

ФГБОУ ВО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова
Химический факультет
ФГАОУ ВО Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС»
Лаборатория «Биомедицинские наноматериалы»

На правах рукописи

Уварова Виктория Игоревна

**Разработка системы доставки малых интерферирующих
рибонуклеиновых кислот на основе функционализированных
липидами магнитных наночастиц**

1.5.6 – Биотехнология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научные руководители:
д.х.н., проф. Клячко Н.Л.
к.х.н. Абакумов М.А.

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	4
ВВЕДЕНИЕ	8
Глава 1 Обзор литературы	14
1.1 РНК-терапия.....	14
1.1.1 Некодирующие терапевтические РНК	14
1.1.2 Перспективные мишени для гиполипидемической РНК-терапии	21
1.1.3 Системы доставки	26
1.2 Магнитные НЧ для биомедицинских применений	34
1.2.1 Свойства и получение НЧ оксида железа	34
1.2.2 Принципы зародышеобразования и роста коллоидных частиц.....	40
1.2.3 Внешнее магнитное поле в наномедицине	44
1.2.4 Магнитофекция.....	48
Глава 2 Материалы и методы	50
2.1 Материалы.....	50
2.1.1 Реактивы	50
2.1.2 Расходные материалы	51
2.1.3 Оборудование	51
2.1.4 Малые интерферирующие РНК	52
2.1.5 Клеточные культуры	53
2.1.6 Животные модели.....	53
2.2 Методы	54
2.2.1 Синтез прекурсора.....	54
2.2.2 Получение НЧ оксида железа.....	54
2.2.3 Определение концентрации железа	57
2.2.4 Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)	57
2.2.5 Рентгенофазовый анализ (РФА).....	58
2.2.6 Динамическое рассеяние света (ДРС)	58
2.2.7 Термогравиметрический анализ (ТГА)	58
2.2.8 Магнитные свойства.....	59
2.2.9 Функционализация НЧ.....	59
2.2.10 Цитотоксичность экспериментальных образцов.....	59

2.2.11 Определение концентрации терапевтического агента.....	60
2.2.12 Загрузка терапевтического агента на функционализированные НЧ.....	61
2.2.13 Трансфекция.....	61
2.2.14 Выделение и очистка суммарной РНК.....	62
2.2.15 Электрофорез в агарозном геле.....	63
2.2.16 Синтез первой цепи кДНК на РНК-матрице.....	63
2.2.17 Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени	63
2.2.18 Динамика накопления и внутриклеточное распределение НЧ	65
2.2.19 Влияние внешнего магнитного поля на эффективности накопления и трансфекции <i>in vitro</i> под действием НЧ.....	66
2.2.20 Оценка локализации экспериментальных образцов методами магнитно-резонансной томографии (МРТ) и атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой (АЭС-ИСП) <i>in vivo</i>	66
2.2.21 Гистологическое исследование	68
2.2.22 Эффективность ингибирования экспрессии мРНК <i>ApoB in vivo</i> , биохимическое исследование крови	69
2.2.23 Статистический анализ	69
Глава 3 Результаты и обсуждение	70
3.1 Синтез НЧ оксида железа	70
3.2 Функционализация НЧ оксида железа	84
3.3 Оптимизация загрузки миРНК на функционализированные липидами НЧ.....	88
3.4 Биологическое тестирование НЧ, загруженных миРНК	93
3.5 Влияние внешнего магнитного поля на эффективность трансфекции	103
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	113
ВЫВОДЫ	115
БЛАГОДАРНОСТИ	116
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	117

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АБ – атеросклеротическая бляшка

АСО – антисмысловые олигонуклеотиды

АСТ – аспартатаминотрансфераза

АЭС-ИСП – атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой

ДРС – динамическое рассеяние света

дц - двухцепочечные

дцРНК – двухцепочечные рибонуклеиновые кислоты

ИПД – индекс полидисперсности

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

КТЗ – классическая теория зародышеобразования

ЛНРНК-К – липидные наночастицы с магнитным ядром кубической формы

ЛНРНК-С – липидные наночастицы с магнитным ядром сферической формы

ЛНЧ – липидные наночастицы

ЛП – липопротеин(ы)

ЛП(а) – липопротеин (а)

ЛПВП – липопротеины высокой плотности

ЛПНП – липопротеины низкой плотности

ЛПОНП – липопротеины очень низкой плотности

ЛППП – липопротеины промежуточной плотности

миРНК – малые интерферирующие рибонуклеиновые кислоты

МП – магнитное поле

мРНК – матричные (информационные) рибонуклеиновые кислоты

МРТ – магнитно-резонансная томография

НК – нуклеиновые кислоты

нкРНК – некодирующие рибонуклеиновые кислоты

НЧ – наночастицы

оц – одноцепочечные

п. о. – пар оснований

ПАВ – поверхностно-активные вещества

ПМП – переменное магнитное поле

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

- РФА – рентгенофазовый анализ
- СГ – семейная гиперхолестеринемия
- ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания
- ТГА – термогравиметрический анализ
- ХС – холестерин
- ЦТМА – хлорид цетилтриметиламмония
- ЭР – эффективность реакции
- AGO – белки семейства Argonaute
- ANGPTL3 – ангиопоэтин-подобный белок 3
- ANGPTL3* – ген, кодирующий ангиопоэтин-подобный белок 3
- Аро(а) – аполипопротеин А1
- АроВ – аполипопротеин В
- Apo(a)* – ген, кодирующий аполипопротеин А1
- ApoB* – ген, кодирующий аполипопротеин В
- АроС-III – аполипопротеин С3
- ApoC-III* – ген, кодирующий аполипопротеин С3
- С12-200 – (1,1'-(2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазанедиил)дидодекан-2-ол)
- СС₅₀ – полумаксимальная цитотоксическая концентрация
- CDM-NAG – карбокси дималеимидный ангидридный линкер с N-ацетилгалактозамином
- CDM-PEG – карбокси дималеимидный ангидридный линкер с полиэтиленгликолем
- РНКаза Н – рибонуклеаза Н
- сКК-Е12 – 3,6-бис(4-(бис(2-гидроксидодецил)амино)бутил)пиперазин-2,5-дион
- CNR (contrast-to-noise ratio) – отношение контраста к шуму
- Су5 – 3,3,3',3'-тетраметил-2,2'-индодикарбоцианин
- D_{гид} – гидродинамический размер
- DiD – 1,1-диооктадецил-3,3,3,3-тетраметилиндодикарбоцианин перхлорат
- DiI – 1,1-диооктадецил-3,3,3,3-тетраметилиндокарбоцианин перхлорат
- DLin-DMA – 1,2-дилинолеилокси-N,N-диметиламинопропан
- DLin-MC3-DMA – (6Z,9Z,28Z,31Z)-гептатриаконта-6,9,28,31-тетраен-19-ил 4-(диметиламино) бутаноат
- DMEM – модифицированная по способу Дульбекко среда Игла
- DMEM/F12 – модифицированная по способу Дульбекко среда Игла с добавлением питательных веществ (F-12)
- DOPC – 1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфатидил-холин

- DOPE – 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин
- DOTAP – 1,2-диолеоил-3-триметиламмоний-пропан
- DPC2.0/EX-1 – амфифильный полимер, состоящий из поли-(бутил-аминовинилового эфира), к которому присоединены CDM-NAG или CDM-PEG
- DSPC – 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин
- DSPE-PEG(2000)-NH₂ – 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[амино (полиэтиленгликоль)-2000] аммониевая соль
- EGF – эпидермальный фактор роста
- FBS – эмбриональная бычья сыворотка
- FDA (Food and Drug Administration) – управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов
- Fe(III)-OL – комплекс олеата железа (III)
- GalNAc – трехантенный N-ацетилгалактозамин
- GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
- GDDC4 – полимер состава PG-P(DPAx-co-DMAEMAy)-PCB, где PG – гуанидинированный поли(аминоэтил-метакрилат), PCB – поли(карбоксибетаин), P(DPAx-co-DMAEMAy) – поли(диметиламиноэтил-метакрилат-со-диизопропилэтил-метакрилат)
- L319 – ди((Z)-нон-2-ен-1-ил)-9-((4-(диметиламино)бутаноил)окси)гептадекандиоат
- H_c – коэрцитивная сила
- mPEG-DSPE – 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[метокси-(полиэтиленгликоль)]
- MLP – мелиттиноподобный пептид
- M_s – намагниченность насыщения
- MTS – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолиум
- NaOL – олеат натрия
- OL – олеиновая кислота
- Opti-MEM – модифицированная среда Игла с добавлением HEPES, бикарбоната натрия, гипоксантина, тимидина, пирувата натрия, L-глутамина, микроэлементов и факторов роста
- Pasp (DET) – поли-(N-(N-(2-аминоэтил)-2-аминоэтил)аспартамид)
- PBS – фосфатно-солевой буфер
- PCC – коэффициента корреляции Пирсона
- PCSK9 – ген, кодирующий пропротеиновую конвертазу субтилизин-кексинового типа 9
- PCSK9 – пропротеиновая конвертаза субтилизин-кексинового типа 9
- PEG – полиэтиленгликоль

PEG-C-DMA — N-[(метоксиполи(этиленгликоль)2000)карбамил]-1,2-
 димиристилоксипропил-3-амин

PEI — полиэтиленимин

PLGA — полилактат-со-гликолевая кислота

PNP — полипептидная наночастица

PTMS — поли[этиленгликоль-со-(2,4,6,-триметоксибензилиден-1,1,1-трис(гидроксиметил)
 этилметакрилат)-со-диметиламиноглицидил метакрилат]

RISC — эффекторный рибонуклеопротеиновый комплекс

TRIzol — тризол (гуанидин тиоцианат и фенол)

V-АТФаза — аденозинтрифосфатаза вакуолярного типа

γ_m — коэффициент активности мономера в растворе

μ_m — химический потенциал мономера

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Малые интерферирующие рибонуклеиновые кислоты (миРНК) – класс двухцепочечных РНК, которые после образования комплекса с рядом белков вызывают деградацию комплементарных матричных РНК (мРНК) [1]. Целенаправленное подавление экспрессии генов с помощью миРНК в быстро делящихся клетках эукариот носит временный характер, при этом выраженный эффект лечения наблюдается в течение нескольких месяцев. Терапия с использованием миРНК является одним из наиболее перспективных направлений – на сегодняшний день не менее 80 препаратов на основе нуклеиновых кислот (НК) проходят различные стадии клинических испытаний для терапии онкологических патологий, вирусных инфекций, диабета, гиперхолестеринемии и глаукомы [2–4]. В качестве терапевтического агента миРНК имеют ряд преимуществ по сравнению с низкомолекулярными соединениями, поскольку достаточно доставить лишь несколько молекул в клетку для достижения терапевтического эффекта. Препараты для генной терапии потенциально способны лечить многие заболевания путем нацеливания на первопричину (дефектный ген), а не блокирования нижестоящих путей или лечения симптомов. Молекула миРНК загружается в эффекторный мультибелковый комплекс, направляя его к мРНК-мишени, которая расщепляется за счет эндонуклеазной активности одной из субъединиц в его составе [5]. Подавление экспрессии целевых генов последовательность-специфическим образом посредством деградации мРНК ведет к снижению биосинтеза белка, что может оказывать терапевтический эффект в случае ряда заболеваний. К этой группе можно отнести семейную гиперхолестеринемия (СГ) – генетическое заболевание липидного обмена, которое характеризуется высоким уровнем холестерина липопротеинов низкой плотности (ЛПНП) в плазме. Для терапии сложных случаев СГ, когда стандартная фармакотерапия статинами не эффективна, используются радикальные меры, такие как шунтирование подвздошной кишки или трансплантация печени. Таким образом, поиск приемлемых способов лечения сложных случаев СГ при помощи доступных и безопасных лекарственных препаратов является важной задачей. Современный подход в разработке терапии СГ – это ингибирование синтеза аполипопротеина В (АpoВ), который преимущественно синтезируется в гепатоцитах печени. АpoВ играет ключевую роль в сборке и секреции частиц ЛПНП, накопление и окисления которых ведет к повреждению стенок кровеносных сосудов, повышая риск развития атеросклероза [6]. Поэтому в данной работе рассматриваются подходы к доставке миРНК к мРНК *ApoB*, которая является, с одной стороны, модельным объектом исследования, а с другой – потенциальным терапевтическим агентом для терапии СГ.

Основными препятствиями на пути к безопасной и эффективной липидснижающей генной терапии являются низкая адресность доставки миРНК в гепатоциты, неэффективное преодоление

клеточной мембраны и высвобождение в цитозоль для оказания терапевтического эффекта. Молекулы миРНК обладают выраженным отрицательным зарядом и слишком велики, чтобы пересекать клеточные мембраны, но достаточно малы для быстрого удаления из организма с помощью клубочковой фильтрации, что препятствует их эффективному накоплению в клетках-мишенях [7]. Поэтому нейтрализация отрицательного заряда за счет включения миРНК в системы доставки, в состав которых входят положительно заряженные липиды или полимеры, является основной стратегией для эффективного предотвращения почечного клиренса. Несмотря на современные достижения в области разработки невирусных систем доставки на основе липидных и неорганических наночастиц (НЧ), липосом, дендримеров и конъюгатов, эффективность высвобождения миРНК в цитозоль из эндолизосомального компартмента клетки при эндоцитозе носителя все еще достаточно невысока (1-2 % от введенной миРНК) [8]. Поэтому поиск новых систем доставки терапевтических миРНК, которые обеспечат эффективное решение ранее обозначенных проблем, является актуальной как фундаментальной, так и практической задачей.

Среди множества изученных синтетических средств доставки миРНК НЧ оксида железа являются одной из наиболее перспективных платформ по нескольким причинам. Во-первых, оксид железа является биосовместимым и биоразлагаемым материалом, ряд препаратов на его основе были одобрены для медицинского применения, другие находятся на поздних стадиях клинических испытаний [9]. Во-вторых, развитая поверхность позволяет осуществлять направленную функционализацию частиц, например, катионными липидами, для защиты миРНК от деградации и повышения эффективности трансфекции. Кроме того, наличие магнитного ядра в системе доставки обеспечивает дополнительные преимущества, такие как возможность визуализации НЧ с помощью метода магнитно-резонансной томографии (МРТ) и неинвазивное удаленное управление носителем с помощью внешнего магнитного поля (МП). Применение низкочастотного переменного «вращающего» МП для механической стимуляции клеток может привести к усилению накопления и/или улучшению профиля кинетики доставки НЧ с загруженными миРНК в клетки, повышая эффективность трансфекции.

Степень разработанности темы исследования. На момент начала работы была показана возможность увеличения эффективности ингибирования экспрессии генов с помощью магнитных НЧ и миРНК под действием постоянного магнитного поля *in vitro* [10–12]. В ряде работ было продемонстрировано, что применение осциллирующего [13] или переменного [14] магнитного поля в сочетании с коммерчески доступными НЧ для магнитофекции приводит к повышению эффективности доставки репортерной плазмиды в клетки, однако, оценка производилась только с помощью полуколичественных методов, таких как флуоресцентная и конфокальная микроскопия. Было показано увеличение адресности доставки к опухоли под

действием постоянного магнитного поля *in vivo* при терапии онкологических заболеваний [15; 16].

Цели и задачи. Цель работы – разработать технологию эффективной системы доставки терапевтических миРНК в составе функционализированных липидами НЧ оксида железа в печень с возможностью визуализации носителя методом МРТ.

Исходя из поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Синтезировать магнитные НЧ оксида железа различных форм и размеров, определить исходя из физико-химических свойств наиболее перспективные НЧ для биомедицинского применения.
2. Провести функционализацию НЧ формуляцией липидов, оптимизировать параметры загрузки терапевтических миРНК.
3. Провести комплексное биологическое исследование полученных комплексов НЧ-миРНК *in vitro* (цитотоксичность, эффективность ингибирования экспрессии мРНК *ApoB*, взаимодействие образцов с клетками – внутриклеточная локализация и динамика накопления).
4. Исследовать влияние внешнего магнитного поля на эффективность трансфекции под действием экспериментальных образцов *in vitro*.
5. Провести тестирование терапевтической эффективности образца системы доставки *in vivo*: визуализировать локализацию введенных НЧ с помощью метода МРТ, оценить биораспределение и токсичность, эффективность ингибирования мРНК *ApoB* и уровни общего холестерина.

Научная новизна. В настоящей работе впервые получены НЧ оксида железа различных форм и размеров с помощью разработанного двухстадийного синтеза, где на первом этапе с помощью стандартного метода термического разложения прекурсора были получены зародыши НЧ, а на втором – осуществлялось увеличение размера зародышей путем добавления в реакционную среду раствора прекурсора. Преимущество такого подхода заключается в том, что вторая стадия может быть продлена на произвольно длительное время, что позволяет получать высокомоносферные НЧ с контролируемой формой и размером в широком диапазоне. К тому же, разделение стадий зародышеобразования и роста НЧ позволило тонко контролировать и задавать необходимые физико-химические свойства, что особенно важно для частиц, которые используются в биомедицине, где важен баланс между высокими магнитными характеристиками и коллоидной стабильностью. Результаты, полученные в ходе работы над синтезом магнитных НЧ, легли в основу нескольких полученных патентов на изобретение (№ 2668440, 2656667 и 2689392). В диссертационной работе впервые была экспериментально продемонстрирована возможность использовать низкочастотное переменное МП для увеличения эффективности ингибирования экспрессии мРНК гена-мишени *in vitro* с помощью магнитных НЧ с

загруженными миРНК в сравнении с теми же образцами без действия поля (патенты № 2699172, 2704998).

Теоретическая и практическая значимость работы. В работе создана теоретическая база для получения магнитных НЧ оксида железа с контролируемой формой и размером для биомедицинского применения; разработанный метод синтеза позволяет тонко настраивать физико-химические свойства НЧ, которые имеют определяющее значение в их эффективности в качестве средств доставки миРНК. В работе последовательно демонстрируется, что заложенные теоретические основы на стадии химического синтеза НЧ имеют прогностическое значение для их дальнейшего поведения на стадиях *in vitro* и *in vivo*. Ключевым практическим аспектом работы является предложенный подход к трансфекции под действием низкочастотного «вращающего» переменного магнитного поля, который может стать решением при переносе технологии магнитофекции с уровня *in vitro* с использованием постоянного магнита на уровень *in vivo*, преодолевая тем самым существующие ограничения этого метода. Экспериментально показано, что применение низкочастотного переменного МП приводит к более выраженному накоплению НЧ в клетках и повышению эффективности трансфекции по сравнению с образцом в отсутствие МП. Разработанные в диссертации подходы могут представлять собой практические рекомендации к созданию эффективных систем доставки миРНК на основе магнитных наночастиц и имеют важное значение для прикладных исследований. Работа расширяет понимание методов синтеза НЧ для будущих биомедицинских применений и подходов к магнитофекции, возможных не только для использования *in vitro* для регуляции или изучения экспрессии генов, но и в терапии генетических заболеваний.

Методология и методы исследования. Экспериментальные исследования проводились с использованием современных физико-химических и биологических методов, на высокоточном оборудовании, со статистической обработкой результатов. На основании анализа информационных литературных источников были выбраны и оптимизированы методологические подходы к синтезу и функционализации НЧ, проведению трансфекции, оценке токсичности и локализации образцов *in vitro* и *in vivo*. Основные методы исследования, используемые в работе: полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени с обратной транскрипцией, конфокальная микроскопия, фазово-контрастная микроскопия, магнитно-резонансная томография, атомно-эмиссионный спектральный анализ.

Положения, выносимые на защиту.

1. Метод синтеза наночастиц оксида железа, основанный на расширенном механизме ЛаМера, позволяет получать высокомонодисперсные частицы с контролируемыми размерами (определяются длительностью введения прекурсора) и формой (варьируется в зависимости от

соотношения химических потенциалов мономера, поверхностно-активных веществ и граней роста кристалла в реакционной среде, а также от изначальной формы используемых зародышей).

2. Формировании того или иного типа функционализированных агломератов обуславливается дипольным параметром λ и формой НЧ, входящих в их состав. Тип сформированных агломератов НЧ влияет на емкость загрузки миРНК, скорость накопления НЧ в клетках и эффективность ингибирования экспрессии гена-мишени при проведении трансфекции.

3. Эффективность ингибирования экспрессии мРНК гена-мишени под действием НЧ, загруженных миРНК *in vitro*, сопоставима с действием современных коммерчески доступных трансфецирующих агентов; образцы не обладают цитотоксическим действием в концентрациях, необходимых для проведения трансфекции.

4. Использование внешнего низкочастотного переменного МП с миРНК-загруженными магнитными НЧ приводит к более выраженному накоплению образцов в клетках и позволяет достоверно увеличить эффективность ингибирования мРНК гена-мишени *in vitro* по сравнению с тем же образцом в отсутствие поля.

5. При внутривенном введении образцы эффективно накапливаются в целевом органе – печени, где не задерживаются, и через 48 часов более половины введенной дозы образцов удаляется из организма выделительными системами. В течение всего этого времени образцы могут быть визуализированы с помощью МРТ, давая выраженный T2-контрастный сигнал на изображениях.

6. Введение образцов животным приводит к снижению уровня общего холестерина; концентрации аспаратаминотрансферазы и аланинаминотрансферазы в сыворотке лабораторных животных остаются в пределах нормы.

Личный вклад автора. Представленные в работе данные получены лично автором или при ее непосредственном участии на всех этапах исследований под руководством д.х.н, профессора Клячко Н.Л. и к.х.н. Абакумова М.А. Автор самостоятельно изучила современные литературные данные по теме исследования и на их основании составила обзор литературы. Автор самостоятельно или при непосредственном участии выполнила все эксперименты, произвела сбор, обработку и анализ полученных результатов. Автором была проведена значительная работа над текстом статей и патентов, а также представление их в редакции журналов, переписка с редакторами и рецензентами. В работах, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит автору. На защиту вынесены только те положения и результаты экспериментов, в получении которых роль соискателя была определяющей.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов определяется проведением экспериментов с использованием современного

высокоточного оборудования, выбором актуальных физико-химических и биологических методов в исследовании, а также статистической обработкой полученных результатов. Основные результаты настоящей работы были представлены на российских и международных конференциях, в том числе: II International scientific-practical conference «Magnetic nanomaterials in biomedicine: synthesis, properties and application» (Москва, Россия, 2017), XXV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2018» (Москва, Россия, 2018), X Международный конгресс «Биотехнологии: состояние и перспективы развития» (Москва, Россия, 2018), V Международная молодёжная научно-практическая школа-конференция «Актуальные вопросы современного химического и биохимического материаловедения» (Уфа, Россия, 2018), 16th World Medical Nanotechnology Congress (Токио, Япония, 2018), XXXI Зимняя молодёжная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, Россия, 2019), Ежегодный саммит молодых ученых и инженеров «Большие вызовы для общества, государства и науки» (Адлер, Россия, 2019).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 2 статьи в журналах, рецензируемых базами данных Scopus/Web of Science, 5 патентов на изобретение и 6 тезисов докладов всероссийских и международных научных конференций.

Связь работы с государственными программами. Работа выполнена при поддержке Соглашения о предоставлении Субсидии №14.578.21.0201 «Разработка платформенной технологии доставки терапевтических миРНК в печень».

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы по тематике исследования (Глава 1), описания материалов и методов (Глава 2), результатов и обсуждения (Глава 3), заключения, выводов и списка литературы, состоящего из 316 ссылок. Диссертационная работа изложена на 141 странице и включает 49 рисунков и 10 таблиц.

Глава 1 Обзор литературы

1.1 РНК-терапия

1.1.1 Некодирующие терапевтические РНК

Благодаря развитию технологии секвенирования нового поколения, а также статистических и экспериментальных подходов, становится все более достижимо определить генные мутации, отвечающие за возникновение и развитие заболевания [17; 18]. В настоящее время многие фармацевтические и биотехнологические компании разрабатывают препараты на основе РНК для специфической регуляции генов, для лечения как моногенных, так и более сложных случаев полигенных заболеваний. Несколько таких продуктов были успешно одобрены Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) для использования в терапии; многие другие находятся на разных стадиях клинических испытаний [19; 20]. Значительное структурное разнообразие молекул РНК позволяет модулировать экспрессию генов и синтез белковых продуктов для широкого спектра мишеней [21; 22]. В зависимости от мишени, терапевтические не кодирующие РНК (нкРНК) можно разделить на три группы: нкРНК, нацеленные на нуклеиновые кислоты [23; 24], белки [25; 26] или матричные РНК (мРНК), которые транслируются в белки [27–29]. На Рисунке 1.1 показаны основные представители каждой группы: одноцепочечные (оц) и двухцепочечные (дц) нкРНК, мишенью для которых служат молекулы ДНК или РНК; РНК-аптамеры, которые способны связывается с белком-мишенью с высокой степенью селективности и блокировать его функцию; мРНК, которые являются кодирующей матрицей для синтеза белка-мишени.

Большинство препаратов на основе нкРНК представляют собой антисмысловые олигонуклеотиды (АСО) или молекулы двухцепочечной РНК, которые участвуют в механизме РНК-интерференции (миРНК) [21]. АСО – короткие (~ 18-30 нуклеотидов) модифицированные одноцепочечные синтетические полимеры нуклеиновых кислот, разработанные для избирательного связывания по принципу комплементарности с заданной последовательностью [30]. В зависимости от цели, терапевтические подходы с использованием АСО могут варьироваться. Например, связываясь с мишенью, они могут запускать деградацию мРНК транскрипта, опосредованную рибонуклеазой H (РНКазы H), или влиять на сплайсинг с помощью изменения фактора рекрутирования, а при связывании со зрелой мРНК могут предотвращать ее прикрепление к рибосоме, блокируя трансляцию [31]. Эндогенный фермент РНКазы H распознает субстрат гетеродуплекса РНК-ДНК, который образуется, когда олигонуклеотиды на основе ДНК связываются с комплементарными транскриптами мРНК, и катализирует его деградацию, тем

самым подавляя экспрессию гена-мишени. На сегодняшний день три АСО, служащие субстратом для расщепления РНКазой Н, одобрены FDA: Фомивирсен, Мипомерсен и Инотерсен [32]. Примечательно, что РНКаза Н активна как в цитоплазме, так и в ядре [33–35], что позволяет выбирать в качестве мишеней ядерные транскрипты (например, незрелые предшественники мРНК и длинные нкРНК), которые могут быть менее доступны для других технологий (например, для миРНК).

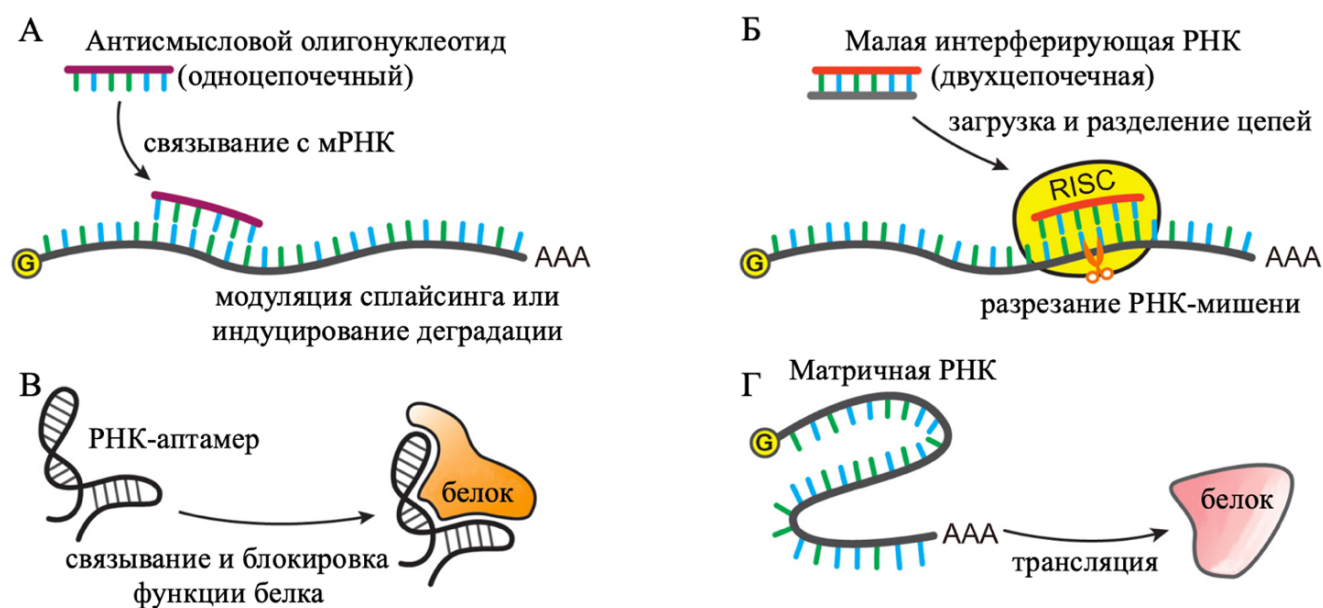


Рисунок 1.1 – Схемы механизмов действия различных терапевтических РНК.

А) Одноцепочечные АСО предназначены для связывания с пре- или зрелой мРНК для модуляции сплайсинга предшественников мРНК, а также для деградации или ингибирования трансляции мРНК; Б) двухцепочечная миРНК после загрузки в эффекторный комплекс RISC и удаления цепи-спутницы (смысловой) специфично связывается с последовательностью мРНК-мишени и вызывает ее деградацию; В) РНК-аптамер связывается с молекулярной мишенью и блокирует ее функцию; Г) трансляция с мРНК белкового продукта, который может работать как фермент или антиген [21]

Другой категорией АСО являются стерически блокирующие олигонуклеотиды, которые предназначены для гибридизации с транскриптами-мишенями для модуляции альтернативного сплайсинга, не приводя при этом к деградации мРНК. Выборочный пропуск или включение в зрелую мРНК экзона первичного транскрипта [36] может использоваться для восстановления трансляционной рамки считывания, чтобы стабилизировать или восстанавливать функции белков [37; 38]. Этот подход был использован для лечения мышечной дистрофии Дюшенна. Это X-сцепленное рецессивное заболевание, вызванное мутацией в гене дистрофина, которая ведет к преждевременному усечению его трансляции [39; 40]. Однако внутренние делеции или

дубликации, поддерживающие рамку считывания, позволяют транслировать дистрофины, которые сохраняют свои N- и С-концевые домены. В этом случае форма дистрофинов более усеченная, но функциональная, что ведет к менее тяжелой и прогрессивной форме заболевания – мышечной дистрофией Беккера [37; 41]. Ряд АСО был одобрен FDA для ингибирования сплайсинга в конкретном сайте путем пропуска экзона, который либо имеет кодон преждевременной терминации, созданный мутацией, либо делецией, приводящей к сдвигу рамки считывания – Этеплирсен, Голодирсен, Вилтоларсен и Касимерсен для терапии миодистрофии Дюшенна [40] и Нусинерсен для лечения спинальной мышечной атрофии [42]. Тот же подход может быть использован для активации биосинтеза белка посредством ингибирования отрицательной регуляции, если АСО нацелен на длинные нкРНК, вовлеченные в транскрипционную репрессию белок-кодирующих генов [43].

РНК-интерференция является эволюционно консервативным защитным механизмом против экзогенных дцРНК [44; 45]. Ее основная функция – подавление экспрессии целевых генов последовательность-специфическим образом посредством деградации мРНК-мишени (эффektorные молекулы, участвующие в процессе – миРНК или микроРНК) или репрессии трансляции (только микроРНК), что показано на Рисунке 1.2 [19]. Данный процесс осуществляется РНК-индуцированным белковым комплексом (RISC), в состав которого входят эндонуклеаза семейства Argonaute (AGO2), РНК-связывающий белок и другие эффекторные белки [45; 46], а рибонуклеиновый компонент может быть представлен как эндогенными так и экзогенными короткими РНК. Пути биогенеза микроРНК и миРНК изначально отличаются в зависимости от их двухцепочечных предшественников. Тем не менее, оба этих дуплекса расщепляются рибонуклеазой из семейства РНКаз III, называемой Dicer или Dicer-подобным ферментом [47]. Основным различием между миРНК и микроРНК – степень комплементарности их последовательностей к мРНК. Для миРНК это полная комплементарность, и, соответственно, существование единственной мишени и только одного механизма регуляции – расщепление этой мишени; для микроРНК, напротив, это частичная комплементарность, как правило к 3'-нетранслируемой области мРНК, что подразумевает наличие сразу нескольких целевых последовательностей [48]. На Рисунке 1.2А показана схема механизма РНК-интерференции под действием миРНК. Белковый комплекс RISC рекрутируется для различения двух цепей миРНК как смысловой и антисмысловой (цепь-спутница и ведущая цепь, соответственно). Далее ведущая цепь направляет RISC к полностью комплементарной последовательности мРНК, которая расщепляется за счет эндонуклеазной активности одной из субъединиц в его составе. Активированный RISC может многократно участвовать в процессе расщепления мРНК. К основным механизмам регуляции под действием микроРНК относятся репрессия трансляции и деградация мРНК, а также, в редких случаях, эндонуклеазное расщепление мРНК (только при

высоком уровне комплементарности между микроРНК и мРНК). После процессинга и загрузки в RISC, дуплекс микроРНК раскручивается, высвобождая и отбрасывая цепь-спутницу, в отличие от миРНК, где для аналогичного процесса требуется эндонуклеаза AGO2. Далее зрелые одноцепочечные микроРНК направляют активированный RISC к целевым мРНК, где за счет частичной комплементарности оснований происходит связывание. Это препятствует прохождению рибосомы и ведет к репрессии трансляции. Однако этот процесс усложняется, когда микроРНК становится терапевтической мишенью, на которую нацелены (ингибируют) другие агенты. На Рисунке 1.2Б схематически представлены варианты воздействия на микроРНК, например, стерически блокирующих АСО, выступающих в роли антагомира (анти-микроРНК), которые ингибируют микроРНК за счет прямого связывания с ней в RISC. Альтернативный подход к ингибированию микроРНК – использование АСО, которые регулируют активность микроРНК посредством маскировки целевой последовательности на мРНК транскрипте [49].

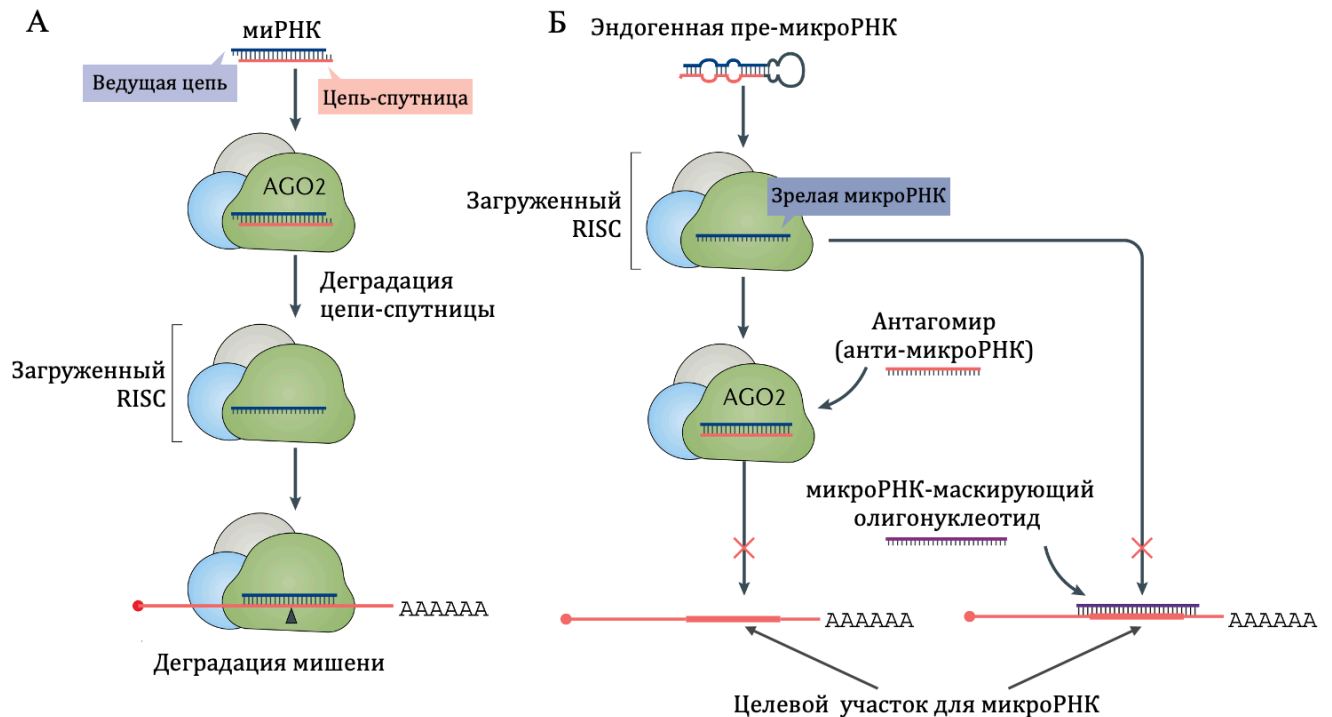


Рисунок 1.2 – Регуляция экспрессии генов с участием молекул-триггеров РНК-интерференции.

А) микроРНК загружается в RISC, цепь-спутница подвергается эндонуклеолитическому расщеплению. Ведущая цепь направляет RISC к комплементарной последовательности, которая затем расщепляется за счет эндонуклеазной активности AGO2; Б) активность эндогенной микроРНК, загруженной в RISC, может регулироваться стерически блокирующими АСО, которые связываются со зрелой микроРНК или гибридизируются с транскриптом, маскируя мишень [5]

Синтетические молекулы-триггеры РНК-интерференции обычно представляют собой полностью комплементарные дцРНК или короткие шпилечные РНК с общей длиной от 15 до 30 пар оснований (п. о.). дцРНК размером менее 15 п. о. не могут участвовать в РНК-интерференции, тогда как дцРНК размером более 30 п. о. могут вызывать неспецифическую токсичность посредством активации пути дцРНК-зависимой протеинкиназы [50; 51]. Более крупные (21-30 п. о.) дуплексы расщепляются рибонуклеазой Dicer и ведущая цепь, комплементарная транскрипту-мишени, загружается в RISC. Более короткие (15-21 п. о.) миРНК и аналоги могут обходить расщепление Dicer и проникать в RISC с помощью РНК-связывающего белка TARBP2 [52]. Второй путь может включать Dicer, но может осуществляться и в его отсутствии [53].

Между мотивами последовательностей миРНК существуют важные функциональные различия, которые влияют на эффективность прохождения РНК-интерференции. Выбранная последовательность будет влиять на вероятность выбора ведущей антисмысловую цепь, а не смысловую (эффективность прохождения РНК-интерференции), а также на совместимость с различными паттернами и типами химических модификаций. Например, при использовании «асимметричных» миРНК (дцРНК с тупым концом с одной стороны и двумя нуклеотидными выступами на другом 3'-конце), независимо от относительной термодинамической стабильности, характер 2-нуклеотидного 3'-выступа является преобладающей детерминантой в выборе этой цепи в качестве направляющей [54]. Возможно, одно из наиболее важных функциональных различий между миРНК заключается в том, являются ли они субстратом для Dicer или нет. Сравнивая миРНК длиной 25 п. о. (субстрат для Dicer) и более короткую миРНК (19 п. о.), было показано, что предварительное разрезание рибонуклеазой ведет к повышению эффективности прохождения РНК-интерференции за счет более надежного отбора антисмысловой цепи в качестве ведущей для загрузки в RISC [55]. С другой стороны, для более коротких миРНК (не являются субстратом для Dicer) значительно шире возможности химических модификаций, которые ведут к повышению метаболической стабильности [56]. Выбор мотива последовательности оказывает значительное влияние на селективность в отборе ведущей цепи и уровень неспецифической активности [57]. Для оптимизации отбора ведущей цепи ее 5'-конец должен быть, как правило, более богатым аденином и урацилом, которые связаны только двумя водородными связями [58]. При выборе последовательности необходимо избегать совпадения с мРНК, которые не являются мишенью.

