируются неконтролируемым высвобождением ЛС в токсических дозах, либо, наоборот, крайне медленным его высвобождением. Поэтому в настоящее время актуально создание СДЛ с контролируемым высвобождением ЛС. В основе всех методов управляемого повышения проницаемости СДЛ лежит нарушение целостности структуры контейнера при действии некоего стимула. Из существующих на сегодняшний день подходов неинвазивного воздействия на СДЛ наибольшее применение получило использование магнитного поля (МП) в сочетании с МНЧ. МНЧ магнетита или одобренные для использования в клинической практике, маггемита. являются посредниками между терапевтической системой, органом-мишенью и внешним МП. Применение МНЧ в гипертермии и связанными с ней областями основано на неелевской (магнитный процесс) и брауновской (механический процесс) релаксациях при воздействии радиочастотным (≥ 100 кГц) ПМП (РЧ ПМП) на МНЧ. При этом следует отметить, что данный подход обладает рядом недостатков: высокая концентрация МНЧ (порядка мг/мл), длительная экспозиция РЧ ПМП (до нескольких часов), затрагивание здоровых тканей, РЧ ПМП при длительном действии на живой организм вызывает побочные эффекты. Применение магнитной гипертермии для контролируемого высвобождения ЛС из СДЛ ограничивает спектр доставляемых молекул, так как при локальном повышении температуры может возникнуть деструкция ЛС, особенно если оно имеет белковую природу. Более безопасным и приемлемым в этой области является применение магнитомеханической актуации (MMA) МНЧ в условиях низкочастотного (≤ 10 кГц) ПМП (НЧ ПМП). Предполагается, что вращательно-колебательное движение МНЧ может приводить к формированию дефектов, механической деформации наноконтейнера и, как следствие, к высвобождению ЛС из СДЛ. Данный механизм имеет ряд преимуществ таких, как малые времена экспозиции поля, низкая концентрация МНЧ, не затрагиваются здоровые ткани и отсутствуют побочные эффекты самого поля. В связи с этим в последнее десятилетие большое внимание уделено исследованиям по применению ММА при разработке стимул-чувствительных СДЛ. Таким образом, данное направление является актуальным, и основой представленной работы стала разработка магнитных Лип (МЛип) и БИК, и изучение воздействия НЧ ПМП на них.

Степень разработанности темы исследования. На момент начала работы была показана возможность воздействия НЧ ПМП посредством МНЧ на работу Na/K каналов клеток, скорость роста клеток и активность биомолекул. В случае воздействия НЧ ПМП на магнитные СДЛ была показана возможность высвобождения низкомолекулярных соединений, но не был изучен механизм действия поля на данные системы.

Цели и задачи работы. Целью данной работы стало исследование магнитомеханического воздействия на магнитные наносистемы для контролируемого высвобождения ЛС.

Для достижения данной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Получить МЛип различного липидного состава, содержащие гидрофобные МНЧ в мембране и гидрофильные МНЧ на поверхности мембраны, загруженные низко- и высокомолекулярными соединениями (белками).

2. Изучить физико-химическими методами анализа действие НЧ ПМП на структуру липидного бислоя МЛип.

3. Изучить влияние состава липидной мембраны (тип липидов, входящих в состав бислоя) и параметров внешнего ПМП на эффективность магнитомеханического подхода повышения проницаемости МЛип.

4. Получить магнитный БИК, содержащий МНЧ, функционализированные блоксополимером полилизин-полиэтиленгликоль и сорбированным ферментом супероксиддисмутазой 1 (СОД1).

5. Изучить действие НЧ ПМП на магнитный БИК, содержащий СОД1.

Научная новизна. В работе были получены два типа магнитных наносистем – Лип и БИК, которые в дальнейшем активировались действием НЧ ПМП. Впервые было проанализировано действие НЧ ПМП с различными параметрами и предложен механизм магнитомеханического воздействия на МЛип различной архитектуры и липидного состава. Полученные зависимости были впервые систематизированы и было предложено базовое понимание процессов, происходящих под действием НЧ ПМП. Впервые был подробно изучен и доказан механизм высвобождения белковых молекул из магнитного БИК с электростатически сорбированным ферментом. Впервые были экспериментально подтверждены теоретические расчеты оптимальных параметров внешнего НЧ ПМП для разработанных систем: МЛип и магнитного БИК. Таким образом, исследование дает рекомендации для разработки и оптимизации СДЛ с контролируемым высвобождением ЛС.

Теоретическая и практическая значимость работы. Разработанные теоретические подходы и экспериментальные методики войдут в лекционные курсы кафедры, лабораторные занятия. В работе создана теоретическая база для разработки СДЛ с контролируемым высвобождением как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных ЛС. Экспериментально доказана возможность применения магнитомеханического подхода в наномедицине. Разработанные в диссертации подходы могут представлять собой практические рекомендации к созданию эффективных СДЛ и имеют важное значение для прикладных исследований. Эта работа расширяет базовые знания и понимание основных явлений высвобождения веществ из МЛип и магнитных БИК под действием НЧ ПМП и дает обоснование для разработки таких систем для будущих биомедицинских применений. **Положения, выносимые на защиту.**

1. Максимальный диаметр МНЧ, которые могут быть встроены в мембрану МЛип, составляет 7 нм.

2. При экспозиции МЛип в НЧ ПМП происходит повышение локального давления на фосфолипиды в области МНЧ за счет ММА частиц и их агрегации, что вызывает образование дефектов в этой области и повышение проницаемости мембраны.

3. Липидный состав мембраны и параметры внешнего НЧ ПМП влияют на магнитомеханическое действие МНЧ на бислой. Колебательное движение МНЧ, встроенных в липидную мембрану гелевой фазы, в условиях НЧ ПМП нарушает упаковку липидов, увеличивая проницаемость или вызывая разрыв мембраны. Снижение эффекта поля для мембраны в жидкокристаллической фазе обусловлено восстановлением упаковки липидов после возникновения деформаций и дефектов, создаваемых механическим движением МНЧ.

4. Действие НЧ ПМП на МЛип с ковалентно иммобилизованными МНЧ на поверхности мембраны способствует высвобождению высокомолекулярных соединений (белков) из примембранной полимерной оболочки.

5. Вращательно-колебательное движение МНЧ в НЧ ПМП вызывает обратимую десорбцию электростатически сорбированного СОД1 из магнитного БИК за счет возникающей гидродинамической силы, действующей на макромолекулы на поверхности МНЧ.

Личный вклад автора. Представленные в работе данные получены лично автором или при непосредственном участии автора на всех этапах исследований. Автор самостоятельно изучил современные литературные данные по теме исследования и на основании изученных работ составил литературный обзор. Автор самостоятельно или при непосредственном участии выполнил все эксперименты. Автор самостоятельно собрал, обработал и проанализировал полученные результаты, принимал участие в написании всех статей.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов определяется проведением экспериментов с использованием современных физико-химических методов исследования, на высокоточном оборудовании, а также статистической обработкой полученных результатов.

Результаты настоящей работы были представлены на всероссийских и международных научных конференциях, на большинстве из которых автор выступил с докладами. 6th International Conference on Nanomaterials - Research & Application (NANOCON) (Чехия, 2014), Х международной (XIX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых (Москва, 2015), International Conference on Magnetism and Magnetic Materials (ICMMM) (Испания, 2015), European & Global Summit for CliniCal nanomedicine and targeted medicine enabling technologies for personalized medicine (CLINAM) (Швейцария, 2016), 7th Baikal International Conference «Magnetic materials. New technologies» (BICMM) (Иркутск, 2016), International conference «Biocatalysis: Fundamentals & applications» (Истра, 2015; Истра 2017; Санкт-Петербург 2019), II Международной научно-практической школы-конференции «Магнитные наноматериалы в биомедицине: получение, свойства, применение» (Москва, 2017), «МЕНДЕЛЕЕВ-2017» и II школа-конференция «Направленный дизайн веществ и материалов с заданными свойствами»

(Санкт-Петербург, 2017), 10th International conference "Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues" (Греция, 2019).

