

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМ. М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

ПОТАПЕНКОВ КИРИЛЛ ВАСИЛЬЕВИЧ

**НОВЫЕ НАНОКОМПОЗИТНЫЕ МЕМБРАННЫЕ ВЕЗИКУЛЫ И ИХ
АКТИВАЦИЯ ВНЕШНИМИ ФИЗИЧЕСКИМИ ВОЗДЕЙСТВИЯМИ**

Специальность 03.01.08 – «Биоинженерия»

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2020

Работа выполнена на кафедре биофизики физического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель: **Хомутов Геннадий Борисович**, доктор физико-математических наук, доцент

Официальные оппоненты: **Рууге Энно Куставич**, доктор физико-математических наук, профессор, профессор кафедры биофизики федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова»

Курочкин Илья Николаевич, доктор химических наук, профессор, директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимической физики им. Н.М. Эмануэля Российской академии наук (ИБХФ РАН)

Нечипуренко Юрий Дмитриевич, доктор физико-математических наук, старший научный сотрудник лаборатории ДНК-белковых взаимодействий ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук»

Защита диссертации состоится 14 сентября 2020 года в 16.00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.01.04 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119991 Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 2, Физический факультет МГУ,

E-mail: info@physics.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский пр-т, д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/304522586/>

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета МГУ.01.04,

кандидат технических наук

Сидорова А.Э.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Везикулы на основе биогенных липидов (липосомы) являются важным биомиметическим объектом фундаментальных биофизических исследований, а также прикладных биомедицинских и нанотехнологических разработок. Методы получения липосом относительно просты и в настоящее время хорошо отработаны. Липосомы являются простейшим аналогом мембран природных клеток, биосовместимы и нетоксичны, поэтому находят широкое применение в качестве модельных систем в фундаментальных биофизических исследованиях и используются в современной клинической практике для капсулирования ряда лекарств.

Одной из наиболее актуальных и важных научных проблем на стыке биофизики, нано-биоинженерии, биологии и медицины в настоящее время является проблема создания эффективных средств капсулирования, адресной доставки и управляемого высвобождения в целевой области биологически активных веществ и лекарственных препаратов, в том числе *in vivo*. Создание технологий управляемой доставки лекарств может значительно повысить эффективность лекарственной терапии ряда заболеваний, включая онкологические; минимизировать токсические и побочные эффекты применяемых препаратов, значительно повысить концентрацию препарата непосредственно в очаге заболевания. Свидетельством актуальности данной проблемы является растущее из года в год количество публикаций по данной теме в научной литературе.

Среди работ, посвященных доставке лекарственных препаратов *in vivo* (т.н. «drug delivery» в англоязычной научной литературе), значительный процент приходится на работы, в которых в качестве средства доставки используются именно липосомы – бислойные мембранные везикулы на основе природных липидов. Ряд лекарственных форм, в которых действующее вещество загружено внутрь липосом (Doxil, Daunoxome), уже одобрен американским управлением по контролю за лекарствами и пищевыми продуктами (FDA) и коммерчески доступен. Липосомы обладают рядом достоинств: липиды, используемые для получения липосом, являются основным структурным компонентом мембран биологических клеток, а потому они биосовместимы, и побочные токсические эффекты липосом минимальны или вовсе исключены. Широкий спектр простых и доступных методик позволяет получать липосомы различных размеров, оптимальные для каждого конкретного биомедицинского и биоинженерного применения.

Уже упоминавшиеся липосомальные лекарственные формы - препараты «Doxil» и «Daunoxome», содержащие капсулированный доксорубин, не имеют функциональных компонентов в мембранах липосом. Накопление таких липосом в опухоли происходит за счет т.н. эффекта повышенной проницаемости и удержания, обусловленного особенностями строения стенок сосудов опухолей. Липосомальные лекарственные препараты показали большую терапевтическую эффективность в сравнении со свободным состоянием действующего вещества в жидких биологических средах. Дополнительные функциональные компоненты липосом-носителей могут еще более повысить эффективность применения загруженных в липосомы лекарств, во-первых, за счет специфического связывания и избирательной локализации носителей лекарств в целевой области организма и, во-вторых, за счет управляемого высвобождения капсулированных веществ из носителей. В частности, функционализация липосом может обеспечить их восприимчивость к внешним физическим и химическим активирующим воздействиям, приводящим к управляемому высвобождению лекарственного препарата из капсулы-носителя в нужном месте в нужное время и в нужном количестве (так называемое пространственно-временное сопряжение адресной доставки лекарства). В качестве активирующих физических воздействий в настоящее время используются электромагнитные воздействия, в том числе свет, внешние электрические и магнитные поля, температурные воздействия, ультразвук.

Неорганические магнитные наночастицы оксида железа - один из интереснейших объектов биофизических исследований. Так, суперпарамагнитные и однодоменные ферромагнитные наночастицы магнетита обнаруживаются в ряде живых систем. Именно они обеспечивают магнитное ориентирование птиц, рыб, насекомых и бактерий в магнитном поле Земли [1]. Магнитные наночастицы также найдены в мозге пациентов с нейродегенеративными заболеваниями (болезнью Альцгеймера, Паркинсона и пр.) [2], что может, в том числе, выступать диагностическим критерием ряда нейродегенеративных нарушений. Магнитные наночастицы магнетита дают характерный «широкий» сигнал ЭПР, могут быть использованы в качестве контрастирующего агента для МРТ; используются в разработках методов магнитной гипертермии опухолей. Кроме того, наночастицы магнетита и внешнее неоднородное магнитное поле могут обеспечить направленное избирательное аккумулялирование магнитного носителя лекарств непосредственно в очаге заболевания, например в опухоли. Включение наночастиц магнетита в мембраны липосом может обеспечить как управляемую доставку лекарств, так и их высвобождение из липосом в очаге заболевания.

Золотые наночастицы, локализованные во внутренних гидрофобных областях липидной мембраны, могут быть использованы для разрушения липосом путем воздействия на них внешнего электрического поля. Использование электрического поля для биомедицинских применений, в том числе для вскрытия носителей лекарств или образования пор в клетках посредством эффекта электропорации, сопряжено с потенциальными негативными воздействиями на здоровые клетки и болевыми эффектами для пациента. В настоящей работе показано, что наночастицы золота могут быть использованы для избирательного разрушения липосомальных бислоев, эффективно усиливая локальное электрическое поле, что позволяет использовать для дистанционного вскрытия липосом электрические импульсы наносекундной длительности. Наносекундная длительность импульсов позволяет минимизировать возможные негативные эффекты электрических воздействий на организм. Однако, для реализации эффекта электропорации на липидных мембранах клеток или липосом, необходимо накопление на мембране определенной величины электрического заряда («зарядка мембранного конденсатора»). Носители зарядов в водной среде имеют ионную природу, обуславливающую меньшую величину их подвижности, по сравнению с электронами в металлах. Ввиду этого, а так же значительной емкости липидных мембран, их зарядка до величин, необходимых для реализации эффекта электропорации, требует определенного времени, порядка микросекунд или их десятых долей. Наночастицы, обладающие электронной проводимостью, поляризуются во внешнем электрическом поле на несколько порядков быстрее. Это позволяет обеспечить быструю поляризацию наночастиц в сравнении со временем накопления заряда на клеточных мембранах. Локализация функциональных электропроводящих и магнитных наночастиц непосредственно во внутренней гидрофобной области липидного бислоя липосомальной мембраны обладает рядом преимуществ. Во-первых, исключается контакт наночастиц с водной средой и, тем самым, исключаются возможные токсические эффекты, обусловленные зарядом и химической активностью функциональных неорганических наночастиц. Кроме того, низкая величина диэлектрической проницаемости внутренних гидрофобных областей липидной мембраны оптимальна для восприимчивости поляризующихся электропроводящих наночастиц к воздействиям внешнего электрического поля.

Таким образом, разработка биомиметических нанокомпозитных везикул на основе липосом с гидрофобизованными функциональными наночастицами магнетита и/или золота, локализованными в гидрофобной области липидного бислоя, является актуальной для решения проблем прикладной биофизики и

биоинженерии. Данные везикулы обладают значительным потенциалом для модельных биофизических исследований и практических биомедицинских применений.

В настоящей работе получены и охарактеризованы новые мембранные липидные везикулы, функционализированные неорганическими гидрофобизованными наночастицами магнетита и золота. Проведены работы по капсулированию внутри таких липосом модельных соединений - раствора соли NaCl и молекул красителя карбоксифлуоресцеина а также лекарственного препарата доксорубина. Экспериментально изучены эффекты высвобождения загруженных в липосомы веществ, обусловленные нетермическим воздействием внешнего импульсного электрического или постоянного магнитного полей. Приводятся теоретические оценки эффектов, которые могут лежать в основе механизмов явлений, наблюдаемых при воздействии внешних электрических и магнитных полей на нанокompозитные липосомы. Результаты работы в перспективе могут быть использованы для создания эффективной биомедицинской платформы, обеспечивающей адресную доставку и управляемое высвобождение биологически активных веществ, в т.ч. лекарств, в живых системах.