РНК-индуцированный RISC потенциально может снижать экспрессию различных мРНК при полной комплементарности затравочной области ведущей цепи (основания 2-8 с 5' конца) [59]. Поскольку она состоит всего из семи оснований, возможное число нецелевых совпадений крайне велико для любой последовательности. Тем не менее, эффективная деградация мРНК-

мишени возможна только при большем числе комплементарных оснований для привлечения эндонуклеазы AGO2 [60; 61]. Дело в том, что AGO2 разрезает мРНК только в случае полной комплементарности к ней ведущей цепи, загруженной в RISC. Однако, связывание RISC даже с частично комплементарной мРНК может приводить к подавлению трансляции независимо от эндонуклеазной активности AGO2. Для эффективного дизайна миРНК необходимо провести проверку совпадений геномных последовательностей для определения транскриптов, которые имеют высокую степень комплементарности с предполагаемыми ведущими цепями [62].

Вторая категория препаратов в РНК-терапии (молекулы НК, нацеленные на белки или другие молекулярные мишени) – аптамеры. Аптамеры нуклеиновых кислот – это короткие одноцепочечные ДНК или РНК, часто называемые «химическими антителами», которые функционально сопоставимы с традиционными антителами, но имеют несколько преимуществ, включая относительно небольшой физический размер, гибкую структуру, быстрое производство, широкие возможности химических модификаций и высокую стабильность [25]. Аптамеры склоны формировать вторичные структуры, а их совокупность может складываться в уникальную трехмерную организацию, способную к специфическому молекулярному распознаванию мишеней. За счет различных взаимодействий, включая гидрофобные и электростатические, водородные связи и силы Ван-дер-Ваальса, аптамеры способны связываться с мишенью с высокой степенью аффинности [63]. В комплексе, это обеспечивает сопоставимое сродство и специфичность связывания (с константами диссоциации в пико- и наномолярном диапазоне [26]), и даже превосходство над антителами. Аптамеры способны различать близкие молекулы, такие как конформационные изомеры [64], мишени, содержащие различные функциональные группы [65; 66] или даже аминокислотные замены [67]. Тем не менее производство клинически эффективных аптамеров значительно отстает от терапевтических антител [68; 69], которые по-прежнему доминируют на мировом фармацевтическом рынке [70]. Например, Пегаптаниб (Pfizer/Eyetech), направленный против фактора роста эндотелия сосудов, является единственным одобренным на федеральном уровне препаратом на основе аптамеров [71; 72], который в дальнейшем был заменен на моноклональные антитела (Бевацизумаб и Ранибизумаб, Genentech), показавшие более высокую терапевтическую эффективность [73; 74]. Ряд важнейших факторов, таких как короткий период полувыведения в результате нуклеазной деградации, низкая эффективность прохождения клеточной мембраны, а также нецелевое связывание, которое может привести к нежелательным побочным эффектам, являются серьезными ограничениями на пути разработки аптамеров для применения в терапии.

Третья категория препаратов в РНК-терапии – это молекулы мРНК, которые транслируются в белки. Терапевтические мРНК структурно напоминают зрелые мРНК эукариот после процессинга – это одноцепочечные НК с модифицированным нуклеотидом на 5'-конце (5'-кэп) и

поли(А)-хвостом на 3'-конце. В отличие от ДНК, молекулам мРНК нет необходимости проникать в ядро клетки для функционирования, и они, таким образом, не несут риска инсерционного мутагенеза [29]. В мРНК-терапии существуют два основных подхода: трансформация клеток *ex vivo*, которые затем вводят обратно пациенту, или прямое системное введение мРНК [75]. Основные области применения – иммунотерапия на основе дендритных и Т-клеток для лечения рака и инфекционных заболеваний, заместительная белковая терапия. В настоящее время большую актуальность имеет разработка вакцин на основе мРНК, механизм действия которых основан на трансфекции клеток молекулами мРНК, кодирующими антиген [76]. В отличие от классических аттенуированных вирусных или субъединичных вакцин, которые главным образом вызывают антительный ответ, мРНК-вакцины также демонстрируют клеточно-опосредованный антиген-специфический иммунный ответ [77; 78]. Также известно, что экзогенная мРНК стимулирует врожденную иммунную систему, так как она распознается рецепторами как патоген-ассоциированный молекулярный паттерн [79]. Такой иммунитет против мРНК может быть как полезным, так и вредным с точки зрения эффективности вакцины. С одной стороны, мРНК может проявлять адъювантные свойства, воздействуя на созревание дендритных клеток, и тем самым усиливать иммунитет. С другой стороны, опознавание паттерн-распознающими рецепторами (например, толл-подобными), может вызвать сильную индукцию интерферонов типа I, которая ингибирует биосинтез белка [76; 80].

Таким образом, существует большое разнообразие подходов в РНК-терапии, которые обеспечивают новые направления в исследовании и разработки препаратов для ранее не поддающихся лечению генетических заболеваний [81–83]. Одно из главных преимуществ терапии на основе РНК – это универсальность. После того, как фосфатный остов и структура рибозы АСО или миРНК установлены, остается просто изменить последовательность азотистых оснований, чтобы обеспечить комплементарное связывание этих РНК-лекарств с молекулами-мишенями, что делает дизайн таких препаратов быстрым и простым [21]. Важное преимущество при использовании миРНК вместо АСО – длительный эффект. Как показали недавние клинические испытания, экспрессия гена-мишени пропротеиновой конвертазы субтилизин-кексинового типа 9 (PCSK9) была эффективно подавлена, уровень холестерина ЛПНП снижался и оставался низким даже через шесть месяцев после лечения [84]. Этот продолжительный эффект препаратов на основе миРНК в отличие от АСО и малых молекул обусловлен тем, что активированный RISC может многократно участвовать в процессе дегградации мРНК.

Значительное структурное разнообразие молекул РНК, широкие возможности химического синтеза и глубокое понимание процессов генной регуляции позволяют говорить о больших перспективах использования РНК в терапии различных заболеваний. В следующем разделе будут подробно рассмотрены основные мишени в РНК-терапии сердечно-сосудистых заболеваний.

1.1.2 Перспективные мишени для гиполипидемической РНК-терапии

Несмотря на прогресс во внедрении инициатив по улучшению образа жизни и профилактическому медикаментозному лечению, сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) остаются ведущей причиной общего числа потерянных лет жизни в результате преждевременной смертности (один из важнейших показателей здоровья населения) во всем мире [85]. Следует отметить, что значительный остаточный риск ССЗ сохраняется даже после изменения образа жизни, антигипертензивной терапии и приема высоких доз статинов [86–88]. Несмотря на лечение новыми гиполипидемическими препаратами, такими как ингибитор абсорбции холестерина Эзетимиб [89], моноклональные антитела Эволокумаб [90] и Бокоцизумаб [91], нацеленные на PCSK9, производное фиброевой кислоты Безафибрат [92], ингибитор белка-переносчика холестерина Анацетрапид [93] и противовоспалительный препарат Канакинумаб [94], сохраняется высокая вероятность осложнений [95].

Большинство гиполипидемических лекарственных средств, используемых в клинической практике, представляют собой малые молекулы или антитела (Рисунок 1.3). Статины блокируют ферменты или рецепторы в цитоплазме и на поверхности клеток, а препараты на основе антител, в свою очередь, связываются с целевыми белками плазмы [96].

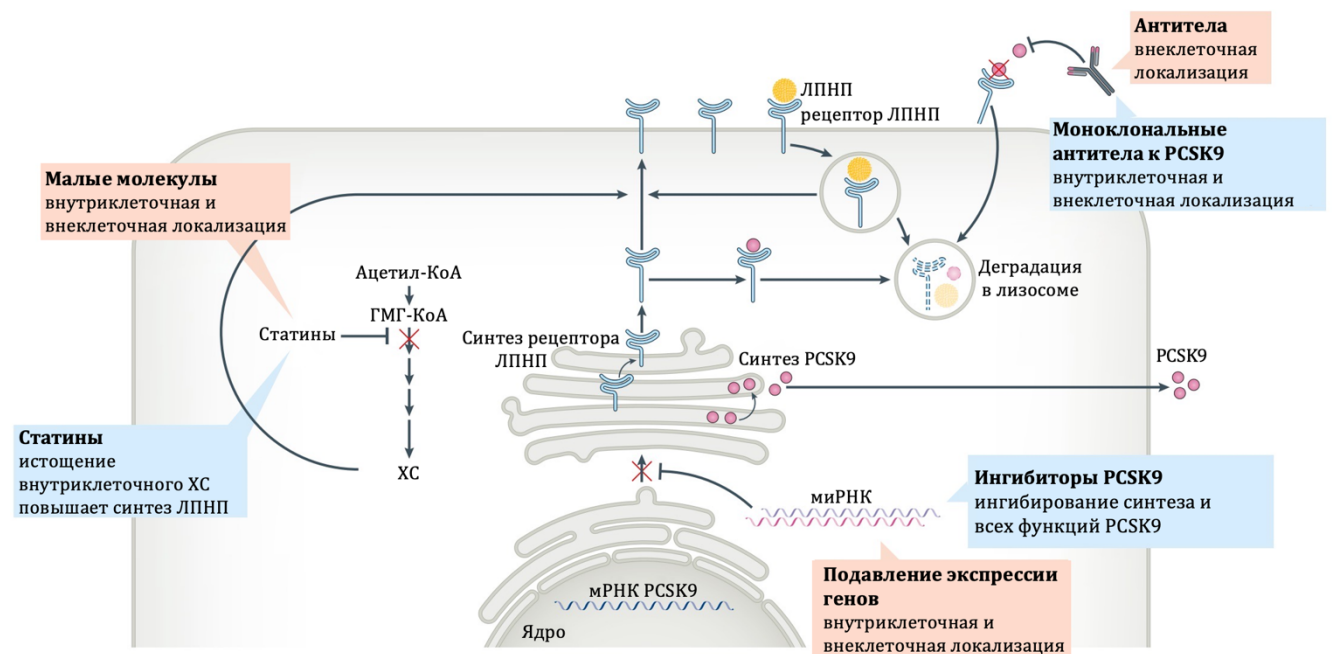


Рисунок 1.3 – Сравнение различных подходов к снижению уровня XС ЛПНП на основе малых молекул, антител и РНК-терапии [6]

Поскольку липиды нерастворимы в водной среде, в организме существует липидтранспортная система, состоящая из различных липопротеинов. Внешний гидрофильный

слой этих липопротеиновых частиц формируют полярные части фосфолипидов, холестерина (ХС) и белков, а внутреннее ядро – гидрофобные остатки и триацилглицеролы [97]. Существуют четыре основных класса липопротеинов (ЛП): липопротеины высокой плотности (ЛПВП), липопротеины низкой плотности (ЛПНП), липопротеин (а) (ЛП(а)) и триглицерид-богатые или остаточные (ремнантные) ЛП. ЛПВП обладает самой высокой плотностью и небольшим размером, за ним следуют ЛПНП, ЛП (а), липопротеины промежуточной плотности (ЛППП), липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП) и хиломикроны в порядке возрастания по размеру и в порядке убывания по плотности. На Рисунке 1.4 показано, что, как и в случае с ЛПНП, богатые триглицеридами липопротеины вызывают атеросклероз, вероятно, из-за отложения ХС в интимае [98; 99]. Основная предпосылка для инфаркта миокарда или ишемического инсульта – развитие атеросклероза коронарных (и других) артерий. Инициирование атеросклеротической бляшки (АБ) происходит за счет инфильтрации ЛПНП и ремнантных ЛП из плазмы в интиму артерий под влиянием градиента артериального давления, что показано на Рисунке 1.4А. Оба ЛП слишком велики, чтобы проникнуть дальше, поэтому они поглощаются макрофагами с образованием пенистых клеток [100; 101]. Размер хиломикронов и частиц ЛПОНП (более 75 нм) не позволяет им пересекать слой эндотелиальных клеток интимы, поэтому необходим гидролиз триглицеридов для формирования остаточных ЛП меньшего размера. На Рисунке 1.4Б показано, что прогрессирование АБ может происходить, если уровни ЛПНП и ремнантных ЛП остаются повышенными в течение продолжительного времени, за счет увеличения количества пенистых клеток. Разрыв АБ, ведущий к инфаркту миокарда или ишемическому инсульту, обычно происходит на участках нестабильных АБ с продолжающимся локальным воспалением и отсутствием фиброзной покрышки [101]. На Рисунке 1.4В показано, что разрыв (трещина, эрозия) нестабильной АБ приводит к образованию тромба с активированными тромбоцитами и отложениями фибрина. Высокие уровни ЛП(а) ингибируют процесс растворения тромбов и сгустков крови, вследствие чего тромб может увеличиваться в размере [102]. Его рост может привести к инфаркту миокарда или стенозу артерий. Таким образом, эффективная гиполипидемическая терапия должна быть направлена на снижения уровней ЛПНП и их остатков в плазме для стабилизации АБ и снижения местного воспаления. Согласно данным эпидемиологических и клинических исследований, высокие уровни ЛПНП [86; 88; 103], остаточных или триглицерид-богатых ЛП [98; 99; 104; 105] и ЛП(а) [106–108] могут вызывать ССЗ независимо друг от друга.

PCSK9, ApoC-III (аполипопротеин C3), ANGPTL3 (ангиопоэтин-подобный белок 3), Apo(a) (аполипопротеин A1) и ApoB (аполипопротеин B) действуют через четыре различных пути метаболизма липидов, которые показаны на Рисунке 1.5 и в настоящее время являются наиболее многообещающими мишенями для липидснижающей генной терапии [109].

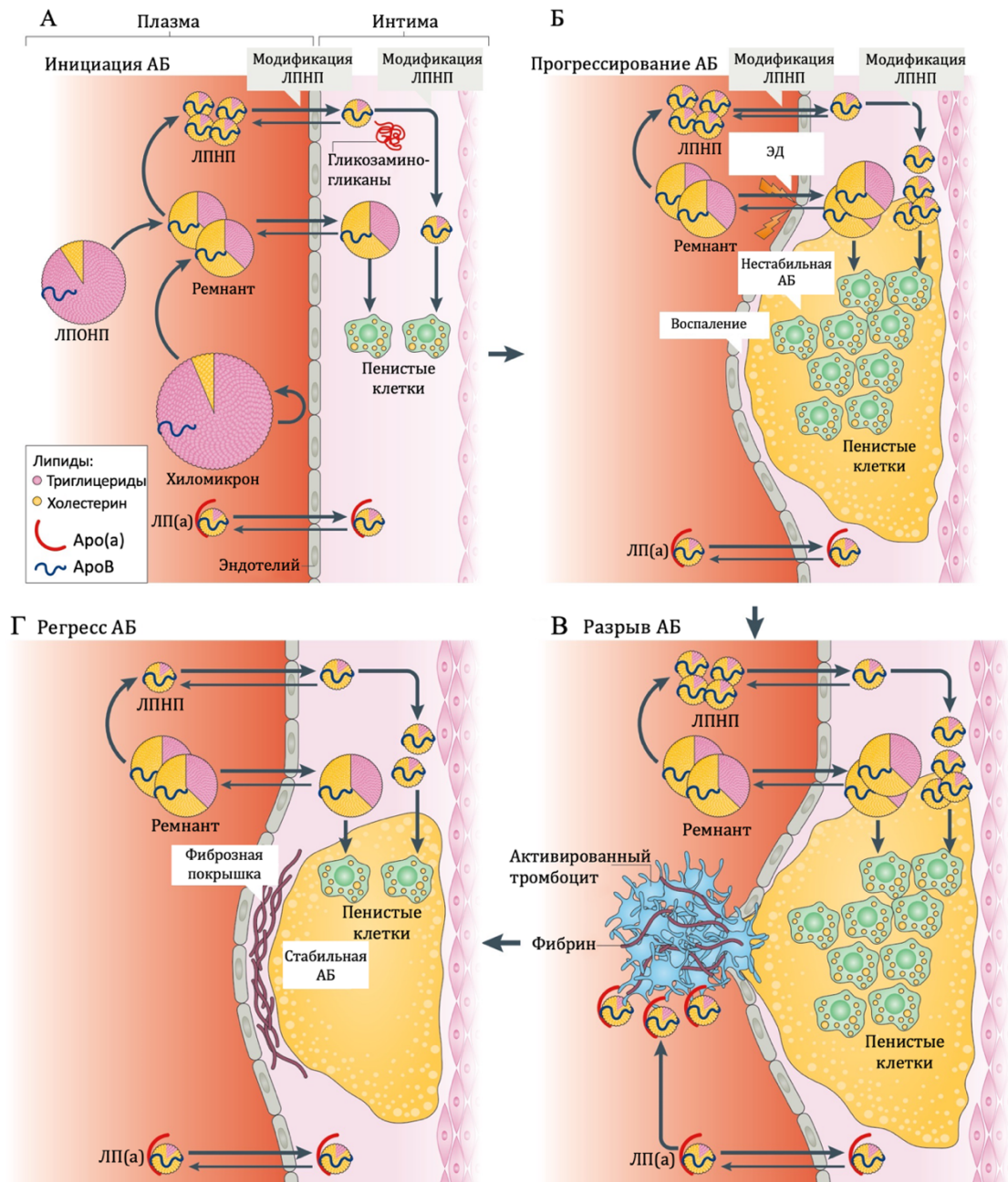


Рисунок 1.4 – Роль ЛП в инициации, прогрессировании, разрыве и регрессе АБ. А) ЛП превращаются в частицы ЛПНП, а после поглощения макрофагами – в пенистые клетки; Б) увеличение количества пенистых клеток ведет к воспалению, которое является характерной особенностью нестабильных АБ; В) нестабильные АБ склонны к разрыву, что приводит к образованию тромба с активированными тромбоцитами и отложениями фибрина; Г) эффективная терапия, которая снижает количество ЛПНП и их остатков, приведет к уменьшению образования пенистых клеток и развитию отложений холестерина, следовательно, снизит воспаление и стабилизирует АБ [6]

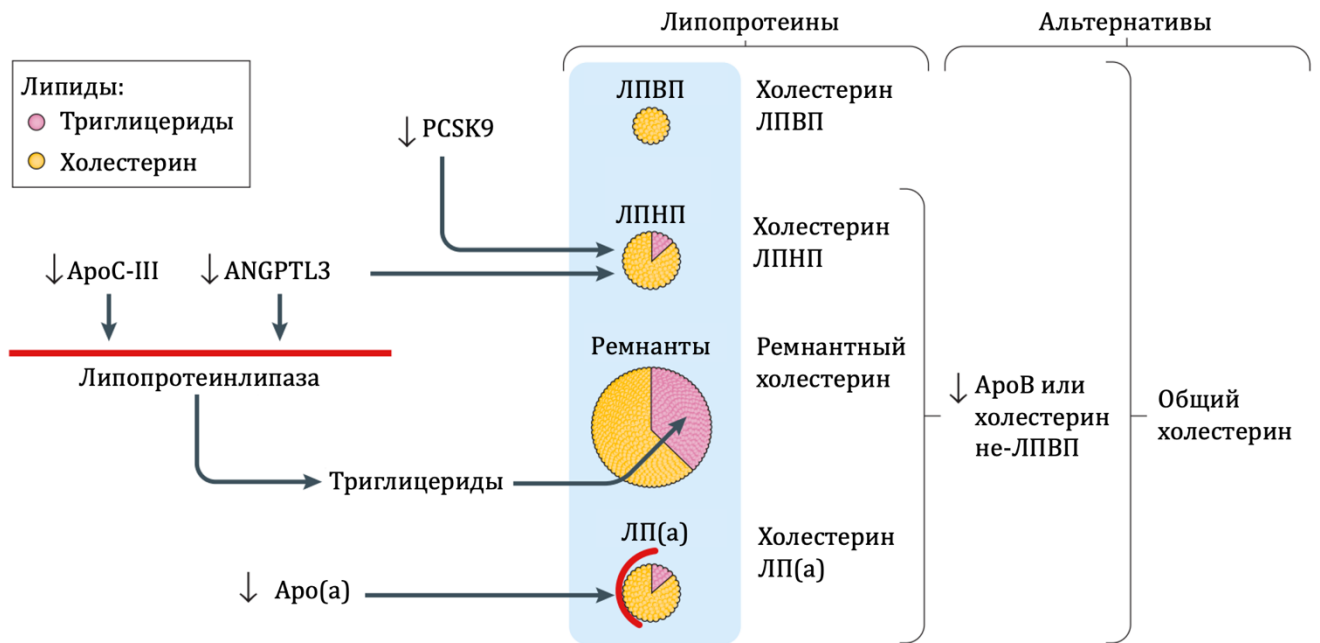


Рисунок 1.5 – АроВ-содержащие частицы, повышенный уровень которых является причиной ССЗ. Стрелками обозначены потенциальные мишени для снижения уровней липопротеинов в плазме [6]

В ряде экспериментов было показано возможность регулирования активности PCSK9 [110]. Выбор данной мишени обусловлен распространенностью генетических нарушений, связанных с повышенной активностью этой протеазы, что приводит к возникновению гиперхолестеринемии или, наоборот, к очень низкому уровню ХС в крови. Кроме того, было обнаружено, что активность PCSK9 оказывает сильное влияние на уровень холестерина за счет запуска процессов деградации основных или клиринговых рецепторов на гепатоцитах, чувствительных к ЛПНП [111; 112]. У пациентов, получавших миРНК к мРНК гена *PCSK9*, загруженные в липидные наночастицы, наблюдалось снижение холестерина ЛПНП на 60 % без применения статинов. Этот эффект был устойчивым в течение более трех месяцев после разового введения препарата с дозой 10 мг/кг [113]. Также в скором времени ожидается появление на рынке еще одного одобренного Европейским медицинским агентством препарата – Инклисирана, который является конъюгатом миРНК к мРНК *PCSK9* и тканеспецифического лиганда трехантенного N-ацетилгалактозамина (GalNAc) [21; 114]. Этот лиганд используется для направленной доставки препаратов в печень, поскольку связывается с асиалогликопротеиновым рецептором, который почти исключительно экспрессируется на гепатоцитах [115]. Клинические исследования показали, что влияние Инклисирана на холестерин ЛПНП длится более шести месяцев после однократной инъекции [84]. Такая чрезвычайно долгая эффективность возможна, поскольку активированный RISC может многократно участвовать в процессе деградации мРНК, несмотря на низкую эффективность высвобождения препарата в цитозоль клетки (1-2 % от введенной миРНК) [8].

Высокие уровни ApoC-III, вызывающего гипертриглицеридемию, и ANGPTL3, вызывающего смешанную гиперлипидемию с выраженной гипертриглицеридемией – примеры других потенциальных мишеней [116]. ApoC-III расположен на поверхности мембраны, содержащей липопротеины с высоким содержанием триглицеридов, в том числе ЛПОНП, хиломикроны и их остатки. В двух генетических исследованиях было выявлено, что у лиц с мутацией гена *ApoC-III*, приводящей к его дисфункции, наблюдается на ~ 42 % более низкий уровень триглицеридов и ~ 40 % более низкий риск развития ишемической болезни сердца [117]. Нокдаун мРНК *ApoC-III* под действием АСО привел к снижению уровня триглицеридов и увеличению содержания ХС ЛПВП, не вызывая при этом стеатоза печени [118]. По данным генетических исследований также было выявлено, что ген *ANGPTL3* тоже может служить потенциальной мишенью для терапии с помощью миРНК. Мутации в этом гене вызывают семейную гипобеталипипропротеинемию второго типа, и пациенты с дисфункцией *ANGPTL3* имеют инсулин-чувствительный фенотип с более низким уровнем инсулина и глюкозы в плазме [111]. К молекуле белка после трансляции дополнительно встраивается пептид с N-конца и фибриноген с C-конца. N-конец цепи является регулятором метаболизма липидов и секреции липопротеинов, в то время как C-конец может быть вовлечен в ангиогенез [119]. В клинических исследованиях было показано, что введение АСО к мРНК *ANGPTL3* привело к дозозависимому снижению уровней экспрессии мРНК *ANGPTL3* на 85 %, триглицеридов на 63 % и ХС ЛПНП на 33 % [120].

Многочисленные генетические исследования показали, что повышенный уровень ЛП(а) является причиной развития ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда и аортального стеноза [121–123]. Ранние клинические исследования показали, что применение АСО к мРНК *Apo(a)* ведет к снижению уровня ЛП(а) на 78 % [124], а в более поздних работах, где исследовалась оптимизированная формуляция (конъюгаты АСО с лигандом GalNAc для направленной доставки в гепатоциты), было показано снижение уровня ЛП(а) на 92 % [125]. Однако, низкая концентрация ЛП(а) связана с повышенным риском диабета 2-го типа и агрессивное целенаправленное снижение ЛП(а) в плазме может теоретически увеличить риск его развития [126; 127].

Выбор в качестве мишени ApoB обусловлен тем, что мутация в гене *ApoB-100* вызывает СГ, наследственную (аутосомно-доминантную) форму гиперхолестеринемии – нарушение липидного обмена [128]. Одним из основных факторов риска развития атеросклероза является гиперлипидемия, которая коррелирует с высоким уровнем ХС ЛПНП [129]. Накопление и окисления молекул ЛПНП ведет к повреждению стенок кровеносных сосудов, провоцируя воспалительный процесс [130; 131]. Таким образом, поскольку ApoB играет ключевую роль в сборке и секреции ЛПНП и ЛПОНП, его высокий уровень напрямую связан с повышенным риском ССЗ и атеросклерозом. *ApoB*, который преимущественно экспрессируется в печени и

тонком кишечнике, состоит из двух изоформ: В-48 синтезируется в энтероцитах, В-100 – в гепатоцитах. Традиционный метод лечения статинами, которые ингибируют 3-гидрокси-3-метилглутарил-кофермент А редуктазу, не эффективен для пациентов, имеющих мутации в гене *ApoB*, которые связаны со сверхэкспрессией транскриптов и белков. В качестве терапии используется одобренный FDA препарат Мипомерсен для лечения гомозиготной семейной гиперхолестеринемии. Этот АСО второго поколения, который успешно ингибирует экспрессию мРНК *ApoB*, снижает уровень ApoB в печени, общий холестерин в плазме и холестерин ЛПНП [132; 133]. Также было показано, что введение Мипомерсена связано с тенденцией к увеличению содержания внутрипеченочных триглицеридов и у одного из десяти пациентов развивался легкий стеатоз [134]. Для снижения риска стеатоза печени, одним из подходов может быть объединение АСО или миРНК *ApoB* с другими терапевтическими средствами, которое способствуют удалению триглицеридов из печени, а также соблюдение пациентом специальной лечебной диеты [135].

Ввиду того, что повышенный уровень экспрессии *ApoB* ведет к разнообразным негативным последствиям, связанным с патологией кровеносных сосудов, этот ген был выбран в качестве мишени в настоящей работе. Для снижения уровня его экспрессии будет использована химически модифицированная миРНК к мРНК *ApoB*, которая ввиду особенностей своего механизма действия должна оказывать более длительные эффекты, чем, например, АСО.

1.1.3 Системы доставки

Для осуществления механизма РНК-интерференции помимо направляющего рибонуклеинового компонента необходим целый ряд белков (эндонуклеаза AGO2, РНК-связывающий белок и т.д.), находящихся в цитоплазме. Поэтому, для успешного системного введения экзогенной миРНК требуется преодолеть ряд барьеров, таких как деградация в присутствии ферментов нуклеаз и короткое время циркуляции в кровотоке, распознавание клетками иммунной системы, доставка в целевой орган/ткань, эффективный трансмембранный перенос и выход из эндосом и лизосом в цитозоль клетки. За счет введения в структуру РНК различных химических модификаций, например, таких наиболее распространенных групп как 2'-О-метил, 2'-фтор и тиофосфат, удалось существенно уменьшить проблемы, связанные со стабильностью миРНК и распознаванием ее клетками иммунной системы [136]. Молекула миРНК обладает выраженным отрицательным зарядом и слишком велика, чтобы пересекать клеточные мембраны, но достаточно мала для свободного выведения из организма с помощью клубочковой фильтрации (длина 7-8 нм, диаметр 2-3 нм и молекулярная масса 13-16 кДа) [137]. Следовательно, как только миРНК покидают кровоток, они накапливаются в мочевом пузыре и

быстро удаляются в течение получаса, что препятствует их накоплению в клетках-мишенях [7]. Поэтому нейтрализация отрицательного заряда за счет включения миРНК в системы доставки, в состав которых входят положительно заряженные липиды или полимеры, является основной стратегией для эффективного предотвращения почечного клиренса, а также для осуществления трансмембранного переноса (преодоление клеточной мембраны). Результирующий нейтральный поверхностный заряд носителей миРНК также полезен для предотвращения нежелательного связывания с ними белков плазмы при циркуляции в кровотоке. Однако для некоторых систем доставки требуется формирование «белковой короны» вокруг носителей для прикрепления к определенным тканям или клеткам [138]. Например, ионизируемые катионные липидные НЧ (положительно заряжены при кислотном pH и нейтральны при физиологическом) преимущественно накапливаются в печени за счет взаимодействия с липопротеинами сыворотки, которое приводит к их специфическому распознаванию рецепторами ЛПНП [139].

Первоначально наноноситель с загруженной миРНК захватывается клетками через рецепторно-опосредованный эндоцитоз и переносится в раннюю эндосому (pH 6,3), которая постепенно созревает в позднюю эндосому (pH 5,5) под действием протонных насосов АТФазы вакуолярного типа (V-АТФаза), активно транспортирующих протоны в эндосому [140]. После этого поздняя эндосома сливается с лизосомой (pH 4-5), и внутреннее содержимое разрушается лизосомальными ферментами [141]. Поэтому, ключевой проблемой в эффективной доставке миРНК было и остается высвобождение из эндолизосомального компартмента в цитозоль клетки после эндоцитоза, где миРНК должны загружаться в RISC. Когда оболочечные вирусы попадают в эндосому, их вирусная мембрана может сливаться с эндосомальной мембраной, позволяя вирусному капсиду проникать в цитозоль [142]. Аналогичным образом было высказано предположение, что липидный бислой липосомы может сливаться с плазматической или эндосомной мембраной и высвобождать везикулярное содержимое в цитозоль (Рисунок 1.6А). Однако данная гипотеза несовместима с недавним наблюдением, согласно которому только около 50 % миРНК внутри каждой ЛНЧ высвобождается из эндосомы в цитозоль, поскольку слияние мембран, как ожидалось, должно было привести к полному высвобождению всего содержимого [143].

Одним из возможных решений вышеописанной проблемы является использование систем доставки с pH-чувствительными элементами, которые будут реагировать на изменения pH в эндосоме и/или лизосоме. Например, катионные липиды, имеющие вторичные или третичные аминогруппы с pK_a в диапазоне pH 5-6 будут поглощать свободные протоны в эндосомах (протонироваться), пока увеличивающееся осмотическое давление не приведет к повышению мембранного потенциала выше равновесного уровня [144]. Равновесный потенциал, в первую очередь, устанавливается диффузией хлорид-анионов, поток которых начинает диффундировать

в эндосомы в попытке восстановить равновесие, что еще больше увеличит осмотическое давление. В конечном итоге, эти изменения могут вызвать разрушение мембраны и высвобождение миРНК в цитоплазму. Это так называемая гипотеза «эффекта протонной губки» или «эффекта коллоидно-осмотического давления», которая ведет к дестабилизации [145] или набуханию мембраны [146], соответственно (Рисунок 1.6Б). При этом, всего 1-2 % миРНК, загруженных в ЛНЧ, высвобождались в цитоплазму, и это происходило только в течение ограниченного периода времени после преодоления носителем клеточной мембраны [143]. Данный паттерн наблюдается и на уровне *in vivo*: липосомы, для которых характерен активный захват клетками печени [147], несмотря на это, в большинстве случаев демонстрируют низкую терапевтическую эффективность из-за деградации в лизосомах [148].

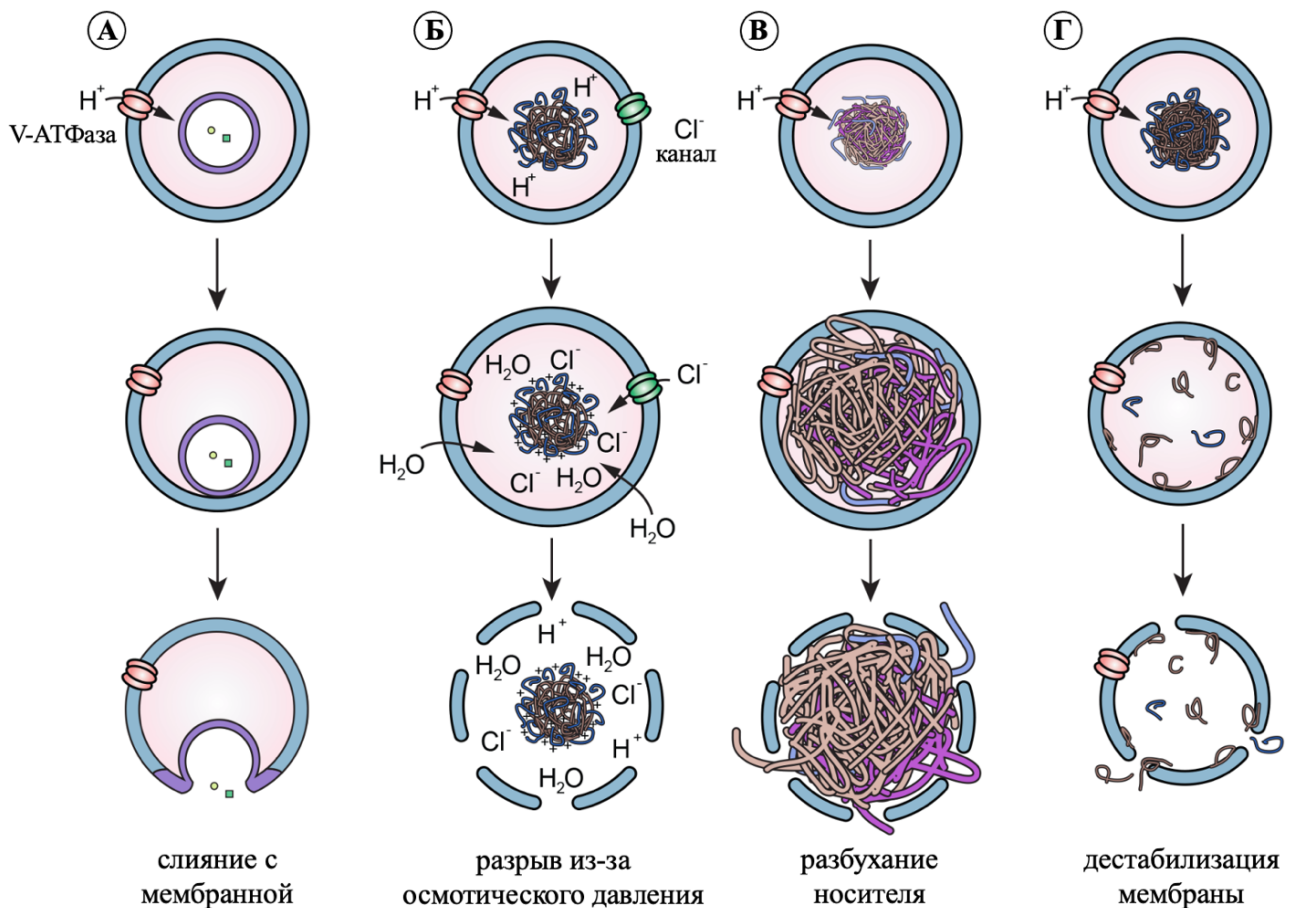


Рисунок 1.6 – Схематическое представление механизмов высвобождения наночемического носителя из эндосомы. А) Слияние мембраны эндосомы и наночемического носителя для высвобождения загруженной миРНК в цитозоль; Б) носитель, который является «протонной губкой», увеличивает приток хлорид-ионов за счет поглощения H^+ , что ведет к разрушению эндосом из-за повышенного осмотического давления; В) набухание чувствительного к рН наногеля разрывает эндосомальную мембрану; Г) чувствительные к рН наночастицы высвобождаются в результате дестабилизации эндосомальной мембраны [149]

Теория «протонной губки» на сегодняшний день все еще остается гипотезой, поскольку входит в противоречие с несколькими экспериментальными наблюдениями. Во-первых, не все полимеры, которые обладают буферными свойствами в диапазоне pH 5-7, способны обеспечить высвобождение из эндосом [150]. Во-вторых, с помощью прямого измерения было обнаружено, что содержание полиэтиленimina не влияет на pH в лизосомах, как предполагалось ранее [151]. В-третьих, было показано, что многие из липидных систем доставки относительно нетоксичны для клетки и высвобождение миРНК из ЛНЧ не приводит к полному разрыву поздней эндосомы или лизосомы, как постулирует данная гипотеза [152].

Одной из механистических гипотез является «разбухание носителя» под действием снижающегося pH при созревании эндосомы, его последующее давление на мембрану везикулы, приводящее к ее разрыву и высвобождению загруженного препарата (Рисунок 1.6В). С помощью данной теории часто описывают pH-чувствительные системы доставки на основе полимеров, которые формируют частицы, способные менять свой размер в зависимости от микроокружения. Для описания высвобождения полимерных наноносителей из эндосом все чаще используют гипотезу «дестабилизации и/или разрушения мембраны» (Рисунок 1.6Г). Согласно этой теории, полимерный носитель напрямую взаимодействует с внутренней эндосомальной мембраной за счет электростатических или гидрофобных взаимодействий, что приводит к ее локальной дестабилизации и повышению проницаемости [149]. Поскольку дестабилизация мембраны носит локальный характер, большая часть эндолизосомального компартмента остается нетронутой во время и после высвобождения, в отличие от полного лизиса эндолизосомы, предполагаемого гипотезой «протонной губки» [141]. Потенциальным ограничением выхода из эндосом из-за дестабилизации мембраны является размер загружаемого терапевтического агента (предельный размер молекулы 10 кДа) – молекулы большего размера оставались захваченными и не могли диффундировать в цитозоль [153]. Таким образом, был предложен ряд механизмов, с помощью которых описывается процесс высвобождения носителей из эндосом с той или иной степенью убедительности. Следовательно, дальнейшее исследование возможных механизмов высвобождения миРНК из эндосом и понимание того, как повысить эффективность этого процесса, имеет определяющее значение для разработки данного класса препаратов.

В настоящее время существует ряд систем доставки миРНК, которые нашли применение на уровне доклинических и клинических испытаний – это липидные наночастицы (ЛНЧ), липосомы, дендримеры, конъюгаты с GalNAc, динамические поликонъюгаты, неорганические частицы, вирусы и многие другие [154–156]. Использование вирусных векторов (ретровирусных или аденовирусных) в качестве переносчиков терапевтических миРНК возможно благодаря их природной способности переносить чужеродный для клетки-хозяина генетический материал. Хотя такие вирусные системы обладают высокой эффективностью, их клиническое применение

было ограничено потенциальными рисками инсерционного мутагенеза, а также воспалениями и иммунными реакциями организма [157].

Системы доставки, основным компонентом которых являются катионные липиды, являются наиболее часто используемыми невирусными векторами для доставки РНК, как в фундаментальных исследованиях, так и при проведении клинических испытаний [158–160]. С начала разработки ЛНЧ, используемые липиды были существенно усовершенствованы от классических трансфекционных агентов «DOTAP-DOPE» (1,2-диолеоил-3-триметиламмоний-пропан и 1,2-диолеоил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин) до гораздо более сложных структур, которые показаны на Рисунке 1.7. ЛНЧ обычно состоят из четырех компонентов – ионизируемого катионного липида, фосфолипидов, холестерина и липида на основе полиэтиленгликоля, среди которых ионизируемый липид играет ключевую роль в защите РНК от деградации и обеспечении направленной доставки в цитозоль. В настоящее время существует пять основных структурных типов ионизируемых катионных липидов, которые широко используются для доставки РНК: ненасыщенные, с несколькими длинными алифатическими заместителями, с разветвленными заместителями, полимерные и биоразлагаемые [139]. Степень насыщенности углеводородного заместителя сильно влияет на текучесть и эффективность доставки. Увеличение ненасыщенности заместителя от 0 до 2 *цис*-двойных связей коррелирует с повышенной тенденцией липидов к формированию небислойных, не плотноупакованных структур [161]. По этой причине углеводородная цепь линолевой кислоты была выбрана в качестве структурной основы в процессе оптимизации ионизируемого липида Dlin-MC3-DMA (Рисунок 1.7), который использовался в первом одобренном FDA препарате на основе мРНК Патисиране, предназначенном для лечения транстиретиновой семейной амилоидной нейропатии [145; 162].