Публикации. Основные результаты диссертационной работы представлены в 6 публикациях в журналах, рецензируемых базами данных Scopus и Web of Science, и 14 тезисах докладов конференций.

Связь работы с государственными программами. Работа выполнена при поддержке проекта Мегагрант (11G34.31.0004); РНФ (проект 14-13-00731)); РФФИ (проекты 16-33-01023, 17-54-33027\17); Соглашения о предоставлении субсидии № 14.575.21.0147.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы (Глава 1), описания материалов и методов исследований (Глава 2), результатов и их обсуждения (Глава 3), выводов и списка литературы, состоящего из 215 ссылок. Диссертация изложена на 155 страницах и включает 69 рисунков и 16 таблиц.

Основное содержание работы

Синтез МНЧ. Для исследований, проводимых в работе, нами были синтезированы МНЧ методом термического разложения ацетилацетоната железа (III) (Fe(acac)₃) в спирте. Данный метод позволяет получить высококристалличные бензиловом наночастицы с узким распределением по размеру. В работе использовались два типа частиц: со средним диаметром 5-6 нм (МНЧ1) (Рис. 1А-Б) и 7-9 нм (МНЧ2) (Рис. 1 Г-Д). Полученные МНЧ1 по фазовому составу, определенному методом Мёссбауэровской спектроскопии, представляют собой маггемит (γ-Fe₂O₃), МНЧ2 по фазовому составу представляют собой смесь магнетита (Fe₃O₄) и маггемита (γ-Fe₂O₃) (среднее соотношение 4:1). У всех типов наночастиц на кривой гистерезиса отсутствует остаточная намагниченность, что говорит об их суперпарамагнитных свойствах. Намагниченность насыщения для МНЧ1 составила 20 э.м.е./г, для МНЧ2 – 60 э.м.е./г (Рис. 1В, Е).



Рисунок 1. Микрофотографии, распределение по размеру, и кривая намагниченности насыщения МНЧ, полученных термическим разложением Fe(acac)₃ в бензиловом спирте. А-Б) при 175 °C, МНЧ1; В-Г) при 210 °C, МНЧ2.

Получение магнитных липосом с гидрофобными МНЧ. Для включения МНЧ в липидный бислой частицы были функционализированы фосфатидилхолином (eggPC) (МНЧ@eggPC) посредством фосфатных групп. Данный тип покрытия был выбран в связи с тем, что получение таких гидрофобных частиц можно осуществлять непосредственно во время приготовления МЛип. МЛип составом eggPC/холестерин (Chol)/дистероилфосфоэтаноламин-полиэтиленгликоль 2000 (DSPE-PEG), получали обращенно-фазовым методом, т.к. в данном случае включение гидрофобных частиц выше. Более того, на стадии получения эмульсии смесь с МНЧ@eggPC обрабатывается ультразвуком, что минимизирует агрегацию частиц и повышает эффективность включения. По данным просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) (Рис. 2А) видно, что частицы загружаются внутрь мембраны МЛип.



Рисунок 2. Включение МНЧ в МЛип (eggPC/Chol/DSPE-PEG): А) Микрофотография МЛип, полученная методом ПЭМ; Б-В) распределение по размерам МНЧ1 и МНЧ2, соответственно, включенных в мембрану.

Нами была исследована загрузка частиц двух типов – МНЧ1@eggPC и МНЧ2@eggPC. По литературным данным средний диаметр частиц, которые можно включить в липосомальную мембрану составляет 6,5-8 нм в зависимости от природы частиц. В нашем случае МНЧ1@eggPC относительно легко включались в бислой, в отличие от более крупных частиц (Рис. 2Б). В случае МНЧ2@eggPC мы наблюдали, что в мембрану включалась фракция с диаметром 5-7 нм, реже встречались частицы диаметра 8 нм (Рис. 2В).

Иными словами, мембрана МЛип имеет ограничение предельной величины гидрофобных МНЧ, которые могут включаться в бислой, и эта величина составляет до 7 нм в диаметре. Также было отмечено, что при увеличении концентрации МНЧ, добавляемых к смеси липидов при получении МЛип, эффективность включения частиц снижается (Таб. 1). Данный эффект обусловлен тем, что при повышении концентрации МНЧ при постоянной концентрации липидов увеличивается вероятность агрегации частиц, что препятствует их включению в бислой. Таким образом, для дальнейших исследований использовался только один тип частиц МНЧ1 (14% загрузки, Таб. 1).

_	Отношение липид/МНЧ, мг/мг	Загруженные МНЧ1, %	Загруженные МНЧ2, %
	100:14	-	6,7
	100:10	-	9,0
	100:5	14,0	10,0

Таблица 1. Эффективность загрузки МНЧ в МЛип при различном исходном соотношении липид/МНЧ. Липидный состав: eggPC/DSPE-PEG/Chol.

Изучение действия НЧ ПМП на магнитные липосомы. На первом этапе исследование ММА МЛип проводилось на системе с доксорубицином (DOX). Так, были получены МЛип, загруженные DOX (DOX-МЛип), состоящие из eggPC/DSPE-PEG/Chol в мольном соотношении 81/4/15. Средний гидродинамический диаметр (D_{HD}) DOX-МЛип составил 130-140 нм (полидисперсность (PDI) < 0,2), доля МНЧ1@eggPC составила 1,5% по массе от общего количества липидов и частиц, концентрация DOX – 450-500 мкг/мл.



Рисунок 3. Кинетика высвобождения DOX из DOX-МЛип без (контроль) и после 15 мин действия НЧ ПМП (50 Гц 50 кА/м) 25 °С. Концентрация липидов 12 мг/мл, DOX 200 мкг/мл. n=3.



Рисунок 4. Микрофотографии флуоресцентной микроскопии монослоя клеточной линии аденокарциномы молочной железы 4Т1 мыши, инкубированных с А) DOX-МЛип без экспозиции и Б) после экспозиции в НЧ ПМП (50 Гц 50 кА/м 15 мин) в течение 30 мин при 37 °С. Ядра покрашены DAPI – синий, DOX – красный.

На первом этапе мы *in situ* проверили скорость высвобождения DOX без и после обработки НЧ ПМП. Параметры поля были выбраны, исходя из теоретических расчетов и данных, полученных ранее в нашей лаборатории, и составили 50 Гц 50 кА/м. Было показано, что в условиях ММА препарат высвобождается интенсивней, чем без экспозиции в НЧ ПМП (Рис. 3). Проведение *in vitro* эксперимента на клеточной линии рака молочной железы мыши (4T1) показало, что в случае, когда DOX-МЛип предварительно были

обработаны НЧ ПМП (50 Гц 50 кА/м, 15 мин), клетки накапливали больше DOX в ядрах в сравнении с контрольными необработанными DOX-МЛип (Рис. 4).

Конфокальная микроскопия позволила количественно определить разницу в накоплении ядрами клеток DOX из МЛип без действия (контроль) и после действия НЧ ПМП (50 Гц 50 кА/м). Эксперимент был проведен на двух клеточных линиях, 4T1 и рака молочной железы человека МСF-7. Было показано, что после экспозиции DOX-МЛип с клетками в НЧ ПМП в ядрах накапливалось больше препарата, чем в контрольном эксперименте (Рис. 5А, Б, Г, Д). При этом следует отметить, что само по себе поле с используемыми параметрами не влияло на скорость накопления свободного DOX в клетке, тем самым мы исключили прямое влияние поля на клеточный метаболизм в наших экспериментах.