Степень разработанности темы. Имеется значительное количество научных публикаций по теме адресной доставки и управляемого высвобождения лекарственных препаратов; ряд специализированных научных журналов по данной тематике. Липосомы остаются одним из наиболее популярных средств доставки лекарств *in vivo*, существуют коммерчески доступные препараты, в которых действующее вещество загружено внутрь липосом. В ряде публикаций описана дополнительная функционализация липосом, в том числе включение в липосомы наночастиц магнетита или золота. Воздействие сверхкоротких импульсов электрического поля и магнитного поля на нанокompозитные липосомы с наночастицами не исследовалось.

Цель диссертационного исследования. Создать и охарактеризовать новые нанокompозитные мембранные везикулы на основе биогенных липидов и гидрофобизованных неорганических наночастиц магнетита и золота, а также разработать физико-химические подходы к применению таких везикул для капсулирования и управляемого высвобождения из них модельных соединений и лекарственного препарата доксорубина под действием внешних магнитных и импульсных электрических полей.

Задачи работы:

1) Получить стабильные коллоидные растворы гидрофобизованных (с использованием стеариновой кислоты) неорганических наночастиц магнетита (Fe_3O_4) и наночастиц золота, гидрофобизованных с использованием дополнительных амфифильных водонерастворимых лигандов (стеариновая кислота, октадецилтиол).

2) Получить новые биомиметические мембранные нанокомпозитные везикулы на основе фосфатидилхолина и гидрофобизованных наночастиц золота и магнетита. Исследовать возможность капсулирования в них ряда веществ, в т.ч. раствора соли NaCl , красителя карбоксифлуоресцеина и противоопухолевого препарата доксорубина.

3) Исследовать воздействия коротких импульсов электрического поля высокой напряженности или внешних магнитных полей на нанокомпозитные везикулы, содержащие раствор соли NaCl , карбоксифлуоресцеин или доксорубин.

4) Построить теоретические модели, описывающие влияние внешних электрических и магнитных полей на нанокомпозитные липосомы.

Объект и предмет исследования. Объектом исследования являются нанокомпозитные везикулы, содержащие в гидрофобных областях мембраны функциональные неорганические наночастицы магнетита и золота. Предметом исследования является высвобождение загруженных веществ из данных везикул под действием внешних физических воздействий.

Научная новизна

1. Разработана методика синтеза с одновременной гидрофобизацией наночастиц золота, позволяющая варьировать размер получаемых частиц.

2. Впервые получены и охарактеризованы нанокомпозитные липосомы, содержащие гидрофобизованные золотые наночастицы, локализованные во внутримембранных гидрофобных областях липосомальных мембран.

3. Впервые экспериментально исследован эффект влияния внешних полей (электрических и магнитных) на нанокомпозитные липосомы, содержащие в гидрофобных областях мембран наночастицы магнетита или золота.

4. Сделаны теоретические оценки эффекта изменения формы и проницаемости нанокомпозитных магнитных липосом во внешних магнитных полях.

Теоретическая и практическая значимость работы. Получены, исследованы и охарактеризованы новые нанокompозитные везикулы на основе фосфолипида фосфатидилхолина и гидрофобизованных наночастиц золота и магнетита. Установлена возможность загрузки в такие нанокompозитные везикулы модельных и биологически активных веществ, а также продемонстрировано управляемое высвобождение инкапсулированных веществ под действием внешнего импульсного электрического поля или внешнего магнитного поля. Сделаны теоретические оценки наблюдаемых эффектов влияния внешних электрических и магнитных полей на нанокompозитные везикулы. Практические и теоретические результаты работы могут быть использованы для разработки перспективных средств капсулирования и управляемой доставки биологически активных веществ и лекарственных препаратов.

Методология диссертационного исследования. В работе использовали комплекс современных взаимодополняющих физико-химических методов, таких как спектрофлуориметрия, динамическое светорассеяние, лазерный микроэлектрофорез, просвечивающая электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, ИК-Фурье спектроскопия, кондуктометрия и др.

Положения, выносимые на защиту:

1. Методом разложения гидрофобного прекурсора в хлороформе и варьирования концентрации лигандов (октадецилтиол, стеариновая кислота) получены коллоидные растворы гидрофобизованных наночастиц золота контролируемого размера в хлороформе. Получены коллоидные растворы гидрофобизованных наночастиц магнетита в хлороформе.

2. С использованием комплекса экспериментальных методов получены липидные везикулы, содержащие гидрофобизованные наночастицы магнетита и золота. Нанокompозитные липосомы на основе фосфатидилхолина и гидрофобизованных наночастиц магнетита и золота капсулируют во внутреннем объеме различные вещества включая лекарственные препараты (доксорубицин).

3. С использованием комплекса экспериментальных методов установлено, что короткие импульсы электрического поля высокой напряженности вызывают высвобождение содержимого нанокompозитных липосом во внешнюю водную среду. Под воздействием внешнего магнитного поля происходит изменение формы магнитных липосом и высвобождение капсулированного вещества во внешнюю водную среду.

Степень достоверности. Достоверность результатов настоящего исследования подтверждается использованием адекватных экспериментальных методов и согласием с литературными данными.

Личный вклад автора. Автор лично проводил анализ литературных данных, участвовал в постановке задач и планировании экспериментов. Разработка теоретических моделей, интерпретация результатов эксперимента и написание выводов проведены лично автором или при его непосредственном участии. Автор принимал активное участие в написании публикаций и тезисов конференций по теме диссертационной работы.

Публикации. По теме диссертационной работы опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах Web of Science, Scopus и РИНЦ.

Апробация работы. Результаты работы представлены на 14 международных и всероссийских конференциях (23 публикации в сборниках тезисов).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, четырех глав, содержащих обзор литературных данных, изложение и обсуждение результатов, заключения и списка литературы. Работа изложена на 133 страницах, включает 6 таблиц и 35 иллюстраций. Список литературы включает 160 наименований.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во *введении* сформулированы цель и задачи исследования, обозначены актуальность, научная новизна, научная и практическая значимость исследований, перечислены положения, выносимые на защиту.

Первая глава посвящена обзору литературных данных по теме диссертационной работы. Рассматривается современное состояние исследований в области технологий доставки лекарств в организме, особое внимание уделяется рассмотрению ныне существующих концептов систем доставки лекарств, предусматривающих восприимчивость к внешним активирующим управляющим воздействиям.

Вторая глава содержит описание материалов и методов диссертационного исследования.

Характеризация и гидрофобизация наночастиц магнетита. Для получения наночастиц магнетита был использован широко известный метод, предложенный Рене Массартом в 1981 году [3].