Ионизируемые катионные липиды с несколькими длинными алифатическими заместителями отличаются от ненасыщенных наличием трех и более цепей (8-12 атомов углерода в каждом). Ожидается, что такие липиды будут формировать конусообразные структуры (гексагональная II фаза) с фосфолипидами эндосомальной мембраны, тем самым разрушая ее. На основе принципов комбинаторной химии такие липиды можно легко синтезировать и затем проверить с помощью высокопроизводительного скрининга [163]. После создания первой комбинаторной библиотеки в 2008 году [164] был идентифицирован ряд эффективных катионных липидов с несколькими длинными заместителями, такие как C12-200 и cKK-E12 [165; 166]. Чтобы уменьшить накопление в тканях и возможные побочные эффекты, ионизируемые липиды должны легко расщепляться до нетоксичных метаболитов после успешной доставки терапевтического агента, что особенно важно для РНК-терапии, где требуется неоднократное введение дозы. Одной из основных стратегий повышения биodeградируемости может стать

включение в липиды сложноэфирных связей, которые стабильны при физиологическом pH, но гидролизуются под действием клеточных ферментов.

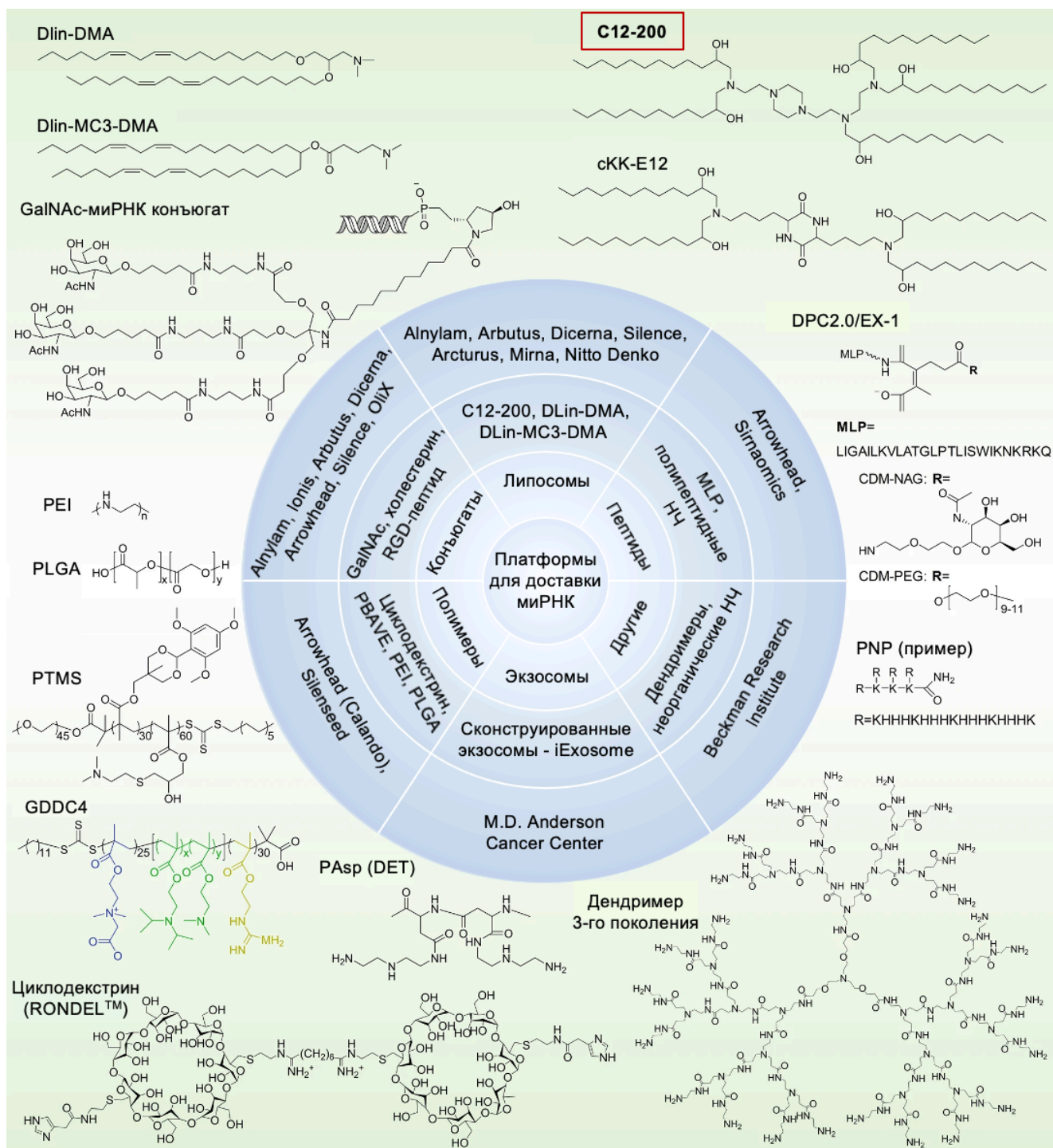


Рисунок 1.7 – Потенциальные системы доставки миРНК, прошедшие доклинические и клинические испытания. Различные липиды, РНК-конъюгаты, пептиды, полимеры, неорганические НЧ и экзосомы были протестированы биотехнологическими компаниями и исследовательскими институтами для поиска потенциальных носителей [19]

Для того чтобы сделать липид Dlin-MC3-DMA биоразлагаемым, в каждой его алифатической цепи проводили замену одной двойной связи на сложноэфирную связь. Полученный таким образом липид L319 не только сохранял высокую эффективность *in vivo*, но также быстро метаболизировался под действием ферментативного гидролиза, за счет активности эстераз или липаз с широкой субстратной специфичностью, присутствующей в тканях и внутриклеточных компартментах [167]. Следует отметить, что стерический эффект от вводимых сложноэфирных связей, а также их положение, могут сильно влиять на метаболизм ионизируемых липидов и их эффективность [168].

Таким образом, с химической точки зрения были достигнуты несколько существенных усовершенствований структуры липидов, которые сделали их более эффективными средствами доставки РНК. Было показано, что введение множественных алифатических заместителей в структуру ионизируемых катионных липидов приводило к увеличению эффективности трансфекции за счет дестабилизации эндосомальной мембраны клетки, в то время как замены двойных связей на сложноэфирные в структуре этих заместителей обеспечили биodeградируемость и быстрый метаболизм этих носителей [169].

Несмотря на существование FDA-одобренных ионизируемых липидов для доставки терапевтических РНК, остаётся целый ряд проблем, которые требуют решения. Во-первых, ионизируемые липиды, которые входят в состав ЛНЧ, могут вызвать острый иммунный ответ и долгосрочную токсичность. Несмотря на то, что для биodeградируемых липидов нового поколения эти негативные эффекты удалось в некоторой степени снизить, предварительное использование глюкокортикоидов и антигистаминных препаратов перед введением ЛНЧ все еще необходимо [170]. Во-вторых, получение рационально сконструированных ионизируемых липидов является сложной задачей из-за трудоемкости процесса синтеза. В настоящее время все ионизируемые липиды, которые применяются в клинике, синтезируются в несколько этапов, что приводит в свою очередь к ряду производственных проблем.

Для формирования ЛНЧ помимо ионизируемых катионных липидов используют вспомогательные липиды [171]. Примерами вышеупомянутых вспомогательных липидов [172] являются фосфолипиды слияния, увеличивающие трансфекционную активность ЛНЧ путем дестабилизации липидного бислоя клеточных мембран, и липиды на основе полиэтиленгликоля (PEG-липиды), уменьшающие иммунный ответ клетки путем увеличения стабилизации и защиты ЛНЧ от макрофагов. Следует учитывать, что высокое поверхностное содержание PEG-липидов приводит к стабилизации мембраны, и, следовательно, к меньшему накоплению ЛНЧ в клетках. Для преодоления этой проблемы можно уменьшить количество PEG-липидов в системе или использовать их модифицированные производные, которые бы слабо связывались с ЛНЧ и постепенно высвобождались во время циркуляции в крови [173]. Холестерин является другим

ключевым компонентом ЛНЧ, заполняющим пространство между липидами [174] и усиливающим активность катионных липидов [175]. Стандартная схема образования миРНК-ЛНЧ включает несколько стадий. На первой стадии получают комплексы миРНК с катионными липидами в растворе с низкими ионной силой и pH (4-5). Далее эти структуры покрываются вспомогательными липидами, холестерином и PEG-липидами, что приводит к образованию ЛНЧ с загруженным в них миРНК. Большинство параметров при получении ЛНЧ-миРНК, таких как соотношение липидов, концентрации используемых реагентов и температура, оптимизируется эмпирически.

Среди множества изученных синтетических наноносителей для доставки терапевтических РНК, НЧ оксида железа являются одной из самых перспективных платформ по нескольким причинам [176]. Во-первых, оксид железа является биосовместимым и биоразлагаемым материалом, некоторые препараты на его основе были одобрены FDA, а другие находятся на поздних стадиях клинических испытаний [9; 177; 178]. Например, Феридекс – это покрытые декстраном наночастицы оксида железа, одобренные в качестве контрастного агента для визуализации и обнаружения поражений печени. Ферумокситол был одобрен для лечения железодефицитной анемии у взрослых пациентов с хроническим заболеванием почек [179]. Во-вторых, синтез НЧ достаточно просто масштабировать для промышленного производства [180], а развитая поверхность позволяет направленно осуществлять функционализацию частиц для последующей эффективной доставки терапевтического агента [181]. Такая платформа позволяет объединить достижения в различных направлениях: модификация поверхности ионизируемыми катионными липидами для эффективной трансфекции, конъюгирование с антителами или аптамерами для направленной доставки и многое другое, что обсуждалось выше. Кроме того, наличие магнитного ядра в системе доставки обеспечивает дополнительные преимущества, такие как возможность визуализации с помощью метода магнитно-резонансной томографии [182] и неинвазивное удаленное управление наноконтейнером с помощью внешнего магнитного поля. Под действием поля магнитные моменты НЧ стремятся выстраиваться вдоль оси его приложения. При изменении направления вектора магнитной индукции (переменное поле), релаксация магнитного момента происходит посредством механического вращения частиц (релаксация по Брауну) и/или посредством нагрева (релаксация по Неелю; подробнее будет обсуждаться в разделе 1.2.3) [183; 184]. Реализация этих механизмов нашла свое применение в контролируемом высвобождении НК из термочувствительных носителей за счет нагрева НЧ в высокочастотном поле [185; 186], а также в увеличении эффективности трансфекции за счет магнитомеханической стимуляции в низкочастотном негреющем магнитном поле [14]. Тем не менее, не смотря на эффективность магнитного поля для трансфекции *in vitro*, этот подход пока не удалось воплотить на *in vivo* модели.

Большинство магнитных наночастиц, попадающих в кровоток, обычно подвергаются опсонизации (адсорбции белков плазмы на поверхности частиц) с последующим распознаванием и захватом макрофагами, находящимися в органах мононуклеарной фагоцитарной системы, что в конечном итоге приводит к их удалению из кровотока [187]. Обычно считается, что взаимодействие НЧ оксида железа с биологическими компонентами (например, белками), захват клетками, токсичность и поведение *in vivo* сильно коррелируют с их физико-химическими характеристиками. Например, гидродинамический размер является одним из наиболее важных факторов, который влияет на распределение и клиренс НЧ. Частицы диаметром более 200 нм быстро захватываются селезенкой посредством фагоцитоза, тогда как НЧ размером менее 10 нм удаляются через почечный клиренс. Частицы размером порядка 100 нм, как правило, накапливаются в печени. Считается, что малые суперпарамагнитные НЧ (менее 50 нм) выигрывают за счет более медленных опсонизации и выведении клетками ретикулоэндотелиальной системы [178]. Кроме того, однородность размеров наночастиц влияет на их поведение *in vivo*: при низком индексе полидисперсности (ИПД) получающиеся результаты по исследованиям фармакокинетики и биораспределения более единообразны и повторяемы.

1.2 Магнитные НЧ для биомедицинских применений

1.2.1 Свойства и получение НЧ оксида железа

Получение НЧ оксида железа с контролируемыми физико-химическими свойствами (размер, морфология, кристалличность, фазовый состав и химия поверхности) является не только фундаментальной научной задачей, но также важно с точки зрения практического применения в биомедицине. Магнитные НЧ оксида железа являются одними из наиболее часто используемых медицинских агентов, которые применяются для решения широкого спектра задач в диагностике и терапии: в МРТ [182], гипертермии [184; 188–191], биоанализе [192; 193] и доставке лекарственных средств и нуклеиновых кислот [194; 195] ввиду их биосовместимости и низкой токсичности.

Различают четыре основные модификации оксида железа: Fe_{1-x}O (вюстит), α – Fe_2O_3 (гематит), γ – Fe_2O_3 (маггемит) и Fe_3O_4 (магнетит), в Таблице 1.1 представлены их основные характеристики [196]. Оксиды железа имеют плотноупакованную решетку анионов кислорода, где катионы железа занимают октаэдрические и тетраэдрические позиции. Вюстит имеет структуру каменной соли, содержит Fe^{2+} в октаэдрических участках и часто обладает нестехиометрической катион-дефицитной структурой. Гематит кристаллизуется в структуре корунда и содержит Fe^{3+} в октаэдрических позициях. Магнетит имеет структуру обратной

шпинели с Fe^{3+} в тетраэдрических позициях и смесь, состоящую из половины Fe^{2+} и половины Fe^{3+} в октаэдрических позициях. При окислении Fe_3O_4 , Fe^{2+} превращается в Fe^{3+} в структуре шпинели и в октаэдрической подрешетке появляются компенсирующие вакансии. При полном окислении железа до Fe^{3+} образуется метастабильная фаза – маггемит.

Таблица 1.1 – Основные структурные характеристики оксидов железа

	Вюстит	Магнетит	Маггемит	Гематит
Формула	Fe_{1-x}O	Fe_3O_4	$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$
Катионы	Fe^{2+}	$\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$	Fe^{3+}	Fe^{3+}
Тип структуры	Дефектная структура каменной соли	Обратная шпинель	Дефектная шпинель	Структура корунда
Сингония	Кубическая	Кубическая	Кубическая / Тетрагональная	Гексагональная
Пространственная группа	Fm3m	Fd3m	P4 ₃ 32	R $\bar{3}$ c
Параметр решетки	a = 0,4302-0,4275	a = 0,8396	a = 0,8347	a = 0,5044, c = 1,3749
Магнетизм	Антиферромагнетик	Ферримагнетик	Ферримагнетик	Слабый ферромагнетик / антиферромагнетик

Основываясь на характере отклика магнитных диполей частиц и общей намагниченности в присутствии и в отсутствие внешнего магнитного поля, магнитные НЧ обычно классифицируют как диамагнитные, парамагнитные, ферромагнитные, ферримагнитные и антиферромагнитные [197]. В большинстве опубликованных исследований используются ферримагнитные, ферромагнитные или суперпарамагнитные частицы (частный случай ферро- или ферримагнитных частиц) [198]. Меньше определенного критического размера, который зависит от свойств материала, поведение магнитных НЧ напоминает парамагнетик: в отсутствие внешнего поля они обладают нулевым магнитным моментом, который быстро возрастает (по сравнению с парамагнетиками) в направлении приложенного внешнего поля. Это явление, наблюдаемое при температурах выше так называемой температуры блокировки (T_B), возникает из-за того, что тепловые флуктуации внутри наночастиц сравнимы или превышают энергетический барьер для обращения момента, что позволяет магнитным моментам быстро менять направление случайным образом. В случае, когда результирующая намагниченность НЧ в интервале измерения/наблюдения равна нулю в отсутствие внешнего поля, такие наночастицы называются суперпарамагнитными. Суперпарамагнетизм особенно важен в таких областях, как доставка лекарств или МРТ, поскольку НЧ, не обладающие остаточной намагниченностью после удаления внешнего поля, не притягиваются друг к другу, и, следовательно не агрегируют.

Магнитные НЧ могут быть получены с помощью многочисленных физических и

химических подходов [199–203]. Физические методы основаны на подходе «сверху вниз» и осуществляются путем разделения объемного материала на более мелкие единицы. Основным недостатком такого подхода является невозможность контролировать размер НЧ в нанометровом диапазоне. Химические методы – подходы «снизу вверх», где в процессе реакции НЧ собираются из атомов, являются более подходящими для получения НЧ с контролируемой морфологией и размером. Ниже будут рассмотрены основные химические методы получения НЧ оксидов железа, их достоинства и недостатки.

Метод совместного осаждения (соосаждения) является одной из самых простых процедур получения гидрофилизированных НЧ с высоким выходом. Стандартная реакционная среда состоит из смеси солей трехвалентного и двухвалентного железа с добавлением основания; реакция протекает, как правило, при комнатной температуре. В типичном синтезе НЧ оксида железа, к смеси хлорида Fe^{2+} и Fe^{3+} в молярном соотношении 1 к 2, в инертной атмосфере по каплям добавляют основание (рН между 8 и 14). Общая реакция может быть записана как $\text{Fe}^{2+} + 2\text{Fe}^{3+} + 8\text{OH}^- \rightarrow \text{Fe}_3\text{O}_4 + 4\text{H}_2\text{O}$ [204]. Физико-химические свойства НЧ зависят от природы соли железа (хлоридов, сульфатов и нитратов), соотношения трехвалентных и двухвалентных ионов, температуры реакции, значения рН, ионной силы и т. д. Не смотря на простоту и высокий выход, НЧ, полученные методом соосаждения, показывают относительно низкую кристалличность и несовершенное упорядочение спинов на поверхности. Эти явления приводят к более низкому значению M_s (30-60 Ам² кг⁻¹) по сравнению со значением для объемного материала. Кроме того, полидисперсность полученных таким образом НЧ приводит к широкому диапазону температур блокировки, делая их непригодными для некоторых задач, например, в гомогенном биоанализе [205].

Метод микроэмульсий основан на получении дисперсии двух несмешивающихся фаз – водной и масляной. Есть два типа микроэмульсий: вода в масле (обратные мицеллы) и масло в воде. В типичном микроэмульсионном синтезе водные микрокапельки образуются в смеси масляной фазы и поверхностно-активных веществ (ПАВ) [206]. Синтезированные мицеллы действуют в качестве микрореакторов, каждая из которых имеет определенный объем, который можно варьировать путем изменения соотношения воды и ПАВ. Микрокапелька воды окружена поверхностным слоем ПАВ и содержит определенное количество солей металлов, действующих в качестве прекурсоров. Соль металла подвергается восстановлению, и в конечном итоге внутри микрокапель образуются НЧ. Реакции обычно проводятся при комнатной температуре и в инертной атмосфере. У этой методики есть определенные недостатки, и основной из них связан с аморфной природой получаемых НЧ. Для кристаллизации частиц применяется постобработка кальцинированием, вызывающая их неизбежную агломерацию и коагуляцию. Кроме того, полученные НЧ показывают широкое распределение по размерам, а также достаточно низкий

выход продукта по сравнению с методом соосаждения, делая метод микроэмульсий не лучшим выбором для крупномасштабного синтеза [207].

Качество и функциональность НЧ оксида железа зависит от распределения по размерам, степени кристалличности и упорядоченности спинов поверхности. Для получения таких частиц были разработаны различные подходы к синтезу при более высоких температурах и/или давлении, таких как метод термического разложения металлоорганических прекурсоров и гидротермальный синтез.

Гидротермальный синтез проводят в реакторах или автоклавах (нержавеющая сталь с тефлоновым покрытием) в водной среде, где поддерживается давление свыше 10 Мпа, температуру около 220 °С и общее время реакции составляет примерно 72 часа [208; 209]. Реакционная смесь состоит из линолеата металла, жидкой фазы этанол-линолевой кислоты и водно-этанольной фазы, выдерживаемых в гидротермальных условиях. Как правило, размер и распределение НЧ зависят от концентрации прекурсора, температуры, времени реакции и оптимизируется эмпирически. К достоинствам данного метода относится получение НЧ с высокой кристалличностью и возможность достаточно точно контролировать форму и размер, особенно с помощью ПАВ. Однако, как правило, получающиеся НЧ имеют достаточно выраженную склонность к агрегации, происходящей во время синтеза.

Среди различных подходов к получению НЧ, синтезы, основанные на высокотемпературном разложении металлоорганических прекурсоров являются наиболее привлекательными с точки зрения монодисперсности, совершенства кристаллической структуры и магнитных свойств получаемых НЧ. В результате получают магнитные НЧ с гидрофобной поверхностью (как правило модифицированные олеиновой кислотой), которые вследствие диспергируются в неполярных органических растворителях и должны пройти дополнительную фазу гидрофилизации для дальнейшего биомедицинского применения.

В методе термического разложения существуют два основных подхода: впрыскивание прекурсора или постепенный нагрев реакционной смеси вместе с прекурсором [210]. Быстрое впрыскивание металлоорганических прекурсоров в смесь растворителя и ПАВ при высокой температуре приводит к внезапному и короткому этапу зародышеобразования, за которым следует этап медленного роста – два ключевых критерия для получения монодисперсных НЧ. Этот метод позволяет получать частицы с относительно узким распределением по размеру (монодисперсность δd_c примерно 10%, для дальнейшего сужения распределение по размерам применяется селективное фракционирование) и высоким качеством кристаллической структуры. Вскоре после этого был разработан новый подход, основанный на медленном нагревании реакционной смеси (прекурсор, растворитель и ПАВ) до температуры кипения растворителя (обычно углеводородов с длинной цепью, таких как 1-октадецен, 1-эйкозан и т. д.). В качестве

источника железа использовали олеат железа III (Fe(III)-OL), синтезированный в результате реакции между хлоридом железа III, олеатом натрия и водой при температуре ниже 100 °C. Было показано, что, варьируя температуру и время реакции, можно получать НЧ оксида железа с размером ядра от 5 до 22 нм [211]. По сравнению с впрыскиванием прекурсора, метод высокотемпературного термического разложения, который предполагает нагревание прекурсора вместе с остальными компонентами, является менее технически сложным и более безопасным, поскольку не требует проводить манипуляции при высоких температурах.

Ключевым фактором, определяющим конечную структуру наночастиц оксида железа (их форму и размер), синтезированных с помощью метода термического разложения, является соотношение между химическим потенциалом (μ_m) мономеров (промежуточного соединения, продукта разложения прекурсора) и химическим потенциалом различных плоскостей растущего кристалла [212]. В случае магнетита плоскости семейства $\{111\}$ наиболее плотно упакованы и имеют самый низкий химический потенциал и, следовательно самую низкую реакционную способность [213]. С другой стороны, плоскости $\{100\}$ наименее плотно упакованы и имеют самую высокую реакционную способность, в то время как плоскости $\{110\}$ занимают промежуточную позицию между ними. Следовательно, химический потенциал этих плоскостей можно ранжировать как $\mu_{\{100\}} > \mu_{\{110\}} > \mu_{\{111\}}$.

При повышении температуры смеси железосодержащий прекурсор разлагается с образованием промежуточного соединения (мономера), которое накапливается и при достижении критической концентрации пересыщения образуются зародыши (подробнее процессы зародышеобразования и роста будут обсуждаться в разделе 1.2.2) [214]. В этот момент химический потенциал мономеров выше, чем кристаллических плоскостей ($\mu_m > \mu_{\{100\}} > \mu_{\{110\}} > \mu_{\{111\}}$), и они могут переходить из сольватированного состояния (высокий химический потенциал) в любую из плоскостей с более низким химическим потенциалом. Эта стадия называется диффузионным ростом. Несмотря на то, что в зародышах термодинамически разрешен рост в любой плоскости, скорость осаждения мономеров будет различна для каждой грани в зависимости от кинетических констант, которые обратно пропорциональны энергетическому барьеру данного процесса. Поскольку плоскости $\{111\}$ наиболее плотно упакованы и имеют более высокие стерические затруднения для поступления новых мономеров, энергетический барьер, который должен преодолеть мономер для осаждения на этой плоскости, выше, чем на других плоскостях; следовательно, грани $\{111\}$ будут расти медленнее всего.

Первоначальный одновременный рост в трех направлениях (управляемый только разницей в скорости осаждения) приводит к образованию октаэдров с усеченными вершинами. По мере развития реакции химический потенциал мономера падает (из-за снижения концентрации) до точки, при которой плоскости $\{100\}$ больше не могут расти ($\mu_{\{100\}} > \mu_m > \mu_{\{110\}} > \mu_{\{111\}}$). Тем не

менее грани $\{110\}$ и $\{111\}$ продолжают расти, в результате чего октаэдры превращаются в тетрадекаэдры. Точно так же, когда μ_m уменьшается в достаточной степени, осаждение на плоскостях $\{110\}$ прекращается, в то время как оно продолжается на плоскостях $\{111\}$, что приводит к переходу от тетрадекаэдров к кубам. Если количество оставшегося мономера достаточно велико для продолжения осаждения в плоскостях $\{111\}$, вершины куба будут продолжать расти, в результате чего образуются звездообразные структуры. Однако из-за большого гидродинамического размера мономера олеата железа им очень трудно преодолеть стерические затруднения плоскостей $\{111\}$, что делает рост звезд маловероятным с термодинамической точки зрения (Рисунок 1.8).

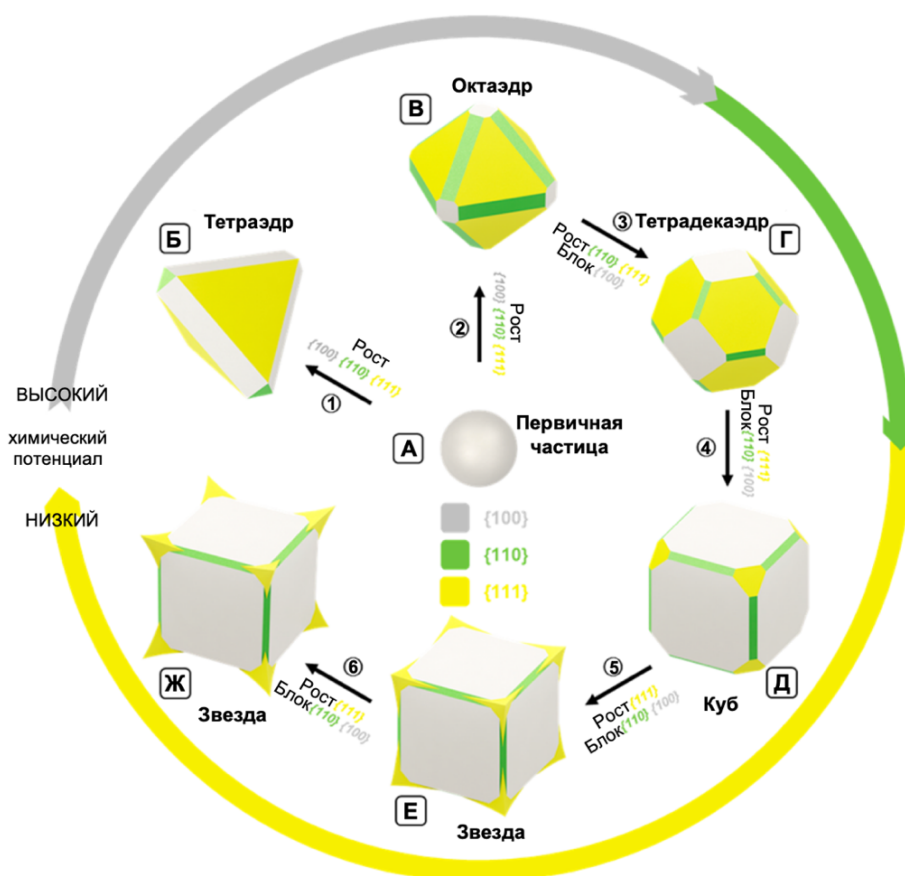


Рисунок 1.8 – Схематическое изображение модели роста НЧ. А) Первичная частица (зародыш), без определенных граней; Б) тетраэдр или В) октаэдр, которые растут во всех направлениях, но доминирующее – рост в направлении плоскости $\{100\}$; Г) тетрадекаэдр (усеченный куб / октаэдр) получается при росте в направлении плоскостей $\{110\}$ и $\{111\}$ и остановки роста в направлении плоскости $\{100\}$; Д) куб, который преимущественно растет в направлении плоскости $\{111\}$; Е) при дальнейшем росте в направлении плоскости $\{111\}$ формируется звездчатая структура с вытянутыми вершинами; Ж) вершины звездчатой структуры продолжают расти в направлении $\langle 111 \rangle$ и вытягиваться еще сильнее. Серый цвет обозначает плоскости $\{100\}$, зеленый – $\{110\}$, желтый – $\{111\}$ [212]

Химический потенциал мономера выражается как $\mu_m = \mu_m^0 + RT \ln(C_m \times \gamma_m)$, где μ_m^0 – химический потенциал мономера в исходном состоянии, R – универсальная газовая постоянная, T – температура, C_m – концентрация мономера, γ_m – коэффициент активности мономера в растворе [215]. Таким образом, μ_m^0 и R являются константами и не влияют на форму наночастиц. Кроме того, принимая во внимание, что стадия роста частиц осуществляется при температуре кипения растворителя, если состав растворителя стабилен, T можно принять как константу. Из этого следует, что C_m и γ_m являются потенциально варьируемыми параметрами, через которые можно влиять на химический потенциал мономера и тем самым, на форму частиц.

Концентрация мономера – это баланс между скоростью образования и расхода мономера в процессе синтеза. Этот параметр можно контролировать с помощью варьирования количества железосодержащего прекурсора и ПАВ в реакционной среде, а также соотношения между ними. Параметр γ_m зависит от силы взаимодействия между растворителем и мономером, и его можно регулировать, используя либо различные прекурсоры железа, либо растворитель. Поскольку неполярные растворители имеют более сильные молекулярные взаимодействия с длинными алифатическими цепями мономеров, что снижает γ_m , и это должно приводить к образованию кубических структур, в то время как использование полярных растворителей – к октаэдрическим структурам. Этот эффект становится критическим при использовании дибензилового эфира, так как при высоких температурах он обычно разлагается на бензальдегид и бензилбензоат, которые еще более полярны, чем сам дибензиловый эфир [212]. Вследствие повышения полярности растворителя, взаимодействие между ним и алифатическими цепями мономеров становится слабее, растет γ_m и μ_m настолько, что становится возможен рост во всех направлениях. В целом полярность снижается в ряду от кислот к алканам (в порядке убывания: кислоты – спирты – альдегиды – амины – эфиры – алкены – алканы).

1.2.2 Принципы зародышеобразования и роста коллоидных частиц

Зародышеобразование (нуклеация) – термодинамическая модель, описывающая начальную стадию фазового перехода первого рода, в процессе которой образуются ядра стабильной фазы в метастабильной первичной матрице. Подавляющее большинство доступных теоретических работ с применением равновесной термодинамики основано на классической теории зародышеобразования (КТЗ), разработанной Беккером и Дёрингом более 70 лет назад [216]. В фундаменте КТЗ лежит то, что термодинамическая система стремится минимизировать свободную энергию Гиббса. Концепция КТЗ основана на адсорбции, что означает, что скорость нуклеации выражается через изменение поверхностной энергии Гиббса [217]. В данном контексте важно различать гомогенную и гетерогенную нуклеацию. Зарождение, которое

происходит в местах на твердых поверхностях, контактирующих с жидкостью или паром, называется гетерогенным зародышеобразованием. Например, гетерогенное зародышеобразование происходит на поверхности частиц в растворе, которые служат в качестве сайтов нуклеации и используются в синтезах с затравочным ростом. Напротив, гомогенная нуклеация происходит самопроизвольно и случайно, но требует сверхкритических состояний, таких, например, как перенасыщение [218].

Свободная энергия Гиббса зародыша обычно выражается как сумма отрицательного и положительного слагаемых. Отрицательный член определяется событием, приводящим к снижению объемной свободной энергии Гиббса, положительный член – увеличению свободной поверхностной энергии Гиббса. В простейшем виде для кластера со сферической симметрией и радиусом r она выражается как сумма между изменением свободной энергии Гиббса на единицу объема и поверхностной энергией на единицу площади:

$$\Delta G = -\frac{4}{3}\pi r^3 |\Delta G_v| + 4\pi r^2 \gamma, \quad (1)$$

где ΔG – свободная энергия Гиббса зародыша,

r – радиус,

ΔG_v – свободная энергия Гиббса на единицу объема,

γ – поверхностная энергия Гиббса на единицу площади.

Из-за отрицательного (образование связей) и положительного (поверхностная энергия) членов, функция свободной энергии Гиббса, показанная на Рисунке 1.9, имеет максимум в точке равной r_c (критический радиус кластеров при нуклеации), соответствующий энергии активации ΔG_c . Для кластеров, меньших r_c , рост энергетически невыгоден и растворение более вероятно.

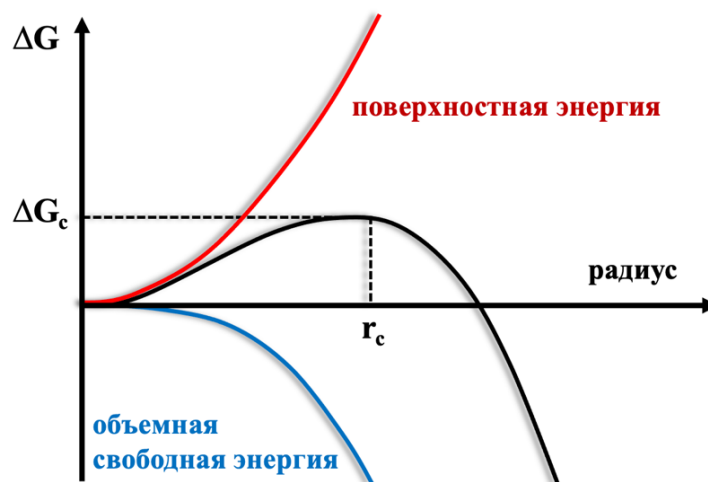


Рисунок 1.9 – Зависимость свободной энергии ΔG от радиуса кластера согласно КТЗ. Кривая имеет максимальную свободную энергию ΔG при критическом размере кластера r_c , который определяет первые стабильные зародыши

Гетерогенное зародышеобразование – образование новой фазы на участках со сниженной эффективной поверхностной энергией (поверхность, границы раздела, примеси) и, соответственно, имеющих более низкий порог энергии активации, что делает зарождение в этих местах более вероятным. В результате гетерогенная нуклеация происходит чаще, чем гомогенная. При синтезе НЧ предполагается, что оба типа зародышеобразования происходят как последовательно, так и параллельно. На основании КТЗ ЛаМером была предложена теоретическая модель «взрывного» зародышеобразования, в которой разделялись стадии зародышеобразования и роста коллоидных НЧ, что можно интерпретировать как отделение гомогенной нуклеации от гетерогенной [219]. В своем оригинальном исследовании ЛаМер описал реакцию с использованием графика условной концентрации нестабильного промежуточного соединения (мономера), способного образовывать НЧ или присоединяться к частице без значительного энергетического барьера, в зависимости от времени. Классический механизм ЛаМера, показанный на Рисунке 1.10, состоит из трех основных стадий: (I) при разложении прекурсора увеличивается концентрация мономера в системе до критического значения (C_{min}), при достижении которого может быть преодолен энергетический барьер для инициации гомогенного зародышеобразования; (II) «взрывное» зародышеобразование приводит к снижению концентрации мономера в реакционной смеси; (III) концентрация мономера опускается ниже порогового значения для нуклеации, рост происходит за счет диффузии мономеров к поверхности частиц, что можно интерпретировать как гетерогенное зародышеобразование.

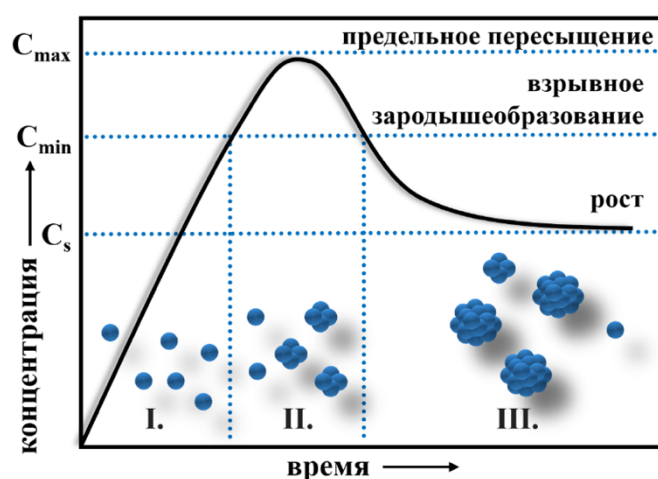


Рисунок 1.10 – Классический механизм ЛаМера для зародышеобразования и роста наночастиц

Модель ЛаМера и ее модификации до сих пор являются единственными общепринятыми моделями, описывающими общий механизм процесса образования НЧ. Однако модель ЛаМера не способна предсказать или охарактеризовать эволюцию распределений НЧ по размерам. С

падением концентрации мономера в реакционной среде на стадии III, может происходить процесс Оствальдского созревания, когда более крупные частицы растут за счет более мелких, тем самым снижая общую поверхностную энергию системы. Известно, что вторичное зародышеобразование и Оствальдовское созревание на стадии (III) приводят к получению НЧ с широким распределением по размерам. Позже, группой исследователей [220; 221] был предложен расширенный механизм роста по ЛаМеру, который в отличие от классического, представляет собой открытую систему, где на стадии III вводится дополнительное непрерывное добавление прекурсора в реакционную среду (стадия IV), схематично этот процесс представлен на Рисунке 1.11. Преимущество такого подхода заключается в том, что этот дополнительный этап может быть произвольно продлен на длительное время, что позволяет получать НЧ с точно заданным, теоретически сколь угодно большим размером. Из-за непрерывного и контролируемого добавления прекурсора не происходит созревание Оствальда, а за счет поддержки уровня пересыщения ниже $C_{\min}$ не происходит вторичного зародышеобразования.

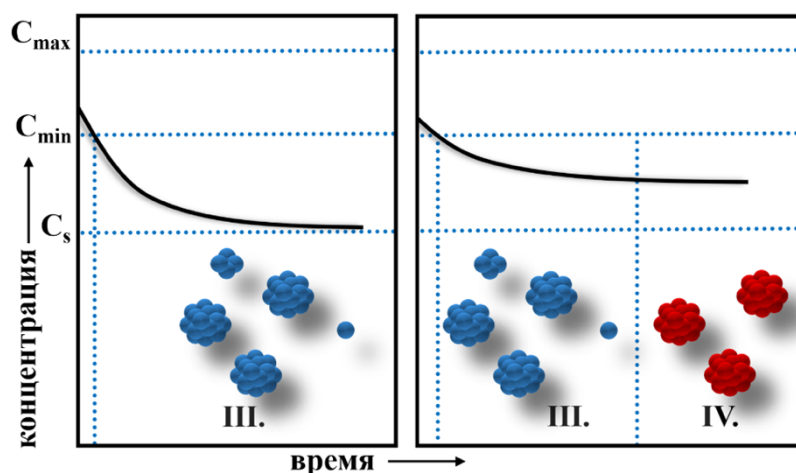


Рисунок 1.11 – Расширенный механизм ЛаМера (справа) отличается от классического (слева) наличием стадии IV, где происходит равномерный рост наночастиц за счет непрерывного добавления прекурсора в реакционную среду

Альтернативные подходы к характеристике роста частиц представляют собой модели с использованием скоростных уравнений. Формулировка и решение (в общем, численно) этих математических выражений описывают распределение НЧ по размерам во времени. В нескольких публикациях были разработаны кинетические модели с использованием только скоростных уравнений для описания нуклеации и роста НЧ [222; 223]. Также была предложена модель, состоящую из двух этапов: этап нуклеации (КЗТ), за которым следует агрегация первичных зародышей в коллоидные агломераты (уравнения скорости). Таким образом, для описания процессов нуклеации и роста НЧ существует несколько теоретических моделей: КЗТ и

ее расширенные модификации и уравнения скорости, а также ряд исследований, которые расширяют, улучшают или комбинируют эти модели [224–226].