Рисунок 5. Результаты конфокальной микроскопии накопления DOX клеточной линии 4T1 (А, Б) и МСF-7 (Г, Д) после 30 мин инкубации с DOX- МЛип до и после 30 мин экспозиции в НЧ ПМП (50 Гц 50 кА/м). Красный - МЛип (DiD), желтый – ядра (DOX). Результаты MTS-теста клеточной линии 4T1 (В) и MCF-7 (Е) после 30 мин инкубации с DOX- МЛип до и после 30 мин экспозиции в НЧ ПМП (50 Гц 50 кА/м).

Цитотоксическое действие DOX основано на встраивании препарата в ДНК клетки и нарушении клеточного деления. Так как мы видим разницу в накоплении DOX в ядрах клеток, мы предположили, что сможем эту разницу также зафиксировать с помощью стандартного MTS-теста на цитотоксичность. В ходе эксперимента были подобраны оптимальные временные промежутки инкубации образцов с клетками, при которых можно было зафиксировать разницу в цитотоксичности. Для этого варьировалось время инкубации клеток с препаратом после 30 мин экспозиции в поле. После каждой временной точки клетки отмывались от препарата и оставлялись в среде на 24 ч в CO₂-инкубаторе при 37 °C. Для двух клеточных линий эффект MMA DOX-MЛип наблюдался сразу же после 30

мин экспозиции в поле (Рис. 5 В, Е). При более длительном времени инкубирования после действия поля разница в цитотоксичности между контролем и обработанным образцом сокращалась.

Таким образом, была показана эффективность ММА МЛип, содержащих гидрофобные МНЧ.

Магнитомеханическое воздействие на мембрану магнитных липосом. Для того, чтобы установить механизм действия НЧ ПМП на МЛип с гидрофобными МНЧ, мы изучили изменения в состоянии непосредственно самой мембраны МЛип. Теоретическое предположение, описанное в ряде статей по исследованиям брауновской релаксации МНЧ в НЧ ПМП, говорит о том, что в ходе колебательно-вращательного движения частиц липидный бислой достигает такой же разупорядоченности, как в точке фазового перехода, и, тем самым, увеличивается его проницаемость. Но релаксация по Брауну характерна для частиц со средним диаметром выше 12 нм, что больше среднего максимального размера частиц, загружаемых в мембрану. Для того, чтобы понять, что происходит с МНЧ и самой мембраной мы использовали метод ПЭМ. Мы исследовали два типа Лип: стабилизированные и не стабилизированные полиэтиленгликолем (ПЭГ). Данные ПЭМ (Рис.6) показали, что для обоих типов Лип уже при малых временах (до 5 мин) действия НЧ ПМП происходит частичная агрегация МНЧ в более крупные кластеры. Затем уже эти кластеры начинают постепенно действовать на бислой МЛип. Так, через 25 мин экспозиции МЛип в поле наблюдается полная (в случае нестабилизированных МЛип) (Рис. 6А), либо частичная деструкция структуры везикул (в случае стабилизированных ПЭГ-МЛип) (Рис. 6Б). Частичную деструкцию ПЭГ-МЛип через 30 мин экспозиции в поле мы также наблюдали с помощью конфокальной микроскопии в ходе in vitro экспериментов (Рис. 7). При захвате МЛип клеткой они длительное время находятся в эндосомах и видны как округлые образования (Рис. 7А-Б). При инкубации МЛип с клетками в условиях НЧ ПМП в течение 30 мин наблюдалось частичная диффузия флуоресцентной метки из мембран МЛип (Рис. 7В-Г). Данный эффект скорее всего вызван разрушением и/или реорганизацией липидных бислоев.

Для более детального понимания видоизменений мембраны мы использовали инфракрасную (ИК) Фурье-спектроскопию в режиме нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). Данный метод позволяет по изменениям полос поглощения, соответствующих колебаниям углеводородных цепей (СН₂ симметричные (с) и ассиметричные (ас)), судить об изменениях плотности фосфолипидов в мембране. Исследования показали, что включение модифицированного ПЭГ-липида не приводит к изменения в липидной упаковке мембраны МЛип, а включение гидрофобных МНЧ вызывает высокочастотный сдвиг положения пика CH₂-групп, то есть небольшое уменьшение плотности бислоя (Рис. 8).



Рисунок 6. ПЭМ фотографии МЛип (А, Г) до и после воздействия НЧ ПМП (50 Гц, 50 кА/м) в течение: (Б, Д) 5 мин; (В, Е) 25 мин. Состав МЛип: (А-В) eggPC/Chol (85:15 моль/моль), 0,8% МНЧ1@eggPC; (Г-Е) eggPC/Chol/DSPE-PEG (81:4:15 моль/моль), 1,2% МНЧ1@eggPC. (А-Е) концентрация МЛип во время воздействия составляла 0,012 мг липида/мл.



Рисунок 7. Результаты конфокальной микроскопии клеточной линии 4T1 после 30 мин инкубации с DOX-МЛип до (А-Б) и после экспозиции (В-Г) в НЧ ПМП (50 Гц 50 кА/м). Красный – МЛип (DiD). Б – увеличенный фрагмент А; Г – увеличенный фрагмент В. Размерная шкала – 50 мкм. Состав МЛип – eggPC/Chol/DSPE-PEG (81:4:15 моль/моль), 1,5% МНЧ1@eggPC

При экспозиции МЛип в НЧ ПМП как для нестабилизированных (без ПЭГ), так и для ПЭГ-МЛип, содержащих МНЧ диаметром 5-6 нм, максимум полосы поглощения CH₂групп сместился в сторону более низких частот, что указывает на дегидратацию и увеличение плотности упаковки углеводородных цепей (Рис. 9). Этот эффект, возможно, связан с процессом агрегации частиц в пределах мембраны, которую мы наблюдали методом ПЭМ (Рис. 6), и, как следствие, возникновением локального увеличения напряжения в области МНЧ. На ИК-спектрах также прослеживалась временная зависимость степени изменения упорядоченности липидной упаковки. На Рис. 9 по сдвигу полосы поглощения CH₂ac видно, что первые 5-10 мин идет увеличение эффекта поля с последующим плавным выходом на плато. Выход на плато может быть связан с полной деструкцией МЛип. При этом изменения в гидрофобной части мембраны ПЭГ-МЛип (Рис. 9Б) были более выражены, чем в случае везикул без ПЭГ (Рис. 9А), что может быть связано со стабилизацией мембраны и, как следствие, повышенной чувствительностью бислоя к движению частиц.



Рисунок 8. Спектры ИК Фурье-спектроскопии А) Лип состава eggPC/Chol без и с DSPE-PEG; Б) ПЭГ-Лип состава eggPC/DSPE-PEG/Chol без и с МНЧ1@eggPC при 25 °C в 10 мМ PBS.



Рисунок 9. Сдвиг полосы поглощения CH₂ac групп в Лип в условиях НЧ ПМП в зависимости от времени и параметров ПМП. А) состав: eggPC/Chol, MHЧ1@eggPC; Б) состав: eggPC/DSPE-PEG/Chol, MHЧ1@eggPC.