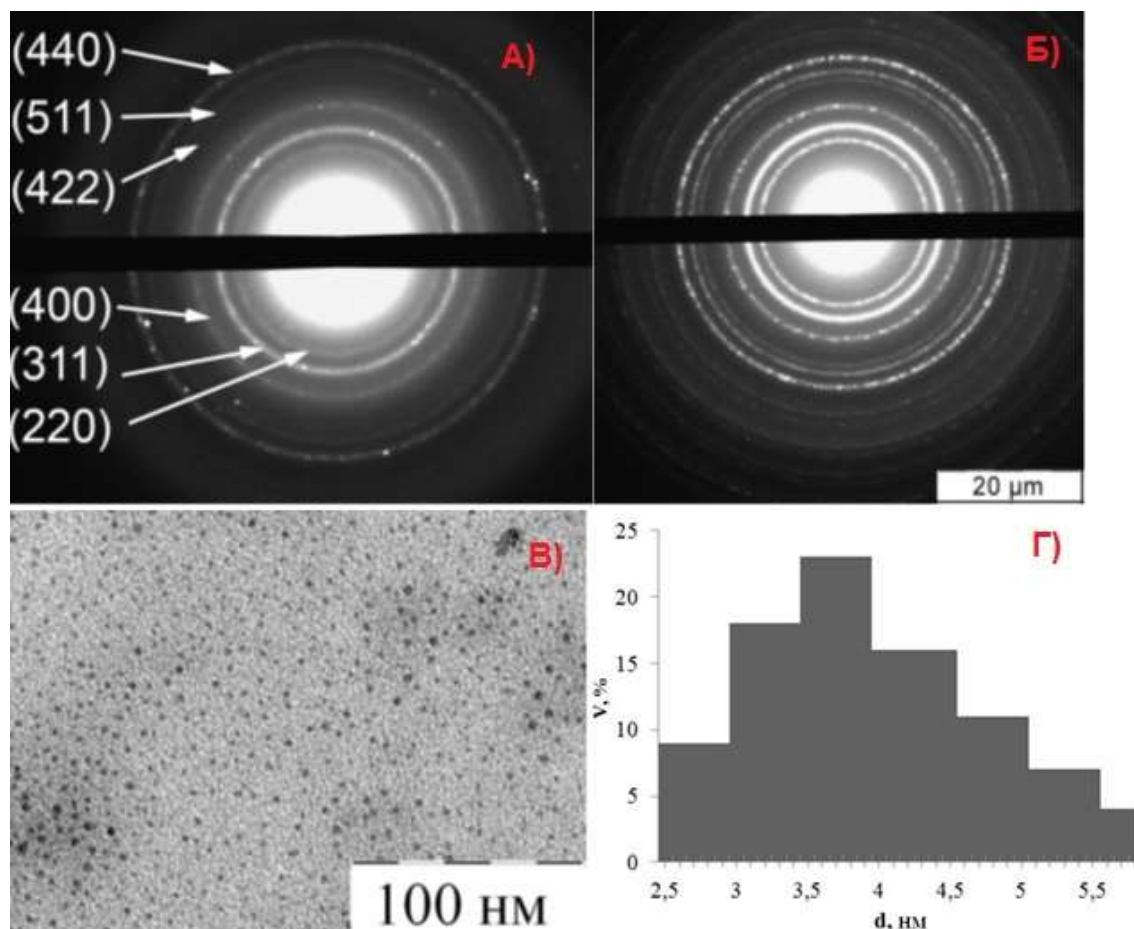


Рисунок 1. Данные для наночастиц магнетита, полученные с помощью электронного просвечивающего микроскопа LEO 912AB, IOME GA. А – электронная дифрактограмма для частиц магнетита, полученных в настоящей работе, цифрами указаны номера кристаллографических плоскостей для кристаллической фазы магнетита. Б - эталонная электронная дифрактограмма для дисперсного магнетита. В - типичная микрофотография высушенной коллоидной суспензии наночастиц магнетита. Г - справа – построенная на ее основе гистограмма, отображающая распределение наночастиц магнетита по размерам.

Для характеристики полученных наночастиц использовался ряд методов: просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ, использовался электронный микроскоп LEO 912AB, IOME GA), электрофорез и динамическое светорассеяние (использовалась установка Brookhaven instruments corporation 90 Plus). Функционал микроскопа LEO 912AB, IOME GA позволяет получить результаты дифракции электронов на наночастицах и сравнить получившиеся дифрактограммы с дифрактограммами для эталонного магнетита. Совпадение положений рефлексов и их интенсивностей на дифрактограммах свидетельствует о том, что синтезированные нами частицы представляют собой действительно нанофазный магнетит. Поскольку другой магнитный оксид

железа маггемит (Fe_2O_3) обладает схожим с магнетитом строением кристаллической решетки, допускается наличие доли маггемита в синтезированных частицах. Кроме электронограмм, электронный просвечивающий микроскоп позволил получить ряд изображений и изучить их распределение по размерам (рисунок 1, г). Наряду с данными динамического светорассеяния, это позволяет оценить средний размер синтезированных нами наночастиц магнетита – он составляет порядка 4 нм. Результаты электрофоретического исследования коллоидной суспензии наночастиц магнетита в водной фазе позволили нам получить данные о ζ -потенциале, который составил $20,5 \text{ мВ} \pm 0,8 \text{ мВ}$ при $\text{pH}=3,8$. Поскольку наночастицы магнетита в зависимости от размера обладают суперпарамагнитными или ферромагнитными свойствами, их коллоидная суспензия также была охарактеризована методом электронно-парамагнитного резонанса (ЭПР) – см. рисунок 2. Широкий сигнал, представленный на рисунке 2, характерен для суперпарамагнитных и однодоменных ферромагнитных наночастиц магнетита.

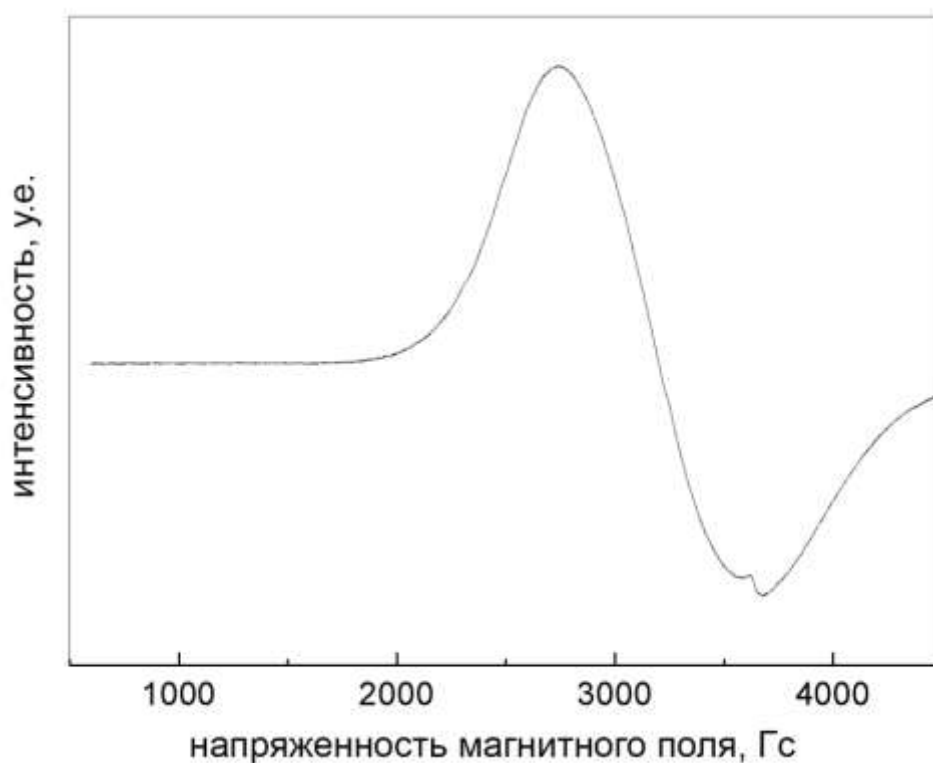


Рисунок 2. Спектр ЭПР полученной нами суспензии коллоидных наночастиц магнетита (средний диаметр 4 нм) в водной фазе.

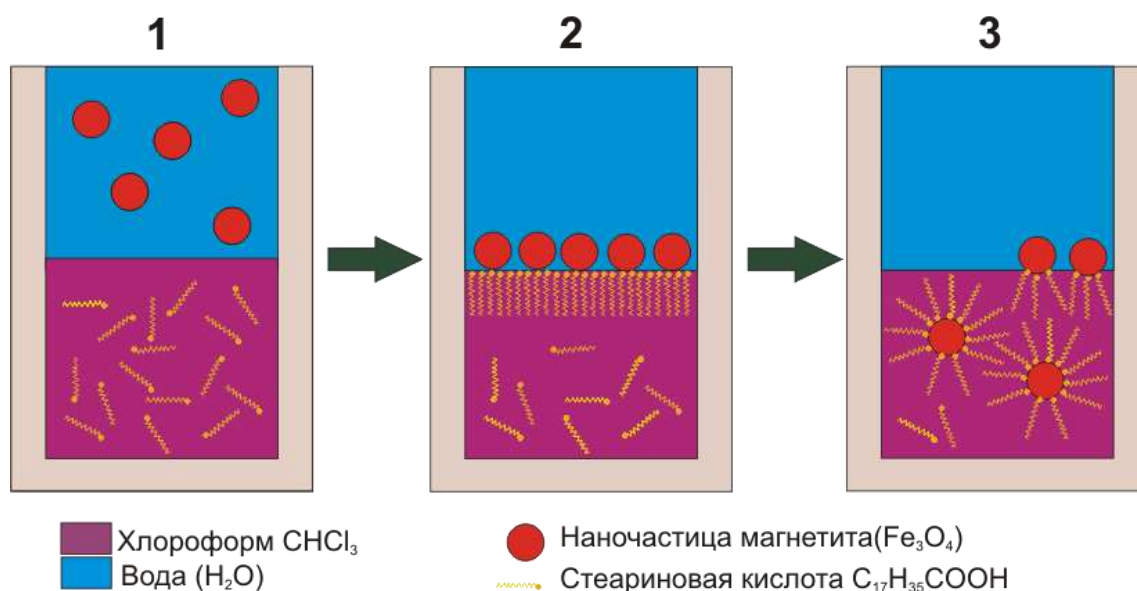


Рисунок 3. Схематическое изображение методики гидрофобизации наночастиц магнетита, включающей связывание стеариновой кислоты с наночастицами магнетита на границе раздела фаз вода/хлороформ.