1.2.3 Внешнее магнитное поле в наномедицине

Переменное магнитное поле (ПМП) с частотой ниже 0,1 МГц считается безопасным и может проникать в ткани на глубину до 1 метра, что позволяет эффективно воздействовать на все потенциальные терапевтические цели в организме человека. С термодинамической точки зрения магнитное поле с индукцией B меньше 1 Тл считается «слабым», поскольку энергия $U_M \sim \mu_B B$ (здесь $\mu_B = 9,3 \times 10^{-24}$ А м² – магнетон Бора, B – индукция магнитного поля), которую такое поле может передать одному электрону (иону, радикалу, атому), крайне мала по сравнению с энергией активации биохимических реакций $U_a = 0,1-1,0$ эВ. Фактически значение U_M на несколько порядков меньше тепловой энергии при комнатной температуре. Эффекты вихревого поля при частоте (f) ПМП много меньшей 0,1 МГц на ионах и электронах также незначительны. Силы Кулона и Лоренца в этом случае на несколько порядков ниже пороговых значений активации наиболее чувствительных биохимических систем, таких как ионные каналы и рецепторы клеточных мембран (от 1 до 10 пН) [227]. Следовательно, согласно теоретическим оценкам, магнитное поле с частотой менее 0,1 МГц и магнитной индукцией менее 1 Тл будет иметь недостаточную энергию активации для воздействия на химические и биохимические системы в состоянии термодинамического равновесия. Однако биохимические реакции и процессы в клетках не находятся в термодинамическом равновесии, поэтому ПМП и сопровождающее его вихревое электрическое поле могут влиять на биохимические процессы с помощью нескольких теоретически обоснованных и экспериментально подтвержденных механизмов [228–231]. Известно, что магнитные НЧ усиливает влияние магнитного поля на биологические системы, что позволяет дистанционно управлять НЧ и их влиянием на биохимические процессы как *in vitro*, так и *in vivo*. Почти все магнитные НЧ диаметром меньше 100 нм являются однодоменными, что означает в первом приближении, что все магнитные моменты атомов в кристаллической решетке НЧ ориентированы вдоль одной и той же оси легкого намагничивания, формируя жестко ориентированный единый магнитный момент (спин). С физической точки зрения, наличие таких НЧ в неупорядоченном магнитном поле (водный раствор, клетка или ткань) вызывает различные локальные эффекты. Например, под действием внешнего магнитного поля с индукцией $B = 0,5$ Тл, сферическая НЧ магнетита с диаметром 15 нм приобретет энергию $U_M = M_s \rho V_M B \approx 100$ кВТ ($M_s \approx 80$ А м² / кг – намагниченность насыщения магнетита, ρ – плотность НЧ, V_M – объем НЧ). Эта энергия на 5 порядков больше, чем у одного

электрона или радикала, и в биологическом контексте она может реализовываться через два основных механизма – магнитная гипертермия и магнитомеханическая актуация [232].

В нескольких исследованиях авторы первоначально фокусируют внимание на магнитной гипертермии, но наряду с интерпретациями, основанными на гипотезе о внутриклеточном нагревании, также были предположения, что наблюдаемые явления могут объясняться нетермическими механизмами. Например, проникновение НЧ магнетита (размер ядра магнетита 13 нм; концентрация 10^4 - 10^5 НЧ/клетка) в дендритные клетки и последующее воздействие на них ПМП ($B = 16$ мТл, $f = 260$ кГц) приводило к гибели 95-98 % клеток [233–236]. Следует отметить, что экспозиция в ПМП привела лишь к незначительному повышению температуры с 26 до 29-30 °С, что не могло объяснить цитотоксический эффект. При этом ни НЧ, ни ПМП отдельно не оказывали токсического эффекта на клетки. Первоначально авторы предположили, что наблюдаемое явление было обусловлено локальным «внутриклеточным» нагреванием. Однако в более поздних работах было показано, что в 5 из 12 исследований, связанных с магнитной гипертермией, не было обнаружено повышения температуры, которое было бы достаточно для клеточной гибели [236]. Таким образом, было высказано предположение, что, несмотря на общепринятое использование термина «магнитная гипертермия», при различных параметрах ПМП могут реализовываться несколько механизмов клеточной гибели через апоптоз или некроз, в том числе и нетермические.

Отходя от классической магнитной гипертермии авторы серии работ предположили, что магнитные НЧ под действием ПМП могут оказывать цитотоксическое действие на опухолевые клетки в отсутствие нагревания [237]. Культуру клеток MDA-MB-468 с трижды негативным раком молочной железы поддерживали при 37 °С в течение всего периода воздействия ПМП ($B = 47$ мТл, $f = 233$ кГц). НЧ были конъюгированы с эпидермальным фактором роста (EGF) для нацеливания на рецептор EGF, повышенная концентрация которого наблюдается на поверхности вышеупомянутых клеток. Под действием ПМП магнитные НЧ, конъюгированные с EGF, оказывали значительное цитотоксическое действие, приводящее к снижению жизнеспособности клеток по сравнению с НЧ без EGF. Стоит отметить, что клеточная гибель наблюдалась без ощутимого повышения температуры в условиях, когда нельзя было ожидать клеточного апоптоза. Поэтому было высказано предположение о магнитомеханической силе, которая действует на рецептор EGF посредством связанных с ним конъюгатов EGF-НЧ. В более поздней работе та же группа предположила, что модифицированные EGF магнитные НЧ в ПМП могут разрушать лизосомы и вызывать апоптоз клеток в отсутствии нагревания [238]. Этот эффект может объясняться тем, что рассеяние энергии происходит за счет механического вращения НЧ в ПМП, что создает сдвиговые и растягивающие напряжения в лизосомальных мембранах клеток, которые увеличивают их проницаемость [239; 240].

Похожий подход применили в исследовании, где коммерчески доступные магнитные НЧ размером 100 нм использовались для индукции гибели опухолевых клеток с помощью вращающего магнитного поля [241]. НЧ были модифицированы антителами против белка лизосомальной мембраны – LAMP1, для усиления их связывания с внутренней частью лизосомальных мембран клеток. Под действием низкочастотного ПМП ($B = 30$ мТл; $f = 20$ Гц) было показано увеличение эффективности накопления НЧ, где они преимущественно локализовались в лизосомах. Последующее воздействие низкочастотного «вращающего» ПМП приводило к повреждению лизосом и клеточной гибели. Таким образом, было показано, что низкочастотное ПМП, которое вызывает вращение каждой отдельной НЧ вокруг своей оси, приводило к апоптозу посредством механических сил, действующих на лизосомальные мембраны без какого-либо нагрева [238; 242].

Нетермические гипотезы, обсуждаемые в вышеописанных публикациях, имеют под собой физическое обоснование. Магнитные НЧ под действием внешнего магнитного поля, помимо нагрева (что обусловлено магнитной релаксацией по Неелю – переориентацией магнитных моментов НЧ в поле, когда частица остается статичной), также подвергаются механическому вращению. В равномерном ПМП с индукцией B есть момент вращения $L = \mu \times B$ (μ – магнитный момент), в неоднородном ПМП момент вращения дополняется силой F . В некоторых исследованиях использовалось вращающееся или прецессирующее магнитное поле с осью вращения вектора индукции, перпендикулярной или наклоненной относительно направления поля, а не ПМП. Амплитуда такого поля может быть постоянной или изменяющейся с заданной частотой. По сути, вращающее поле – это своего рода ПМП, поскольку обычно оно создается возвратно-поступательным или вращательным движением постоянных магнитов или суперпозицией двух ортогональных переменных полей, имеющих фазовый сдвиг $\pi/2$ между собой.

Для оценки динамики магнитных НЧ в низкочастотном и сверхнизкочастотном ПМП была описана модель, где рассматривалось поведение НЧ с магнитным ядром и сплошной золотой оболочкой, которые были покрыты полимерными цепями [232]. Поведение НЧ после воздействия однородного ПМП будет зависеть от отношения их магнитной энергии в поле к потерям энергии к вязкому трению, а также от магнитостатических взаимодействий и энергии тепловых колебаний [243]. Можно пренебречь магнитостатической энергией взаимодействий магнитных НЧ, если эти частицы имеют золотое и/или полимерное покрытие с суммарной толщиной, превышающей в несколько раз радиус магнитного ядра R_m . Энергия системы достигает своего минимума, когда векторы магнитного момента μ и индукции B становятся коллинеарными и сонаправленными. По синусоидальному закону с частотой f релаксация

магнитного момента НЧ происходит за счет механического вращения частиц, то есть релаксация по Брауну, как показано на Рисунке 1.12.

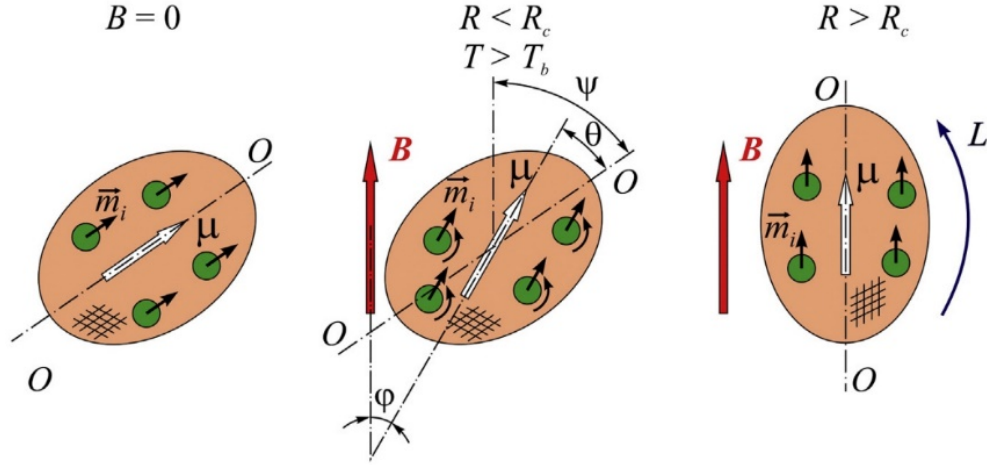


Рисунок 1.12 – Однодоменная магнитная НЧ во внешнем магнитном поле. Слева направо – первоначальное состояние, релаксация по Неелю и релаксация по Брауну. О-О – ось легкого намагничивания, m_i и μ – магнитные моменты i -го атома и НЧ, соответственно, L – крутящий момент, T_b – температура блокировки магнитных моментов атомов [232]

Конкурентным процессом является релаксация по Неелю, когда магнитные НЧ остаются неподвижными, но спины каждого атома вращаются, преодолевая энергию кристаллографической анизотропии. Релаксация по Брауну происходит быстрее, чем релаксация по Неелю, если радиус НЧ больше некоторого критического значения R_c . Эта величина зависит от природы ферро- или ферримагнитного материала, например, для магнетита это значение $R_c \approx 7$ нм [244]. Следовательно, для обеспечения эффективного преобразования энергии ПМП в энергию механического движения НЧ, частица должна иметь радиус $R_m > R_c$. Однако на низкой частоте ПМП (когда полупериод колебаний поля превышает время релаксации по Брауну) небольшие магнитные НЧ, которые как правило релаксируют по Неелю, также могут вращаться. В этих условиях угол между направлением вектора поля и осью малой спонтанной намагниченности уменьшается, что способствует уменьшению магнитной энергии системы. Принимая во внимание вышеизложенные предположения, вращательное движение сферической магнитной НЧ в вязкой среде под действием ПМП, будет описываться следующим уравнением:

$$I \frac{d^2 \varphi}{dt^2} = -\mu B(t) \sin \varphi - 6\eta V_{HD} \frac{d\varphi}{dt} \quad (2)$$

где I – момент инерции, φ – угол между вектором магнитного момента НЧ и направлением ПМП, μ – магнитный момент частицы, B – индукция магнитного поля, η – вязкость среды, V_{HD} – гидродинамический объем.

Критическая частота (максимальная угловая скорость) может быть представлена как:

$$\omega_c = B \frac{M_s \rho}{6\eta} \left(\frac{R_M}{R_{HD}} \right)^3, \quad (3)$$

где R_M – радиус ядра магнетита, R_{HD} – гидродинамический радиус, M_s – намагниченность насыщения, ρ – плотность магнетита.

Для частиц, которые имеют соотношение $R_M/R_{HD} = 1/2$ в водной среде при 40 °С и в экспозиции поля $B = 100$ мТл, ω_c составит $1,5 \times 10^6$ с⁻¹, а f_c – 250 кГц. Это можно считать оценкой максимальной величины параметра ω_c , поскольку увеличение гидродинамического размера НЧ, уменьшение магнитной индукции или повышение вязкости среды должны привести к ее значительному снижению. Например, для НЧ с соотношением $R_M/R_{HD} = 1/5$ в средах с вязкостью, превышающей вязкость воды на 1-2 порядка в поле 10 мТл, значение ω_c становится равным 10-100 с⁻¹. Таким образом, критическая частота f_c лежит в диапазоне от нескольких герц до нескольких десятков килогерц и дальнейшее ее увеличение не будет приводить к усилению магнитомеханических сил.

1.2.4 Магнитофекция

Магнитофекция – эффективный метод трансфекции клеток с помощью комплексов нуклеиновых кислот и магнитных НЧ, объединяющий преимущества биохимических и физических подходов, который отличается безопасностью, низкой иммуногенностью и цитотоксичностью [245]. Процесс доставки вирусных и невирусных векторов является диффузионно-ограниченным, то есть длительное время, необходимое для того, чтобы векторы сталкивались с клетками-мишенями и связывались с их поверхностью, является основным препятствием для успешной доставки НК. Это ограничение еще более выражено *in vivo*, где опсонизация, иммунная система и деградационные процессы инактивируют векторы [246]. Для преодоления этой проблемы при стандартном подходе магнитофекции постоянный магнит с высоким градиентом поля помещается под культуральный планшет с клетками, куда добавляется магнитный наноконкомплекс. Под действием магнитного поля осуществляется механическая стимуляция, которая способствует более эффективному эндоцитозу комплекса частиц-генов, не нарушая при этом клеточную мембрану [15].

В первой публикации по магнитофекции были описан подход увеличения эффективности трансфекции с помощью комплексов покрытых стрептавидином магнитных НЧ и ретровирусных векторов, меченных биотином, под действием постоянного магнитного поля [247]. В работе [248] были использованы суперпарамагнитные НЧ оксида железа, покрытые полиэтиленгликолем,

электростатически связанные с невирусными и вирусными векторами (коммерчески доступные трансфекционные агенты Lipofectamine и GenePorter, комплексы полиэтиленимин-ДНК и 1,2-диолеоил-3-триметиламмоний-пропан-холестерин-ДНК, рекомбинантные аденовирусы и ретровирусы). Для магнитофекции *in vitro* магнитные НЧ и генные векторы помещались в чашки для культивирования клеток, под которые располагали постоянные неодимовые магниты (сплав неодима, бора и железа). Магнитные градиентные поля были достаточны для стимулирования седиментации магнитных НЧ в течение нескольких минут, что значительно ускорило кинетику трансфекции (10-минутная инкубация клеток с векторами по сравнению с 2-4 часами для стандартных протоколов). Было показано, что применение магнитного поля в совокупности с магнитными НЧ повышает уровни экспрессии репортерного гена до трех порядков по сравнению со стандартными векторами в тех же условиях без поля. Это объясняется тем, что для большинства векторов кинетика процесса магнитофекции имела логарифмический профиль, в то время как процесс с тем же вектором в отсутствие магнитного поля имел линейную зависимость между экспрессией репортерного гена и временем инкубации клеток с вектором [249]. Это означает, что, преодолевая диффузионный барьер путем применения магнитофекции, возможно достичь высоких уровней экспрессии трансгена при низкой дозе вектора и коротком времени инкубации. Магнитофекция также была успешно использована для доставки АСО [250] и миРНК [246] для подавления экспрессии генов.

Также была показана эффективность магнитофекции для труднотрансфецируемых клеток, таких как неиммortalизованные первичные культуры (первичные эпителиальные клетки легкого [251], эндотелиальные клетки кровеносных сосудов [252], кератиноциты и хондроциты [246]).

Помимо использования постоянных магнитов, в ряде исследований за последние годы было продемонстрировано использование массивов колеблющихся магнитов, а также импульсных электромагнитов, которые ориентированы перпендикулярно вектору намагниченности магнита под чашкой для культивирования [253; 254]. Такая конструкция позволяет ввести боковой компонент движения, что способствует более равномерному распределению НЧ на клеточной мембране, увеличивая при этом вероятность более выраженного эндоцитоза комплекса частиц-генов, тем самым значительно повышая эффективность трансфекции по сравнению с использованием только постоянного магнита [13; 14]. Однако, перенос данной технологии на *in vivo* модель в качестве потенциальной генной терапии до сих пор остается труднодостижимым в связи с ограничениями мощности постоянных магнитов и направления действия магнитного поля.

Глава 2 Материалы и методы

2.1 Материалы

2.1.1 Реактивы

Олеат натрия ($\geq 95\%$), олеиновая кислота (технический класс, 90%), 1-октадецен (технический класс, 90%), 1-бутанол (безводный, $99,8\%$), 1-метил-2-пирролидон (99%), безводный хлорид железа III (97%), стандарт железа (1000 мг/л Fe в 2% азотной кислоте), реагент для определения концентрации железа FerroZine (97%), бензиловый эфир (98%), триоктиламин (98%), ацетат натрия ($> 99\%$), трипсин, трис(гидроксиметил)аминометан (ТРИС) ($\geq 99\%$), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) ($\geq 99\%$), лизосомальный краситель Red DND-99, параформальдегид, ферроцианид калия ($\geq 99\%$), нейтральный красный ($\geq 90\%$), Pluronic F-127, среда для культивирования DMEM/F12 Gibco, эмбриональная бычья сыворотка (FBS) и L-глутамин ($\geq 99\%$) фирмы Sigma-Aldrich, США.

Реагент для выделения РНК TRIzol, ингибитор РНКазы RiboLock, реагент для трансфекции Lipofectamine 3000, среда для проведения трансфекции Opti-MEM, дезоксирибонуклеаза I (DNase I, RNase-free), набор для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) Maxima First Strand для RT-qPCR фирмы Thermo Fisher Scientific, США.

Quant-iT RiboGreen RNA Assay (Invitrogen, США), D сорбитол (Acros, Бельгия), Triton-X 100 (технический класс, ICN Biochemicals, США), готовая реакционная смесь для ПЦР с красителем SYBR Green I qPCRmix-HS (Евроген, Россия), физиологический раствор ($0,9\%$ водный NaCl) (Гематек, Россия), (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолиум) – МТС-тест (Abscam, Англия), набор для окраски срезов по Перльсу (BioVitrum, Россия), доксорубин гидрохлорид ($\geq 98\%$, Glentham, Великобритания), таблетки натрий-фосфатного буфера (Biotechnology Grade, Amresco, США), реагент для криоблоков Tissue-Tek O.C.T. Compound (Electron Microscopy Sciences, США), среда для культивирования DMEM (Corning, США), промывочный буфер для РНК RPE (Qiagen, Германия), колонки для выделения РНК (Thomas Scientific, США).

Флуоресцентные метки DiD (1,1-диокадецил-3,3,3,3-тетраметилиндокарбоцианин перхлорат) и DiI (1,1-диокадецил-3,3,3,3-тетраметилиндокарбоцианин перхлорат) производства Thermo Fisher Scientific, США. Хлороформ ($\geq 99,8\%$), гексан ($\geq 98\%$), этанол (95%), ацетон ($\geq 99,5\%$), уксусная кислота, концентрированные азотная (HNO_3) и соляная (HCl) кислоты, глицерин (чистый), сахароза фирмы Компонент-Реактив, Россия. Холестерин ($\geq 99\%$), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-

N-[амино(полиэтиленгликоль)-2000] аммониевая соль (DSPE-PEG(2000)-NH₂) фирмы Avanti Polar Lipids, США. Липидоид C12-200 (1,1'-(2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидодецил)амино)этил)пиперазин-1-ил)этилазанедиил)дидодекан-2-ол) был синтезирован на заказ по опубликованной методике [166]. Синтез проводился через раскрытие оксиранового цикла 1,2-эпоксидодекана под действием аминопроизводного пиперазина. Подтверждение состава и строения соединений основано на результатах комплексных физико-химических исследований (спектроскопия ядерного магнитного резонанса ¹H и ¹³C, масс-спектроскопия, элементный анализ). Все растворы готовились на основе дистиллированной (DI) воды Milli-Q.

2.1.2 Расходные материалы

Диализные пакеты SERVAPOR MWCO 25 кДа (SERVA Electrophoresis GmbH, Германия) спин-колонки RNeasy Mini Kit (Qiagen, Германия), 96-луночные черные микропланшеты с прозрачным дном для флуоресцентных анализов (Corning, США), стерильные пластиковые культуральные флаконы EasyFlask 25 см² (Thermo Fisher Scientific, США), одноразовые наконечники для дозаторов на 10, 200, 1000 и 5000 мкл (Eppendorf, Германия), серологические пипетки на 2, 5 и 10 мл (Sartorius AG, Германия), микроцентрифужные пробирки типа Эппендорф на 0,2, 1,5 и 2 мл (Scientific Specialties Inc., США), SnapStrip&UltraFlux ПЦР-пробирки на 0,2 мл (Scientific Specialties Inc., США), центрифужные пробирки типа фалькон объёмом 15 и 50 мл (Corning Incorporated, США), стеклянная посуда.

2.1.3 Оборудование

Система очистки воды Milli-Q-RO4 (Millipore, США), система очистки воды Hydrolab HLP 5UV (Химтест Украина, Украина), насос электрический для заполнения пипеток 1-100 мл (Sartorius AG, Германия), нагревательные плитки с перемешиванием C-MAG HS 7 и RCT basic, магнитное перемешивающее устройство Color squid white, погружной термостат IC basic pro 12 c (IKA Werke GmbH & Co. KG, Германия), механические дозаторы Eppendorf Research plus, центрифуга MiniSpin plus (Eppendorf, Германия), ультразвуковая ванна (ПСБ-Галс, Россия), лабораторные весы VIBRA AJ и аналитические весы ViBRA AF (VIBRA-inc, Пуэрто-Рико), центрифуга компактная Hettich Eba 280 S и центрифуга настольная EBA 20 (Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Германия), вакуумная насосная система с дистанционным управлением KNF SC 920, ротационный испаритель RC 900 и чиллер C 900 (KNF Neuberger Inc., США), морозильник ARCTIKO ULUF 450-2M (ARCTIKO, Дания), сушильный шкаф с принудительной конвекцией FD 53 (BINDER, Германия), система для визуализации клеток EVOS FL со световыми кубами

DAPI, GFP, RFP, Cy5 (Life Technologies, США), автоматизированный счетчик клеток MOXI Z Mini (Orflo Technologies, США), инвертированный биологический микроскоп PRIMO VERT (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Германия), ламинарный шкаф SafeFAST Elite класса II A1/A2 (Faster S.r.l., Италия), бокс биологической безопасности Streamline Класс II (ESCO Corporation, США), CO₂ инкубатор IncuSafe MCO-18AIC (SANYO Electric Co., Ltd., Япония), генератор переменного низкочастотного магнитного поля TOR 03/15 Electromagnet (Наноматериалы, Россия), Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical, Нидерланды), дифрактометр Rigaku Ultima IV (Rigaku Corporation, Япония), вибромагнетометр в системе Quantum Design PPMS DynaCool (Quantum Design, Inc., США), термоанализатор Netzsch STA 449 F3 (Netzsch, Германия), просвечивающий электронный микроскоп JEOL JEM 1200 (JEOL Ltd., Япония), атомно-эмиссионный спектрометр с микроволновой плазмой Agilent 4200 MP-AES (Agilent Technologies, США), автоклав Bioclave 16L (Benchmark Scientific, Inc., США), микропланшетный ридер SpectraMax M5 (Molecular Devices, США), амплификатор детектирующий ДТпрайм (ДНК-Технология, Россия), атомно-эмиссионный спектрометр 4200 MP-AES (Agilent Technologies, США), системы хранения в жидком азоте Locator JR Plus (Thermo Fisher Scientific, США), спектрофотометр Thermo Scientific Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, США), амплификатор SimpliAmp VeriFlex (Thermo Fisher Scientific, США), флуориметр Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, США), капиллярная система электрофореза LabChip GXII Touch HT (PerkinElmer, США), NanoDrop One/OneC Microvolume UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, США), автоматический биохимический анализатор (HiTechnologies, США), МР-томограф ClinScan (Bruker Biospin, США), замораживающий микротом (MNT Slee, Германия), микроскоп Leica DMLB 100S (Германия), мультифотонный микроскоп A1 MP (Nikon, Япония), гомогенизатор MP Lyser (Applied biosystems, США).

2.1.4 Малые интерферирующие РНК

Использованные в исследовании миРНК были любезно предоставлены к.х.н. Зацепиным Тимофеем Сергеевичем. В качестве модельного препарата для загрузки на функционализированные липидами НЧ была выбрана миРНК к мРНК *ApoB* следующего строения: GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAAsT/ uuGGAUcAAAUuAAGAuUCcscsUs-(invdT) (A – аденозин, C – цитидин, G – гуанозин, U – уридин, u – 2'-О- метилуридин, c-2'-О-метилцитидин, s – тиофосфат), которая была химически модифицированная путем введения по 2'-концу цепочки метокси-групп и фтора, в структуре фосфатной группы кислород был частично замещен на серу с образованием тиофосфатной группы. Также со стороны 3'-конца антисмысловой последовательности был добавлен фрагмент инвертированного тиминмонофосфата, что приводит к ингибированию деградации последовательности экзонуклеазами. Данная

последовательность использовалась ранее и показала свою эффективность [255]. Для визуализации процессов трансфекции функционализированных липидами частиц, содержащих миРНК, была синтезирована аналогичная последовательность с добавлением флуорофора (Cy5) на смысловую цепь: GGAAUCuuAuAuuuGAUCcAAs-(s-Cy5)/uuGGAUcAAuAuAAGAuUCscsUs-(invdT). В качестве контроля в экспериментах по изучению действия НЧ с загруженной миРНК к мРНК *ApoB* использовались аналогичные частицы с загруженной миРНК к мРНК люциферазы (Luc) следующего строения: cu(Uf)a(Cf)g(Cf)u(Gf)a(Gf)u(Af)c(Uf)u(Cf)g(Af)-(invdT) / Ts(Cf)g(Af)a(Gf)u(Af)c(Uf)c(Af)g(Cf)g(Uf)a(Af)gTsT. миРНК были синтезированы на заказ – каждая цепь миРНК *ApoB* была индивидуально синтезирована на твердофазном носителе с использованием автоматизированного олигонуклеотидного синтезатора MerMade 6/12 (BioAutomation, США) по амидофосфитной схеме. После проведения синтеза РНК была удалена с твердофазного носителя с последующим деблокированием защитных групп.

2.1.5 Клеточные культуры

Эксперименты проводили на клетках линий гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 и Huh7, а также на клетках линии карциномы молочной железы мыши 4T1. Исходные стоки клеток культуры HepG2 (ATCC, HB-8065) и 4T1 (ATCC, CRL-2539) были приобретен коммерческим способом через банк клеток. Исходный сток клеток линии Huh7 был получен из отдела структуры и функций РНК научно-исследовательского института Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ.

Работу с клетками проводили в стерильном ламинарном шкафу II класса защиты SafeFAST Elite 212 S (Faster, Италия). Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе MCO-18AIC CO₂ Incubator (Sanyo, Япония) при 37 °C и 5 % углекислого газа. Для культивирования клеточной линии Huh7 использовали среду DMEM (Corning), содержащую 4,5 г/л глюкозы, 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) и 4 mM L-глутамина, для клеточной линии HepG2 – среду DMEM/F12 (Gibco), содержащую 10 % FBS и 4 mM L-глутамина и для 4T1 – среду RPMI 1640 (Gibco), содержащую 10 % FBS и 2 mM L-глутамина.

2.1.6 Животные модели

Эксперименты выполнялись на половозрелых самках мышей породы BALB/c возрастом 6-7 недель, весом 19-20 грамм, которые были приобретены в Центральном питомнике лабораторных животных Академии медицинских наук (Андреевка, Россия) и содержались в

индивидуально вентилируемых клетках (протокол № 1/2016 от 03.02.2016, утвержденный этическим комитетом Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н. И. Пирогова»).

2.2 Методы

2.2.1 Синтез прекурсора

Комплекс олеата железа III (Fe(III)-OL) получали по методике, описанной в литературе, с небольшими изменениями [211]. В трехгорлой колбе объемом 2 л, снабженной термометром, 240 ммоль олеата натрия растворяли в смеси, состоящей из 160 мл этанола, 120 мл воды и 280 мл гексана, нагревали до температуры кипения (57 °C) при постоянном перемешивании в атмосфере аргона. После полного растворения олеата натрия в реакционную среду медленно, по каплям, добавляли 80 ммоль FeCl₃, растворенного в 20 мл воды. Устанавливали обратный холодильник и выдерживали в течение 4 часов при температуре кипения. После этого содержимое колбы остужали до комнатной температуры и переносили на делительную воронку. Содержимое делительной воронки промывали 5 л DI H₂O. Затем переносили смесь в одnogорлую колбу и упаривали до полного удаления гексана с помощью роторного испарителя, что приводило к получению комплекса олеата железа в виде воскообразного темно-коричневого вещества.

2.2.2 Получение НЧ оксида железа

Для синтеза наночастиц оксида железа использовали метод термического разложения металлоорганических прекурсоров в высококипящих органических растворителях, таких как 1-октадецен, триоктиламин или дибензиловый эфир, с добавлением ПАВ (олеиновая кислота, олеат натрия) в качестве стабилизаторов.

Образец 1 получали путем термического разложения пентакарбонила железа Fe(CO)₅ по описанной в литературе методике с некоторыми изменениями [256]. В трехгорлой колбе объемом 250 мл, снабженной термометром, 18 ммоль олеиновой кислоты (OL) растворяли в 40 мл 1-октадецена, нагревали смесь под током аргона до 110 °C и выдерживали в течение 1 часа. После этого устанавливали обратный холодильник и быстро вводили в реакционную среду 6 ммоль Fe(CO)₅. Затем нагревали смесь со скоростью 3,3 °C/мин до температуры кипения и выдерживание 2 часа. После отключения нагрева и остывания смеси до комнатной температуры, добавляли 150 мл бутанола-1 и отделяли полученные НЧ с помощью магнитной декантации.

Дополнительно НЧ отмывали от ПАВ смесью, состоящей из 120 мл бутанола-1 и 30 мл этанола, при помощи центрифуги (15 мин, 6000 об/мин), после чего очищенные частицы растворяли в хлороформе или гексане и обрабатывали суспензию ультразвуком в течение 5-10 минут.

Образец 2 получали методом термического разложения олеата железа III (Fe(III)-OL) согласно стандартному протоколу с некоторыми изменениями [257]. В снабженную термометром трехгорлую колбу объемом 250 мл загружали 6 ммоль Fe(III)-OL, 24 ммоль OL и 30 мл 1-октадецена и полученную смесь нагревали под непрерывным током аргона при перемешивании до 110 °С и выдерживали при этой температуре в течение 1 часа. После раствор нагревали до температуры кипения (318 °С) со скоростью 3,3 °С/мин при непрерывном перемешивании и выдержали 1 час. Далее раствор охлаждали до комнатной температуры путем удаления источника нагрева. В смесь добавляли 150 мл бутанола-1 и отделяли полученные НЧ с помощью магнитной декантации. Дополнительно НЧ отмывали от ПАВ смесью, состоящей из 120 мл бутанола-1 и 30 мл этанола с помощью центрифугирования (15 мин, 6000 об/мин), после чего растворяли в хлороформе или гексане и обрабатывали суспензию ультразвуком в течение 5-10 минут.

Образцы 3-7 получали методом термического разложения 3 ммоль олеата железа (III) в 30 мл 1-октадецена, с добавлением в качестве стабилизаторов 1 ммоль олеиновой кислоты и варьируемое количество олеата натрия – NaOL (0,21, 0,43, 0,60, 1,2 и 1,5 ммоль, соответственно). Вышеописанную смесь компонентов помещали в трехгорлую колбу объемом 250 мл, снабженной термометром, нагревали под током инертного газа (аргона) до 110 °С, оставляли при этой температуре в течение 1 часа для удаления следов легколетучих соединений. После этого устанавливали обратный холодильник и нагревали смесь до температуры кипения (318 °С) со скоростью 3,3 °С/мин, выдерживали в течение 1 часа. После отключения нагрева и остывания смеси до комнатной температуры, добавляли 150 мл бутанола-1 и отделяли полученные НЧ с помощью магнитной декантации. Дополнительно НЧ отмывали от ПАВ смесью, состоящей из 120 мл бутанола-1 и 30 мл этанола, при помощи центрифуги (15 мин, 6000 об/мин), после чего растворяли в хлороформе или гексане и обрабатывали суспензию ультразвуком в течение 5-10 минут.

Образцы 8-10 получали методом термического разложения 3 ммоль Fe(III)-OL в 30 мл высококипящего органического растворителя, с добавлением в качестве стабилизаторов 1 ммоль OL и 1,5 ммоль NaOL. В качестве растворителя использовали смесь бензилового эфира и триоктиламина в соотношении 1 к 1 для Образца 8 и 1 к 2 для Образца 9, для Образца 10 – чистый триоктиламин, варьируя тем самым температуру кипения реакционной смеси [258]. Вышеописанную смесь компонентов помещали в трехгорлую колбу объемом 250 мл, снабженной термометром, нагревали под током аргона до 110 °С, оставляли при этой

температуре в течение 1 часа для удаления следов легколетучих соединений. После этого устанавливали обратный холодильник и нагревали смесь до температуры кипения (примерно 314, 338 и 365 °C для Образца 8, 9 и 10, соответственно) со скоростью 3,3 °C/мин, выдерживали в течение 1 часа. После отключения нагрева и остывания смеси до комнатной температуры, добавляли 150 мл бутанола-1 и отделяли полученные НЧ магнитной декантацией. Дополнительно НЧ отмывали от ПАВ смесью, состоящей из 120 мл бутанола-1 и 30 мл этанола, при помощи центрифуги (15 мин, 6000 об/мин), после чего растворяли в хлороформе или гексане и обрабатывали суспензию ультразвуком в течение 5-10 минут.

Для синтеза Образцов 11 и 12 был разработан и оптимизирован двухстадийный протокол: на первой стадии получали НЧ оксида железа сферической или кубической формы в диапазоне размеров от 10 до 20 нм, методами, описанным выше, на второй стадии полученные НЧ использовались в качестве зародышей, а их размер увеличивали путем медленного добавления в реакционную среду раствора прекурсора.

В качестве зародышей для Образца 11 использовался Образец 1. 70 мг Образца 1 в 3 мл хлороформа смешивали с 6 мл смеси, состоящей из триоктиламина и бензилового эфира в соотношении 1 к 1, с помощью роторного испарителя удаляли из смеси хлороформ. После этого раствор НЧ перемещали в трехгорлую колбу, снабженную обратным холодильником, высокотемпературным термометром и системой подачи инертного газа, добавляли 1 ммоль OL и 1,2 ммоль NaOL, нагревали под током аргона до 110 °C, оставляли при этой температуре в течение 1 часа для удаления следов воды и других легколетучих соединений. После этого устанавливали обратный холодильник и нагревали смесь до температуры кипения со скоростью 10 °C/мин путем постепенного увеличения мощности плитки. Затем, заранее подготовленный и продегазированный аргоном 0,2 М раствор Fe(III)-OL в 40 мл бензилового эфира (всего 8 ммоль олеата железа), вводили по каплям в реакционную среду с НЧ со скоростью 3 мл/час с помощью шприцевого инфузионного насоса. После окончания добавления раствора прекурсора, выдерживали смесь еще 30 минут и охлаждали до комнатной температуры путем удаления источника нагрева. В реакционную среду добавляли 150 мл бутанола-1 и отделяли полученные НЧ магнитной декантацией. Дополнительно НЧ отмывали от ПАВ смесью, состоящей из 120 мл бутанола-1 и 30 мл этанола с помощью центрифугирования (15 мин, 6000 об/мин), после чего растворяли в хлороформе или гексане и обрабатывали суспензию ультразвуком в течение 5-10 минут.

В качестве зародышей для Образца 12 использовался Образец 7. 70 мг Образца 7 в 3 мл хлороформа смешивали с 6 мл смеси, состоящей из триоктиламина и бензилового эфира в соотношении 1 к 1, с помощью роторного испарителя удаляли из смеси хлороформ. После этого раствор НЧ перемещали в трехгорлую колбу, снабженную обратным холодильником,

высокотемпературным термометром и системой подачи инертного газа, добавляли 1 ммоль OL и 1,2 ммоль NaOL, нагревали под током инертного газа аргона до 110 °С, оставляли при этой температуре в течение 1 часа для удаления следов легколетучих соединений. После этого устанавливали обратный холодильник и нагревали смесь до температуры кипения со скоростью 10 °С/мин с постепенным увеличением мощности плитки. Затем, заранее подготовленный и продегазированный 0,2 М раствор Fe(III)-OL в 14 мл бензилового эфира (всего 2,8 ммоль олеата железа), вводили по каплям в реакционную среду с НЧ со скоростью 3 мл/час с помощью шприцевого инфузионного насоса. После окончания добавления раствора прекурсора, выдерживали смесь еще 30 минут и охлаждали до комнатной температуры путем удаления источника нагрева. В реакционную среду добавляли 150 мл бутанола-1 и отделяли полученные НЧ магнитной декантацией. Дополнительно НЧ отмывали от ПАВ смесью, состоящей из 120 мл бутанола-1 и 30 мл этанола с помощью центрифугирования (15 мин, 6000 об/мин), после чего растворяли в хлороформе или гексане и обрабатывали суспензию ультразвуком в течение 5-10 минут.

2.2.3 Определение концентрации железа

Для определения концентрации железа (наночастиц оксида железа) к 20 мкл аналита добавляли 80 мкл концентрированной соляной кислоты и обрабатывали ультразвуком при температуре 50 °С в течение 2 часов. После этого анализируемый раствор разбавляли в 150 раз DI H₂O и смешивали с феррозиновым тестом в объемной доли 15 к 1, который был приготовлен согласно приведенному протоколу [259]. Полученный окрашенный в фиолетовый цвет раствор был перенесен в лунки 96-ти луночного планшета по 300 мкл в каждую, после чего производилось измерение оптической плотности на длине волны 580 нм. Из измеренных показателей с помощью калибровочной кривой определяли искомую концентрацию. Калибровочную кривую строили, используя растворы с известной концентрацией (стандарт железа в 2 % азотной кислоте), которые проходили аналогичные с образцом стадии разбавления.

2.2.4 Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)

Микрофотографии образцов были получены на просвечивающем электронном микроскопе JEOL JEM-1400 с рабочим ускоряющим напряжением 120 кВ. Образцы готовились нанесением 1-3 мкл сильно разбавленной суспензии НЧ на покрытую формваром медную сетку (300 mesh), которая затем сушилась на воздухе. Перед нанесением, в случае необходимости, НЧ гидрофилизировали путем покрытия хлоридом цетилтриметиламмония (ЦТМА). Для этого 50

мкл НЧ в хлороформе с концентрацией 10 мг/мл смешивали с 100 мкл 5 мМ раствора ЦТМА и обрабатывали ультразвуком до полного удаления хлороформа. Средний размер НЧ получали из светлопольных ПЭМ-микрофотографий с помощью программного обеспечения ImageJ, где анализировали как минимум 1000 индивидуальных частиц. За диаметр ограненных частиц принимали длину наибольшей диагонали. С помощью пакета для численного анализа данных программы OriginPro определяли тип распределения частиц по размеру (тест на нормальность распределения), средний размер и стандартное отклонение.

2.2.5 Рентгенофазовый анализ (РФА)

Рентгеновские спектры исследуемых образцов для определения параметров кристаллической структуры были получены на дифрактометре Rigaku Ultima IV (напряжение трубки 40 кВ, ток – 30 мА, излучение Co-K α с $\lambda = 0,179$ нм или Cu-K α с $\lambda = 0,154$ нм). Диапазон дифракционных углов 2θ при излучении Cu-K α от 10° до 100° (шаг $0,1^\circ$, время экспозиции на точку съёмки – 3 секунды), при излучении Co-K α от 20° до 120° (шаг $0,05^\circ$, время экспозиции на точку съёмки – 3 секунды). Качественный фазовый анализ проводили путём сопоставления спектров с использованием базы данных PHAN; интенсивности приведенных пиков нормировали на значение максимального пика.

2.2.6 Динамическое рассеяние света (ДРС)

Для определения гидродинамического размера и ζ -потенциала НЧ готовили раствор с концентрацией 0,2 мг/мл, измерение проводили с помощью прибора Zetasizer Nano ZS при 25°C . Для измерения размера гидрофобных НЧ в хлороформе использовали стеклянные кюветы. Гидродинамический размер и ζ -потенциал функционализированных НЧ определяли в водной среде с использованием капиллярных пластиковых кювет с электродами.