Использование флуоресцентного красителя 1-анилино-8-нафталинсульфокислота (1,8-ANS) позволяет судить о подвижности и доступности воды в области бислоя в участках, состоящих из полярных головных групп, с которыми связывается краситель, посредством изменения флуоресценции 1,8-ANS. В эксперименте, когда 1,8-ANS был изначально загружен в мембрану ПЭГ-МЛип, состоящих из eggPC, DSPE-PEG, Chol, после действия поля мы наблюдали постепенное уменьшение сигнала флуоресценции (Рис. 10) в зависимости от времени экспозиции (1 и 5 мин). Возможно, при этом 1,8-ANS жестко фиксируется и выталкивается к поверхности бислоя из-за некоторого упорядочивания и сжатия гидрофобной части мембраны МЛип, что было подтверждено методом ИК-спектроскопии (Рис.9). Как видно из Рис. 10, наблюдается слабая зависимость эффекта от

частоты внешнего НЧ ПМП. В другом эксперименте 1,8-ANS загружался в МЛип в условиях НЧ ПМП. Наблюдалось увеличение значения сигнала флуоресценции в условиях поля (Рис.11), что говорит о появлении гидрофобных взаимодействий красителя и фосфолипидов мембраны, т.е. о повышении проницаемости бислоя. Следует отметить, что в данных временных точках ПЭГ-МЛип по данным ПЭМ не разрушены.



Рисунок 10. Изменение сигнала флуоресценции 1,8-ANS, загруженного в МЛип, в зависимости от времени экспозиции в НЧ ПМП (50 Гц 50 кА/м и 250 Гц 50 кА/м) при 25 °С. Состав ПЭГ-МЛип: eggPC/DSPE-PEG/Chol с МНЧ1@eggPC. Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение. *p<0,05, n=7.



Рисунок 11. Изменение сигнала флуоресценции 1,8-ANS в смеси с магнитными МЛип под действием НЧ ПМП (50 Гц 50 Гц) и без (контроль) в зависимости от времени экспозиции при 25 °C. Состав МЛип: eggPC/DSPE-PEG/Chol с МНЧ1@eggPC Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение, n= 5.

Таким образом, при экспозиции МЛип в НЧ ПМП происходит повышение локального давления на фосфолипиды в области МНЧ за счет ММА частиц и их агрегации, что вызывает образование дефектов в этой области и повышение проницаемости мембраны. При длительном воздействии поля происходит необратимое нарушение целостности липидного бислоя.

Детальное понимание механизма воздействия НЧ ПМП на мембрану МЛип позволят в дальнейшем ориентироваться, какова должна быть архитектура липидной везикулы, чтобы разработать формуляцию, чувствительную к ММА.

Влияние липидного состава параметров поля на эффект И магнитомеханической актуации. При изучении изменения состояния мембраны МЛип в условиях внешнего поля мы обнаружили, что для ПЭГ-МЛип эффекты были более выражены, чем для нестабилизированных. В связи с этим мы проверили влияние липидного состава на эффект ММА по изменению скорости высвобождения гидрофильных флуоресцентных красителей (кальцеина и карбоксифлуоресцеина (КФ)). Для этого сравнили МЛип, состоящие из ненасыщенного фосфолипида (eggPC) и насыщенного (дистероилфосфатидилхолина DSPC) с разными температурами фазового перехода (T_m) (а именно, 3,9 °С и 54 °С, соответственно), содержащие и не содержащие ПЭГ и Chol.

Для того, чтобы исключить влияние eggPC на поверхности частиц при формировании МЛип на основе DSPC, мы частицы предварительно функционализировали гидрофобным пальмитоил-нитродофамином (МНЧ1@PNDA). При этом наблюдалось увеличение степени загрузки частиц в МЛип в среднем в 5 раз. Все полученные МЛип имели очень похожие D_{HD} (от ~ 100 нм до ~ 104 нм, PDI ~ 0,12-0,14) и заряд (ζ -потенциал ~ от 3,2 мВ до -4,2 мВ).

Стабилизация МЛип ПЭГ привела к замедлению скорости выхода красителя из ПЭГ-МЛип в сравнении с нестабилизированными МЛип в условиях НЧ ПМП (50 Гц 50 кА/М) (Рис.12А). При этом следует отметить, что природа красителя также влияет на скорость его выхода из МЛип (сравнение красных столбиков на Рис. 12А и 12Б). При замене в ПЭГ-МЛип ненасыщенного липида (eggPC) на насыщенный DSPC мы наблюдали увеличение эффекта действия НЧ ПМП (50 Гц 50 кА/м) (Рис. 12Б). Разница стала более существенной, когда температура увеличилась с 25 °C до 37 °C (Рис.12Б).



Рисунок 12. Влияние состава МЛип на высвобождение метки в условиях НЧ ПМП (50 Гц 50 кА/м, 30 мин). А) влияние ПЭГ на поверхности МЛип, при 25 °C; Б) влияние степени насыщенности липида; В) влияние количества Chol в МЛип составом DSPC/DSPE-PEG/Chol; Г) влияние Chol в МЛип составом DSPC/DSPE-PEG/Chol; Г) влияние Chol в МЛип составом DSPC/DSPE-PEG/Chol (30% по молям) и eggPC/DSPE-PEG/Chol (30% по молям). МЛип содержали МНЧ1@PNDA. Концентрация липидов 0,018 мг липида/мл. Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение, n= 3.

Мы полагаем, что колебательное движение МНЧ, встроенных в мембрану гелевой фазы, может приводить ее в состояние нарушенной упаковки липидов (например, подобное тому, которое наблюдается при фазовом переходе) или в точку разрыва. Повышение

температуры, не достигая T_m, приближает такие бислои к границе наиболее проницаемого состояния, тем самым облегчая «работу» МНЧ внутри мембраны в поле. Напротив, более скромные эффекты проницаемости, вызванные полем, в жидкокристаллических липидных мембранах могут быть объяснены их большей способностью к «восстановлению» деформаций и дефектов, создаваемых механическим движением МНЧ, по сравнению с липидными бислоями гелевой фазы. Следовательно, можно предположить, что для создания оптимальных условий для индуцированного полем высвобождения красителя из МЛип липидный бислой должен находиться в гелевой фазе. Добавление Chol значительно уменьшало процент высвобождения красителя из МЛип под действием НЧ ПМП (Рис.12В-Г).

Скорость высвобождения кальцеина из МЛип зависела также и от параметров поля. При этом не было обнаружено существенной разницы в высвобождении кальцеина при варьировании частоты поля (Рис.13А). Данный результат согласуется с теоретическими расчетами критической частоты внешнего ПМП, выше которой пропадает зависимость эффекта от частоты поля. Для нашего случая DSPC-МЛип при напряженности поля 50 кА/м критическая частота составляет 65 Гц (при вязкости внутри мембраны 150 мПа*с). Как видно, экспериментальные данные оказались близки к этой рассчитанной величине. Значение напряженности поля при постоянной частоте 50 Гц давало существенные изменения в количестве высвободившегося красителя с выходом эффекта на плато (Рис.13Б).



Рисунок 13. Влияние частоты (А) и напряженности (Б) НЧ ПМП на высвобождение кальцеина из МЛип составом DSPC/DSPE-PEG (95/5 по молям) с МНЧ1@PNDA. Концентрация МЛип 0,018 мг липида/мл. Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение, n= 3.

Еще одним существенным параметром действия поля является время экспозиции. Действительно, количество высвобождаемого кальцеина увеличивалось с нуля до примерно 80% по мере того, как продолжительность воздействия увеличивалась до 30 минут, а затем оставалась неизменной (Рис. 14А). Примечательно, что никакого дополнительного выделения кальцеина не наблюдалось, когда образцы обрабатывались НЧ ПМП в течение 20 минут, а затем инкубировались в течение 24 часов без поля (Рис. 14Б). Это говорит о том, что изменение проницаемости липосомальной мембраны из DSPC индуцируется непосредственно во время воздействия поля на МЛип.