Положительный заряд неорганических наночастиц ограничивает их применение *in vivo*, поскольку приводит к неспецифическому связыванию таких наночастиц с анионными биологическими коллоидными объектами и поверхностями. Это обстоятельство обуславливает необходимость модификации поверхности наночастиц специальными лигандами, обеспечивающими коллоидную стабильность наночастиц и их функционализацию. Одним из способов модификации полученных наночастиц для биомедицинских применений является их гидрофобизация. Кроме того, гидрофобизация позволяет дополнительно стабилизировать наночастицы и изолировать их от водной фазы биологических жидкостей. Ряд предложенных в литературе методов неприменим для использования в средствах доставки лекарственных препаратов, поскольку используются высокотоксичные соединения, и нами был разработан метод, лишенный данного недостатка. Стабилизирующим гидрофобным лигандом являлась нетоксичная стеариновая кислота. Другим лигандом, способным обеспечить гидрофобизацию наночастиц магнетита, является октадецилтиол (ОДТ). Наночастицы магнетита, гидрофобизованные с использованием ОДТ, также были получены и обладали свойствами, аналогичными гидрофобизованным наночастицам магнетита со стеариновой кислотой в качестве амфифильного лиганда. Поэтому в последующих экспериментах с загрузкой флуоресцентного красителя внутрь липосом и исследования влияния на них внешних воздействий использовались преимущественно наночастицы, гидрофобизованные стеариновой кислотой.

Схематическое изображение происходящих при гидрофобизации процессов приведено на рисунке 3.

Синтез золотых наночастиц с одновременной гидрофобизацией. В настоящей работе нами реализован подход, совмещающий классический двухфазный синтез и современные методы монослойной самосборки с алкановыми тиолами. Особенностью предлагаемого нами метода является восстановление ионов золота из гидрофобного прекурсора $\text{Au}(\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3)\text{Cl}$ и стабилизация образующихся кластеров металлического золота прикрепляющимися к ним молекулами алкилтиолов, в качестве которых использовался октадецилтиол (ОДТ); т.е. синтез и гидрофобизация наночастиц золота происходят одновременно. Изменяя концентрацию ОДТ, возможно варьировать размер получаемых наночастиц. Лигандами, стабилизирующими зарождающиеся кластеры золота и обеспечивающими их гидрофобизацию, являются трифенилфосфин $\text{P}(\text{C}_6\text{H}_5)_3$ и ОДТ. Именно наличие ОДТ позволяет эффективно изменять размер образующихся наночастиц золота.

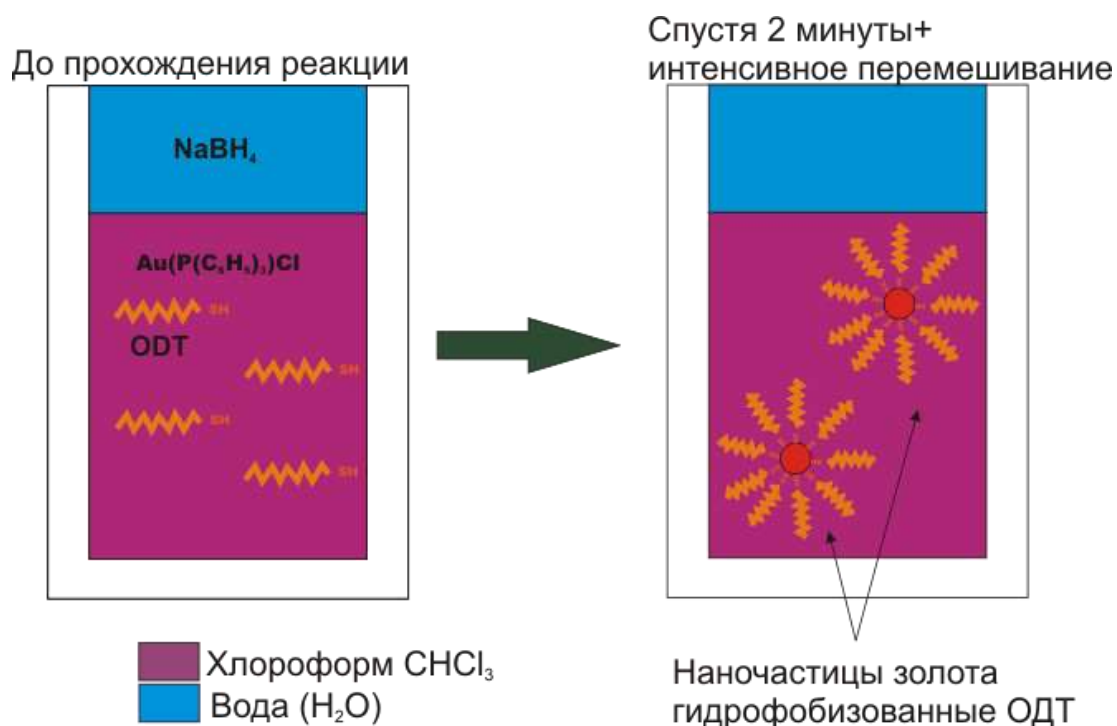


Рисунок 4. Схематическое изображение процесса синтеза наночастиц золота с их одновременной гидрофобизацией.

На рисунке 4 схематически показаны процессы, происходящие при синтезе наночастиц золота с их одновременной гидрофобизацией. При концентрации ОДТ 0,11 мг/мл в процессе синтеза образуются более крупные частицы, размерами 5-8 нм. При концентрации ОДТ 0,35 мг/мл размеры частиц

распределены в диапазоне 2,5-5 нм. Описанная в диссертационной работе методика синтеза золотых наночастиц с одновременной гидрофобизацией не использует высокотоксичных соединений, не требует особых условий для прохождения реакций.