2.2.7 Термогравиметрический анализ (ТГА)

ТГА анализ проводился на синхронном термоанализаторе Netzsch STA 449 F3. Образцы нагревали в алундовых тиглях в атмосфере аргона в температурном интервале от 50 до 800°C со скоростью $10^\circ\text{C}/\text{мин}$. Для проведения ТГА анализа растворы наночастиц предварительно были упарены до состояния порошка на роторном испарителе.

2.2.8 Магнитные свойства

Измерение статических магнитных свойств в интервале магнитных полей с индукцией до 3 Тл при 300 К проводили с помощью установки «Quantum Design» Physical Property Measurement System (PPMS), оборудованной вибромагнетометрической вставкой (VSM), амплитуда колебаний составляла 2 нм, частота – 40 Гц.

2.2.9 Функционализация НЧ

Для функционализации НЧ формуляцией липидов был использован метод замены растворителя [11]. Покрытие НЧ оксида железа формуляцией липидов, состоящий из липидоида C12-200, холестерина, DSPC и DSPE-PEG(2000)-NH₂ в массовом соотношении 75:15:7:3, проводилось путем смешения 2 мл раствора НЧ с концентрацией 2,5 мг/мл в хлороформе с 20 мкл липидов. Для НЧ размером в диапазоне от 10 до 20 нм использовали 50 мкг формуляции, для НЧ размером в диапазоне от 20 до 30 нм – 45 мкг. Для инициации адгезии между липидами и поверхностью НЧ добавляли 4 мл растворителя N-метил-2-пирролидона, при этом раствор становился мутным из-за кластеризации наночастиц. Смесь НЧ и липидов обрабатывали ультразвуком в течение 1-2 часов, пока раствор не становился прозрачным. После этого из смеси полностью удаляли хлороформ с помощью роторного испарителя для предотвращения разделения фаз после переноса частиц в воду. Затем N-метил-2-пирролидон удалялся диализом частиц (диализный мешок с размером пор 12-14 кДа) против 4 литров DI воды в течение двух суток с, как минимум, однократной заменой воды. Раствор после диализа профильтровывали в стерильных условиях через шприцевой фильтр с размером пор 0,2 мкм.

Покрытие НЧ с помощью Pluronic F-127 осуществляли согласно описанной методике с некоторыми изменениями [260; 261]. 15 мл раствора НЧ в толуоле (C = 1 мг/мл по оксиду железа) смешивали с аналогичным объемом Pluronic F-127 в воде (C = 25 мг/мл), интенсивно перемешивали в течение ночи. Полученную суспензию центрифугировали (1000 g) для отделения водной фазы, которую собирали и снова центрифугировали (12 000 g) для осаждения наночастиц. Осадок НЧ повторно растворяли в DI воде при интенсивном озвучивании.

2.2.10 Цитотоксичность экспериментальных образцов

Для изучения токсичности НЧ *in vitro* использовался стандартный MTS-тест, протокол проведения эксперимента соответствует рекомендациям производителя. Для анализа использовали последовательные серийные разведения образцов функционализированных

липидами НЧ в диапазоне концентраций от 400 до 6,25 мкг/мл (по оксиду железа) и от 600 до 1,2 мкг/мл (по оксиду железа) для миРНК-загруженных НЧ. Время инкубации НЧ с клетками составило 24 часа, после чего добавляли MTS-тест, проводили инкубацию в течение 4 часов и спектрофотометрически оценивали показатель оптической плотности на длине волны 490 нм. В качестве контроля использовали интактные клетки без добавления экспериментальных образцов. Выживаемость рассчитывали, как отношение оптических плотностей в лунках с экспериментальными образцами к лункам с интактными клетками. Количественный расчет концентрации соединения, вызывающей цитотоксическое действие на половину клеточной культуры (CC_{50}), проводили с помощью кривых доза-ответ (программное обеспечение GraphPad Prism)

2.2.11 Определение концентрации терапевтического агента

Концентрацию миРНК *ApoB* определяли с помощью флуоресцентного красителя RiboGreen на микропланшетном ридере SpectraMax. Для построения калибровочной кривой подготавливали раствор миРНК *ApoB* с исходной концентрацией 100 нг/мл в ТЕ буфере (10 мМ Трис-HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 7,5) из которого готовили серию разведений: 50, 25, 12,5 и 5 нг/мл. В лунку 96-ти луночного планшета вносили 100 мкл раствора миРНК с известной концентрацией и 100 мкл рабочего раствора красителя RiboGreen (исходный сток RiboGreen разводили в 2000 раз ТЕ буфером), инкубировали 3-5 минут при комнатной температуре в защищенном от света месте, затем снимали интенсивность флуоресценции (длина волны возбуждения = 480 нм, эмиссии = 530 нм). Из полученных зависимостей интенсивности флуоресценции от концентрации миРНК строили калибровочную кривую, которую в дальнейшем использовали для определения искомых концентраций миРНК.

Для определения эффективности загрузки миРНК на функционализированные липидами НЧ, интенсивность флуоресценции миРНК-загруженных НЧ измерялась с добавлением Тритон X-100 в буфер ТЕ в качестве ПАВ для разрушения липидного покрытия [262]. Эффективность загрузки рассчитывали, как отношение количества миРНК, измеренной в ТЕ буфере с добавлением Тритон X-100, к изначально добавленному количеству миРНК. Калибровочную кривую строили по описанной выше процедуре, но вместо ТЕ буфера использовали ТЕ буфер с добавлением Тритон X-100. В качестве фонового сигнала вычитали значение интенсивности флуоресценции RiboGreen в присутствии функционализированных липидами НЧ, не загруженных миРНК.

После выделения из клеток, концентрацию суммарной РНК и одноцепочечной ДНК определяли с помощью наборов для количественной оценки на флуориметре Qubit 4.0 согласно

протоколу производителя. Подготавливали раствор красителя (набор для количественной оценки ДНК или РНК) разведением в буфере в 200 раз. К 10 мкл каждого стандарта добавляли 190 мкл раствора красителя, производили измерение флуоресценции для калибровки. Для определения концентрации неизвестных образцов смешивали 3 мкл раствора ДНК или РНК с 197 мкл раствора красителя.

Концентрации доксорубина определяли по оптической плотности на длине волны $\lambda = 495$ нм с помощью спектрофотометра. Для этого предварительно строили калибровочную кривую доксорубина в диапазоне концентраций от 1 до 50 мкг/мл (96-луночный планшет, 300 мкл/лунка), по которой определяли искомую концентрацию. Загрузку доксорубина на НЧ рассчитывали по разности между исходно добавленным доксорубином и его измеренной концентрации в супернатанте после центрифугирования (свободный препарат, не связавшийся с НЧ).

2.2.12 Загрузка терапевтического агента на функционализированные НЧ

Методика для загрузки миРНК основана на адсорбции отрицательно заряженных нуклеиновых кислот на поверхность НЧ, покрытых катионными липидами [11; 263; 264]. Перед загрузкой миРНК проводили гибридизацию путем последовательного нагревания и охлаждения в ацетатном буфере, получая целевой дуплекс. Загрузку миРНК в липидные магнитные наночастицы осуществили путем интенсивного перемешивания раствора НЧ с раствором миРНК в ацетатном буфере. Образцы после загрузки были очищены от несвязанных миРНК с помощью диализа в течение 2-х суток против воды в диализных мешках с размером пор 25 кДа. Для оптимизации методики загрузки миРНК была выполнена серия экспериментов, в которой варьировали массовое соотношение формуляции липидов (расчет производился на липидоид C12-200) к миРНК: $w = m_{C12-200}/m_{миРНК}$, w в диапазоне от 5,2 до 0,1. Все операции проводились в стерильных условиях, а для приготовления растворов использовалась свободная от нуклеаз вода.

Для загрузки доксорубина на покрытые Pluronic F-127 НЧ к 0,2 мл водного раствора доксорубина ($C = 5$ мг/мл) добавляли аналогичных объем натрий-фосфатного буфера (5X, $pH = 7,4$) и 10 мл водного раствора НЧ ($C = 0,32$ мг/мл по оксиду железа). Полученную смесь перемешивали на магнитной мешалке в течение суток, после чего центрифугировали до осаждения НЧ и повторно растворяли в натрий-фосфатном буфере.

2.2.13 Трансфекция

Для проведения трансфекции с использованием реагента Lipofectamine 3000, в пробирке типа эппендорф смешивали 48 мкл среды Opti-MEM с пониженным содержанием сыворотки и 2 мкл реагента Lipofectamine. В лунку 12-луночного планшета вносили 49 мкл среды Opti-MEM и 1 мкл 20 или 30 мкМ раствора миРНК в ацетатном буфере (для получения конечной концентрации в лунке 20 и 30 нМ, соответственно). Затем содержимое эппендорфа смешивали с содержимым лунки культурального планшета, проводили инкубацию в течении 15 мин для формирования комплекса трансфекционного реагента с миРНК.

Во время инкубации комплекса с миРНК клетки Huh7 (или HepG2) снимали с поверхности пластика с использованием трипсина, его инактивацию проводили средой DMEM для клеточной линии Huh7 и средой DMEM/F12 для HepG2. После окончания инкубации комплекса Lipofectamine 3000-миРНК в лунку культурального планшета вносили 2×10^5 клеток/лунка в 900 мкл среды Opti-MEM и перемешивали пипетированием. Для подсчета концентрации клеток использовался автоматизированный счетчик клеток MOXI Z Mini. Далее проводили инкубацию клеток в стандартных условиях (37 °C, 5 % CO₂) в течение 48 часов. По завершению инкубации отбирали инкубационную среду из лунок и проводили лизис клеток с использованием TRIzol реагента (стандартный метод фенол-хлороформной экстракции [265]). Порядок проведения трансфекции с экспериментальными образцами миРНК-загруженных НЧ аналогичен описанному выше, за исключением того, что вместо комплекса Lipofectamine-миРНК использовались НЧ, загруженные миРНК.

2.2.14 Выделение и очистка суммарной РНК

По завершению инкубации комплекса Lipofectamine-миРНК или НЧ, загруженных миРНК, с клетками отбирали культуральную среду из лунок и проводили лизис клеток с использованием TRIzol реагента (500 мкл TRIzol/лунка), пипетировали лизат для гомогенизации и переносили в чистую пробирку. Добавляли 100 мкл хлороформа, инкубировали при комнатной температуре 2-3 минуты и центрифугировали образцы со скоростью 12 000 об/мин в течение 15 минут при температуре 4 °C. После центрифугирования смесь разделялась на более низкую красную фазу (смесь фенола и хлороформа), промежуточную и бесцветную верхнюю водную фазу в объеме 250 мкл, которую осторожно переносили в отдельную пробирку и добавляли 500 мкл изопропанола. Для дальнейшей очистки РНК использовали набор спин-колонок Qiagen. Далее 700 мкл полученной смеси наносили на колонку и центрифугировали со скоростью 8 000 об/мин в течение 15 секунд. Далее колонку промывали 700 мкл буфера RWT (8 000 об/мин, 15 секунд) и дважды 500 мкл буфера RPE (первый раз – 8 000 об/мин, 15 секунд; второй раз – 8 000 об/мин, 2 минуты). Суммарную РНК элюировали 40 мкл деионизированной воды в чистую пробирку (10

000 об/мин, 1 минута). Для защиты РНК от деградации в смесь добавляли 1 мкл ингибитора РНКаз RiboLock.

2.2.15 Электрофорез в агарозном геле

Для анализа качества препарата очищенной РНК использовали электрофорез в 1% агарозном геле в неденатурирующих (мягких) условиях с трис-ацетатным буфером, окрашивание проводили бромистым этидием (концентрация 0,5 мкг/мл). Качество РНК определяли путем визуальной оценки соотношения интенсивности полос, соответствующих 18S и 28S рРНК. Для дальнейших экспериментов использовали только те образцы РНК, в которых соотношение интенсивности полос 18S и 28S было не менее 1:1. Увеличение интенсивности полосы 18S говорит о деградации образца.

2.2.16 Синтез первой цепи кДНК на РНК-матрице

Для синтеза первой цепи кДНК на РНК-матрице использовали набор реактивов MMLV RT kit, процедуру проводили согласно рекомендациям производителя. Для этого готовили смесь, состоящую из 6 мкл РНК-матрицы (примерно 120 нг) и 3 мкл случайного декануклеотидного праймера – Random (dN)10-primer (20 мкМ), которую прогревали 2 минуты при 70 °С для расплавления вторичных структур РНК и переносили образцы в лед. Добавляли в смесь следующие компоненты: 4 мкл 5х буфер для синтеза первой цепи, 2 мкл смеси нуклеозидтрифосфатов (10 мМ каждого), 2 мкл дитиотреитола (20 мМ) и 3 мкл MMLV ревертазы (300 единиц). Реакцию проводили в амплификаторе с греющей крышкой в течение 60 минут при температуре 40 °С. Для остановки реакции прогревали смесь 10 минут при температуре 70 °С.

2.2.17 Полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени

ПЦР в реальном времени проводили на детектирующем амплификаторе ДТпрайм с использованием готовой реакционной смеси с флуоресцентным интеркалирующим красителем SYBR Green I (qPCRmix-HS, Евроген) согласно рекомендациям производителя. ПЦР проводили при следующих условиях: первичная денатурация – 95 °С / 5 минут; затем 40 циклов, каждый из которых включал в себя стадию денатурации – 95 °С / 15 секунд, отжиг – 60 °С / 50 секунд. Относительный уровень экспрессии мРНК рассчитывали методом $\Delta\Delta C_t$ [266].

Поиск нуклеотидной последовательности гена-мишени осуществляли с использованием базы NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), последовательности праймеров подбирали с

использованием Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). В экспериментах использовались праймеры следующей последовательности: прямой – 5'-ACTGCAAGGTTGAGCTGGAG-3' и обратный – 5'-TCTTGTTTTCTTCAGCAAGG-3' для мРНК *ApoB* (человек); прямой – 5'-CCATGTGCACTTCAACCTTGC-3' и обратный – 5'-GAAGTCACAGTGTTGAAGTGTTTC-3' для мРНК *ApoB* (мышь). В качестве генов «домашнего хозяйства» использовали ген, кодирующий глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (*GAPDH*), праймеры следующей последовательности: прямой – 5'-GAGTCAACGGATTTGGTTCGT-3' и обратный – 5'-TTGATTTTGGAGGGATCTCG-3' [267].

Оптимальную концентрация праймеров подбирали исходя из расчета эффективности ПЦР. Для этого подготавливали 4 и более последовательных разведения кДНК, полученную из интактных клеток, проводили ПЦР в реальном времени в выбранных условиях и рассчитывали значение цикла ПЦР (СТ). Далее строили график зависимости СТ от логарифма концентрации кДНК. На Рисунке 2.1 приведены примеры полученных графиков для различных концентраций праймеров для мРНК *ApoB* (человек).

Расчет эффективности реакции (ЭР) осуществляется по формуле $ЭР = 10^{(-1/(\text{наклон кривой}) - 1)}$. При 100 % эффективности реакции количество кДНК после каждого цикла будет удваиваться, а угол наклона составит ~ -3,33. Реакция считается эффективной, если ЭР находится в диапазоне от 90 до 110 %, а соответствующий угол наклона составит от -3,70 до -3,00. Таким образом, для концентрации праймеров 0,4 мкМ, ЭР составила 128 и 142 % для *ApoB* и *GAPDH*, соответственно. При концентрации праймеров 0,8 мкМ, ЭР – 101 и 108 %, что укладывается в диапазон значений от 90 до 110 % и говорит о том, что реакция эффективна.

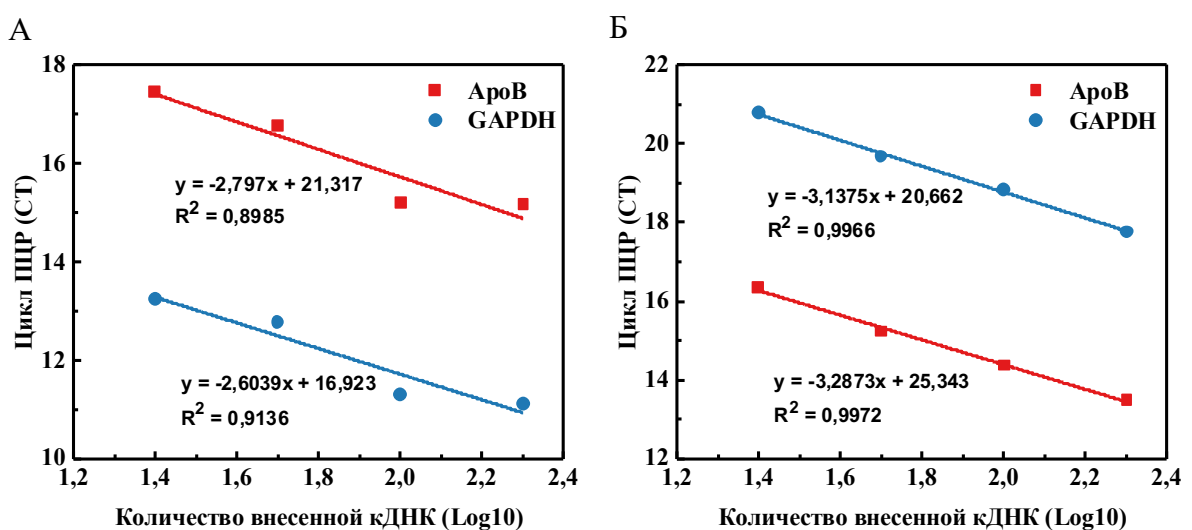


Рисунок 2.1 – Оптимизация реакции ПЦР в реальном времени с помощью оценки эффективности реакции для концентрации праймеров (0,4 мкМ (А) и 0,8 мкМ (Б))

2.2.18 Динамика накопления и внутриклеточное распределение НЧ

Динамика накопления функционализированных липидами НЧ, загруженных миРНК, исследовалась на флуоресцентном микроскопе EVOS (Life technologies). Для визуализации образцов дополнительно загружали в липидное покрытие флуоресцентную липофильную метку DiD (длина волны возбуждения = 644 нм, эмиссии = 665 нм). Для оценки накопления НЧ в клетках проводили трансфекцию по методике, описанной выше, но время инкубации составляло не 48, а 1, 2, 4 и 6 ч. По завершению инкубации (через 1, 2, 4 или 6 ч) отбирали инкубационную среду из лунок и промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) три раза, после чего фиксировали клетки 1 мл 4 % раствора формальдегида в течение 15 минут, промывали 3 раза 1X PBS и проводили съемку с помощью системы EVOS с использованием канала визуализации Cy5 (максимумы $\lambda_{\text{возб}} = 646$ нм и $\lambda_{\text{эм}} = 662$ нм). Исследование внутриклеточного распределения экспериментальных образцов проводилось с помощью конфокального микроскопа Nikon A1R MP+. В исследовании использовались лазеры с эмиссией в 405 нм (Em 425-475 нм), 561 нм (Em 570-620 нм) и 638 нм (Em 663-738 нм). Используемая оптика: Plan Apo 20x/0,75 Dic N, Apo IR 60x/1,27 WI и Apo TIRF 60x/1,49 oil Dic объективы. Контуры клеток визуализировали с помощью дифференциально-интерференционного контраста. Обработку и бинаризацию полученных изображений производили с помощью программного обеспечения NIS-Elements AR.

Для визуализации НЧ, загруженных миРНК, они модифицировались флуоресцентными метками: метка DiI загружалась в липидное покрытие, комплекс миРНК-Cy5 использовался для визуализации РНК, лизосомы окрашивались трекером лизосом Red DND-99.

Для оценки динамики накопления НЧ с загруженным доксорубицином клетки 4T1 предварительно высаживали на стекла в концентрации 120-150 тыс. клеток/чашка Петри. Через 24 часа в культуральную среду с клетками вносили НЧ, загруженные доксорубицином, в концентрации 50 мкг/мл (по доксорубицину), в качестве отрицательного контроля использовали интактные клетки (без добавления частиц). Через 30 мин, 45 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч инкубации НЧ с клетками их промывали натрий-фосфатным буфером три раза и фиксировали 3,7 % раствором формалина в течение 15 минут. Далее проводили съемку с помощью системы EVOS с использованием канала визуализации TRITC (максимумы $\lambda_{\text{возб}} = 544$ нм и $\lambda_{\text{эм}} = 570$ нм), где доксорубин имеет собственную флуоресценцию (максимумы $\lambda_{\text{возб}} = 480$ нм и $\lambda_{\text{эм}} = 590$ нм) [268]; объектив LplanFL PH2 $\times 60$. Последующую обработку полученных изображений проводили в программе ImageJ (Wayne Rasband (NIH), США).

2.2.19 Влияние внешнего магнитного поля на эффективности накопления и трансфекции *in vitro* под действием НЧ

Влияние внешнего переменного низкочастотного магнитного поля на эффективность проникновения миРНК-загруженных НЧ внутрь клеток исследовалось с помощью системы EVOS с использованием канала визуализации Cy5. Для этого в липидное покрытие НЧ загружалась флуоресцентная метка DiD, экспериментальные образцы 30 минут инкубировали с клетками в стандартных условиях (порядок добавления образцов и клеток соответствует описанному выше протоколу для проведения трансфекции) с последующим помещением в магнитное поле на 10, 20 или 30 минут. В качестве контроля экспериментальные образцы инкубировали с клетками аналогичное количество времени.

Количественная оценка влияния внешнего магнитного поля на эффективность трансфекции осуществлялась с помощью ПЦР в реальном времени. Для этого экспериментальные образцы инкубировали с клетками в течение 2 или 6 часов, после чего помещали в генератор магнитного поля (время экспозиции 30 минут) и проводили инкубацию клеток в стандартных условиях (37 °C, 5 % CO₂) в течение 48 часов. По завершению инкубации проводили лизис клеток, выделяли РНК и проводили ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией как описано выше. В качестве контроля проводили трансфекцию с помощью экспериментальных образцов без воздействия магнитного поля.

Используемые в эксперименте параметры поля: частота – 45 Гц, индукция магнитного поля – 80 мТл, режим работы прибора – 30 секунд действие/ 30 секунд пауза. Все экспериментальные исследования были проведены на уникальной научной установке «Генератор переменного низкочастотного магнитного поля TOR 03/15 Electromagnet».

2.2.20 Оценка локализации экспериментальных образцов методами магнитно-резонансной томографии (МРТ) и атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой (АЭС-ИСП) *in vivo*

После 14 дней адаптации в лаборатории, животных взвешивали и распределяли по группам так, чтобы средняя масса тела животных в группе была одинакова; мыши из одной группы находились в максимальном количестве разных клеток; индивидуальное значение массы не отклонялось от среднего значения более чем на 10 %. Идентификацию животных внутри одной клетки осуществляли путем нанесения меток на хвосте перманентным маркером. Распределение экспериментальных образцов для внутривенного введения в сформированных группах производили случайным образом. Внутривенное введение препарата производили в хвостовую

вену. Для этого животное помещали в специальный держатель, хвостовую вену расширяли при помощи двадцатисекундного облучения ИК-лампой, место инъекции протирали 70 % спиртом после чего вводили миРНК-загруженные НЧ в стерильном изотоническом растворе при помощи шприца на 500 мкл с диаметром иглы 30 g. После введения место инъекции зажимали ватой со спиртом для остановки кровотечения. Животным внутривенно вводили раствор наночастиц с концентрацией 0,5 мг/мл в сорбите в количестве 3,64 мг/кг мыши, контрольные животные получали инъекцию сорбитола.

MPT проводили с использованием 7T МР-томографа ClinScan. Для съёмки мышей усыпляли ингаляционным наркозом (2% изофлуран), клали брюшной стороной на магнитную катушку томографа, подкладывая также датчик монитора дыхания. Для получения трансверсальных T2-взвешенных изображений использовался режим с частотным подавлением жира со следующими параметрами Turbo Spin Echo (TSE): TR/TE = 2000/42 мс, echo train length 10, толщина среза 1 мм, матрица 380 x 640, FOV = 34 x 60 мм. Для оценки накопления НЧ в динамике съёмку проводили до введения экспериментальных образцов, а также через 1, 12, 24 и 48 часов после инъекции. Количественное значение сигнала от областей интереса (в качестве контроля использовалась наиболее близкая к катушке область мышцы или желчный пузырь) определяли в программе для работы с изображениями MANGO, Multi-image Analysis GUI.

Биораспределение железа во внутренних органах изучали методом АЭС-ИСП. Внутривенное введение исследуемого препарата НЧ производили согласно описанной выше методике в аналогичных концентрациях. Животным производили транскардиальную перфузию и забор органов через 6 и 48 часов после внутривенного введения растворов НЧ для того, чтобы оценить биораспределение в динамики. Для этого животному вводили интраперитонеально летальную дозу золептила. После исчезновения рефлексов, срединным надрезом вскрывали брюшную полость, грудину рассекали с двух сторон поперек ребер. После этого полость правого предсердия вскрывали, а иглу, введенную в левый желудочек, через канюлю присоединяли к шприцу Жане. Далее была проведена перфузия раствором PBS для исключения попадания в исследуемые образцы железа форменных элементов крови. Затем производили дислокацию шейных позвонков и извлекали органы: печень, селезенку, почки, сердце и легкие. После извлечения, каждый орган был разделен на 2 части (для почек, сердца и легких) и на 3 части (для печени и селезенки), взвешен и помещен в индивидуальную пробирку типа фалькон объемом 15 или 50 мл. Далее, в каждую пробирку было добавлено 3 мл свежеприготовленного раствора смеси, состоящей из концентрированных соляной (2 мл) и азотной кислоты (1 мл). Содержимое пробирок обрабатывали в течение 30 минут в ультразвуковой ванне «Elma» мощностью 200 Вт и оставляли инкубироваться ночь (минимум 12 часов) до полного растворения органов. В каждую пробирку было добавлено 7 мл (для почек, сердца и легких) и 17 мл (для печени и

селезенки) DI воды, стерилизованной пропусканием через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм. Данное разбавление проводилось исходя из предполагаемой концентрации железа в органе, чтобы попасть в рабочий диапазон измеряемых концентрация методом АЭС- ИСП. Пробирки с растворенными органами центрифугировались в течение 10 минут для отделения не растворившегося осадка, после чего растворы пропускались через фильтровальную бумагу.

Метод АЭС-ИСП основан на возбуждении атомарной эмиссии нагревом в плазме с последующим определением интенсивности излучения, позволяющий количественно измерить содержание элементного железа в анализе. Предварительно для измерения концентрации железа приготовили серию из 5 стандартов путем разбавления стандарта с концентрацией 1 г/л железа в 5 % азотной кислоте. Стандарт разбавили 5 % азотной кислотой для получения калибровочных растворов в диапазоне концентраций от 250 до 5000 мкг/л по железу. Объем каждого стандарта составил не менее 10 мл. После построения калибровочной кривой выполнили измерения концентраций в полученных после растворения органов анализах. После измерения концентрации железа в анализе, рассчитывали исходную концентрацию с учетом разведения образцов и – исходя из массы растворенных фрагментов органа – рассчитывали концентрацию железа на грамм органа. Для вычисления концентрации железа, ассоциированной с инъекцией образцов, из полученных значений вычитали среднюю концентрацию железа в органах контрольных животных, не получавших инъекцию (фоновое значение).

Для оценки биораспределения перед извлечением органов была проведена перфузия для исключения попадания в исследуемые образцы железа форменных элементов крови.

2.2.21 Гистологическое исследование

Наличие НЧ в целевых тканях печени через 6 и 48 часов после внутривенной инъекции образцов оценивали в срезах печени, полученных после исследования биораспределения, описанного выше. Визуализация распределение железа в живых тканях проводилась путем гистохимического окрашивания срезов органов по Перлсу с помощью готового набора BioVitrum. На первом этапе были приготовлены срезы печени, выдержанных 24 часа в 30 % растворе сахарозы, на замораживающем микротоме MNT Slee. Толщина срезов составляла 7 мкм. Для увеличения адгезии срезов к предметным стеклам они были подогреты. Затем срезы помещались в дистиллированную воду, после чего переносились в смесь растворов ферроцианида калия и активирующего кислотного буфера (1 к 1) на 30 мин. После тщательного промывания в дистиллированной воде окрашенные срезы переносились в раствор нейтрального красного, разбавленного в 10 раз, на 1 минуту. После окрашивания срезы тщательно промывали в дистиллированной воде, дегидратировали и заключали в 50 % глицерин. Анализ проводили на

микроскопе Leica DMLB 100S.

2.2.22 Эффективность ингибирования экспрессии мРНК *ApoB* *in vivo*, биохимическое исследование крови

Анализ эффективности миРНК-загруженных НЧ в различных дозах (1 и 1,5 мг/кг мыши по миРНК *ApoB*) был проведен через 72 часа после внутривенного введения. С этой целью животным были введены препараты, а также соответствующие контроли (PBS и НЧ, загруженные миРНК к мРНК люциферазы). Через 72 часа животные были наркотизированы с помощью 2 % изофлурана, после чего с помощью хирургических инструментов вскрывали грудную клетку и отбирали кровь из сердца с помощью шприца объемом 1 мл с целью последующего анализа холестерина и печеночных проб, а также уменьшения количества крови в ткани печени. Далее ткань печени изымали и промывали в фосфатно-солевом буфере, после чего кусок ткани массой не более 50 мг помещали в пробирку для гомогенизации, содержащую 1 мл реагента для экстракции РНК ExtractRNA. Кровь центрифугировали при 2000 g в течение 20 минут при температуре 4 °С, после чего отбирали сыворотку, переносили в пустую пробирку и замораживали, хранили при -20 °С до последующего анализа. Образцы ткани гомогенизировали с помощью прибора MP Lyser, после чего проводили экстракцию фенол-хлороформным методом подробно описанном выше. Из полученной РНК была синтезирована кДНК, которая в дальнейшем использовалась в реакции ПЦР в реальном времени. Сыворотка данных образцов была проанализирована с помощью автоматического биохимического анализатора HiTechnologies, определены концентрации холестерина и печеночных ферментов (аспартатаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ)).

2.2.23 Статистический анализ

Предварительно данные были проверены на соответствие закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка и на равенство дисперсий с помощью критерия Левена. В случае нормального распределения и равенства дисперсий расчет доверительных интервалов экспериментальных значений и оценку достоверности различий между ними проводили с использованием однофакторного или двухфакторного дисперсионного анализа для независимых групп (one-way or two-way analysis of variance, ANOVA) с последующим сравнением групп между собой с использованием поправки Бонферрони (при небольшом количестве сравнений – до пяти) или критерия Тьюки при проведении большего числа сравнений.

Глава 3 Результаты и обсуждение

3.1 Синтез НЧ оксида железа

В рамках данного раздела был проведен синтез и оптимизация физико-химических свойств наночастиц оксида железа для их дальнейшей функционализации и биологического тестирования в качестве платформы для доставки терапевтических агентов. Одной из задач работы являлся отбор оптимальных кандидатов, которые должны обладать такими важными свойствами, как коллоидная стабильность, высокая намагниченность насыщения и минимальная коэрцитивная сила для отклика с высокой чувствительностью на действие внешнего магнитного поля. Используя различные подходы к синтезу магнитных наночастиц, были получены экспериментальные образцы в диапазоне размеров от 15 до 30 нм. Варьирование соотношения между металлоорганическим прекурсором железа и ПАВ, использование органических растворителей с разной температурой кипения, а также разработка двухстадийного метода, позволили получить НЧ оксида железа различных форм и размеров (сферы, кубы, октаподы и шестиугольные призмы).

Для получения сферических наночастиц использовали метод термического разложения двух прекурсоров – FeCO_5 и Fe(III)-OL для Образцов 1 и 2, соответственно. В качестве ПАВ использовали олеиновую кислоту (OL), высококипящего органического растворителя – 1-октадецен. OL является одним из наиболее часто используемых ПАВ для синтеза различных НЧ из металлов и оксидов металлов, ввиду наличия карбоксильной группы со значительным сродством к таким поверхностям вместе с неполярной хвостовой группой для стерической стабилизации и предотвращения агрегации НЧ в реакционной среде [258]. На Рисунках 3.1А и 3.1Б представлены изображения Образцов 1 и 2 и их гистограммы распределения по размерам (информация о среднем размере НЧ также приведена в Таблице 3.1). Для обоих образцов характерно достаточно узкое распределение по размерам и выраженная сферическая форма. Термическое разложение или восстановление металлоорганического прекурсора, таких как $\text{M}^{n+}(\text{C}_6\text{H}_5\text{N}(\text{NO})\text{O}^-)_n$, $\text{M}(\text{CO})_5$ или $\text{M}^{n+}(\text{acac}^-)_n$, где М – металл [269–271], в неполярном органическом растворителе в присутствии ПАВ приводит к образованию НЧ оксидов металлов в случае использования комплексов с катионными центрами и металлических НЧ, которые впоследствии окисляются до оксидов (для комплексов с нулевой степенью окисления) [272; 273]. Используемый для синтеза Образца 1 прекурсор – FeCO_5 в присутствии карбоновых кислот при повышении температуры разлагается с образованием промежуточных комплексов с Fe (0), что приводит к мгновенной, «взрывной» нуклеации при достижении критического значения концентрации. По данным рентгенофазового анализа для Образца 1 (Рисунок 3.1В и Таблица 3.1)

видно, что положения пиков рентгеновского спектра идентифицируются как фаза магнетита Fe_3O_4 , которая структурно схожа с другой модификацией оксида железа – маггемитом $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Поскольку метод рентгенофазового анализа не позволяет разделить магнитные фазы оксида железа и точно определить, какая фаза у анализируемого образца (магнетит, маггемит или промежуточная между ними) на Рисунке 3.1 и далее будет указана фаза магнетита Fe_3O_4 , подразумевая и остальные структурно не различающиеся магнитные фазы. В соответствие со значением параметра решетки равным 0,8362 нм, Образец 1 имеет структуру типа $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ с периодом решетки меньшим, чем у массивного магнетита (Fe_3O_4 , $a = 0,8396$ нм), но большим, чем у маггемита ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, $a = 0,8348$ нм) [196]. Размер НЧ по данным ПЭМ ($15,4 \pm 1,0$ нм) практически совпадает с размером кристаллитов ($12,7 \pm 1,0$ нм), что говорит о его монокристалличности с поправкой на поверхностные эффекты, связанные с низким упорядочением спинов на поверхности, характерными для сферической формы [183; 274; 275].

Согласно данным РФА, представленным на Рисунке 3.1В и в Таблице 3.1, Образец 2 является поликристаллическим и имеет структуру «ядро-оболочка» с массовой долей $\text{Fe}_{1-x}\text{O} = 12$ %, параметр решетки соответствует слегка расширенной структуре $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ относительно типа структуры обратной шпинели $\text{Fd-}3\text{m}$ с кубической сингонией (Fe_3O_4), что является следствием эпитаксиального несоответствия между оболочкой $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ и ядром Fe_{1-x}O [276]. Наблюдаемая структура «ядро-оболочка» может являться следствием восстановительной реакционной среды, поскольку термическое разложение олеатов металлов в присутствии карбоновых кислот приводит к появлению нескольких побочных продуктов реакции, таких как CO и CO_2 [257]. При высоких температурах CO восстанавливает Fe^{III} , что приводит к образованию НЧ с различными степенями окисления: Fe_3O_4 , Fe_{1-x}O и Fe и во многих случаях эти частицы имеют структуру «ядро-оболочка»: $\text{Fe}_{1-x}\text{O} / \text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ или $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4 / \text{Fe}$ [277; 278]. Также стоит отметить присутствие небольшого количества (примерно 3 % по массе) метастабильной фазы гётита $\text{FeO}(\text{OH})$, имеющего орторомбическую структуру [279], наличие которой также, вероятно, связано с природой используемого прекурсора.

Исследование магнитных свойств образцов проводилось путем съемки петель магнитного гистерезиса, которые представлены на Рисунке 3.2, в поле с параметрами ± 3 Тл при температуре 300 К. Основные магнитные характеристики (величины намагниченности насыщения M_s и коэрцитивной силы H_c) представлены в Таблице 3.2. Данные значения нормировались на содержание органической фазы (ее доля определялась с помощью термогравиметрического анализа). Оба образца являются магнитомягкими материалами с малыми потерями на гистерезис (значение H_c составляет $0,7 \pm 0,6$ мТл и $1,1 \pm 0,1$ мТл для Образца 1 и 2, соответственно). Несмотря на сопоставимый размер образцов, намагниченность насыщения у Образца 1 ($72,5 \pm 0,5$ Ам² кг⁻¹) более чем в 1,5 раза больше, чем у Образца 2 ($45,9 \pm 1,0$ Ам² кг⁻¹). Эта разница

объясняется несколькими факторами. Во первых, поликристалличностью Образца 2 (размер кристаллита равен $5,3 \pm 1,0$ нм при фактическом размера НЧ – $22,7 \pm 2,0$ нм), поскольку величина M_s напрямую зависит от размера магнитного домена [280].