Рисунок 14. Зависимость скорости высвобождения кальцеина из МЛип А) от времени экспозиции в НЧ ПМП (50 Гц 50 кА/м) и Б) от времени релаксации системы после обработки полем (50 Гц 50 кА/м) в течение 20 мин при 25 °C. Состав МЛип DSPC/DSPE-PEG (95/5 по молям) с МНЧ1@PNDA. Концентрация МЛип 0,018 мг липида/мл. Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение, n= 3.

Таким образом, проведенное исследование позволяет рационально проектировать стабильные системы для доставки лекарств с максимально эффективным действием НЧ ПМП на контролируемое высвобождение препарата посредством МНЧ.

Получение магнитных липосом, загруженных высокомолекулярным соединением. Одной из перспективных областей применения Лип является доставка белковых молекул. В связи с тем, что высокомолекулярные соединения высвобождаются значительно хуже из Лип, чем низкомолекулярные, то применение ММА в данной области имеет большую практическую значимость. Применение данного подхода в этом случае имеет ряд преимуществ перед другими методами повышения процента высвобождения высокомолекулярных соединений из Лип, основными из которых являются простота метода и отсутствие денатурирующего действия на белковую молекулу.

В связи с тем, что при получении МЛип с гидрофобными МНЧ обращенно-фазовым методом применяется органический растворитель и достаточно длительная обработка ультразвуком, это может привести к потере активности белковых молекул на стадии МЛип с МНЧ, получения формуляции. Поэтому использовались ковалентно иммобилизованными на поверхности липидных везикул. В качестве модельного высокомолекулярного белка был использован ингибитор протеаз Баумана-Бирка (BBI) массой 6-8 кДа. Для последующей иммобилизации МНЧ поверхность Лип была функционализирована карбоксильными группами (СОО-) за счет включения в липидный состав DSPE-PEG-COONa. Также в состав липидной мембраны входил дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC) (в отношении DPPC/DSPE-PEG-COONa как 96,6:3,4 по молям), T_m которого составила 41 °C. Полученные анионные Лип (АЛип) имели D_{HD} ~ 187±2 нм (PDI 0,23±0,02) и ζ-потенциал ~ - 21,6±1,0 мВ. Для ковалентной конъюгации МНЧ2, функционализированные дофамином (МНЧ2@ДОРА). использовались Ковалентная иммобилизация МНЧ2@ДОРА на поверхность АЛип была проведена карбодиимидным методом. Отношение количества добавляемых МНЧ к количеству АЛип составляло 1:1 по числу частиц. D_{HD} конечной формуляции составил 272±16 нм (PDI >

0,3). Повышение значения PDI системы скорее всего вызвано присутствием свободных МНЧ@DOPA в растворе.

Высвобождение ВВІ из МАЛип в условиях НЧ ПМП. На следующем этапе работы исследовали высвобождение загруженного ВВІ посредством реакции ингибирования ферментативного гидролиза N-сукцинил-Ala-Ala-Pro-Phe-p-нитроанилида. В качестве фермента использовали α-химотрипсин (α-XT). Изучали высвобождение ВВІ в НЧ ПМП при частоте 110 Гц и напряженностью магнитного поля 70 и 150 кА/м (Рис. 15). Выбор данных параметров поля обусловлен теоретическими расчетами для модели МНЧ, ковалентно связанных с полимерными молекулами.



Рисунок 15. Эффект поля на высвобождение ВВІ из ВВІ-МАЛип в НЧ ПМП (110 Гц, 70 кА/м и 150 кА/м). Измерения проведены при комнатной температуре, концентрации α-XT 3,5 мкг/мл, субстрата 100 мкг/мл в реакционной смеси 10 мМ Tris-HCl, pH 8,2. Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение, n= 9. Эффект поля рассчитан как разница между количеством доступного ВВІ после и без предварительной экспозиции ВВІ-МАЛип в НЧ ПМП, соответственно.

Эффективность ММА высвобождения BBI, рассчитанная как разница количества белка в растворе после и до действия НЧ ПМП (110 Гц 70 кА/м), в данном случае составила около 23% (Рис.15). При этом не наблюдалось изменения количества высвободившегося ингибитора от времени экспозиции в НЧ ПМП. При увеличении напряженности НЧ ПМП от 70 кА/м к 150 кА/м наблюдалась тенденция к увеличению эффекта поля, то есть к росту количества высвободившегося BBI.

Исследование механизма влияния ММА МАЛип на состояние мембраны проводили методом ИК-спектроскопии Фурье в режиме НПВО. АЛип (DPPC/DSPE-PEG-COONa) находятся в гелеобразном состоянии при комнатной температуре (Taб. 2). Ковалентная иммобилизация МНЧ2@DOPA на поверхность АЛип не приводит к изменению состояния липидной упаковки. Изменения положения полос PO₂⁻ ас и C-O-C указывает на взаимодействие МНЧ2@DOPA с поверхностью мембраны, т.е. на эффективную иммобилизацию МНЧ@DOPA.

Положения полос колебаний CH₂c- и CH₂ac-групп для МАЛип, как и при воздействии НЧ ПМП, так и в контрольных экспериментах без НЧ ПМП, не изменяется. Данные результаты свидетельствуют об отсутствии изменений в гидрофобном бислое мембраны данных МАЛип в условиях поля. Также не наблюдалось изменений в области колебаний карбонильных групп (CO), что говорит о том, что серьезных изменений на границе вода-липид не наблюдается.

Образец	νCH ₂ ac, см ⁻¹	νCH ₂ c, см ⁻¹	νСО, см ⁻¹	νРО ₂ ac, см ⁻¹	vC-O-C, см ⁻¹
АЛип					1004.0
АЛип ПМП 5 мин	2918,3	2850,3	1735,6	1224,1	1094,8
АЛип ПМП 15 мин					1047,2
МА Пип	2017.8	28/08	1733,2	1225,1	1094,8
MAJIMI	2917,0	2049,0		237,6	1047,2
МАЛип ПМП 5 мин	2918,3	2849.8	1736,1	1226,0	1094,9
		2017,0		1236,2	1048,1
МАЛип ПМП 15 мин	2918 3	2849.8	1732,3	1226,0	1093,4
	2710,5	2019,0	1713,9	1234,2	1048,6

Талица 2. Характеристические полосы ИК-спектров АЛип и МАЛип в 10 мМ PBS (pH 7.4). Параметры НЧ ПМП – 110 Гп 70 кА/м.

Интересны изменения в положениях полос поглощения PO₂⁻ колебаний для МАЛип (Таб. 2). На ИК-спектрах присутствует плечо, которое характерно при взаимодействии МНЧ2@DOPA с поверхностью липосомальной мембраны. При этом экспозиция в НЧ ПМП (110 Гц 70 кА/м) приводит к сдвигу данного плеча, что говорит о возможном увеличении данных взаимодействий. По изменению положения пиков колебаний С-О-С, соответствующих состоянию ПЭГ, в условиях НЧ ПМП видно, что частицы за счет механического вращения шевелят ПЭГ-корону на поверхности МАЛип. Таким образом, ускорение высвобождения ВВІ из МАЛип основано на продвижении выходящего из МАЛип ингибитора из плотной ПЭГ-короны. Иными словами, мы показали выход белковой молекулы из БИК на поверхности МАЛип.

Данный магнитный липосомальный контейнер показывает перспективность для дальнейшего использования в биотехнологии или наномедицине при доставке высокомолекулярных соединений. Но все же применение такого комплекса имеет ограничения такие, как, например, ограниченная емкость Лип, многостадийность получения и относительная длительность получения.