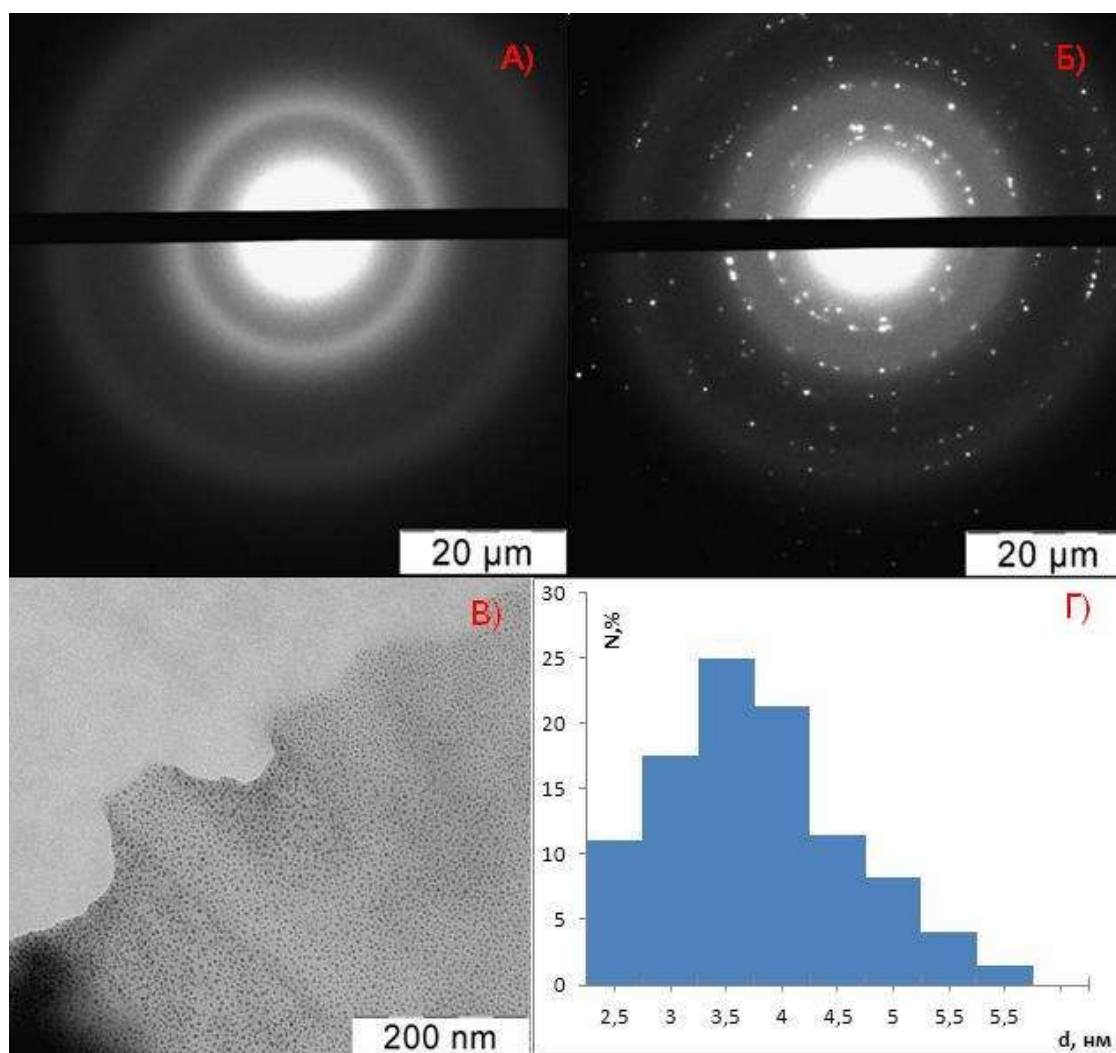


Рисунок 5. Данные о наночастицах золота, полученные с помощью электронного просвечивающего микроскопа LEO 912AB, IOME GA. А - электронная дифрактограмма для гидрофобизованных неорганических наночастиц, б - характерная дифрактограмма для эталонного образца, в - ПЭМ изображение гидрофобизованных золотых наночастиц, г - диаграмма, отражающая их распределение по размерам. Средний размер порядка 3,5-3,7 нм.

Гидрофобизованные наночастицы в настоящей работе необходимы для создания нанокомпозитных липосом. По этой причине оптимальным размером получаемых наночастиц является именно размер, сравнимый с толщиной липидного бислоя, который для фосфатидилхолина составляет порядка 4,1 нм[4]. Наночастицы золота были охарактеризованы при помощи микроскопа LEO 912AB, IOME GA (рисунок 5). Кроме того, коллоидная суспензия золотых наночастиц в хлороформе была охарактеризована методом ИК-Фурье

спектроскопии, что позволяет судить о связанных на поверхности неорганических наночастиц амфифильных водонерастворимых лигандах.

Полученные нами образцы коллоидной суспензии наночастиц золота были охарактеризованы методом ИК-Фурье спектроскопии. Наблюдаемые на спектре гидрофобизованных наночастиц пики соответствуют характерным колебаниям групп, присутствующих в молекулах используемого лиганда и прекурсора (рисунок 6).

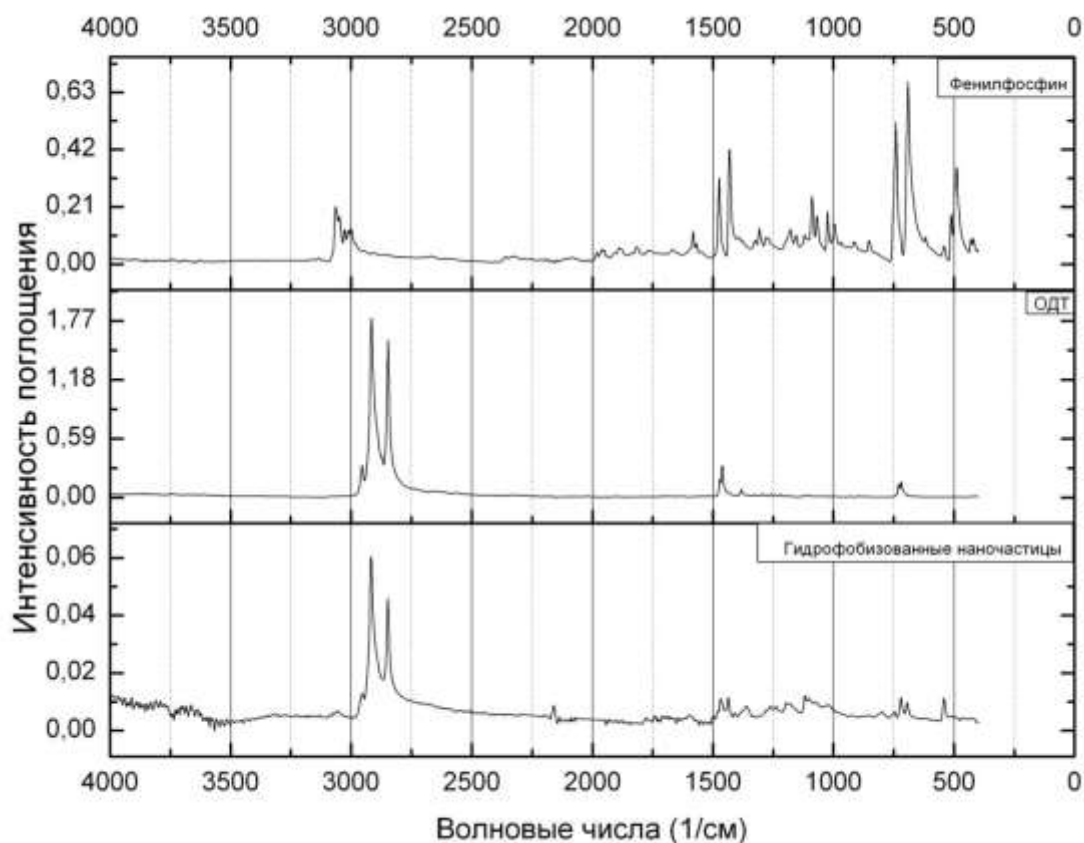


Рисунок 6. Результаты исследования полученных в работе гидрофобизованных наночастиц золота методом ИК-Фурье спектроскопии.

Синтез и загрузка нанокомпозитных липосом

Липосомы – полые везикулы, ограниченные бислойной липидной мембраной. Такие структуры также могут быть образованы рядом амфифильных соединений [5]. Поскольку велико число модельных биофизических и биомедицинских применений липосом, существует широкий ряд методик, позволяющий получать липосомы требуемых размеров [6]. Липосомы в настоящей работе были получены по стандартному методу гидратации тонкой липидной пленки с последующим воздействием

ультразвука. При этом на стадии высушивания тонких пленок в раствор фосфолипидов так же добавлялись коллоидные суспензии гидрофобизованных наночастиц в хлороформе.

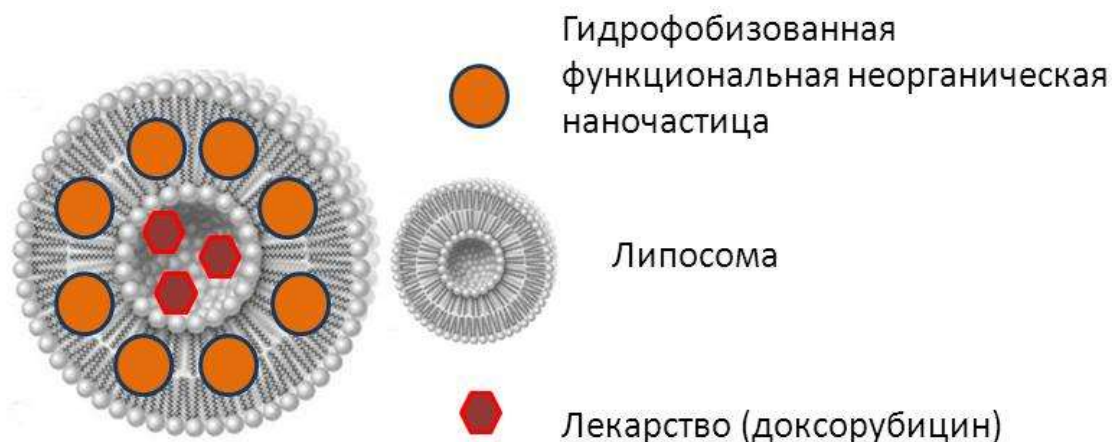


Рисунок 7. Схематическое изображение получаемых в работе нанокомпозитных липосом.

В настоящей работе проводился синтез липосом, содержащих локализованные в гидрофобных областях мембраны суперпарамагнитные наночастицы магнетита или же наночастицы золота (рисунок 7). В качестве модельных веществ, загружаемых внутрь липосом с наночастицами магнетита в мембране, выступал раствор соли NaCl и краситель карбоксифлуоресцеин; в липосомы, содержащие наночастицы золота, загружался противоопухолевый препарат доксорубицин или раствор соли NaCl. Для контрольных экспериментов по воздействию электрического поля также создавались липосомы, не содержащие наночастицы, загруженные доксорубицином или раствором соли NaCl.