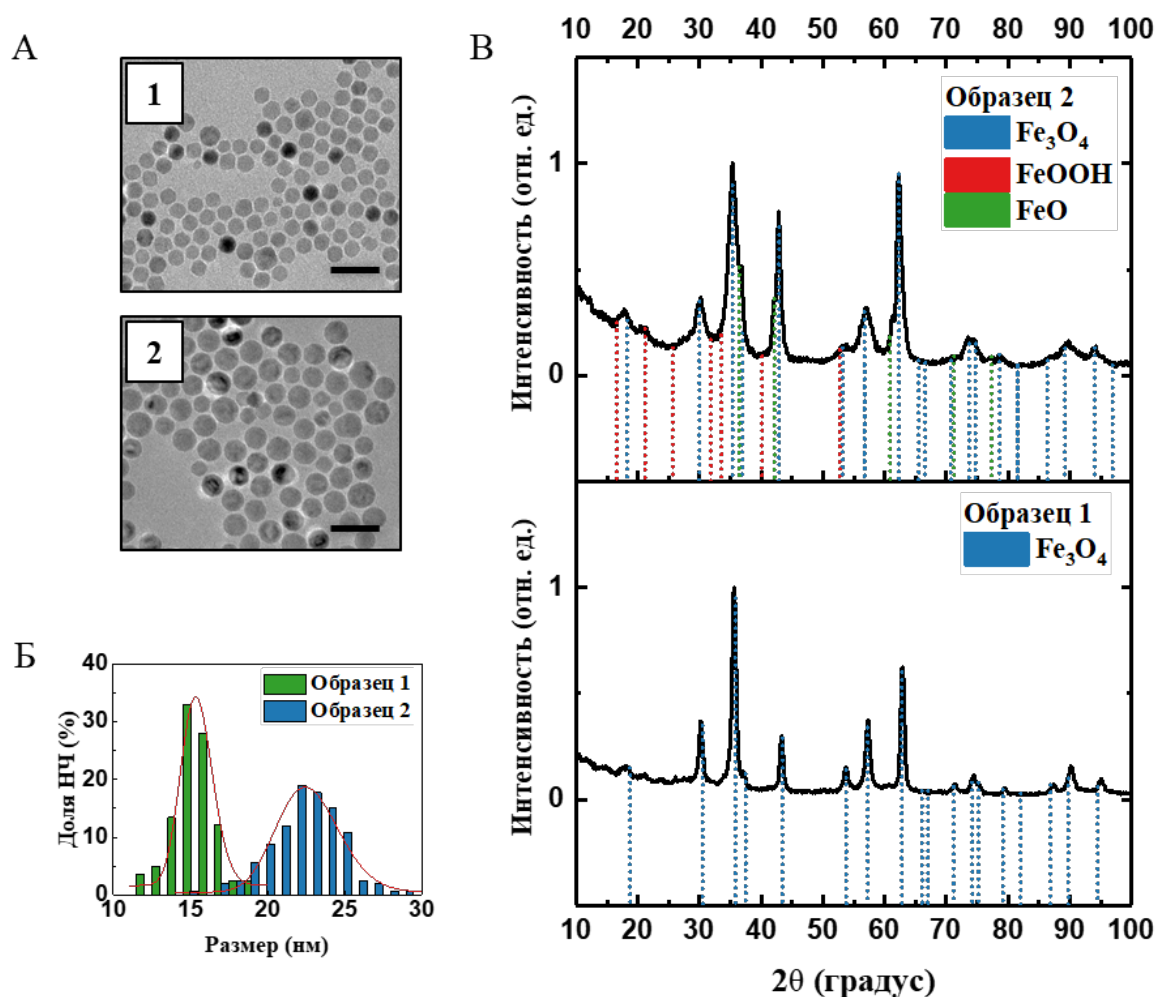


Рисунок 3.1 – А) Микрофотографии Образцов 1 и 2, полученные методом ПЭМ (размер масштабного отрезка на микрофотографии соответствует 50 нм); Б) гистограммы распределения НЧ по размерам; В) рентгеновские спектры (значения интенсивности нормированы на максимальный пик), синим обозначены положения пиков для фазы магнетита Fe_3O_4 , красным – для гётита $\text{FeO}(\text{OH})$, зеленым – для вюститита Fe_{1-x}O

Таблица 3.1 – Данные рентгенофазового анализа Образцов 1 и 2

Образ	Период решетки (нм)			Размер кристаллитов (нм)			Доля фаз (%)			Размер НЧ (нм)
	Fe_3O_4	$\text{FeO}(\text{OH})$	Fe_{1-x}O	Fe_3O_4	$\text{FeO}(\text{OH})$	Fe_{1-x}O	Fe_3O_4	$\text{FeO}(\text{OH})$	Fe_{1-x}O	
1	0,8362	-	-	12,7	-	-	100	-	-	$15,4 \pm 1,0$
2	0,8415	0,3150	0,4223	5,3	12,0	56	85	3	12	$22,7 \pm 2,0$

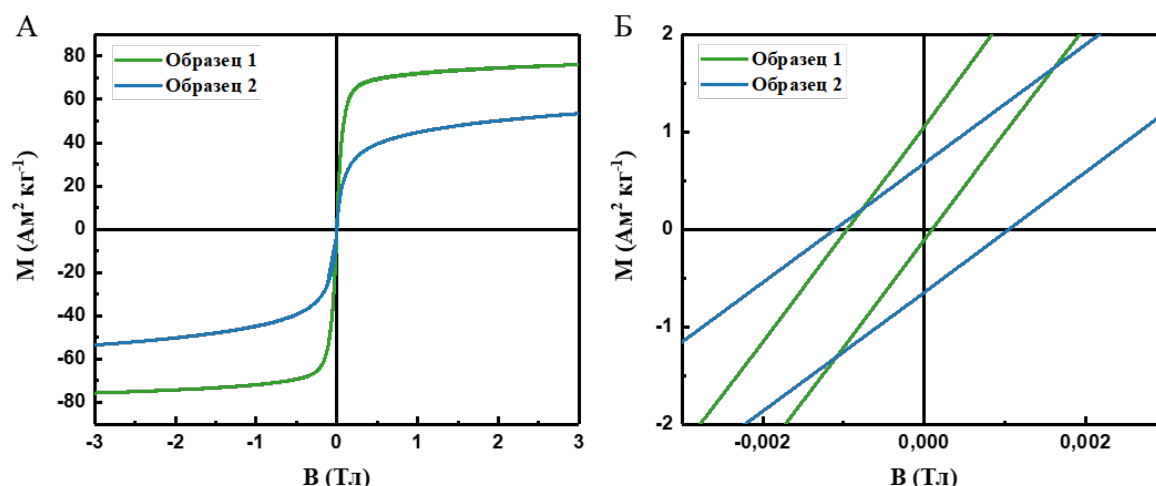


Рисунок 3.2 – А) Петли магнитного гистерезиса для Образцов 1 и 2 в магнитном поле ± 3 Тл при температуре 300 К; Б) увеличение области вблизи нуля

Таблица 3.2 – Статические магнитные свойства Образцов 1 и 2, нормированные на долю наночастиц (термогравиметрический анализ)

Образец	Доля органической фазы (%), согласно ТГ	Намагниченность насыщения M_s ($\text{Am}^2 \text{kg}^{-1}$)	Коэрцитивная сила H_c (мТл)
1	14,3	$72,5 \pm 0,5$	2 ± 1
2	8,8	$45,9 \pm 1,0$	2 ± 1

Во вторых, фазовым составом: Образец 1 имеет структуру типа $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$, что соответствует переходному состоянию между магнетитом (Fe_3O_4) и маггемитом ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) и значение M_s равно $72,5 \pm 0,5 \text{ Am}^2 \text{kg}^{-1}$ с одной стороны достижимо для НЧ, состоящих из магнетита [281; 282], однако все равно слишком велико для НЧ сферической формы и размером менее 16 нм. Таким образом, можно предположить, что структура типа $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ составляет только поверхностный слой НЧ, когда ядро состоит из металлического железа, как ранее было описано для НЧ, полученных из прекурсоров с нулевой степенью окисления. Образец 2 состоит на 12 % из фазы вюстита, который является антиферромагнетиком. Обобщая вышесказанное, можно сделать вывод о том, что полученные НЧ (Образец 1 и 2) путем термического разложения прекурсора в 1-октадецене с добавлением OL в качестве стабилизирующего ПАВ характеризуются сферической формой и узким распределением по размеру, а их структурные и магнитные свойства определяются выбором металлоорганического комплекса – FeCO_5 или Fe(III)-OL .

Для получения кубических наночастиц оксида железа (Образцы 3-7) использовали прекурсор Fe(III)-OL , OL в качестве ПАВ для стерической стабилизации и предотвращения агломерации НЧ, а также как восстанавливающий агент [283], и NaOL, который влияет на скорость роста в определенных кристаллографических направлениях (рост происходит в

плоскостях $\{111\}$), для формирования кубической формы [257; 258; 284]. Олеат натрия, также как и олеиновая кислота, может координироваться с атомами железа, но для этого сначала должна произойти его диссоциация на радикал и катион. По мере прохождения реакции происходит расход олеат-анионов в системе (за счет OL), после чего равновесие должно постепенно смещаться в сторону диссоциированной формы NaOL, что ведет к более плавной скорости образования мономера и к более низкому и постоянному химическому потенциалу. Низкий химический потенциал мономера (μ_m) приводит к росту плоскостей $\{111\}$, которые наиболее плотно упакованы и имеют наименьшую реакционную способность – $\mu_{\{100\}} > \mu_{\{110\}} > \mu_m > \mu_{\{111\}}$.

На Рисунке 3.3 представлены микрофотографии Образцов 3-7, полученных методом ПЭМ и их гистограммы распределения по размерам (информация о среднем размере НЧ также приведена в Таблице 3.3).

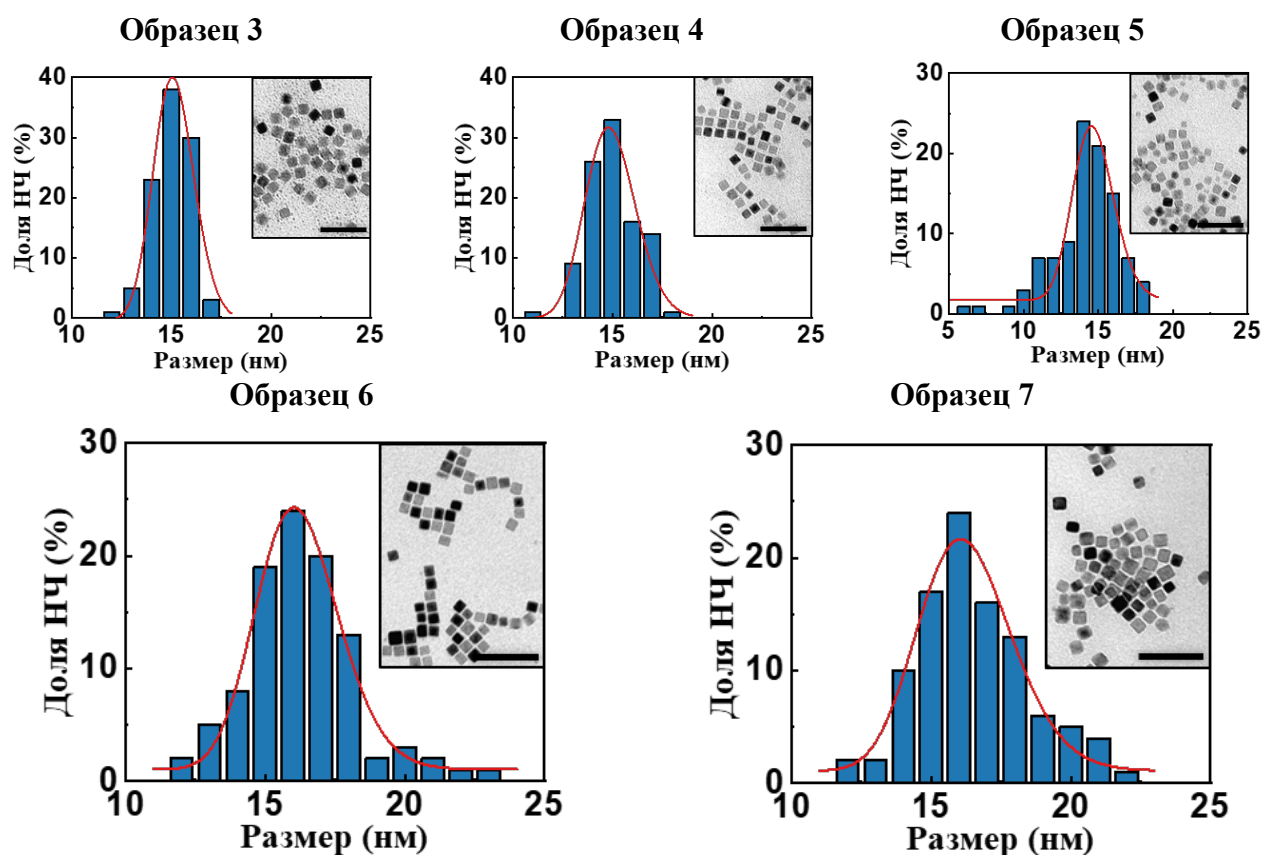


Рисунок 3.3 – Для каждой микрофотографии Образцов 3-7 приведена гистограмма распределения НЧ по размерам (размер масштабного отрезка на микрофотографии соответствует 50 нм)

С увеличением количества NaOL в реакционной среде (соотношения Fe(III)-OL к NaOL равные 14, 7, 5, 2,5 и 2 к 1 для Образцов 3-7, соответственно) значительного роста размера получаемых НЧ не наблюдается, а средний размер всех образцов находится в диапазоне от 14,7

$\pm 1,4$ нм до $16,3 \pm 1,7$ нм. На представленных ПЭМ-микрофотографиях показано, что Образцы 3-7 в присутствии даже небольшого количества NaOL обладают кубической формой, однако, хорошо видно, что с повышением концентрации NaOL НЧ становятся более ограненными и кубическая форма – более выраженной, что согласуется с литературными данными [257].

Из рентгеновских спектров Образцов 3-5, представленных на Рисунке 3.4, были рассчитаны параметры кристаллической структуры, доли фаз и размер кристаллитов, данные представлены в Таблице 3.3. Параметры решетки для вышеперечисленных образцов совпадают и соответствует слегка расширенной структуре $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ (примерно на 0,4-0,6 %) относительно структуры типа обратной шпинели Fd-3m с кубической сингонией (Fe_3O_4).

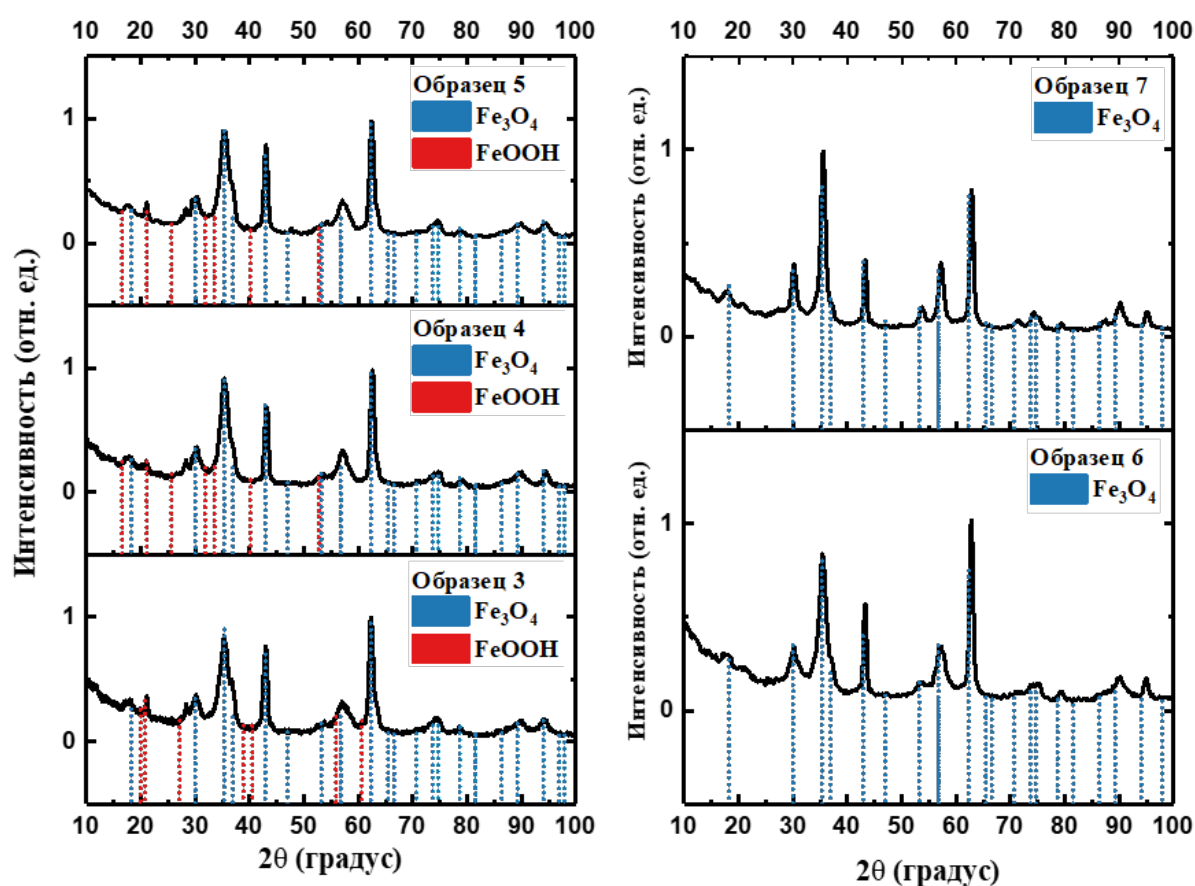


Рисунок 3.4 – Рентгенограммы Образцов 3-7. По оси ординат приведены относительные интенсивности (спектры нормированы на максимальное значение пика), синим обозначены положения пиков для фазы магнетита Fe_3O_4 , красным – для гётита $\text{FeO}(\text{OH})$

По данным РФА для Образцов 6 и 7, которые представлены на Рисунке 3.4 и в Таблице 3.3 видно, что положения пиков рентгеновского спектра идентифицируются как фаза магнетита Fe_3O_4 . Близкие значения параметров решетки (0,8357 и 0,8358 нм) для обоих образцов указывают на структуру типа $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ – промежуточную фазу между Fe_3O_4 и $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$. Образцы 3-7 являются

поликристаллическими (различие в размере кристаллита и фактическом размере НЧ более чем в 2 раза).

Таблица 3.3 – Данные рентгенофазового анализа для Образцов 3-7

Образец	Период решетки а (нм)		Размер кристаллитов (нм)		Доля фаз (%)		Размер НЧ (нм)
	Fe ₃ O ₄	FeO(OH)	Fe ₃ O ₄	FeO(OH)	Fe ₃ O ₄	FeO(OH)	
3	0,8448	0,4820	3,0	2,0	96	4	15,2 ± 1,0
4	0,8404	0,4570	3,4	10,1	98	2	14,7 ± 1,4
5	0,8430	0,4880	3,4	14,2	97	3	15,0 ± 1,4
6	0,8357	-	6,8	-	100	-	16,2 ± 1,5
7	0,8358	-	7,0	-	100	-	16,3 ± 1,7

Магнитные свойства (M_s , H_c) Образцов 3-7 рассчитывались из данных петель магнитного гистерезиса, представленных на Рисунке 3.5, снятых в поле с магнитной индукцией ± 2 Тл при комнатной температуре (300 К). Расчетные данные основных параметров, нормированные на содержание органической фазы (доля определялась с помощью ТГА), представлены в Таблице 3.4.

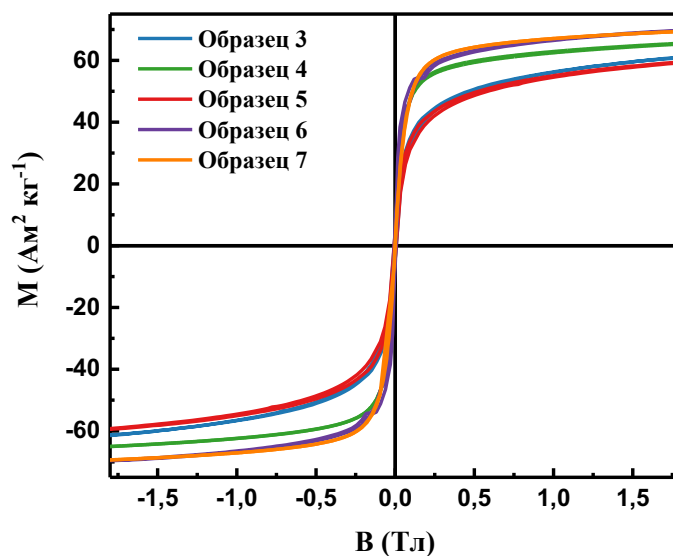


Рисунок 3.5 – Петли магнитного гистерезиса для Образцов 3-7 в магнитном поле ± 2 Тл при температуре 300 К

Как видно из Таблицы 3.4, для Образцов 3-7 значение коэрцитивной силы при комнатной температуре (300 К) меньше 15 мТл говорит о том, что они являются магнитомягкими материалами и проявляют суперпарамагнитные свойства. Несмотря на то, что размеры Образцов 3-7 совпадают в пределах погрешности, наблюдается увеличение M_s от $51,3 \pm 2,3$ Ам² кг⁻¹ до $67,5 \pm 1,1$ Ам² кг⁻¹ для Образцов 3-7, в соответствие с увеличением концентрации NaOL в системе

Известно, что величина намагниченности насыщения напрямую связана с магнитокристаллической анизотропией и анизотропии формы [183]. В то время как кристаллическая анизотропия является свойством материала [182], анизотропии формы – варьируемый параметр, зависящий от морфологии НЧ. Теоретически было показано, что НЧ кубической формы имеют более низкую поверхностную анизотропию по сравнению с НЧ сферической формы ввиду меньшего количества неупорядоченных спинов на поверхности [285]. Изогнутая поверхность сферических НЧ приводит к более выраженному эффекту «кантинга» (обрезания) спинов, чем плоская поверхность куба, что позже было подтверждено экспериментальными исследованиями [286]. Исходя из вышесказанного можно предположить, что увеличение концентрации NaOL в системе ведет к более выраженной кубической форме НЧ, что приводит к увеличению M_s . Таким образом, модуляция эффективной анизотропии с помощью оптимизации параметров синтеза является еще одним инструментом в получении НЧ с высокими магнитными характеристиками.

Таблица 3.4 – Магнитные свойства Образцов 3-7, нормированные на долю наночастиц по оксиду железа (доли органической и неорганической фазы получены из ТГА)

Образец	Доля органической фазы (%), согласно ТГА	Намагниченность насыщения M_s ($\text{Am}^2 \text{кг}^{-1}$)	Коэрцитивная сила H_c (мТл)
3	12,3	$51,3 \pm 2,3$	6 ± 1
4	13,5	$61,9 \pm 1,1$	5 ± 1
5	14,1	$50,2 \pm 3,1$	7 ± 2
6	12,1	$64,6 \pm 1,0$	6 ± 1
7	7,5	$67,5 \pm 1,1$	2 ± 1

Еще один подход к контролю над размером НЧ – варьирование температуры кипения реакционной смеси посредством выбора высококипящего органического растворителя. Для синтеза Образцов 8-10 использовали метод термического разложения прекурсора – Fe(III)-OL в присутствии ПАВ – OL и NaOL. В качестве растворителя использовали смесь бензилового эфира и триоктиламина в соотношении 1 к 1 для Образца 8, 1 к 2 для Образца 9 и использовали только триоктиламин для Образца 10, варьируя тем самым температуру кипения реакционной смеси, которая составила примерно 314, 338 и 365 °C для Образца 8, 9 и 10, соответственно. На Рисунке 3.6 представлены ПЭМ-изображения Образцов 8-10, полученных методом ПЭМ, а также их гистограммы распределения по размерам. Полученные НЧ имеют широкое распределение по размерам и нерегулярную морфологию. Гидродинамический размер всех образцов превышал 100 нм сразу после получения (данные представлены в Таблице 3.7), а через 7 дней НЧ агрегировали. Исходя из вышесказанного, было принято решение о нецелесообразности проведения дальнейшей характеристики физико-химических свойств данных образцов, поскольку

коллоидная стабильность является одним из главных требований, предъявляемых к НЧ для биомедицинского применения.

Тем не менее, полученные зависимости размера и формы наночастиц от температуры кипения растворителя не линейны и носят более сложный характер. Вероятно, температурная составляющая вносит меньший вклад в формирование НЧ, чем полярность растворителя и химический потенциал мономера в этом растворителе. Ранее уже обсуждалось, что полярность в общем случае уменьшается в ряду кислоты – спирты – альдегиды – амины – эфиры – алкены – алканы. Коэффициент активности мономера в растворе (γ_m) растет при росте полярности растворителя. Для синтеза Образцов 8-10 использовались два растворителя – дибензиловый эфир и триоктиламин и их смесь для образца 9, соответственно γ_m и химический потенциал должен расти от Образца 8 до 10. Для Образца 10 наблюдается сферическая форма несмотря на присутствие NaOL. Для сравнения, в Образце 7, где все параметры реакции аналогичны Образцу 10 помимо растворителя (для Образца 7 используется 1-октадецен, алкен, более низкий γ_m) наблюдается выраженная кубическая форма. Другими словами, триоктиламин достаточно полярный для того, чтобы химический потенциал мономера (μ_m) в данном случае превысил химические потенциалы всех граней – $\mu_m > \mu_{\{100\}} > \mu_{\{110\}} > \mu_{\{111\}}$, и стал возможен рост во всех направлениях.

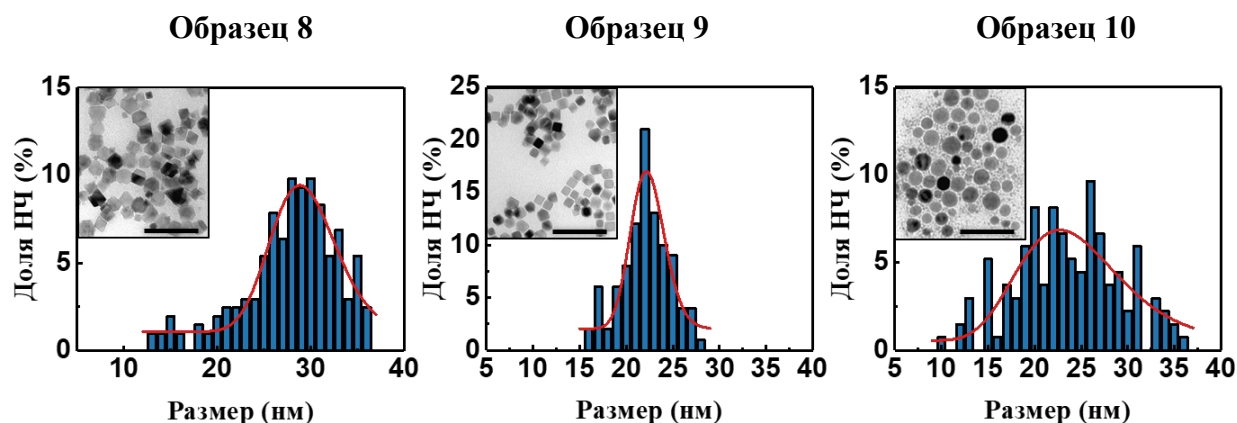


Рисунок 3.6 – Для каждой микрофотографии Образцов 8-10 приведена гистограмма распределения НЧ по размерам (размер масштабного отрезка на микрофотографии соответствует 100 нм)

Дибензиловый эфир менее полярный, чем триоктиламин, поэтому в Образце 8 уже не наблюдается изотропного роста, а полученные частицы имеют выраженные грани. Форма и размер частиц при этом не регулярна, что может объясняться вторичными процессами разложения дибензинового эфира на бензальдегид и бензилбензоат при повышенной температуре. Эти продукты разложения более полярны, чем дибензиловый эфир, что в итоге

приводит к тому, что соотношение дибензилового эфира и триоктиламин как 1 к 1 (Образец 8) более полярно, чем соотношение 1 к 2 (Образец 9), хотя в первом рассмотрении должно было быть наоборот. Это наблюдение подтверждает то, что для Образца 9 характерна выраженная кубическая форма с небольшим количеством частиц с нерегулярной морфологией. Размер НЧ составляет $29,5 \pm 3,6$, $22,4 \pm 1,8$ и $24,7 \pm 5,9$ для Образцов 8-10, соответственно (измерение размера производится по самой длинной диагонали). Исходя из полученных результатов можно сделать вывод о том, что размер НЧ зависит как от температуры кипения растворителя, так и от его природы и стабильности во время реакции при высоких температурах. Хотя можно упрощенно утверждать, что рост наночастиц происходит быстрее при более высоких температурах и, соответственно, с увеличением температуры кипения растворителя растет размер НЧ [282; 287; 288], полная теоретическая модель должна учитывать температурную (и временную) зависимость по крайней мере четырех различных механизмов: образование мономеров, зародышеобразование, рост и созревание Оствальда. Поэтому, для более полного контроля над формой и размером получаемых НЧ, а также минимизации параметров, влияющих на формирование той или иной структуры, было решено разделить два процесса – зародышеобразование и рост. Для этого был разработан двухстадийный метод синтеза. На первой стадии получали НЧ размером до 20 нм с помощью методов, описанных выше, которые впоследствии использовались в качестве зародышей на второй стадии. На втором этапе подготовленные зародыши растворяли в высококипящих органических растворителях (бензиловый эфир, триоктиламин) в присутствии ПАВ (OL и NaOL), нагревали до температуры кипения в инертной атмосфере и медленно, с помощью шприцевого инфузионного насоса, добавляли в реакционную среду 0,2 М раствор прекурсора Fe(III)-OL со скоростью 3 мл/час. Скорость добавления прекурсора подбиралась экспериментально – при более быстром введении (5 мл/час) наблюдалось вторичное зародышеобразование.

Разработка этого протокола основана на использовании модели зародышеобразования и роста по расширенному механизму ЛаМера. Согласно классическому механизму ЛаМера, формирование НЧ происходит в замкнутой системе, а число полученных в результате НЧ определяется на стадии нуклеации. В этом случае максимальный размер частиц детерминирован отношением количества первоначально введенного прекурсора к числу образовавшихся зародышей в системе. Напротив, расширенный механизм ЛаМера [221; 289] представляет собой открытую систему и базируется на непрерывном добавлении прекурсора в реакционную среду. Таким образом, в отличие от классического механизма, где формирование НЧ завершается на III стадии после истощения промежуточного комплекса Fe (мономера), появляется дополнительная IV стадия устойчивого роста НЧ. Преимущество такого подхода заключается в том, что IV стадия

может быть продлена на произвольно длительное время, что позволяет получать высокомонодисперсные НЧ с контролируемым размером в широком диапазоне.

Для синтеза Образца 11 в качестве зародышей использовались сферические НЧ с размером $15,4 \pm 1,0$ нм (Образец 1), для Образца 12 – кубические НЧ с размером $16,3 \pm 1,7$ нм (Образец 7). Образцы 11 и 12 получали в присутствии OL и NaOL в смеси, состоящей из бензилового эфира с небольшим добавлением триоктиламина, основное отличие между синтезами заключается в количестве введенного прекурсора на второй стадии и формой ядра, полученном на первой стадии. Добавление триоктиламина было необходимо, чтобы не допустить снижение температуры кипения реакционной смеси ниже температуры нуклеации при использовании в качестве прекурсора олеата железа, которая составляет 280-290 °C [290]. На Рисунке 3.7 представлены изображения Образцов 11 и 12 и их гистограммы распределения по размерам (информация о среднем размере НЧ также приведена в Таблице 3.5). Полученные НЧ обладают различной морфологией – шестиугольные призмы с размером $28,7 \pm 2,6$ нм (Образец 11) и октаподы с размером $23,0 \pm 2,6$ нм (Образец 12).

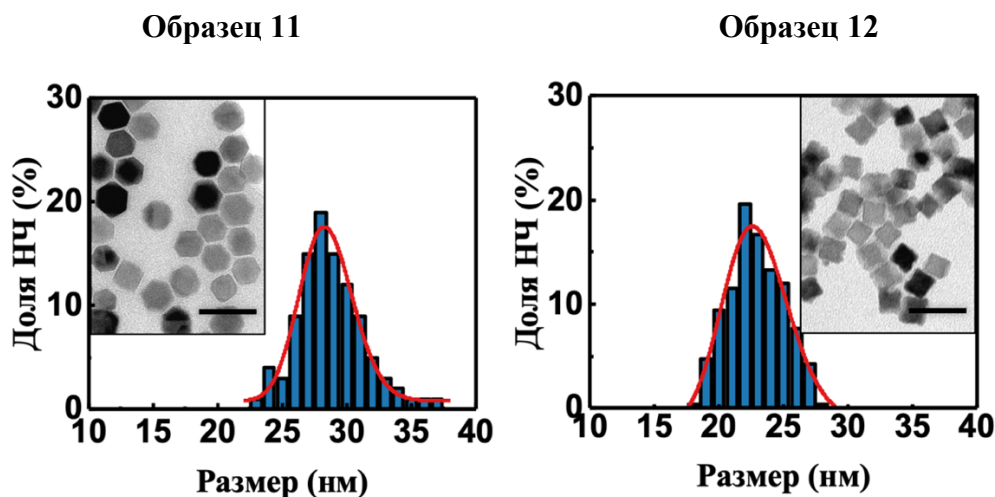


Рисунок 3.7 – Для каждой микрофотографии Образцов 11 и 12 приведена гистограмма распределения НЧ по размерам (размер масштабного отрезка на микрофотографии соответствует 50 нм)

Как правило, форма НЧ определяется преимущественным ростом одного конкретного кристаллографического направления по сравнению с другими. Авторы работы [291] предположили, что триоктиламин, как координирующий растворитель, сорбируется на плоскостях $\{100\}$, обладающих высокой поверхностной энергией, что способствует ограничению роста в этом направлении из-за стерических препятствий. Однако, более корректной кажется гипотеза, которая обсуждалась ранее, основанная на химическом потенциале мономера в системе. Полученные призмы (Образец 11) усечены шестью гранями

{100} на поверхности, в то время как рост в плоскостях {110} и {111} продолжается, к тому же наблюдается выборочные НЧ кубической формы. В Образце 12 видны кубы с вытянутыми вершинами, где рост в направлении {111} доминирует над другими. Поэтому можно предположить, что химический потенциал мономера в данной случае достаточно низок ($\mu_{\{100\}} > \mu_m$), разложение прекурсора происходит постепенно, поддерживая низкую концентрацию мономера в системе.

С помощью метода РФА для Образцов 11 и 12 был определен фазовый состав и кристаллическая структура, данные представлены на Рисунке 3.8А и в Таблице 3.5. На Рисунке 3.8А видно, что положения пиков рентгеновского спектра для Образцов 11 и 12 идентифицируются как фаза магнетита Fe_3O_4 . Значение параметра кристаллической решетки для Образца 11 ($0,8375 \pm 0,0004$ нм) указывают на структуру типа $\text{Fe}_{3-\delta}\text{O}_4$ – промежуточную фазу между Fe_3O_4 и $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, ближе к магнетиту. Параметр решетки для Образца 12 ($0,8393 \pm 0,0004$ нм) соответствует структуре обратной шпинели – фазе магнетита. С учетом размеров частицы и кристаллита ($28,7 \pm 2,6$ нм / $20,0 \pm 2,0$ нм), а также смешенного фазового состава по данным РФА, можно предположить, что Образец 11 обладает структурой типа ядро-оболочка с ядром магнетита и с окисленным слоем маггемита на поверхности. С учетом поправки на поверхностные дефекты и морфологию, Образец 12 являются монокристаллическими с сопоставимыми фактическим размером, определенным методом ПЭМ, и размером кристаллита $23,0 \pm 2,6$ нм / $22,0 \pm 1,0$ нм (размер ПЭМ / размер кристаллита). Важно подчеркнуть, что изначальные размеры наночастиц, которые использовались в качестве зародышей, увеличились без разупорядочения атомной структуры (сохранение монокристалличности), что крайне важно в достижении высоких значений намагниченности насыщения.

На Рисунке 3.8Б и 3.8В представлены петли магнитного гистерезиса Образцов 11 и 12, снятых в поле с магнитной индукцией ± 2 Тл при комнатной температуре (300 К). Расчетные данные основных параметров (намагниченность насыщения и коэрцитивная сила) нормированы на содержание органической фазы (доля определялась с помощью ТГА), представлены в Таблице 3.5. Как видно из Таблицы 3.5, для Образца 12 H_c при температуре 300 К меньше 15 мТл, что указывает на суперпарамагнетизм полученных НЧ. Для Образца 11 коэрцитивная сила составляет $9,8 \pm 1,0$ мТл и он может находиться в пограничном состоянии между суперпарамагнитным и ферромагнитным, когда вклад дипольных взаимодействий может приводить к агломерации или агрегации. Согласно данным, полученным методом ДСР, Образец 11 не обладает коллоидной стабильностью и агрегирует сразу после получения. Экспериментальные Образцы 11 и 12 характеризуются высокой M_s : $78,7 \pm 3,0$ Ам² кг⁻¹ и $83,5 \pm 0,3$ Ам² кг⁻¹ для Образца 11 и 12, соответственно. Эти значения близки к намагниченности насыщения массивного магнетита (M_s массивного образца = 92 Ам² кг⁻¹).

Исследование коллоидной стабильности (данные, полученные методом ДСР, представлены в Таблице 3.8) показало, что Образец 12 стабилен в течение как минимум 7 дней после синтеза.

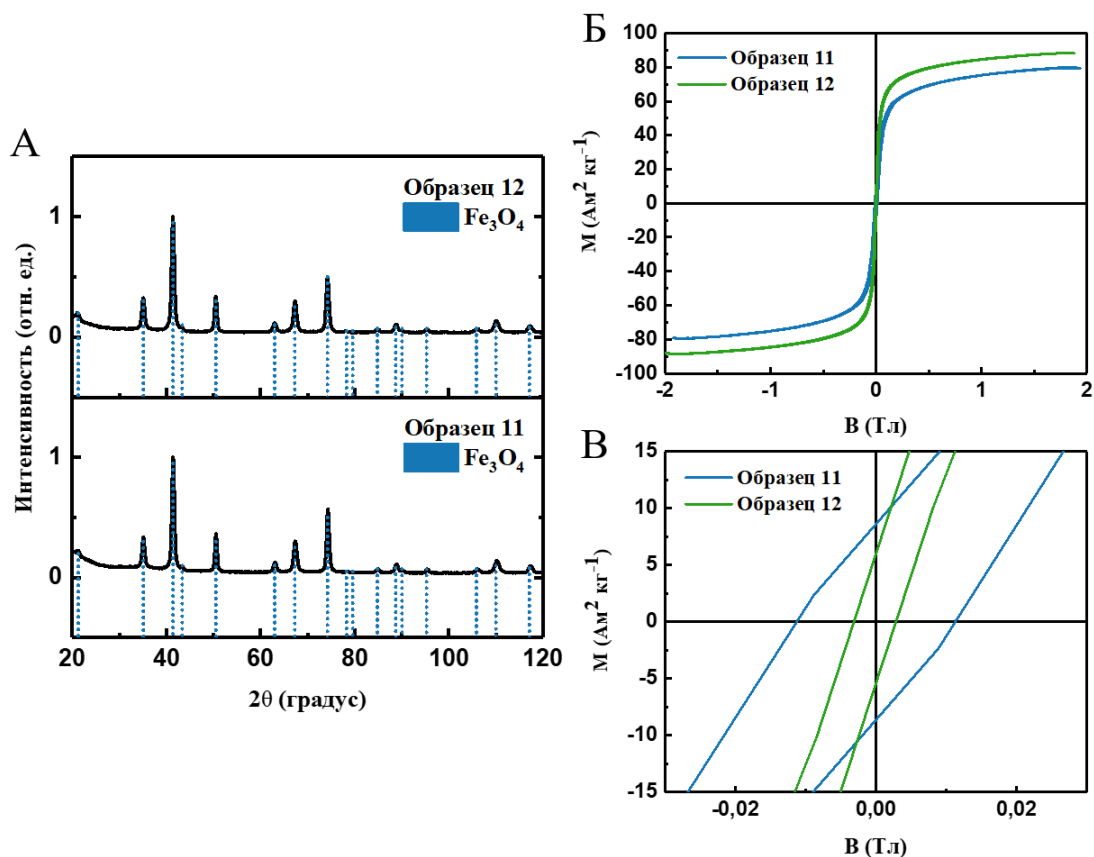


Рисунок 3.8 – А) Рентгеновские спектры (значения интенсивности нормированы на максимальный пик), синим обозначены положения пиков для фазы магнетита (Fe₃O₄); Б) петли магнитного гистерезиса для Образцов 11 и 12 в магнитном поле ± 2 Тл при температуре 300 К; В) увеличение области вблизи нуля

Таблица 3.5 – Данные рентгенофазового анализа для Образцов 11 и 12

Образец	Период решетки а (нм)	Размер кристаллитов (нм)	Доля фазы Fe ₃ O ₄	Размер НЧ (нм)
11	0,8375	20 ± 2	100 %	28,7 ± 2,6
12	0,8393	22 ± 1	100 %	23,0 ± 2,6

Таблица 3.6 – Магнитные свойства Образцов 11 и 12, нормированные на долю наночастиц (доли органической и неорганической фазы получены из ТГА)

Образец	Доля органической фазы (%), согласно ТГ	Намагниченность насыщения M _s (Am ² кг ⁻¹)	Коэрцитивная сила H _c (мТл)
11	14,1 ± 1,0	78,7 ± 3,0	10 ± 2
12	25,8 ± 2,0	83,5 ± 0,3	3 ± 1

Таким образом, были получены НЧ (образцы 11 и 12) с помощью разработанного двухстадийного метода синтеза, основанном на расширенном механизме ЛаМера на зародышах различных форм (Таблица 3.7). Образец кубических частиц (Образец 7), который использовался в качестве зародышей при синтезе Образца 12, имеет структуру типа ядро-оболочка с окисленным слоем Fe_2O_3 (параметр решетки 0,8358 нм) на поверхности ядра Fe_3O_4 . В процессе роста поверхностный слой маггемита восстанавливается до магнетита (0,8393 нм), вероятно, в результате реакции топотактического превращения, при которой часть катионов Fe^{3+} замещаются на Fe^{2+} [292; 293]. В результате получаются монокристаллические НЧ магнетита с сопоставимыми физическим размером (ПЭМ) и размером кристаллита (РФА). Намагниченность насыщения увеличивается на $16 \text{ Ам}^2 \text{ кг}^{-1}$, приближаясь к показателю для массивного образца, при этом коэрцитивная сила остается одинаковой для образцов 7 и 12 в пределах погрешности (и стремится к нулю), что говорит о том, что после увеличения размера образец сохраняет узкую петлю гистерезиса. Для Образца 11, полученного из сфер, наблюдаются схожие тенденции: увеличение параметра кристаллической решетки (от 0,8362 до 0,8375 нм) и увеличение размера кристаллита (от 12,7 до 20 нм), рост M_s . Однако, эти наблюдения менее выраженные чем для образца кубов, поскольку изначально образец сфер был монокристаллическим и имел кристаллическую структуру ближе к фазе магнетита.