Получение магнитного БИК, содержащего СОД1. В исследовании МАЛип, загруженных ВВІ, описанном выше, мы показали эффективное высвобождение белка из БИК за счет ММА МНЧ. Мы решили проверить возможность данного подхода на модели магнитного БИК, содержащего электростатически сорбированный белок. Применение БИК для доставки ферментов хорошо изучено и доказана эффективность данной формы наноконтейнера. В нашей лаборатории была разработана система на основе блоксополимера полилизин-ПЭГ (ПЛЛ-ПЭГ) и антиоксидантного фермента СОД1, поэтому мы решили исследовать магнитный БИК на базе данного комплекса.

Для синтеза комплекса МНЧ2 сначала покрывали катионным блок-сополимером ПЛЛ-ПЭГ с различной длиной цепи полилизина (10, 50 и 100 мономеров) в водной среде для получения стабильных дисперсий частиц. МНЧ2, стабилизированные блок-сополимером (МНЧ2-ПЛЛ-ПЭГ), представляют собой агрегаты с D_{HD} от ~ 80 до ~ 100 нм, PDI в диапазоне от 0,23 до 0,29 и высоким положительным ζ -потенциалом от 27 до 45 мВ.

Столь значительное увеличение размера МНЧ2 после функционализации вызвано тем, что в комплекс входил агрегат из 3-5 частиц по даным ПЭМ. Стабильность полученной коллоидной системы зависела от длины поликатионного блока ПЛЛ-ПЭГ. Оптимальном полимером оказался ПЛЛ₁₀₀-ПЭГ. Содержание полимера в таких МНЧ2-ПЛЛ₁₀₀-ПЭГ, измеренное термогравиметрическим анализом (ТГА), находилось в диапазоне от 45 до 55 мас%. Покрытие блок-сополимером не оказывало существенного влияния на магнитные свойства МНЧ2.

Образец	D_{HD} , нм	PDI	ζ -потенциал, мВ
МНЧ2-ПЛЛ ₁₀ -ПЭГ	84 ± 12	$0{,}24\pm0{,}07$	$36{,}5\pm0{,}3$
МНЧ2-ПЛЛ ₅₀ -ПЭГ	82 ± 12	$0{,}23\pm0{,}01$	$38,0 \pm 1,0$
МНЧ2-ПЛЛ ₁₀₀ -ПЭГ	98 ± 10	$0{,}29\pm0{,}04$	$44,5 \pm 2,0$
МНЧ2-ПЛЛ ₅₀ -ПЭГ/СОД1	108 ± 2	$0{,}20\pm0{,}03$	$29{,}8\pm0{,}5$
МНЧ2-ПЛЛ ₁₀₀ -ПЭГ/СОД1	113 ± 3	$0,\!19\pm0,\!01$	$27,1 \pm 1,0$

Таблица 3. Физико-химические параметры частиц и БИК.

Агрегаты МНЧ2-ПЛЛ₁₀₀-ПЭГ несут положительный заряд из-за наличия избытка катионных цепей в этих агрегатах. Поскольку молекула СОД1 при рН 7,4 заряжена отрицательно (ζ -потенциал - 7 мВ, изоэлектрическая точка рІ 5,35-6,75, D_{HD} = ~ 5,0 нм), она была иммобилизована на МНЧ2-ПЛЛ₁₀₀-ПЭГ путем простого комплексообразования полиионов. Комплексы МНЧ2-ПЛЛ₁₀₀-ПЭГ-СОД1 (Таб. 3) также были стабильны в растворе и не агрегировали более 7-10 дней. Частицы в этих дисперсиях все еще обладали положительным зарядом, хотя ζ -потенциалы значительно снижался после добавления СОД1 по сравнению с исходными МНЧ2-ПЛЛ₁₀₀-ПЭГ (Таб. 3).

Иммобилизация СОД1 на МНЧ2-ПЛЛ₁₀₀-ПЭГ привела к приблизительно двукратному снижению каталитической активности по сравнению с нативным ферментом (Рис. 16). Данное изменение в активности фермента позволило нам исследовать влияние НЧ ПМП на комплекс МНЧ2-ПЛЛ₁₀₀-ПЭГ/СОД1 по изменению ингибирования скорости автоокисления пирогалолла (ПГ).



Рисунок 16. Изменение активности СОД1 при образовании БИК. Следили за ингибированием реакции автоокисления ПГ в 10 мМ HEPES pH 7,4 при комнатной температуре. Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение, n= 3. Видно, что воздействие НЧ ПМП приводит к увеличению активности СОД1 в реакционной среде. Интересно, что при постоянной напряженности поля (55 кА/м) величина эффекта зависела от частоты поля и была наиболее выраженной при 50 Гц (Рис. 17Б). Аналогично, при постоянной частоте поля эффект зависел от напряженности поля и, по-видимому, происходило «насыщение» между 30 кА /м и 120 кА/м при 50 Гц (Рис. 17А). При этом следует отметить, что теоретически рассчитанная критическая частота внешнего ПМП, в пределах которой располагается точка максимального эффекта, составляет 75-110 Гц, что коррелирует с экспериментальными данными.



Рисунок 17. Влияние (А) напряженности НЧ ПМП (при 50 Гц, 30 сек экспозиции) и (Б) частоты НЧ ПМП (при 50 кА/м, 30 сек экспозиции) на МНЧ2-ПЛЛ₁₀₀-ПЭГ/СОД1 в 10 мМ НЕРЕЅ рН 7,4 при комнатной температуре. Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение, n= 7, *p<0,05.

Активность СОД1 в реакционной среде также зависела от продолжительности экспозиции МНЧ2-ПЛЛ₁₀₀-ПЭГ/СОД1 в поле (Рис. 18А). В течение 5 минут воздействия наблюдалась тенденция к росту активности БИК, затем она выравнивалась с выходом на плато, а через 15 минут обнаруживалась тенденция к снижению. Когда комплекс подвергался воздействию поля в течение 5 минут, а затем оставлялся инкубироваться без поля, активность БИК снижалась почти до уровня, наблюдаемого до воздействия поля (Рис. 18Б), то есть влияние поля было обратимым. Следовательно, мы наблюдали сложное поведение активности МНЧ2-ПЛЛ₁₀₀-ПЭГ-СОД1во время и после воздействия НЧ ПМП.

Мы предположили, что при кратковременном воздействии поля СОД1 десорбируется из комплекса, что сопровождается повышением активности. Чтобы проверить это, мы проанализировали фильтраты, полученные центрифугированием образцов БИК до и после 5 и 25 мин воздействия НЧ ПМП, используя целлюлозные фильтры с размерами пор, проницаемыми для белков с массой менее 100 кДа, но непроницаемыми для самих комплексов. После 5-минутного воздействия НЧ ПМП (50 Гц, 55 кА/м) наблюдалось увеличение содержания белка СОД1 в фильтрате в 5 раз (в равных объемах растворов), что было определено методом электронно-ионизационной масс-спектроскопии (ЭИ МС) (Рис. 19) и почти двукратное увеличение ингибирования автоокисления ПГ, катализируемого СОД1 (Таб. 4). Отметим, что наряду с увеличением

количества фермента в фильтрате также наблюдалось увеличение количества блоксополимера, как показано с помощью ЭИ МС (Рис. 19). Следовательно, во время кратковременного воздействия СОД1 и ПЛЛ-ПЭГ частично «стряхиваются» из комплекса. При более длительных экспозициях в поле, таких как 25 мин, количество СОД1, обнаруженного в фильтрате, уменьшается. Это может быть связано с адсорбцией фермента на стенки пробирки или дестабилизацией всей системы из-за десорбции поликатиона и, как следствие, агрегации МНЧ2, приводящих к условиям, при которых фермент становится связанным с агрегатами.