После получения, липосомы были охарактеризованы методами ПЭМ и АСМ. Метод просвечивающей электронной микроскопии использовался для характеристики липосом, содержащих локализованные в гидрофобных областях мембраны функциональные наночастицы золота (рисунок 8, Б) или магнетита (рисунок 8, В, Г). Кроме того, липосомы с золотыми функциональными наночастицами были дополнительно охарактеризованы методом АСМ (рисунок 8, А). Размер полученных функциональных липосом составил порядка 70-300 нм, что является оптимальным размером для ряда биомедицинских применений. На микрофотографиях, полученных методом ПЭМ, видны функциональные неорганические наночастицы, равномерно локализованные в мембранах липосом.

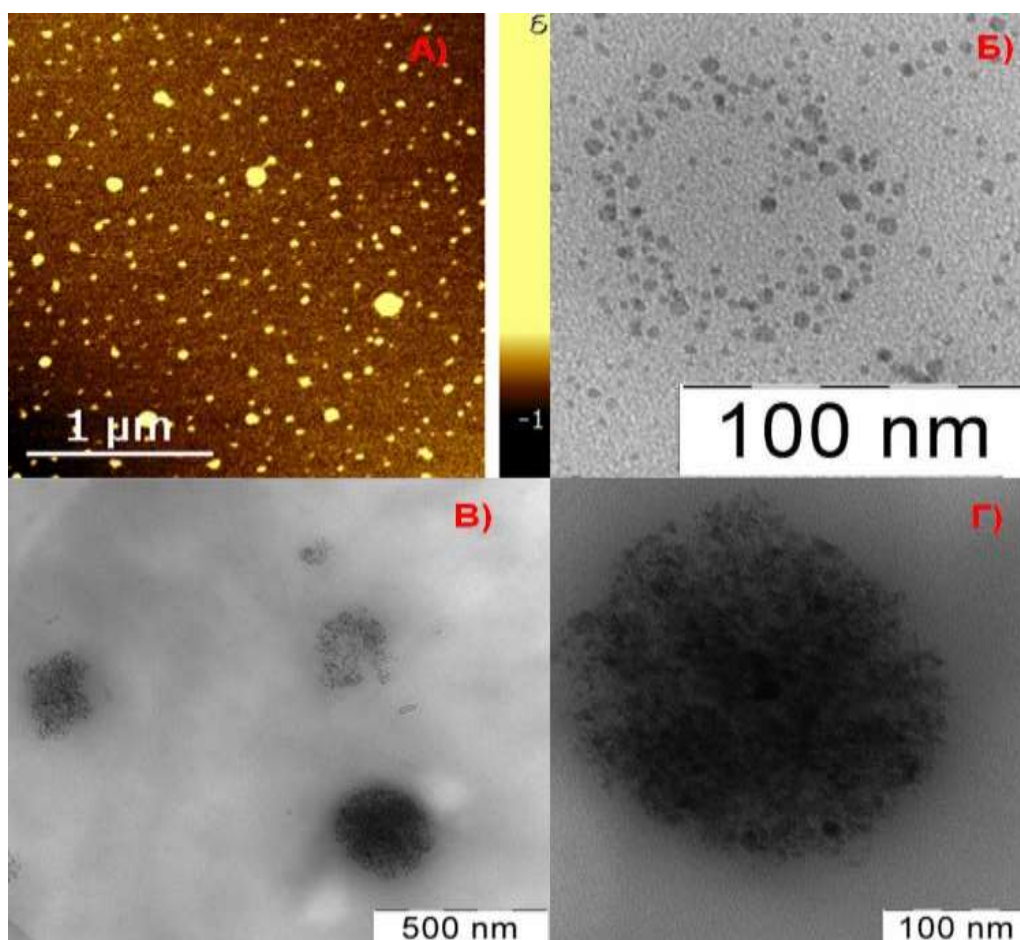


Рисунок 8. Характеризация липосом. А - АСМ изображение липосом с золотыми наночастицами. Б - ПЭМ изображения тех же липосом. В, Г – ПЭМ изображения липосом, содержащих наночастицы магнетита.

В *третьей главе* описываются эксперименты по изучению воздействия внешних полей (импульсных электрических и постоянных магнитных) на нанокompозитные липосомы, а также эксперименты по изучению цитотоксичности нанокompозитных липосом.

Воздействие внешних магнитных полей на липосомы, содержащие в мембранах гидрофобизованные наночастицы магнетита

Образцы коллоидной суспензии нанокompозитных липосом, функционализированных гидрофобизованными наночастицами магнетита и загруженных раствором карбоксифлуоресцеина, экспонировались в постоянном магнитном поле напряженностью 1,9 кЭ в течение 1 часа. До и после воздействия производились измерения флуоресценции образцов при помощи флуоресцентного спектрофотометра Hitachi F-4000.

Идея эксперимента обусловлена эффектом концентрационного тушения флуоресценции: внутри липосом молекулы красителя находятся при

концентрации большей, нежели концентрация самотушения флуоресценции. При выходе красителя из липосом во внешнюю, по отношению к липосомам, водную фазу раствора, он равномерно распределяется по объему суспензии, его концентрация снижается, что приводит к значительному увеличению интенсивности наблюдаемого сигнала флуоресценции. Кроме того, высушенные во внешнем поле образцы нанокompозитных липосом были охарактеризованы методом ПЭМ (рисунок 9). Результаты эксперимента с измерением флуоресценции образцов приводятся в таблице 1.

Таблица 1. Измерение флуоресценции загруженного карбоксифлуоресцеина (измерения для пика 517 нм).

Без воздействия		После воздействия		Эффективность, по отношению пиков
Интенсивность, отн.ед.	Интенсивность после добавления Triton X100, отн.ед.	Интенсивность, отн.ед.	Интенсивность после добавления Triton X100, отн.ед.	97,8%
118±5	323,5±5	308±5	320±5	
Отношение интенсивностей пиков		Отношение интенсивностей пиков		
2,74±0,1		1,03+0,1		

Данные результаты являются свидетельством того, что флуоресцентный краситель вышел из внутреннего объема липосом во внешний раствор. На ПЭМ-микрофотографии (рисунок 9) можно наблюдать изменение формы нанокompозитных липосом под действием внешнего магнитного поля. Наблюдаемый эффект выхода флуоресцентного красителя в раствор объясняется изменением проницаемости липосомальных мембран по причине их растяжения и деформации при изменении формы липосомы со сферической на эллипсоидальную. Более подробное теоретическое рассмотрение эффекта приводится в главе 4.

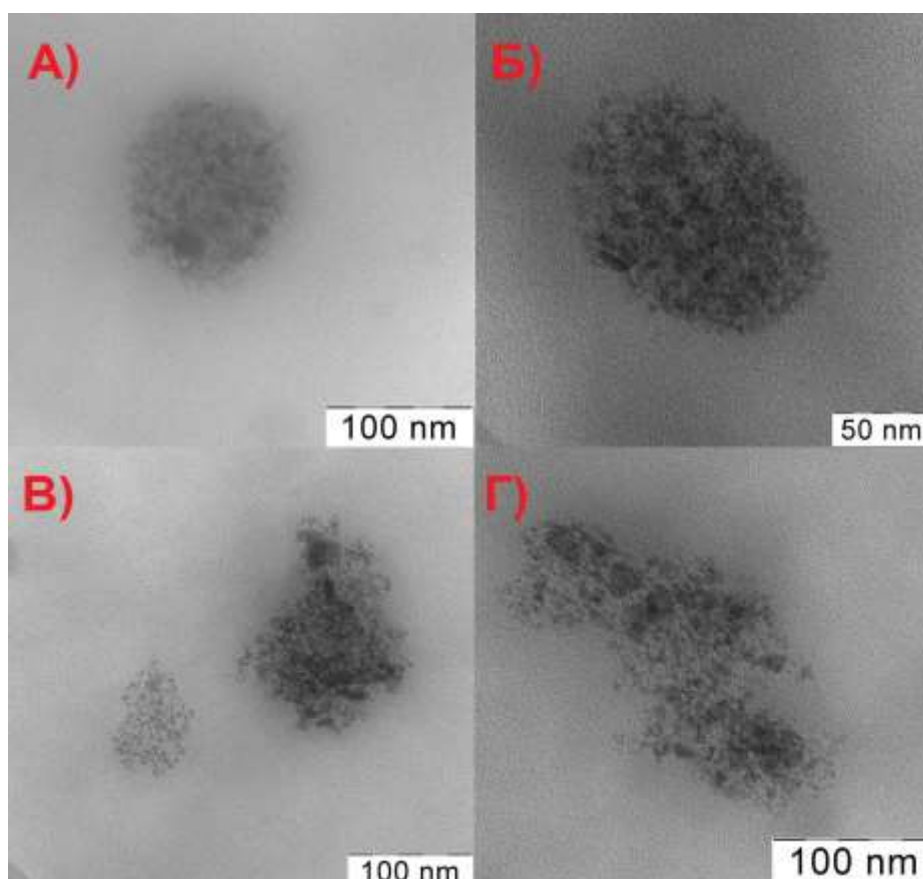


Рисунок 9. А – контроль, Б, В, Г: ПЭМ - изображение образцов нанокompозитных липосом, содержащих наночастицы магнетита, высушенные во внешнем магнитном поле: заметно изменение формы липосом от квази-сферической к вытянутой эллипсоидальной.