Таблица 3.7 – Основные физические свойства зародышей (сферы, кубов) и полученных на их основе Образцов 11 и 12, соответственно

Образец	Размер НЧ (нм)	Размер кристаллитов (нм)	Форма	Фаза	M_s ($\text{Ам}^2 \text{ кг}^{-1}$)	H_c (мТл)	$D_{\text{гид}}$ (нм)	Стабильность (7 дней)
1	$15,4 \pm 1,0$	12,7	Сферы (зародыши)	Fe_3O_4	$72,5 \pm 0,5$	2 ± 1	$17,9 \pm 0,3$	+
11	$28,7 \pm 2,6$	20	Призмы	Fe_3O_4	$78,7 \pm 3,0$	10 ± 2	агрегаты	-
7	$16,3 \pm 1,7$	7	Кубы (зародыши)	Fe_3O_4	$67,5 \pm 1,1$	2 ± 1	$19,1 \pm 0,1$	+
12	$23,0 \pm 2,6$	22	Октаподы	Fe_3O_4	$83,5 \pm 0,3$	3 ± 1	$24,5 \pm 0,1$	+

Одним из важнейших параметров для дальнейшей функционализации и биомедицинского применения магнитных НЧ является коллоидная стабильность. В Таблице 3.8 приведены данные по измерению гидродинамического размера ($D_{\text{гид}}$) и индекса полидисперсности (ИПД), определённые методом динамического светорассеяния (ДСР). Измерения произведены сразу после синтеза НЧ. Стабильность при хранении (закрытая емкость, 4 °С) определялась как «+»,

если значения $D_{гид}$ и ИПД НЧ отличались не более чем на 5 % через 7 дней и «-», если образцы агрегировали. Образцы 9 и 11 не обладали коллоидной стабильностью и агрегировали сразу после получения.

Таблица 3.8 – Стабильность образцов в хлороформе

Образец	ИПД	D _{гид} (нм) пика	Объемная доля (%)	Стабильность (7 дней)	Образец	ИПД	D _{гид} (нм) пика	Объемная доля (%)	Стабильность (7 дней)
1	0,189	17,8	100,0	+	6	0,977	20,3	89	+
2	0,329	28,5	94,5	+			955,9	10,7	
		2164,0	5,5				5249	0,3	
3	0,271	24,3	98,9	+	7	0,197	19,1	100,0	+
		5022,0	1,1		8	0,465	103,0	1,8	-
4	0,191	24,0	100,0	+			1176,0	98,2	
5	0,963	15,4	97,8		10	0,159	131,7	100	-
		290,0	2,2	+	12	0,085	24,6	100	+

Из серии синтезированных образцов были выбраны 3 наилучших кандидата для дальнейшей функционализации формуляцией липидов: Образец 1 (сферы), Образец 7 (кубы) и Образец 12 (октаподы). Вышеперечисленные образцы обладали наилучшими магнитными свойствами (максимальная M_s при минимальной H_c) и коллоидной стабильностью.

3.2 Функционализация НЧ оксида железа

Ковалентное конъюгирование лигандов с поверхностью оксида железа может уменьшить биосовместимость и биоразлагаемость носителей [294], поэтому был выбран альтернативный подход к покрытию наночастиц за счет нековалентного связывания, основанного на гидрофобном взаимодействии с остатками олеиновой кислоты на поверхности НЧ [295]. Существует несколько способов покрытия – наночастицы и липиды сначала соосажаются, а затем повторно диспергируются в воде, либо соединяются через эмульсию, образованную органическим растворителем и водой, а избыток липидных молекул удаляется магнитной сепарацией [296; 297]. К недостаткам этих методов можно отнести образование агрегатов и низкий выход продукта. В результате анализа ряда исследований [11; 263; 296; 297] была выбрана наиболее подходящая методика [11] для получения функционализированных липидами наночастиц, основанная на процедуре фазового переноса. Данный подход заключается в последовательном изменении полярности растворителя: НЧ, растворенные в неполярном

органическом растворителе, таком как хлороформ (относительный индекс полярности 4,1), смешиваются с липидами и промежуточным N-метил-2-пирролидоном (относительный индекс полярности 6,7), который может смешиваться как с водой (относительный индекс полярности 10,2), так и со многими распространёнными органическими растворителями. После обработки ультразвуком и удаления хлороформа (упаривание на роторном испарителе), молекулы липидов стремятся к адгезии за счет гидрофобного взаимодействия с хвостовыми группами карбоновых кислот на поверхности НЧ. После добавления воды и проведения диализа для удаления N-метил-2-пирролидона, получают гидрофилизированные частицы, покрытые липидной формуляцией. В качестве основного компонента покрытия был выбран катионный ионизируемый липид с пятью длинными алифатическими заместителями (липидаид) C12-200 [298], строение которого приведено на Рисунке 3.9В. Ионизируемые липиды, положительно заряженные при низких значениях pH, широко используются в невирусных системах доставки отрицательно заряженных миРНК для обеспечения трансмембранного переноса терапевтического агента и его дальнейшего выхода из эндоцитарных везикул в цитозоль клетки.

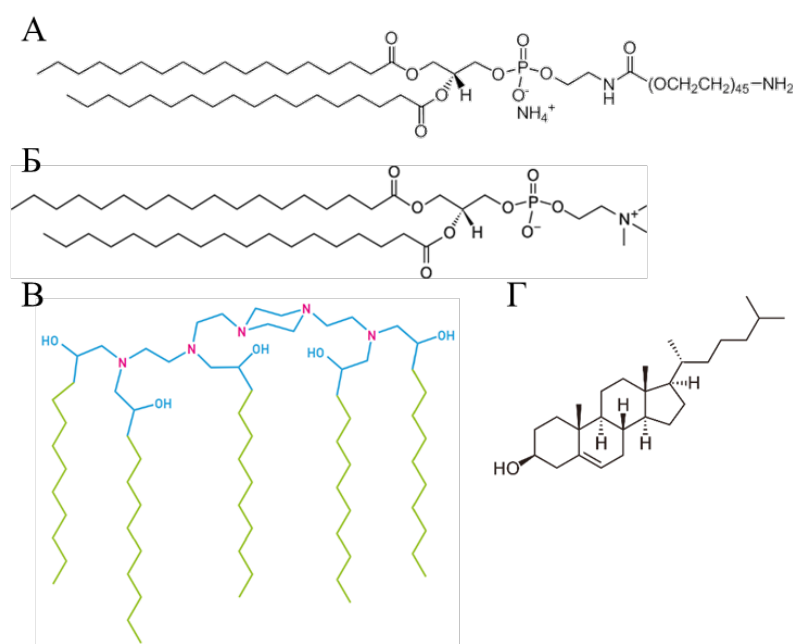


Рисунок 3.9 – Структурные формулы липидов, использовавшихся для функционализации НЧ оксида железа. А) DSPE-PEG-NH₂; Б) DSPC; В) липидаид C12-200; Г) холестерин

В качестве вспомогательных липидов [171], которые вошли в состав формуляции, использовались фосфолипид слияния 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), строение которого приведено на Рисунке 3.9Б, PEG-липид 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин-N-[амино(полиэтиленгликоль)-2000] аммониевая соль (DSPE-PEG-NH₂),

строение которого приведено на Рисунке 3.9А и холестерин (Рисунок 3.9Г) [174]. Схема функционализации частиц формуляцией липидов представлена на Рисунке 3.10.

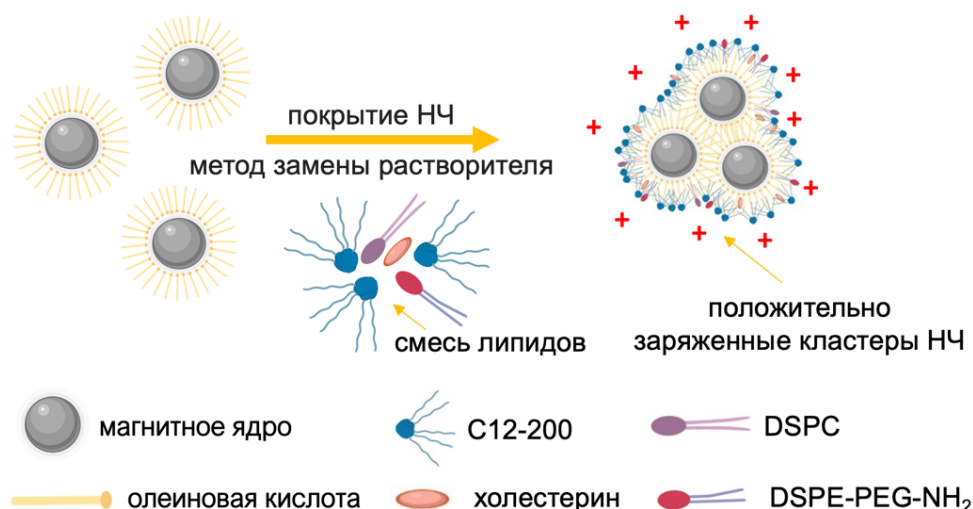


Рисунок 3.10 – Схематичное изображение гидрофилизации НЧ с помощью метода замены растворителя

На Рисунке 3.11 и в Таблице 3.9 представлены данные по гидродинамическому размеру и дзета-потенциалу, полученные методом ДСР. До покрытия формуляцией липидов $D_{\text{гид}}$ НЧ составляет $17,9 \pm 0,3$ нм, $19,1 \pm 0,1$ нм и $24,5 \pm 0,1$ нм для образца сфер, кубов и октаподо, соответственно. После функционализации формуляцией липидов средний гидродинамический размер всех образцов увеличивается, что говорит о кластеризации.

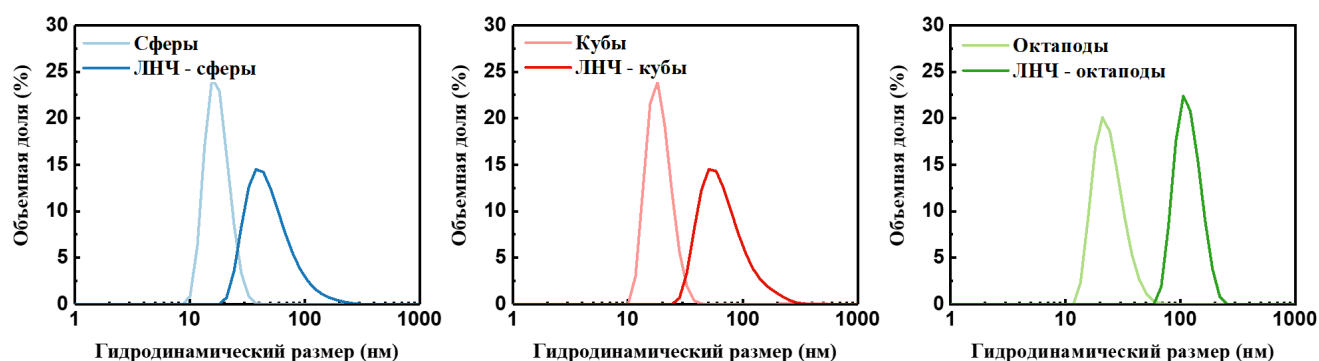


Рисунок 3.11 – Гидродинамический размер НЧ до (сферы, кубы, октаподо) и после функционализации (ЛНЧ-сферы, ЛНЧ-кубы, ЛНЧ- октаподо)

Отношение $D_{\text{гид}}$ полученных липидных НЧ (ЛНЧ) к $D_{\text{гид}}$ НЧ до функционализации составляет 3,2, 3,8 и 4,8 для образца сфер, кубов и октаподо, соответственно. Таким образом, полученные ЛНЧ являются мицеллами, во внутренней структуре которых располагаются 3-5 НЧ. Все полученные ЛНЧ характеризуются выраженным положительным дзета-потенциалом,

наличием единственного пика $D_{гид}$ и низким значением индекса полидисперсности (ИПД) (менее 0,2), что говорит об их коллоидной стабильности и потенциальной возможности дальнейшей загрузки терапевтических миРНК. К тому же, размер носителя порядка 100 нм является оптимальным для доставки терапевтического агента в печень, когда частицы размером менее 10 нм удаляются через почечный клиренс, а более 150-200 нм –накапливаются в селезенке.

Таблица 3.9 – Характеристика НЧ до и после гидрофилизации

Образец	НЧ до функционализации		НЧ после функционализации липидами		
	ИПД	$D_{гид}$ (нм)	ИПД	$D_{гид}$ (нм)	Дзета-потенциал (мВ)
Сферы	0,189	$17,9 \pm 0,3$	0,174	$53,0 \pm 3,0$	$34,7 \pm 0,6$
Кубы	0,197	$19,1 \pm 0,1$	0,160	$72,7 \pm 0,5$	$26,1 \pm 0,5$
Октаподы	0,085	$24,5 \pm 0,1$	0,038	$118,6 \pm 0,1$	$20,5 \pm 0,5$

При выборе клеточных линий для дальнейшего изучения действия миРНК, необходимо выбирать модель с достаточно высокой экспрессией исследуемого гена, потому что нокдаун генов, изначально экспрессирующихся на очень низком уровне, может быть неэффективен. Информацию об экспрессии генов в различных тканях и клетках можно найти в таких базах данных, как FANTOM5, GTExPortal, BioGPS и Human Protein Atlas [299]. Первичные гепатоциты человека являются золотым стандартом для исследований нарушений липидного обмена печени; однако из-за ограничений, связанных с доступностью доноров, обычно используются клеточные линии гепатоцеллюлярной карциномы человека Huh7 и HepG2 [300]. Предварительная оценка токсичности экспериментальных образцов *in vitro* была проведена на этих клетках с помощью стандартного MTS-теста. Протокол MTS-теста основан на реакции его восстановления под действием внутриклеточных оксидоредуктазных ферментов до сине-пурпурного продукта (формазан) в метаболически активных клетках. Данные по выживаемости клеток, полученные через 24 часа после их инкубации с ЛНЧ в концентрации от 6,25 до 400 мг/мл (по оксиду железа) представлены на Рисунке 3.12.

Образец октаподов оказал цитотоксическое действие на половину клеточной культуры (CC_{50}) в концентрации $21,5 \pm 3,4$ мкг/мл (по оксиду железа) для клеточной линии HepG2 и $126,5 \pm 5,8$ мкг/мл для Huh7. ЛНЧ кубической и сферической формы (кубы и сферы) не оказали цитотоксического действия в исследуемых концентрациях. Оксид железа обладают низкой токсичностью, а препарат на его основе (Ферумокситол) одобрен FDA и применяется для терапии железодефицитной анемии [9]. Поэтому, вероятней, цитотоксическое действие наночастиц может быть связано с их механическим влиянием на клетки, например, с дезорганизацией цитоскелета вследствие высокой локальной концентрации НЧ во внутриклеточной области после эндоцитоза [301; 302]. Ранее было показано, что НЧ способны

приводили к деформации сети актина и тубулина при высоком уровне накопления в клетках [303]. На основании этого можно предположить, что наличие высокой концентрации крупных НЧ в эндолизосомальном компартменте клеток может приводить к стерической блокировке цитоскелета. Полученные экспериментальные данные хорошо коррелируют с данной гипотезой: размер магнитного ядра октаподоов в составе ЛНЧ как минимум в 1,3 раза больше, чем у кубов и сфер, а после функционализации разница в гидродинамических размерах достигает 1,6 раз. С учетом аналогичных фазового состава и используемой формуляции липидов для покрытия, наблюдаемая цитотоксичность октаподоов может объясняться именно размерным эффектом. Таким образом, для дальнейшей загрузки терапевтических миРНК были выбраны образцы кубов и сфер, поскольку они обладают коллоидной стабильностью, оптимальными физико-химическими свойствами и оказались нетоксичными в экспериментах *in vitro* в исследуемых концентрациях (до 400 мг/мл).

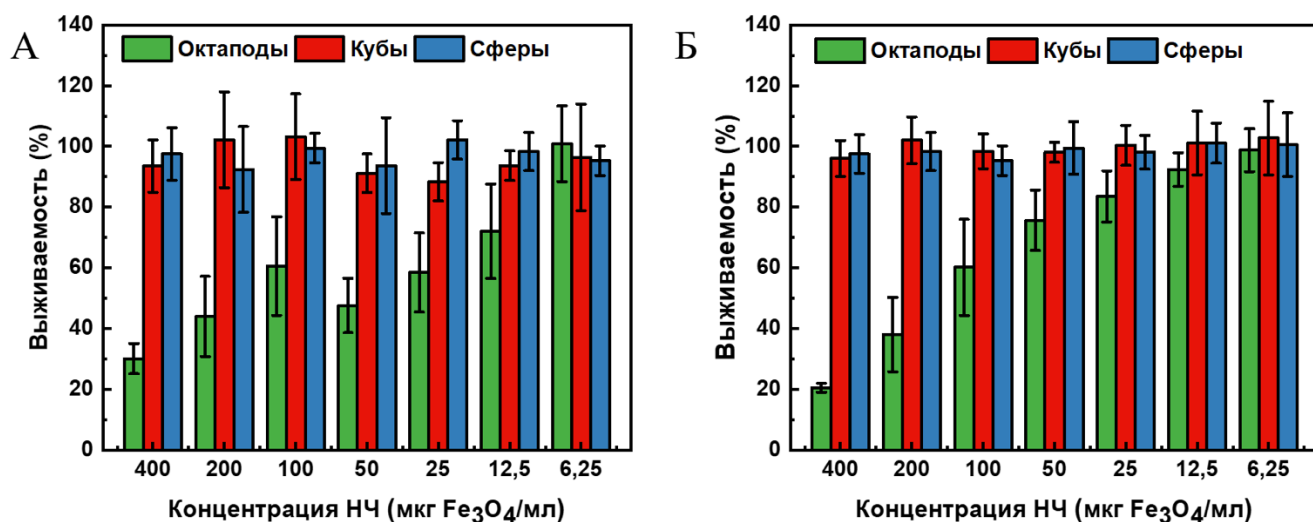


Рисунок 3.12 – Выживаемость клеток HepG2 (А) и Huh7 (Б) в ответ на воздействие различными концентрациями экспериментальных образцов

(n = 3, показаны средние величины ± стандартное отклонение)

3.3 Оптимизация загрузки миРНК на функционализированные липидами НЧ

Методика для загрузки миРНК основана на адсорбции отрицательно заряженных нуклеиновых кислот на поверхность НЧ, покрытых положительно заряженными липидами, под действием интенсивного перемешивания [263; 264]. После адсорбции, не оставаясь на поверхности частиц, молекулы миРНК могут претерпевать конформационные перестройки внутри липидного покрытия, состоящего из нескольких слоев, что в итоге повышает их стабильность к воздействию нуклеаз. Для выбора оптимальных параметров загрузки миРНК

была проведена серия экспериментов, в которой варьировали массовое соотношение формуляции липидов (расчёт производился на липидоид С12-200) к миРНК: $w = m_{\text{С12-200}}/m_{\text{миРНК}}$, w в диапазоне от 5,2 до 0,1. У полученных РНК-загруженных ЛНЧ с магнитным ядром сферической и кубической формы (ЛНРНК-С и ЛНРНК-К, соответственно) определяли гидродинамический размер и дзета-потенциал с помощью метода ДСР, данные представлены на Рисунках 3.13 и 3.14.

Для образца сферической формы на Рисунках 3.13А и 3.14А видно, что при увеличении концентрации миРНК в системе гидродинамический размер ЛНРНК-С возрастает от 53 ± 3 нм до 167 ± 13 нм, достигает критической отметки в примерно 1500 нм (агломерация) для соотношения С12-200 к миРНК = 1,3, после чего уменьшится до 56 ± 1 нм для соотношения С12-200 к миРНК = 0,1. Аналогичная картина наблюдается для образца кубической формы: с увеличением концентрации миРНК в системе гидродинамический размер увеличивается от 72 ± 3 нм до 82 ± 4 нм, в точке соотношения С12-200 к миРНК = 2,6 наблюдается агломерация, в точке 1,3 – агрегация и выпадения образца в осадок и далее уменьшение размера до 52 ± 1 нм. На Рисунке 3.14В показано соответственное изменение индекса полидисперсности (ИПД) для образцов, который растет при росте гидродинамического размера.

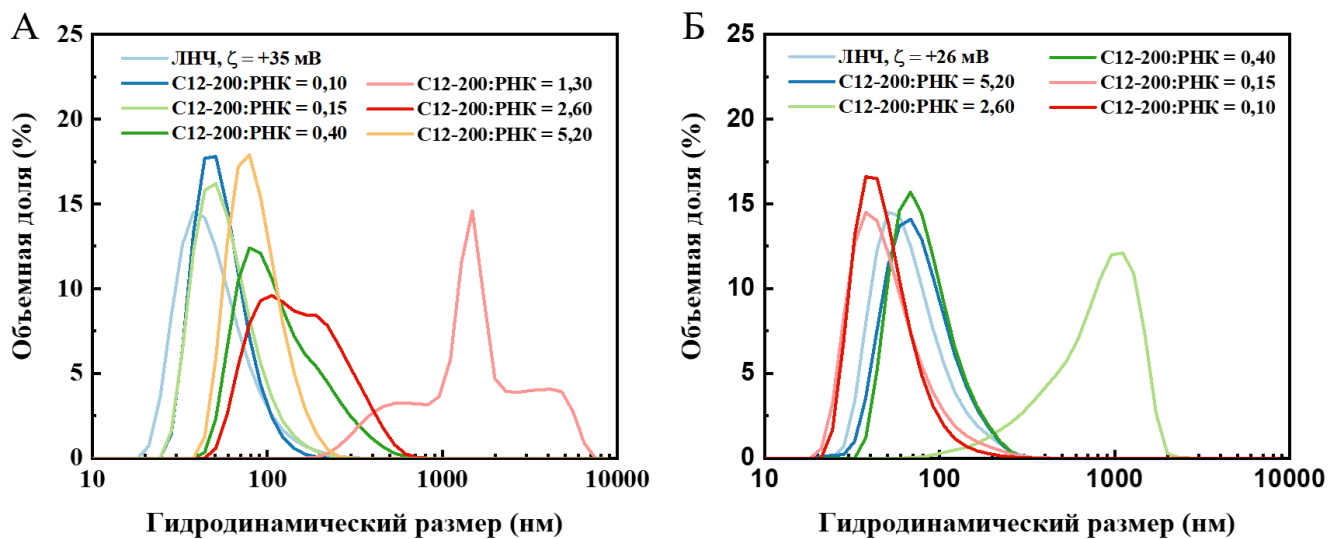


Рисунок 3.13 – Исследование коллоидной стабильности и поверхностного заряда экспериментальных образцов, полученных при варьировании соотношения между миРНК и ЛНЧ. А) ЛНЧ сферической формы Б) ЛНЧ кубической формы

На Рисунке 3.14Г приведен график зависимости дзета-потенциала миРНК-загруженных образцов: изначально ЛНЧ имеют выраженный положительный заряд – 35 мВ и 26 мВ для образца сферической и кубической формы, соответственно. После прохождения нулевой точки (точки перезарядки), где образцы агрегируют, заряд с положительного меняется на

отрицательный и постепенно уменьшается до -26 мВ и -29 мВ для ЛНРНК-С и ЛНРНК-К, соответственно, при максимальном количестве миРНК (избыток). Поверхностный заряд является индикатором доступных заряженных групп на поверхности частиц: отрицательный заряд обозначает, что НЧ в большинстве своем покрыты миРНК, в то время как положительный заряд – неполное насыщение катионных центров липидной формуляции [304]. Полученные данные говорят об успешной загрузке отрицательно заряженной миРНК на положительно заряженные ЛНЧ. Таким образом, возможно получать две модификации экспериментальных образцов: положительно заряженные комплексы с низким содержанием миРНК и отрицательно заряженные – с высоким.

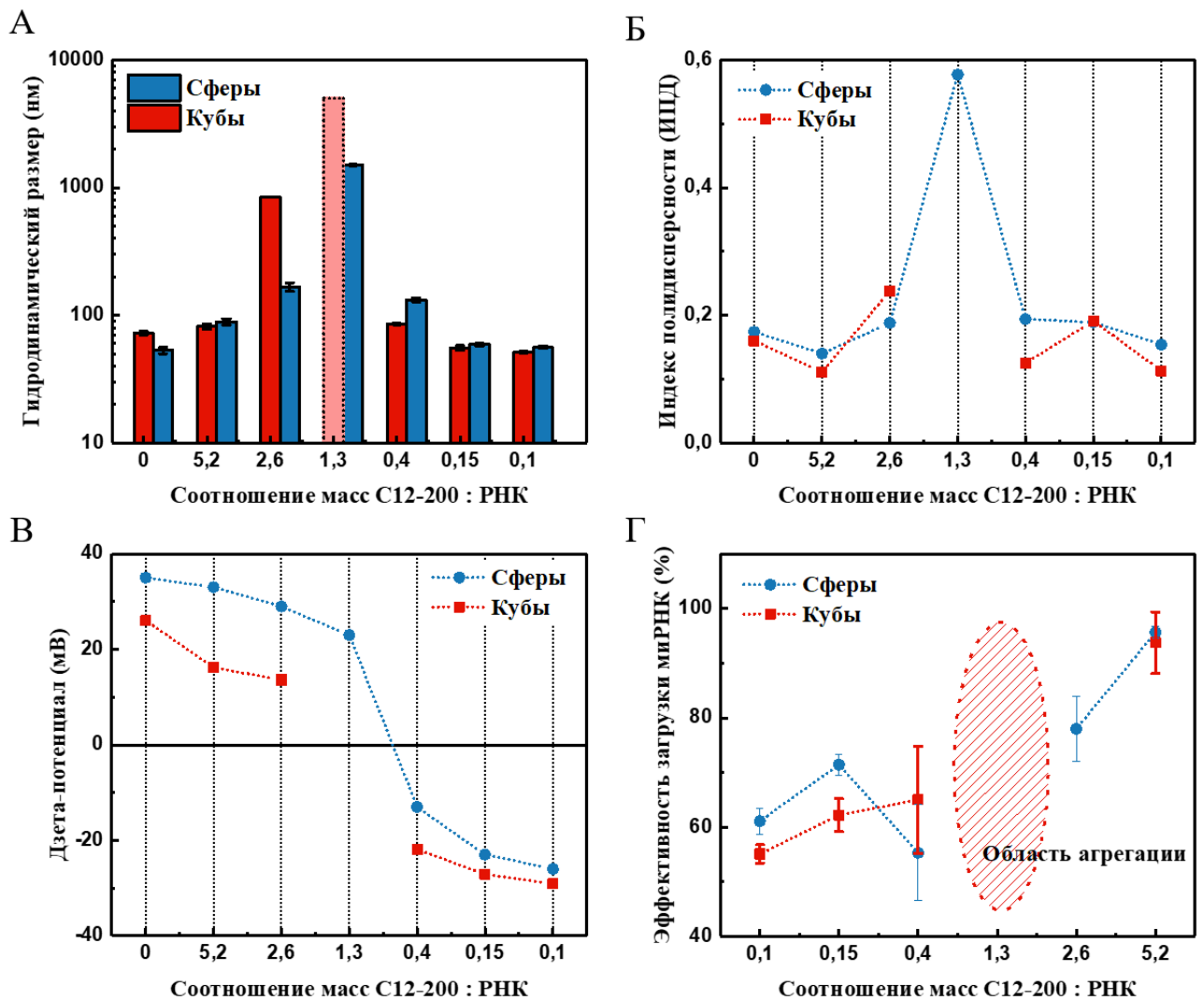


Рисунок 3.14 – Сравнительная характеристика миРНК-загруженных ЛНЧ кубической и сферической формы с различными соотношениями между миРНК и ЛНЧ.

А) гидродинамический размер; Б) ИПД; В) дзета-потенциал; Г) эффективность загрузки миРНК

На Рисунке 3.14Г видно, что график условно разделен на три области: область низких концентраций миРНК ($C_{12-200} : \text{миРНК} = 5,2$), высоких концентраций ($C_{12-200} : \text{миРНК}$ менее 0,15) и промежуточная область в окрестности точки перезарядки поверхности НЧ (где НЧ теряют коллоидную стабильность, $C_{12-200} : \text{миРНК} = 1,3$). Для обоих образцов эффективность загрузки при низкой концентрации миРНК составляет более 93 %. В промежуточной области наблюдается многофакторный процесс, когда количества молекул миРНК недостаточно для полной перезарядки поверхности ЛНЧ и при этом результирующий дзета-потенциал смещается в нейтральную область, поэтому за счет магнитных взаимодействий и отсутствия электростатической стабилизации НЧ агрегируют (или агрегируют).

С увеличением гидродинамического размера площадь поверхности и, соответственно, емкость НЧ уменьшаются. В области высоких концентраций миРНК ($C_{12-200} : \text{миРНК} = 0,1$ и 0,15) наблюдается ожидаемое снижение эффективности загрузки, поскольку в данной системе миРНК находится в избытке. Эффективность загрузки миРНК для ЛНРНК-С и ЛНРНК-К в этой области практически не отличается – $61,1 \pm 2,4 \%$ и $55,1 \pm 1,7 \%$ (разница на 6 %.) для сферических и кубических ЛНЧ, соответственно, при соотношении C_{12-200} к миРНК = 0,1. Для соотношения $C_{12-200} : \text{миРНК} = 0,15$ различие между образцами составляет уже примерно 9 % (эффективность загрузки для сфер выше). Схема на Рисунке 3.15 иллюстрирует соотношение между активными катионными центрами липидной формуляции и отрицательно заряженными молекулами миРНК при загрузке.

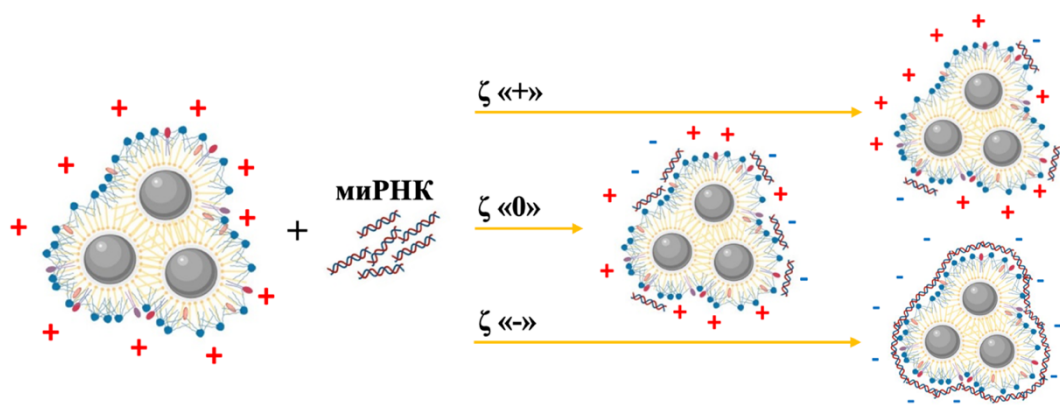


Рисунок 3.15 – Схематическое представление изменения результирующего дзета-потенциала ЛНЧ после загрузки миРНК в зависимости от соотношения между ними

На Рисунке 3.16А-Г представлены микрофотографии, полученные методом ПЭМ, образованных кластеров НЧ после функционализации и загрузки миРНК (соотношением между C_{12-200} и миРНК = 0,1), на Рисунке 3.16Д – гидродинамический размер НЧ на разных стадиях подготовки. Для образца ЛНРНК-С характерно выстраиваться в разветвленные цепочки, для ЛНРНК-К – в плотноупакованные кластеры. Таким образом, более высокая эффективность

загрузки миРНК на сферические ЛНЧ может быть связана с большей удельной поверхностью образованных кластеров.

Основные взаимодействия между магнитными НЧ состоят из сил отталкивания за счет стерической стабилизации и сил притяжения Ван-дер-Ваальса. Магнитное диполь-дипольное анизотропное взаимодействие считается важным фактором для формирования агрегатов, ориентация в пространстве которых зависит от кристаллической структуры входящих в их состав НЧ [305]. Преобладание диполь-дипольного взаимодействия будет наблюдаться в том случае, если размер НЧ (включая слой ПАВ на поверхности) и намагниченность насыщения достигнут критического значения, выражающееся через магнитный дипольный параметр λ , который будет описываться следующим уравнением [212]:

$$\lambda = \frac{U}{E} = \frac{\frac{\mu^2}{D^3}}{k_B T} = \frac{\left(\frac{\pi d^3 M_s}{6}\right)^2 / D^3}{k_B T} = \frac{\pi^2 d^6 M_s^2}{36 k_B T D^3} \quad (4)$$

где U – энергия диполь-дипольного взаимодействия, E – тепловая энергия, μ – магнитный момент частицы, D – общий диаметр частицы, то есть диаметр магнитного ядра плюс двойная длина поверхностного лиганда, d – диаметр магнитного ядра, M_s – намагниченность насыщения, k_B – постоянная Больцмана, T – температура.

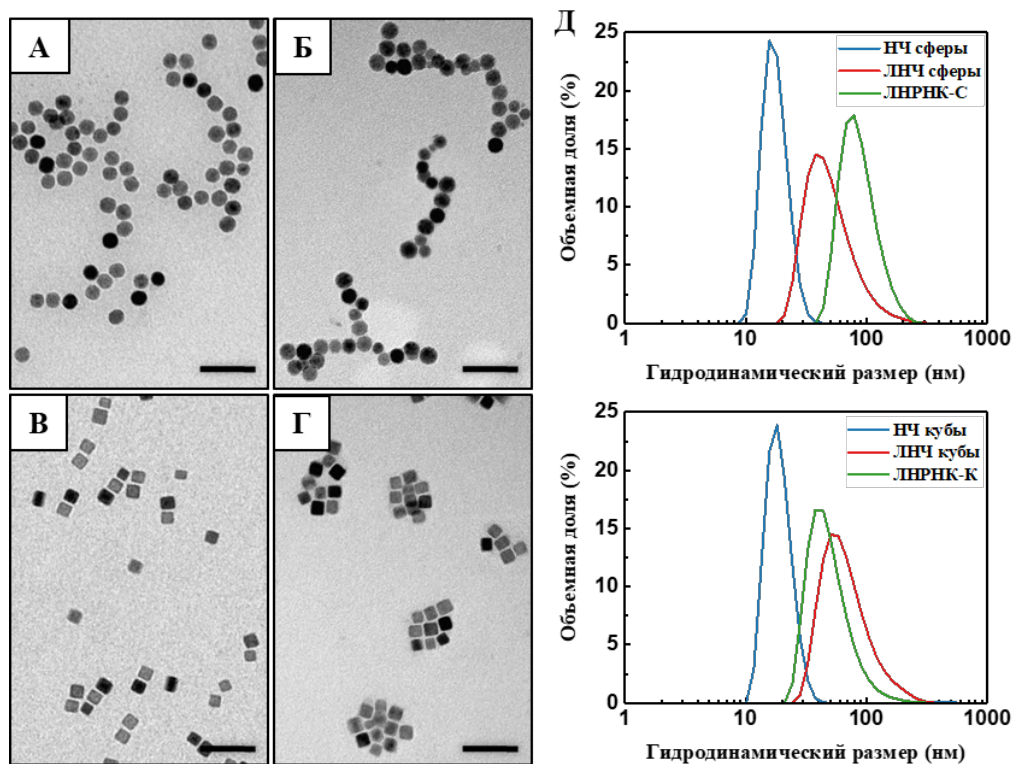


Рисунок 3.16 – ПЭМ-микрофотографии НЧ сферической (А, Б) и кубической (В, Г) формы до (А, В) и после (Б, Г) функционализации и загрузки миРНК; Д) изменение гидродинамического размера НЧ до и после функционализации, а также после функционализации и загрузки миРНК

Критическое значение дипольного параметра составляет приблизительно 3 и значение λ больше трех будет указывать на доминирующий вклад магнитного дипольного анизотропного взаимодействия над изотропным тепловым [306]. Другими словами, при достаточном λ (большой размер, высокая намагниченность насыщения) НЧ будут стремиться к формированию агломератов (цепочки, кольца и кластеры) для обеспечения минимума потенциала, располагаясь в одном направлении вдоль общей оси. Чтобы минимизировать энергию системы, сферические НЧ ориентируются по предпочтительному направлению намагниченности, то есть по направлениям $\langle 111 \rangle$ магнетита. Таким образом, для образца ЛНРНК-С характерно формирование одно- и двухцепочечных структур, а также скрещенные цепочки и кольца. Однако, кубические НЧ не могут выровняться вдоль осей $\langle 111 \rangle$ из-за своей формы (эти направления выходят из их вершин), что приводит к соприкосновению их граней $\{100\}$, формируя при этом небольшие агломераты кластерного вида. С учетом сопоставимых размера и намагниченности насыщения НЧ, входящих в состав образцов ЛНРНК-С и -К, важно отметить, что решающее значение в формировании того или иного типа кластеров обуславливается прежде всего формой НЧ, что приводит к различной емкости при загрузке миРНК из-за разницы в площади поверхности.

3.4 Биологическое тестирование НЧ, загруженных миРНК

Для исследования цитотоксичности миРНК-загруженных экспериментальных образцов использовался стандартный MTS-тест (клеточные линии – Huh7 и HepG2). Данные по выживаемости клеток, полученные через 24 часа инкубации с образцами ЛНРНК-С и ЛНРНК-К в концентрации от 1,2 до 600 мкг/мл (по оксиду железа) представлены на Рисунке 3.17.

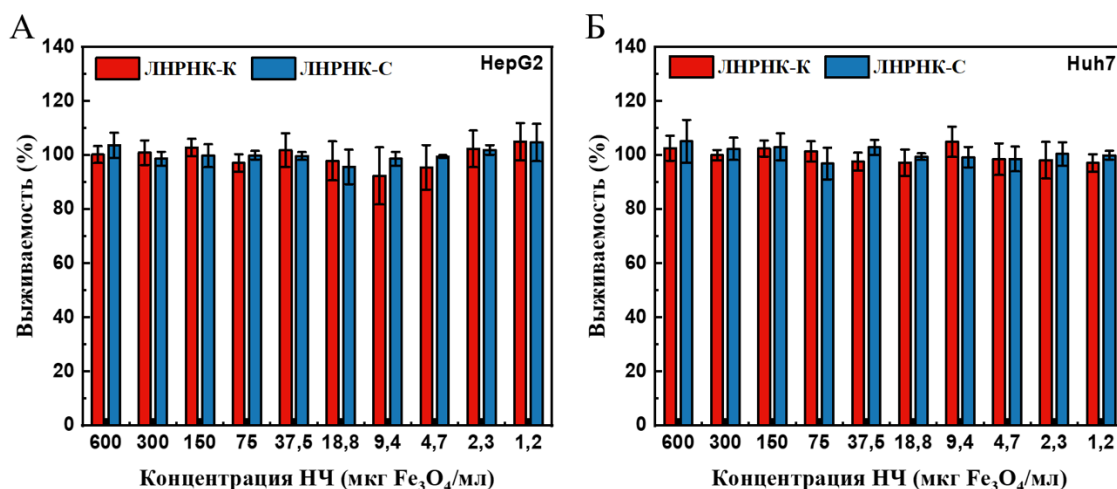


Рисунок 3.17 – Выживаемость клеток HepG2 (А) и Huh7 (Б) в ответ на воздействие различными концентрациями НЧ, загруженных миРНК. Показаны средние величины $\pm$ стандартное отклонение

Оба экспериментальных образца не продемонстрировали токсического действия в исследуемых концентрациях *in vitro* (значение CC_{50} не достигнуто). Таким образом, оба образца могут быть использованы для дальнейших экспериментов.

Эффективность ингибирования экспрессии мРНК *ApoB* под действием ЛНРНК-С и ЛНРНК-К была проверена в экспериментах *in vitro* на клеточных культурах Huh7 и HepG2. Использовали подход обратной трансфекции. Основное различие в подходах между прямой и обратной трансфекцией заключается в том, что клетки высеваются за день до трансфекции при прямой трансфекции или одновременно с проведением трансфекции при обратной. При обратной трансфекции миРНК сначала смешивается с реагентом для трансфекции с образованием комплексов в лунках планшета и затем клетки, суспендированные в среде, добавляют в лунки. Прямая трансфекция обычно применяется в ситуациях, когда клетки должны быть уже прикреплены к субстрату и находиться в активной фазе роста и деления до применения комплекса НК + трансфицирующий агент. Напротив, обратная трансфекция представляет собой процесс, в котором комплекс НК + трансфицирующий агент непосредственно смешиваются с клетками в суспензионном состоянии, обеспечивая тем самым более равномерное распределение и больший контакт агента со всей поверхностью клеточной мембраны. Эффективность трансфекции с использованием экспериментальных образцов сопоставляли с коммерчески доступным реагентом Lipofectamine 3000. В экспериментальные исследования также были включены дополнительные контрольные и проверочные эксперименты, которые позволяют исключить ошибки при интерпретации результатов: в качестве контроля (без миРНК) использовали интактные клетки, а также образцы ЛНРНК-С и ЛНРНК-К, однако, вместо входящей в их состав миРНК к мРНК *ApoB*, использовалась миРНК к мРНК люциферазы. В случае отсутствия достоверного различия ($p > 0,05$) между интактной группой и группой с миРНК к мРНК люциферазы, экспериментальные данные нормировали на интактную группу. Дополнительно осуществляли контроль токсичности (проверка жизнеспособности клеток) посредством визуального осмотра с помощью фазово-контрастной микроскопии. Данные по эффективности ингибирования экспрессии мРНК *ApoB* под влиянием экспериментальных образцов представлены на Рисунке 3.18.