Рисунок 18. Влияние А) времени экспозиции МНЧ2-ПЛЛ₁₀₀-ПЭГ/СОД1 в НЧ ПМП (50 Гц 55 кА/м) и Б) релаксации МНЧ2-ПЛЛ₁₀₀-ПЭГ/СОД1 после экспозиции в НЧ ПМП (50 Гц 55 кА/м) в течение 5 мин в 10 мМ НЕРЕЅ рН 7,4 при комнатной температуре. Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение, n=3.



Рисунок 19. Результаты ЭИ МС фильтратов комплекса МНЧ2-ПЛЛ₁₀₀-ПЭГ/СОД1 до и после экспозиции в НЧ ПМП (50 Гц 55 кА/м) в течение 5 и 25 мин. Значения представлены как среднее ± стандартное отклонение, n=3. **Таблица 4.** Активность СОД1, определяемая по степени ингибирования автоокисления ПГ, в фильтратах образцов после центрифугирования до и после 0,5, 1 и 5 мин экспозиции МНЧ2-ПЛЛ100-ПЭГ/СОД1 в НЧ ПМП (50 Гц, 55 кА/м) в 10 мМ НЕРЕЅ рН 7,4 при комнатной температуре.

Время экспозиции в	Ингибирование автоокисления ПГ (%)			
НЧ ПМП, мин	Без действия НЧ ПМП	После действия НЧ ПМП		
0,5	17±5	19±5		
1	17±5	23±4		
5	17±5	27±3		

Таким образом, мы продемонстрировали, что во время воздействия НЧ ПМП на магнитные БИК с электростатически иммобилизованным СОД1, наблюдается обратимая десорбция фермента из комплекса. Это явление объясняется вращательно-колебательным движением МНЧ в поле, которое генерирует гидродинамическую силу, действующую на макромолекулы в комплексе, что способствует миграции СОД1 на периферию комплекса. Обнаруженный эффект показывает потенциальную возможность применения для разработки систем высвобождения ЛС и других функциональных медицинских материалов из БИК.

Выводы.

1. Получены и изучены МЛип различного липидного состава, содержащие гидрофобные МНЧ в мембране с включенными флуоресцентными гидрофильными и гидрофобной красителями. Выявлено, что максимальный размер частиц, которые могут быть включены в мембрану МЛип составляет ~ 7 нм (диаметр).

2. Изучен эффект НЧ ПМП на мембрану различного липидного состава. С помощью ПЭМ, конфокальной микроскопии и ИК Фурье-спектроскопии в режиме НПВО показано, что действие НЧ ПМП влияет на упаковку гидрофобных алкильных цепей в мембране, приводя к формированию дефектов в мембране или разрушения липидных везикул. Обнаружено, что магнитомеханическое повышение проницаемости мембраны МЛип выше для везикул, находящихся в гелевом фазовом состоянии, для которых наблюдалась более медленная релаксация мембраны после образования дефектов при действии поля.

3. Изучено влияние параметров внешнего НЧ ПМП и времени воздействия на магнитомеханическое повышение проницаемости мембраны МЛип. Выявлена оптимальная частота внешнего поля, при которой наблюдался максимальный эффект, составляет ~ 50 Гц. Данное значение согласуется с теоретически рассчитанным значением – 65 Гц. Показано, что при больших временах (больше 15-30 мин в зависимости от состава системы) происходит разрушение всей системы.

4. Получены МЛип с ковалентно иммобилизованными гидрофильными МНЧ на поверхности мембраны и загруженным высокомолекулярным соединением (белком BBI). Обнаружено, что действие НЧ ПМП на данную систему способствует высвобождению BBI из примембранной полимерной оболочки. Эффект поля зависел от напряженности НЧ ПМП и составил 23% и 37% при 70 кА/м и 150 кА/м, соответственно.

5. Получен магнитный БИК МНЧ2-ПЛЛ100-ПЭГ-СОД1. Показано, что при действии НЧ ПМП на БИК с электростатически адсорбированным ферментом происходит обратимая десорбция СОД1 с поверхности частиц за счет релаксационного вращения МНЧ. Установлена оптимальная частота внешнего поля, при которой наблюдался эффект, которая составила 50 Гц. Данное значение согласуется с теоретически рассчитанным значением – 75-100 Гц. Показано, что при больших временах (больше 15-20 мин) происходит агрегация системы.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Scopus и Web of Science

1. Vlasova K.Yu., Piroyan A., Le-Deygen I., Vishwasrao H., Klyachko N.L., Rudakovskaya P., Kireev I.I., Kabanov A.V. and Sokolsky-Papkov M. Magnetic liposome design for drug release systems responsive to super-low frequency alternating current magnetic field (AC MF) // Journal of Colloid and Interface Science. – 2019. – Vol. 522. – P. 689–700. (Scopus, Web of Science IF 6,361)

2. Le-Deygen I.M., **Vlasova K.Yu.**, Kutsenok E.O., Usvaliev A.D., Efremova M.V., Zhigachev A.O., Rudakovskaya P.G., Golovin D.Yu, Gribanovsky S.L., Kudryashova E.V., Majouga A.G., Golovin Yu.I., Kabanov A.V., Klyachko N.L. Magnetic Nanorods for Remote Disruption of Lipid Membranes by Low Frequency Magnetic Field // **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**. – 2019. – Vol. 21. – P. 1–10. (Scopus, Web of Science IF 5,57)

3. Головин Ю.И., Клячко Н.Л., Мажуга А.Г., Грибановский С.Л., Головин Д.Ю., Жигачев А.О., Шуклинов А.В., Ефремова М.В., Веселов М.М., Власова К.Ю., Усвалиев А.Д., Ле-Дейген И.М., Кабанов А.В. Новые подходы к нанотераностике: полифункциональные магнитные наночастицы, активируемые негреющим низкочастотным магнитным полем, управляют биохимической системой с молекулярной локальностью и селективностью // Российские нанотехнологии. – 2018. – Т. 13, № 5-6. – С. 3–25. (Scopus IF 0,283)

4. Vlasova K.Yu, Abakumova T.O., Melnikov P.A., Golovin Yu I., Kabanov A.V., Markvicheva E.A., Klyachko N.L. Controlled release of Doxorubicin from magnetoliposomes under low-frequency magnetic field // Journal of Bioenergetics and Biomembranes (Springer). $-2018. - V. 50, N_{\odot} 6. - P. 595-595.$ (Scopus IF 2,548)

5. Зайцева Е.А., Головин Ю.И., Кост О.А., Никольская И.И., **Власова К.Ю.**, Филатова Л.Ю., Белова А.Б., Ефременко Е.Н., Лягин И.В., Алексашкин А.Д., Нуколова Н.В., Мажуга

А.Г., Кабанов А.В., Клячко Н.Л. Технология «nanozyme» в московском университете. достижения и перспективы развития // Вестн. моск. ун-та. сер. 2. Химия. – 2016. – Т. 57. № 4. – С. 211-226. (Scopus IF 0,188)

6. Клячко Н.Л., Зайцева Е.А., Ефременко Е.Н., Кост О.А., Маникам Д., Нуколова Н.В., Мажуга А.Г., Головин Ю.И., Легоцкий С.А., Филатова Л.Ю., Мирошников К.А., Абакумов М.А., Лягин И.В., Чеснокова Н.Б., Ефремова М.В., Власова К.Ю., Кузнецов А.А., Кабанов А.В. Новые бионаносистемы для медицинских применений. Развитие технологии «NanoZYME» в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова// Вестник Московского Университета. Серия 2: Химия. – 2014. – Т. 55, № 3. – С. 139–147. (Scopus IF 0,188)

Тезисы докладов научных конференций

1. Vlasova, K.Yu. Enzyme molecule can be released from mnps surface at ac mf exposures / Vlasova, K.Yu., Vishwarsao H., Nukolova N., Abakumov M., Sokolsky M., Golovin Yu., Klyachko N., Kabanov A. // 6th International Conference on Nanomaterials - Research & Application (NANOCON). -2014. - p. 132.