Воздействие импульсных электрических полей на липосомы, содержащие в мембранах золотые наночастицы

Эксперимент, позволяющий наглядно установить влияние импульсов внешнего электрического поля на нанокompозитные липосомы, состоит в загрузке внутрь липосом солевого раствора NaCl (с последующим диализом, обеспечивающим удаление раствора соли из внешнего, по отношению к липосомам, объема водной фазы раствора). Затем проводится измерение проводимости суспензии таких липосом до и после воздействия импульсов.

Наблюдаемый при этом скачок проводимости является свидетельством разрушения липосом и выхода из них солевого раствора. Для эксперимента с солевым раствором пробирки с образцами, содержащие коллоидную суспензию нанокompозитных липосом, помещались между электродами в установке, генерирующей импульсы электрического поля. На электроды установки подавали импульсы напряжения 150 кВ, при этом зазор между электродами установки составлял не более 1 см, а продолжительность импульса не

превышала 10 нс. На образцы воздействовали последовательностями в 10 и 50 импульсов, до и после воздействия измерялась проводимость образцов.

Результаты измерения электропроводности образцов приводятся в таблице 2:

Таблица 2. Результаты измерения проводимости для экспериментов с капсулированием раствора NaCl в нанокompозитных липосомах, содержащих гидрофобизованные золотые наночастицы.

Образец	Электропроводность образца, $\mu\text{S}/\text{см}$	Электропроводность образца после добавления TritonX-100, $\mu\text{S}/\text{см}$	Электропроводность образца после 10 имп, $\mu\text{S}/\text{см}$	Электропроводность образца после 10 имп. После добавления TritonX-100, $\mu\text{S}/\text{см}$	Электропроводность образца после 50 имп, $\mu\text{S}/\text{см}$
Липосомы с наночастицами и NaCl	$40,0 \pm 0.6$	$76,0 \pm 0.6$	$50,0 \pm 0.6$	$75,8 \pm 0.6$	$74,0 \pm 0.6$
Эффективность воздействия)	$27 \pm 3\%$			$94 \pm 3\%$	
Липосомы с NaCl без наночастиц	$45,0 \pm 0.6$	$58,0 \pm 0.6$	$48,0 \pm 0.6$	$59,0 \pm 0.6$	$54,0 \pm 0.6$
Эффективность воздействия	$23 \pm 3\%$			$64 \pm 3\%$	

На основании приведенных данных можно сделать вывод о разрушении большей части нанокompозитных липосом с золотыми наночастицами под воздействием сверхкоротких импульсов внешнего электрического поля и выхода содержимого липосом во внешний раствор. Кроме того, были сделаны ПЭМ и АСМ-микрофотографии образцов, свидетельствующие о разрушении липосом под действием внешнего поля.

Также проведены эксперименты с нанокompозитными липосомами, суспендированными в физиологическом растворе (150 мМ NaCl) и содержащими противоопухолевый препарат доксорубицин, обладающий флуоресцентными свойствами. Липосомы, загруженные доксорубицином, подвергались воздействию 10 импульсов электрического поля с напряжением порядка 3 кВ, длительностью порядка 10 нс. При этом образцы находились в

куветах, расстояние между электродами составляло 4мм. Измерение интенсивности флуоресценции проводилось до и после воздействия импульсов на образцы, причем после измерений на образцы так же воздействовали детергентом Triton x-100, обеспечивающим полное разрушение липосом и высвобождение 100% капсулированного доксорубина, с последующим измерением интенсивности флуоресценции. Результаты измерения флуориметром Hitachi F-4000 приводятся в таблице 3, длина волны возбуждения составляла 540 нм, длина волны испускания составляла 595 нм.

Таблица 3. Результаты измерения флуоресценции доксорубина при воздействии внешнего электрического поля на нанокompозитные и контрольные липосомы, содержащие капсулированный доксорубин.

Образец	Интенсивнос ть флуоресценц ии, отн.ед.	Интенсивнос ть флуоресценц ии после добавления TritonX-100, отн.ед.	Интенсивнос ть флуоресценц ии после воздействия, отн.ед.	Интенсивнос ть флуоресценц ии после воздействия и добавления TritonX-100, отн.ед.	Эффективно сть воздействия, оценивая по отношению пиков
Липосомы с наночастица ми	185.3±5	241.6±5	169,3±5	191,2±5	96,6±2
Отношение пиков	1,303±0,03		1,12±0,03		
Липосомы без наночастиц	156,1±5	212,0±5	151,0±5	303,6±5	33,3±2
Отношение пиков	1,36±0,03		1,348±0,03		

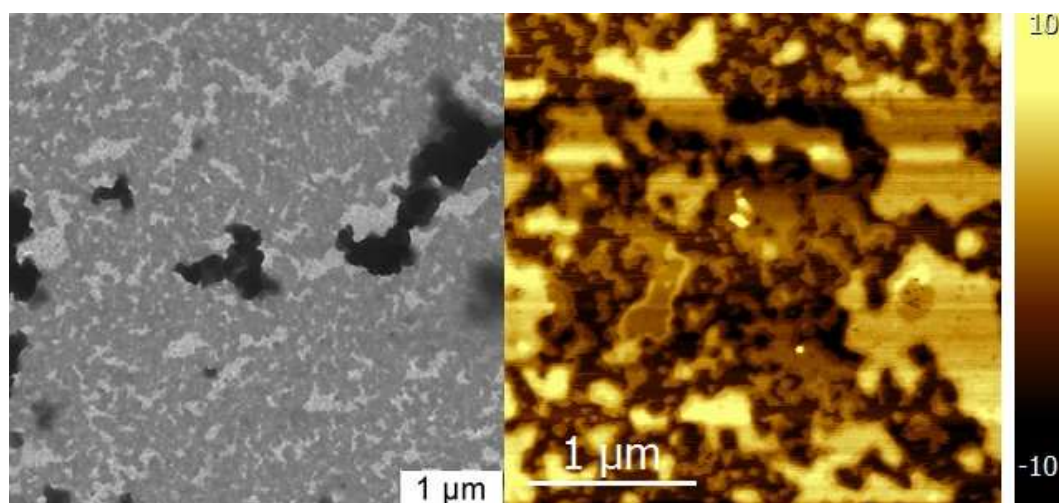


Рисунок 10. ПЭМ (слева) и АСМ (справа) - изображения образца липосом после воздействия импульсов электрического поля. Видны фрагменты разрушенных липосом.

Анализ полученных в результате эксперимента данных позволяет сделать следующий вывод: нанокompозитные липосомы эффективно капсулируют доксорубицин во внутреннем объеме. При воздействии импульсов внешнего электрического поля липосомы эффективно разрушаются, доксорубицин выходит в раствор, при этом изменяется наблюдаемый спектр флуоресценции. О разрушении липосом под действием внешних импульсов так же свидетельствуют результаты ПЭМ и АСМ (рисунок 10).

Кроме того, были проведены эксперименты по измерению цитотоксичности полученных нами нанокompозитных липосом стандартным МТТ-тестом на клеточной линии А375 (меланома человека). Результаты данных экспериментов свидетельствуют, что липосомы, содержащие локализованные в межмембранном пространстве наночастицы золота, не проявляют выраженных цитотоксических свойств при концентрациях менее 0,5 мг/мл. В то же время, при загрузке внутрь липосом противоопухолевого препарата доксорубицина, цитотоксические свойства липосом проявляются уже при их концентрации 0,005 мг/мл, что является подтверждением эффективности доставки модельного лекарства – доксорубицина такими липосомами. Эксперимент для липосом, содержащих в гидрофобной области мембраны наночастицы магнетита, продемонстрировал полное отсутствие цитотоксичности во всем диапазоне концентраций, на котором проводились измерения (от 0,004 до 1 мг/мл). Более того, присутствие наночастиц магнетита в нанокompозитных липосомах, добавляемых в культуры клеток, приводит к определенному увеличению выживаемости клеток по сравнению с контролем (в отсутствие добавок липосом). Этот эффект может быть следствием биогенности и полной биосовместимости наночастиц магнетита, метаболизирующихся клетками.

Четвертая, теоретическая глава посвящена теоретическим оценкам наблюдаемых эффектов: локальной избирательной электропорации нанокompозитных липосом под действием импульсного электрического поля и изменения формы магнитных липосом под действием внешнего магнитного поля.

Выполнены теоретические оценки напряженностей электрического поля вблизи проводящей наночастицы золота во внешнем поле. Результат позволяет предположить, что локальное усиление напряженности электрического поля вблизи проводящих золотых наночастиц, является главным фактором, обуславливающим высвобождение содержимого нанокompозитных липосом под действием импульсов внешнего электрического поля.

Для теоретического описания процессов, происходящих с нанокомпозитными липосомами, содержащими неорганические наночастицы магнетита, локализованные в мембранах во внешнем магнитном поле, липосомальные мембраны аппроксимировались так называемыми феррожидкостями. Рассматривалась задача о деформации эллипсоидального слоя феррожидкости во внешнем магнитном поле. Путем теоретического анализа и численного сравнения полученных для возможных частных случаев формул для свободной магнитостатической энергии оболочки, было установлено, что наиболее энергетически выгодным состоянием является форма вытянутого эллипсоида вращения с большой полуосью, ориентированной вдоль направления внешнего магнитного поля. Численные оценки с использованием полученных формул показывают, что свободная энергия вытянутой эллипсоидальной магнитной оболочки во внешнем магнитном поле может превышать энергию поверхностного натяжения, оцененную для эллипсоидальной липосомальной мембраны, в 4 и более раз, что может приводить к деформациям липосомальной мембраны и изменению ее проницаемости.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ ДИССЕРТАЦИИ

1. Синтезированы суперпарамагнитные коллоидные наночастицы магнетита (Fe_3O_4) со средним диаметром порядка 4 нм и разработана методика их гидрофобизации с использованием амфифильных водонерастворимых лигандов (стеариновой кислоты, октадецилтиола), обеспечивающая получение коллоидного раствора гидрофобизованных наночастиц магнетита в хлороформе. Впервые получен коллоидный раствор наночастиц золота в хлороформе, гидрофобизованных при помощи водонерастворимого лиганда октадекантиоловой кислоты (ОДТ). Размер гидрофобизованных наночастиц золота эффективно варьируется в диапазоне 0,5-8 нм посредством изменения соотношения концентраций прекурсор-лиганд в процессе синтеза.

2. Впервые получены и охарактеризованы новые нанокомпозитные липосомы на основе фосфатидилхолина, содержащие в своих мембранах гидрофобизованные неорганические наночастицы золота или магнетита. Диаметр нанокомпозитных липосом варьирует от 80 до 300 нм, а неорганические наночастицы обладают относительно однородным пространственным распределением в липосомальных мембранах.

3. Нанокомпозитные липосомы эффективно удерживают во внутреннем объеме различные химические соединения, в том числе раствор соли NaCl ,

флуоресцентный краситель карбоксифлуоресцеин и противоопухолевый препарат доксорубицин.

4. Короткие импульсы электрического поля длительностью порядка 10 нс и напряженностью от 3,5 до 15 кВ/см, воздействуя на коллоидные суспензии нанокомпозитных липосом, содержащих в мембранах золотые наночастицы, приводят к высвобождению их содержимого во внешнюю, по отношению к ним, водную фазу раствора. Данный процесс является нетермическим и вызывается эффектом избирательной электропорации липосомальных мембран, обусловленной присутствием в мембране поляризующихся электропроводящих наночастиц, значительно усиливающих напряженность локального электрического поля вблизи частицы.

5. Нанокомпозитные липосомы с локализованными в липидных бислоях суперпарамагнитными наночастицами магнетита под действием внешнего магнитного поля изменяют свою форму со сфероидальной на квази-эллипсоидальную. Это сопряжено со структурными изменениями в нанокомпозитных мембранах, приводящими к изменениям их проницаемости, и постепенному высвобождению содержимого липосомы во внешнюю водную среду.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wilitschko R., Wilitschko W. The magnetite-based receptors in the beak of birds and their role in avian navigation // J Comp Physiol A. 2013. Vol. 199. pp. 89-98.
2. Dobson J. Nanoscale biogenic iron oxides and neurodegenerative disease // FEBS Letters. April 2001. Vol. 496. pp. 1-5.
3. Massart R. Preparation of Aqueous Magnetic Liquids in Alkaline and Acidic Media // IEEE Transactions on magnetic. March 1981. Vol. 17. No. 2. P. March.
4. Balgavý P., Dubnickova M., Kiselev M.A. Bilayer thickness in unilamellar extruded egg yolk phosphatidylcholine liposomes: A small-angle neutron scattering study // Acta Physica Slovaca. August 1998. Vol. 48. No. 4. pp. 509-533.
5. Барсуков Л.И. Липосомы // Соросовский образовательный журнал. 1998. Т. 10. С. 8.
6. Новикова А.А., Кезимана П., Станишевский Я.М. Методы получения липосом, используемых в качестве носителей лекарственных средств (обзор) // Разработка и регистрация лекарственных средств. май 2017. Т. 2. № 19. С. 134-138.

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, РИНЦ:

1. G. B. Khomutov, V. P. Kim, **K. V. Potapenkov** [et al.] Langmuir monolayers and langmuir-blodgett films of ph-sensitive lipid// Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. — 2017. — Vol. 532. — P. 150–154 (*Импакт-фактор Scopus 2018г. - 3,131; SJR 2018г. - 0,735*)

2. G. B. Khomutov, V. P. Kim, **K. V. Potapenkov** [et al.] Nanocomposite biomimetic vesicles based on interfacial complexes of polyelectrolytes and colloid magnetic nanoparticles // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. — 2017. — Vol. 532. — P. 26–35

(*Импакт-фактор Scopus 2018г. - 3,131; SJR 2018г. - 0,735*)

4. Ю. В. Гуляев, В. А. Черепенин, **К.В. Потапенков** и др. Дистанционная активация с помощью импульсного электрического поля нанокompозитных микрокапсул на основе комплексов липидов, полимеров и проводящих наночастиц// Журнал радиоэлектроники. — 2014. — № 11. — С. 1–32

(*Импакт-фактор РИНЦ 2018 г. - 0,423*)

4. В. П. Ким, А. В. Ермаков, **К.В. Потапенков** и др. Планарные наносистемы на основе комплексов амфифильного полиамина, наночастиц магнетита и молекул ДНК // Российские нанотехнологии. — 2014. — Т. 9, № 5-6. — С. 42–46 (*Импакт-фактор РИНЦ 2016 г. - 1,094*)

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ НА МЕЖДУНАРОДНЫХ НАУЧНЫХ КОНФЕРЕНЦИЯХ

1. **Potapenkov K.V.** [et al.] Biomimetic nanostructures: monolayers, films and vesicles based on complexes of amphiphilic compounds, polymers and nanoparticles, Materials of 3rd International Symposium on “Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine” (2018), p. 129–130.

2. **Potapenkov K.V.** [et al.] Nanocomposite magnetic liposomes for targeted delivery and controlled release of drugs: effects of applied electric and magnetic fields, Materials of 3rd International Symposium on “Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine” (2018), p. 129–130.

3. **Potapenkov K.V.** [et al.] Langmuir monolayers and langmuir-blodgett films of functional amphiphilic amines and their interfacial complexes with colloid nanoparticles and polyelectrolytes, 30th Conference of The European Colloid and Interface Society, book of abstracts (2016), p. 137–137.

4. **Potapenkov K.V.** [et al.] Langmuir monolayers and lb films of functional amine-containing ,14-th European Conference on Organized films ECOF-14, , Book of Abstracts (2015), p. 39.

5. **Potapenkov K.V.** [et al.] Nanocomposite nanofilm biocompatible capsules based on the complexes of lipids, amphiphiles, nanoparticles and polymers ,14-th European Conference on Organized films ECOF-14, , Book of Abstracts (2015), p.54.

6. **Potapenkov K.V.** [et al.] Magnetic nanoparticles in biomimetic and biological systems: generation of iron oxide magnetic nanoparticles in dna complexes, isolated chloroplasts and high plants, XII International Conference on Nanostructured Materials (NANO 2014), (2014), p. 4351.

7. **Potapenkov K.V.** [et al.] New nanocomposite planar nanostructures and colloid capsules based on the complexes of polymers, lipids, amphiphiles and functional nanoparticles: synthesis, structure, properties and controlled stimuli-addressed activation, XII International Conference on Nanostructured Materials (NANO 2014), (2014), p. 4342.

8. **Potapenkov K.V.** [et al.] Self-assembly of nanocomposite free-standing planar nanostructures in colloidal solution of magnetite nanoparticles and biogenic polyamines, XII International Conference on Nanostructured Materials (NANO 2014), (2014), p. 4355.