2. Власова, К.Ю. Влияние низкочастотного переменного магнитного поля на загрузку и высвобождение лекарственного препарата в магнитных липосомах / Власова К.Ю., Абакумов М.А., Нуколова Н.В., Головин Ю.И., Кабанов А.В., Клячко Н.Л. // Вестник РГМУ. Материалы X международной (XIX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. – 2015. – С. 461.

3. Власова, К.Ю. Применение магнитных наночастиц для доставки и управляемого высвобождения лекарств / Власова К.Ю., Абакумов М.А., Вишварсао Х., Сокольски М., Нуколова Н.В., Мажуга А.Г., Головин Ю.И., Клячко Н.Л., Кабанов А.В. // Материалы VIII Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – 2015. – С. 98-99.

4. Vlasova, K.Yu. Application of low frequency ac magnetic field for controlled delivery of drugs by magnetic nanoparticles / Vlasova K. Yu., Abakumov M. A., Wishwarsao H., Sokolsky M., Nukolova N.V., Majouga A.G., Golovin Y.I., Klyachko N.L., Kabanov A.V. // World academy of science, Engineering and technology international journal of physical and mathematical sciences. International Conference on Magnetism and Magnetic Materials (ICMMM). – 2015. – Vol. 9, №8. <u>https://publications.waset.org/abstracts/24990/pdf</u> ISNI:0000000091950263.

5. Vlasova, K.Yu. Remote control for release properties of magnetic liposomes / Vlasova K. Yu., Abakumov M.A., Wishwarsao H., Sokolsky M., Nukolova N.V., Majouga A.G., Golovin Y.I., Klyachko N.L., Kabanov A.V. // International conference «Biocatalysis-2015: Fundamentals & applications» – 2015. – c. 90.

6. Vlasova, K.Yu. «Smart liposomes» for remote control drug release / Vlasova K.Yu., Abakumov M.A., Sokolsky M., Majouga A.G., Golovin Y.I., Klyachko N.L., Kabanov A.V. // European & Global Summit for CliniCal nanomedicine and targeted medicine enabling technologies for personalized medicine (CLINAM). – 2016. – p. 256.

7. Vlasova, K.Yu. New approach in remote control of drug release from container by means of magnetic nanoparticles and low frequency magnetic field / Vlasova K.Y., Abakumov M.A.,

Deygen I.M., Golovin Y.I., Majouga A.G., Kabanov A.V., Klyachko N.L. // 7th Baikal International Conference «Magnetic materials. New technologies» (BICMM). -2016. – P. 110-111.

8. Vlasova, K.Yu. Magentic liposomes release hydrophobic cargo under low- frequency magnetic field / Petrunin A.V., Vlasova K.Yu., Golovin Yu.I., Klyachko N.L. // Сборник тезисов X «МЕНДЕЛЕЕВ-2017» и II школа-конференция «Направленный дизайн веществ и материалов с заданными свойствами». – 2017. – с. 331.

9. Vlasova, K.Yu. Magnetic nanocontainers providing stimulus for drug release under low frequency magnetic field / Vlasova K.Yu, Abakumova T.O., Petrunin A.V., Golovin Y.I., Majouga A.G., Kabanov A.V., Klyachko N.L. // International conference «Biocatalysis-2017: Fundamentals & applications». – 2017. – p. 232. ISBN 978-5-9500292-3-3

10. Vlasova, K.Yu. Liposomes encapsulating hydrophobic magnetite nanoparticles: preparation and evaluation of release behavior / Petrunin A.V., Vlasova K.Yu., Golovin Yu.I., Majouga A.G., Kabanov A.V., Klyachko N.L. // International conference «Biocatalysis-2017: Fundamentals & applications». – 2017. – p. 241. ISBN 978-5-9500292-3-3

11. Vlasova, K. Magnetic field responsive magneto-liposomes for controlled drug release / Vlasova K., Abakumova T., Melnikov P., Le-Deygen I., Efremova M., Petrunin A., Majouga A., Golovin Yu, Kabanov A., Klyachko N. // Сборник тезисов II Международной научно-практической школы-конференции «Магнитные наноматериалы в биомедицине: получение, свойства, применение». – 2017. – С. 89-90.

12. Vlasova, K.Yu. Drug-loaded magnetoliposomes with controlled release by low-frequency alternating magnetic field / Vlasova K., Abakumova T., Melnikov P., Le-Deygen I., Chekhonin V., Golovin Yu., Kabanov A., Klyachko N. // Abstract book International conference on nanomedicine and nanobiotechnology (ICONAN). – 2017. – p. 182.

13. Vlasova, K.Yu. Remotely controlled release from magnetoliposomes under low frequency magnetic field: visualization by means of confocal microscopy / Vlasova K.Yu, Melnikov P.A., Abakumova T.O., Gileva A.M., Le-Deygen I.M., Golovin Yu I., Kabanov A.V., Markvichova E.A., Klyachko N.L. // 10th International conference "Biomaterials and Nanobiomaterials: Recent Advances Safety-Toxicology and Ecology Issues". – 2019. – p. 61.

14. Vlasova K.Yu. The development of magnetic liposomes-based nanoparticles iron oxide with different anisometria / Vlasova K.Yu, Vanzarakshaeva S.Ch, Le-Deygen I.M., Usvaliev A.D., Golovin Yu I., Kabanov A.V., Klyachko N.L. // 12th International Conference "Biocatalysis: Fundamentals and Applications". – 2019. – p. 166.

Сокращения, принятые в тексте. PBS – фосфатно-солевой буфер; HEPES – 4-(2гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота; Tris трис(гидроксиметил)аминометан; DOX – доксорубицин; PDI – индекс полидисперсности; DiD – 1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндодикарбоцианина; 1,8- ANS – 1-анилино-8нафталинсульфокислота; eggPC – яичный фосфатидилхолин; DSPC – 1,2-дистеароил-snглицеро-3-фосфатидилхолин; DPPC – дипальмитоил-фосфатидилхолин; DSPE-PEG – 1,2дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси-(полиэтиленгликоль)-2000] аммониевая соль; PNDA – пальмитоил-нитродофамин; DOPA – дофамин; BBI – ингибитор протеаз Баумана-Бирка; Т_m – температура фазового перехода; ЭИ МС – электронноионизационная масс-спектроскопия; ЛС – лекарственное средство; СДЛ – средства для доставки лекарств; ПМП – переменное магнитное поле; ПЭГ – полиэтиленгликоль; РЧ – радиочастотный; НЧ – низкочастотный; МНЧ – магнитные наночастицы; ММА – магнитомеханическая актуация; ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия; НПВО – нарушенное полное внутреннее отражение; ПЛЛ – полилизин; СОД1 – супероксиддисмутаза 1; ПГ – пирогаллол; α-ХТ – α-химотрипсин; Лип – липосомы; МЛип - магнитные липосомы; АЛип - анионные липосомы; МАЛип - магнитные анионные липосомы, ас – ассиметричный, с – симметричный.