Эффективность ингибирования экспрессии мРНК *ApoB* под действием образцов для клеточной линии HepG2 (Рисунок 3.18Б) составила менее 10 % при концентрации 20 нМ и немного различается для обоих образцов при концентрации 30 нМ и составляет 23 ± 3 % и 35 ± 7 % для образцов ЛНРНК-С и ЛНРНК-К, соответственно. Эффективность трансфекции комплекса миРНК-Lipofectamine (44 ± 4 %) примерно на 10 % выше, чем комплекса миРНК с ЛНРНК-К и на 20 % выше ЛНРНК-С. Однако высокая эффективность трансфекции с помощью комплекса Lipofectamine сопряжена с его значительной токсичностью (примерно только треть

клеток выживает после трансфекции), к тому же, его нельзя применять в экспериментах *in vivo* по той же причине. Следует отметить, что при концентрации 30 нМ значения эффективности ингибирования экспрессии с помощью кубических НЧ и Lipofectamine достоверно не различаются.

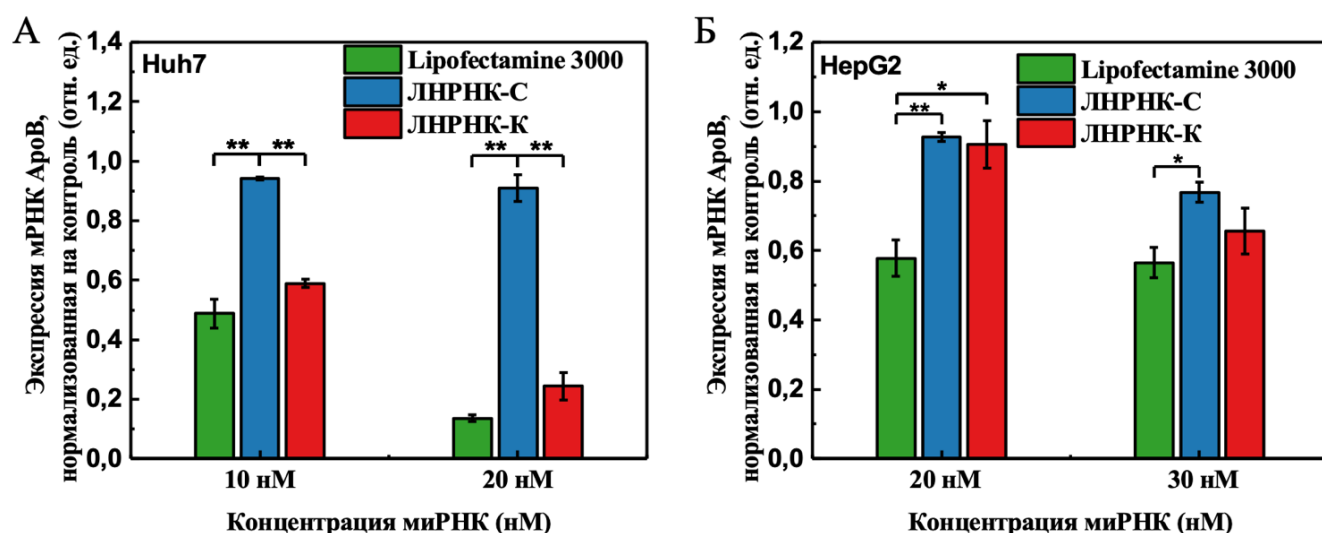
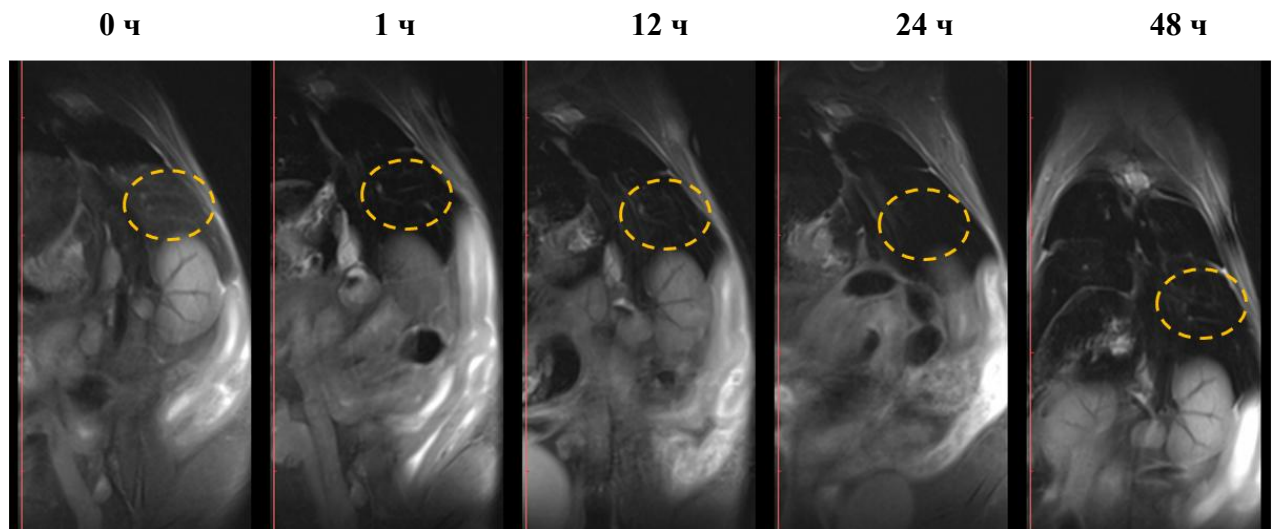


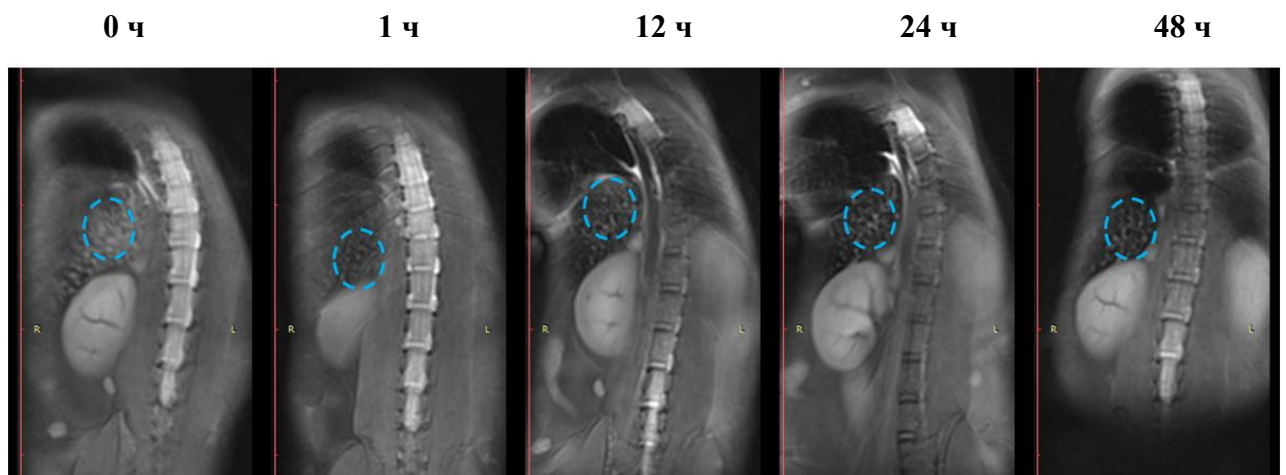
Рисунок 3.18 – Эффективность ингибирования экспрессии мРНК *AroB* после проведения обратной трансфекции с помощью ЛНРНК-С, ЛНРНК-К и Lipofectamine (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, ANOVA, $n = 3$, показаны средние величины $\pm$ среднеквадратичное отклонение (SED)) для клеточной линии Huh7 (А) и HepG2 (Б)

Эффективность ингибирования экспрессии мРНК *AroB* для ЛНРНК-К (клеточная линия Huh7) составляет 41 ± 2 % для концентрации 10 нМ и 76 ± 6 % для концентрации 20 нМ, что является очень высоким показателем и сопоставимо с Lipofectamine 3000 (достоверно не различаются). Для образца ЛНРНК-С показатель эффективности ингибирования экспрессии мРНК *AroB* ниже и составляет всего несколько процентов (6-9 %).

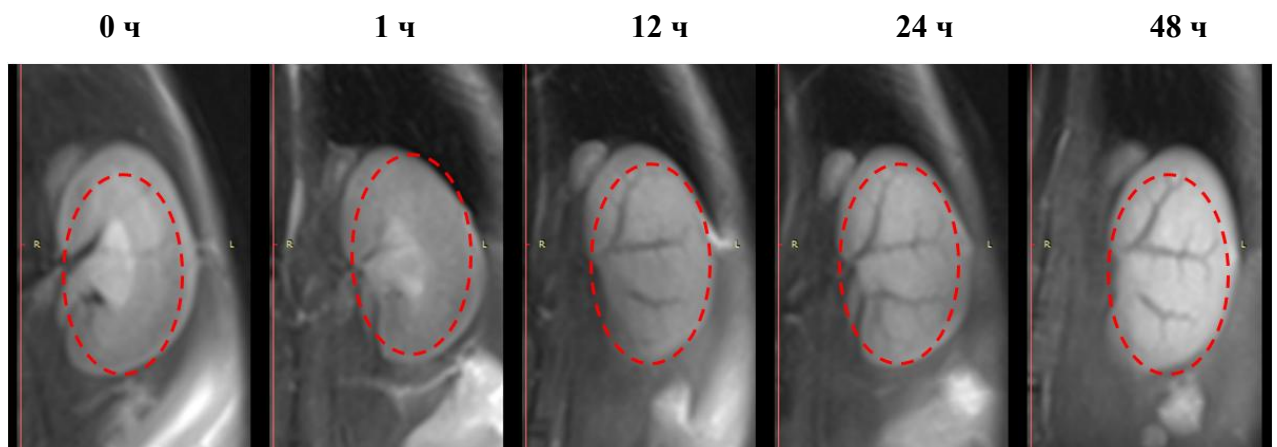
Для анализа поведения НЧ *in vivo* исследовалась локализация экспериментальных образцов в динамике после введения лабораторным животным. НЧ оксида железа являются T2-контрастным агентом, поэтому их накопление в органах и тканях животного возможно визуализировать с помощью метода МРТ (7Т МР-томограф ClinScan, для получения трансверсальных T2-взвешенных изображений использовался режим с частотным подавлением жира). Для оценки накопления ЛНРНК-С и -К в динамике исследования проводили до введения экспериментальных образцов, а также через 1, 12, 24 и 48 часов после инъекции. Ткани и органы, в частности, печень, накопившая НЧ, будет давать пониженный сигнал при T2-релаксации, то есть более светлый сигнал до инъекции сменится более темным сигналом после накопления наночастиц, что видно на Рисунках 3.19 и 3.20.



Негативное контрастирование печени (пунктир ограничивает ее область на коронарном срезе) после введения ЛНРНК-С

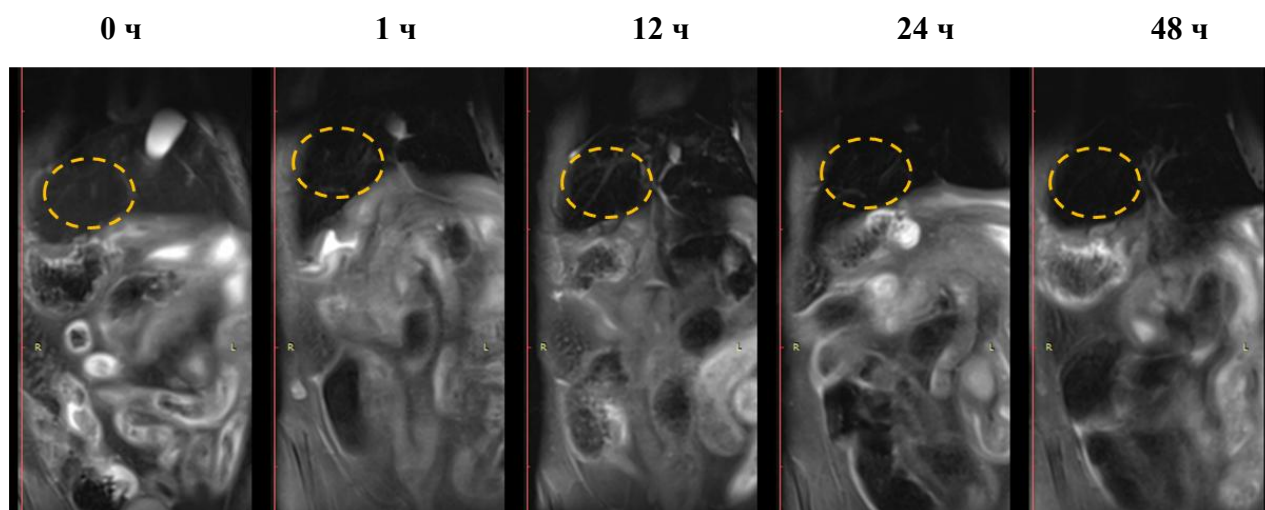


Изменение вида селезенки на МРТ после введения ЛНРНК-С

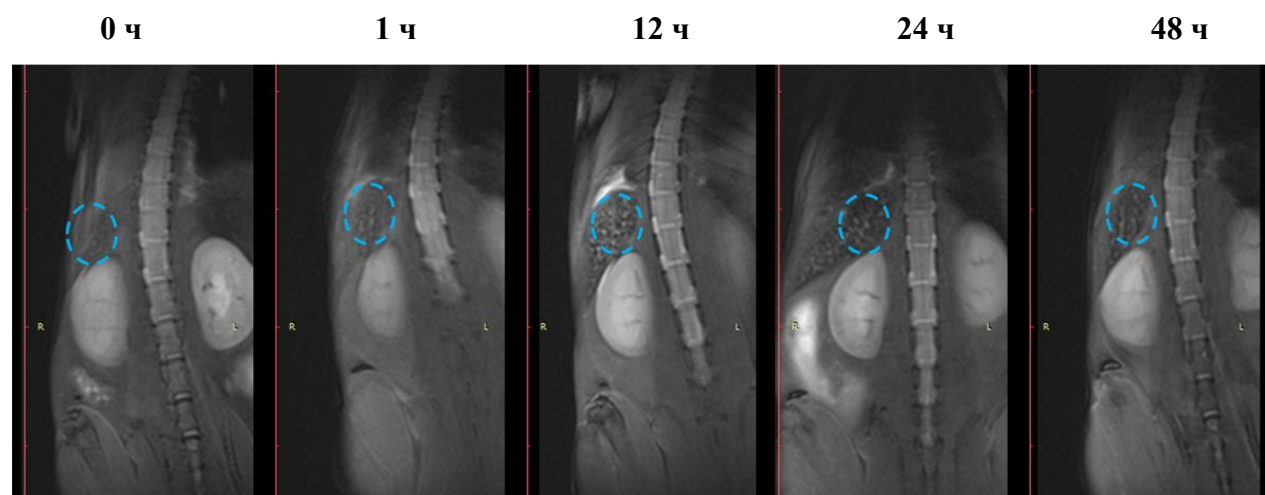


Изменение вида почки на МРТ после введения ЛНРНК-С

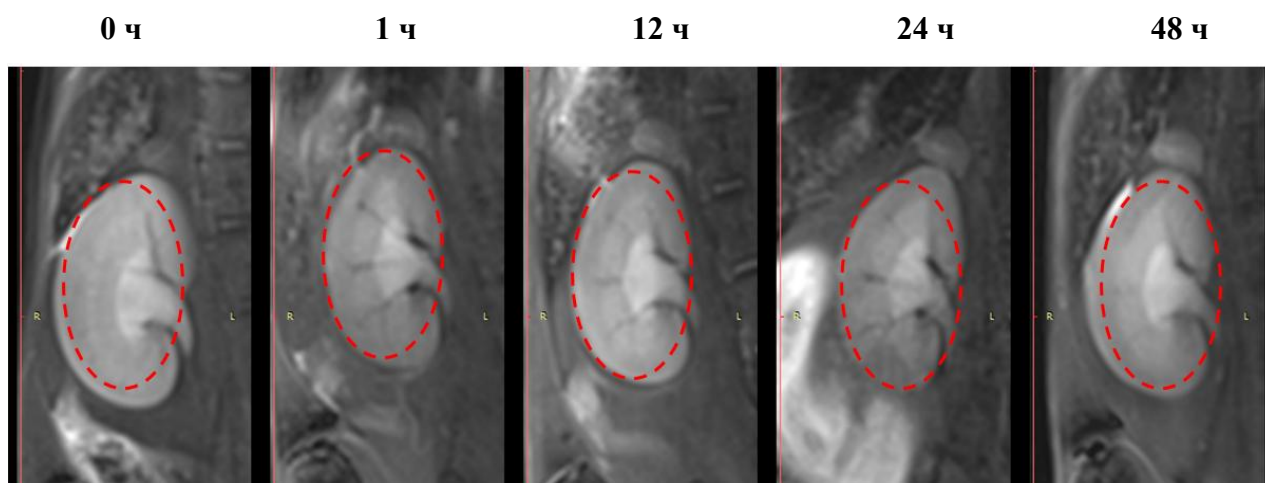
Рисунок 3.19 – Репрезентативные МРТ-изображения органов после внутривенного введения экспериментального образца ЛНРНК-С



Негативное контрастирование печени (пунктир ограничивает ее область на коронарном срезе) после введения ЛНРНК-К



Изменение вида селезенки на МРТ после введения ЛНРНК-К



Изменение вида почки на МРТ после введения ЛНРНК-К

Рисунок 3.20 – Репрезентативные МРТ-изображения органов после внутривенного введения экспериментального образца ЛНРНК-К

Однако МРТ снимки не позволяют строго количественно оценивать изменения сигнала, потому что перед каждой съемкой томограф настраивается и калибруется заново. Для того, чтобы все же получить некую количественную оценку, часто используют такой показатель, как CNR (contrast-to-noise ratio) – отношение контраста к шуму. При этом подходе потемнение района интереса оценивают по какой-либо контрольной ткани на том же снимке, изменение сигнала от которой считают незначительным (или нулевым). Примером контроля может служить мышечная ткань [307]. В экспериментальных исследованиях были использованы здоровые животные, печень целиком (за исключением желчных протоков и желчного пузыря) приобретала темную окраску при съемке на МРТ, поэтому для подсчета CNR была найдена разница между сигналами от области интереса (участок печени, усредненный сигнал собирался с нескольких кадров-сечений одной съемки) и от мышечной ткани, и поделен на сигнал от мышечной ткани ($CNR = (SI_{\text{muscle}} - SI_{\text{liver}}) / SI_{\text{muscle}}$, где SI_{muscle} – усредненный сигнал от области мышечной ткани, SI_{liver} – усредненный сигнал от печени). Для подсчетов была использована съемка в режиме t2 на коронарной проекции. Область мышцы выбирали из участка тела, наиболее близко расположенного к принимающей катушке МРТ.

Помимо мышцы в качестве контрольной области также использовался желчный пузырь. Съемка всей мыши идет одновременно, то есть калибровка прибора внутри одной съемки не меняется и не влияет на изменение относительного сигнала. Количественное значение сигнала от областей интереса (печень, мышца наиболее близка к катушке – на грудице или вдоль позвоночника – в зависимости от положения катушки, желчный пузырь, шум от область воздуха рядом с животным) определяли в программе для работы с изображениями MANGO Multi-image Analysis GUI. Примеры выделения областей для подсчета приведены на рисунке 3.21.

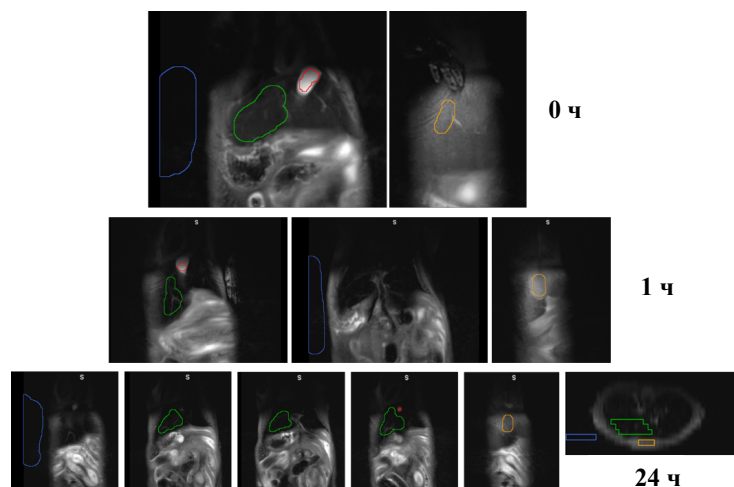


Рисунок 3.21 – Сбор количественных данных с МРТ изображений в программе MANGO. Области интереса в печени (зеленым), мышце (желтым), желчном пузыре (красным), шум (синим) при обработке МРТ изображения

С помощью этого подхода определили CNR печени после введения группам животных образцов ЛНРНК-С и ЛНРНК-К. CNR определяли до инъекции и через 1, 12, 24 и 48 часов, на Рисунке 3.22А показаны расчеты при сравнении печени и мышцы, на Рисунке 3.22Б – печени и желчного пузыря.

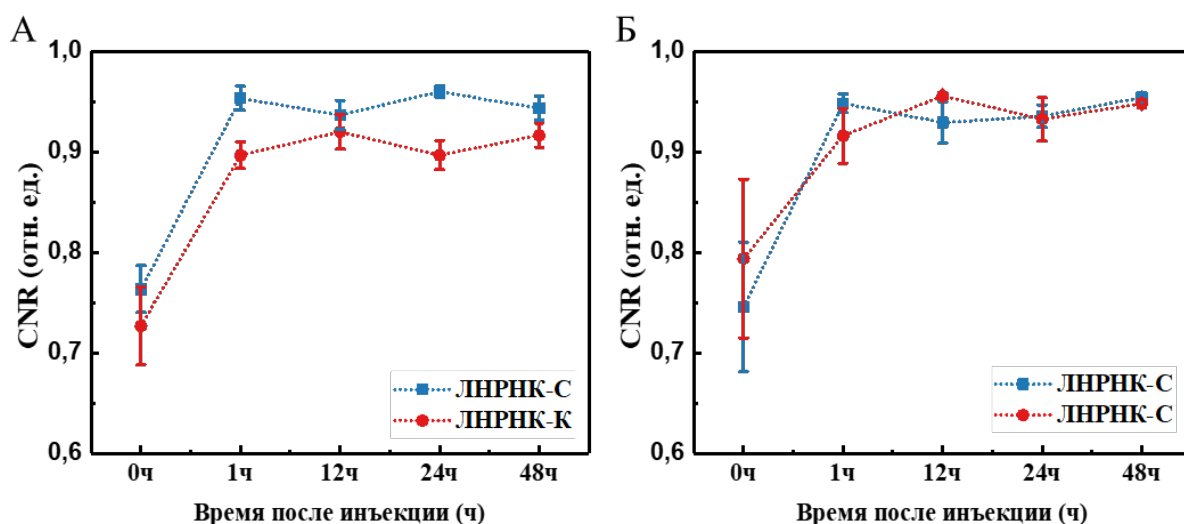


Рисунок 3.22 – Параметр отношения контраста к шуму (CNR) для печени по сравнению с А) мышцей Б) желчным пузырем после введения образцов ЛНРНК-С и -К

Подводя итог, можно заключить, что ЛНРНК-С и -К эффективно накапливаются в печени, значения CNR превышали 0,9 уже через 1 час после введения образцов, сигнал от них прослеживали в течение двух суток.

С помощью метода АЭС-ИСП были измерены концентрации железа в анализе растворенных органов, изъятых через 6 и 48 часов после инъекции образцов ЛНРНК-С и -К. Результаты по накоплению экспериментальных образцов в органах (печень, сердце, легкие, селезенка и почки) приведены на рисунках 3.23 и 3.24.

Через 6 часов уровень накопления экспериментального образца ЛНРНК-С в печени соответствует ~100 % от массы введенных НЧ (по магнетиту), через 48 часов количество образца в целевом органе падает до 47 % от введенной дозы, что говорит о том, что НЧ не задерживаются в печени и через 48 часов примерно половина введенной дозы образца ЛНРНК-С удаляется из организма выделительными системами. Схожая картина наблюдается и для ЛНРНК-К: уровень накопления в печени составляет 89 % и 34 % от введенной дозы через 6 и 48 часов, соответственно. Полученные результаты указывают на то, что ЛНРНК-С и ЛНРНК-К накапливаются и метаболизируются в печени, что соответствует данным литературы, а также результатам МРТ-исследования, представленным выше [308]. Накопление исследуемых образцов в других внутренних органах пренебрежительно мало.

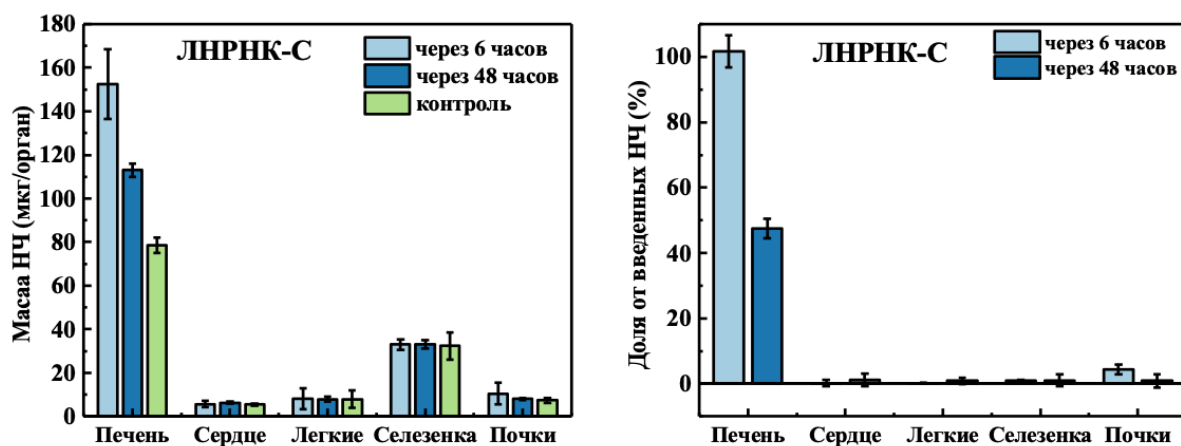


Рисунок 3.23 – Исследование биораспределения ЛНРНК-С методом АЭС-ИСП через 6 и 48 часов после инъекции. Измерение концентрации железа в органах (слева) и оценка доли НЧ, накопившихся в органе, от массы всего введенного железа в составе образца (справа)

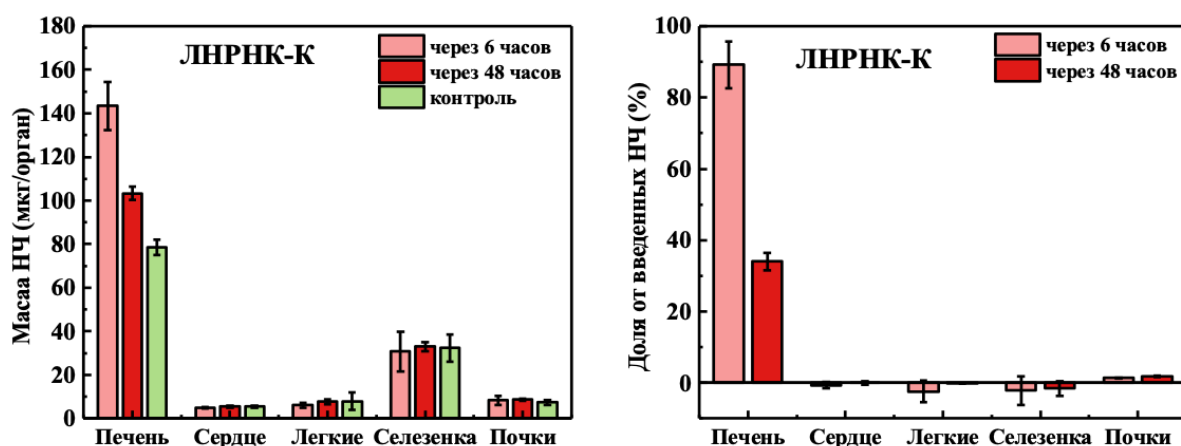


Рисунок 3.24 – Исследование биораспределения ЛНРНК-К методом АЭС-ИСП через 6 и 48 часов после инъекции. Измерение концентрации железа в органах (слева) и оценка доли НЧ, накопившихся в органе, от массы всего введенного железа в составе образца (справа)

Для определения локализации экспериментальных образцов в печени на клеточном уровне, образцы печени окрашивались по методу Перлса. Репрезентативные фотографии образцов печени в каждой из исследуемых групп представлены на Рисунке 3.25, контроль – типичные срезы печени интактных лабораторных животных после перфузии, не получавших дозу экспериментальных образцов. На представленных снимках хорошо видно накопление железа в печени для обоих экспериментальных образцов по сравнению с контрольными образцами. Наблюдается различие в интенсивности окраски печени: через 48 часов гранул синего оттенка гораздо меньше, чем через 6 часов, что справедливо для обоих образцов и хорошо согласуется с данными по биораспределению, полученным методом АЭС-ИСП (Рисунок 3.23 и 3.24) и говорит о том, что оба образца эффективно доставляются в печень, но достаточно быстро выводятся

выделительными системами организма, что видно по снижению интенсивности окраски гистологических срезов через 48 часов.

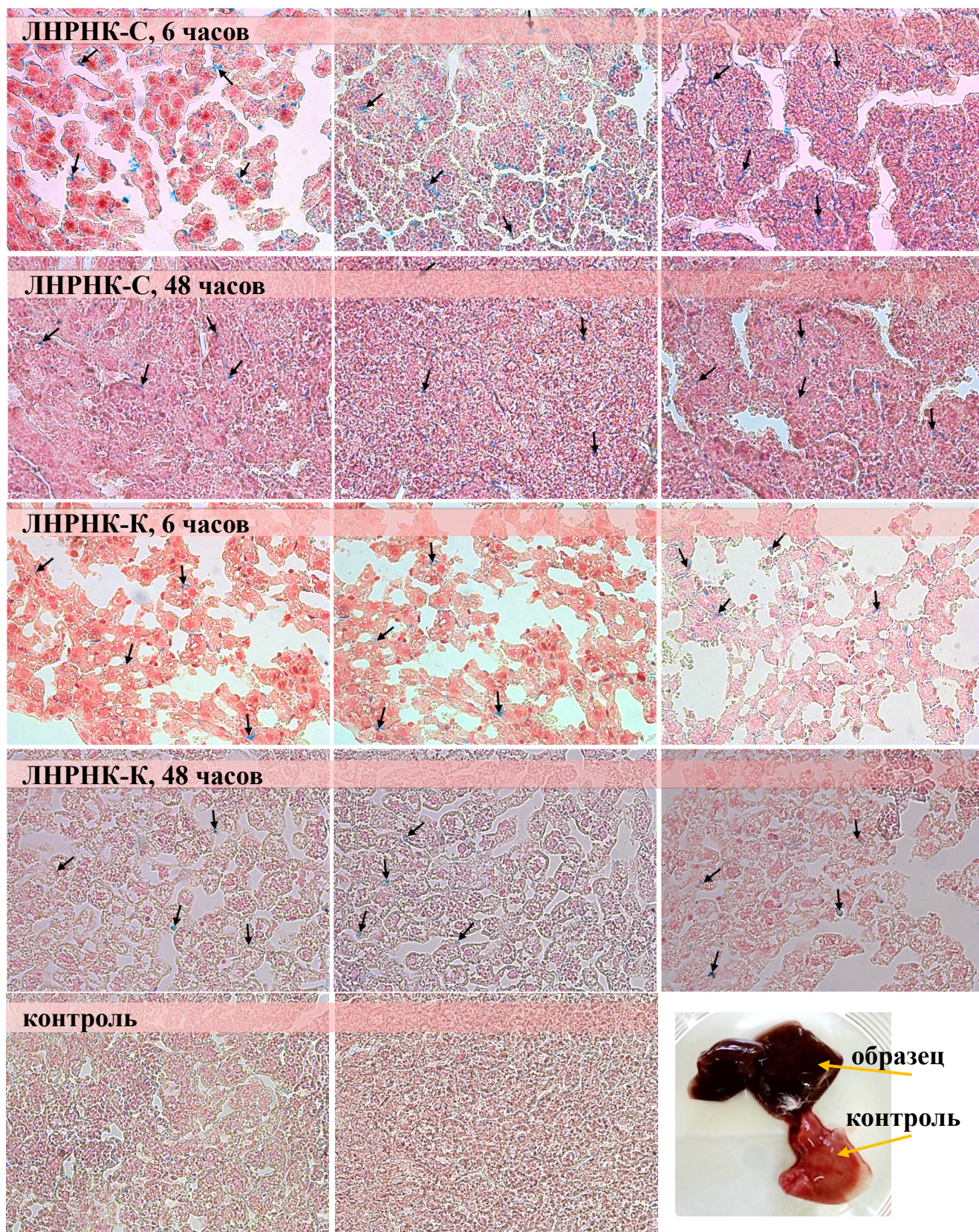


Рисунок 3.25 – Исследование локализации экспериментальных образцов в печени на клеточном уровне (окраска по Перлсу) через 6 и 48 часов после внутривенного введения дозы

Для изучения эффективности ингибирования экспрессии мРНК *ApoB* под влиянием экспериментальных образцов были проведены исследования на мышах линии BALB/c. Для этого была проверена эффективность ЛНРНК-С и -К в различных дозах (1,0 и 1,5 мг миРНК на кг мыши) через 72 часа после введения препаратов. Однако ни в одном из образцов не было обнаружено статистически значимого снижения уровня экспрессии, что показано на Рисунке 3.26А. С учетом того, что выбранный ген-мишень *ApoB* – это ген, кодирующий аполипопротеин липопротеинов низкой плотности, повышенная экспрессия которого напрямую связана с высоким показателем холестерина в крови, были проведены дополнительные исследования по оценке его концентрации [309]. Анализ общего холестерина продемонстрировал достоверное снижение его концентрации ($2,76 \pm 0,21$ ммоль/л для контроля, для образца ЛНРНК-С – $2,05 \pm 0,15$ ммоль/л и $1,87 \pm 0,09$ ммоль/л для концентрации 1,0 мг миРНК/кг и 1,5 мг миРНК/кг, соответственно; для образца ЛНРНК-К – $1,86 \pm 0,28$ ммоль/л и $1,70 \pm 0,34$ ммоль/л для концентрации 1,0 мг миРНК/кг и 1,5 мг миРНК/кг, соответственно) в сыворотке крови мышей под действием экспериментальных образцов по сравнению с контролем, что показано на Рисунке 3.26Б. Более того, образец ЛНРНК-К более эффективно снижал общий уровень холестерина у мышей (снижение на 33 и 39 % для концентрации 1,0 мг миРНК/кг и 1,5 мг миРНК/кг, соответственно), чем образец ЛНРНК-С (снижение на 26 и 32 % для концентрации 1,0 мг миРНК/кг и 1,5 мг миРНК/кг, соответственно).

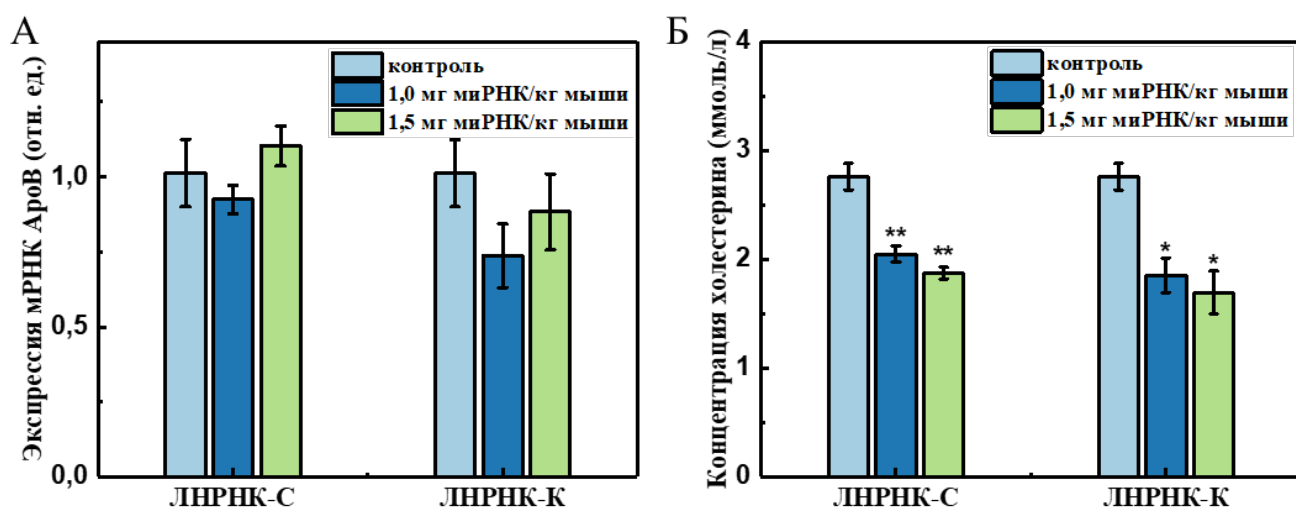


Рисунок 3.26 – А) Уровень экспрессии мРНК *ApoB* в образцах печени через 72 часа после введения ЛНРНК-С и ЛНРНК-К в дозе 1,0 и 1,5 мг/кг; Б) Уровень холестерина через 72 часа после введения; (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, ANOVA, $n = 3$, показаны средние величины $\pm$ стандартная ошибка среднего)

Для предварительной оценки токсичности экспериментальных образцов *in vivo* был проведен биохимический анализ крови лабораторных животных, исследованы показатели АЛТ и АСТ (аланинаминотрансфераза и аспартатаминотрансфераза), поскольку известно, что их уровни резко повышаются в случае острого повреждения печени – данные представлены на Рисунке 3.25 [310]. Поскольку все протестированные группы не показали статистической разницы в уровнях АЛТ и АСТ относительно контроля (PBS) в дозе 1,5 мг/кг, можно сделать предположение, что исследуемые образцы безопасны в этой дозе.

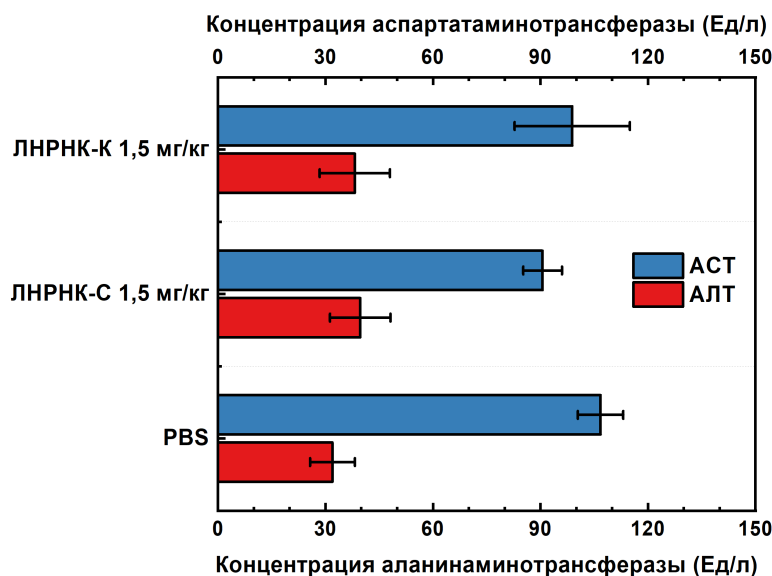


Рисунок 3.27 – Анализ повреждения клеток печени под действием экспериментальных образцов (ANOVA, $n = 3$, показаны средние величины $\pm$ среднеквадратичное отклонение)

3.5 Влияние внешнего магнитного поля на эффективность трансфекции

Для подбора режимов действия низкочастотного магнитного поля, которые будут положительно влиять на эффективность трансфекции, необходимы данные по динамике накопления ЛНЧ с загруженными миРНК. Гидродинамический размер, физико-химические свойства поверхности наночастиц и природа клеточной линии значительно определяют характер клеточных взаимодействий, их эндоцитарную маршрутизацию и эффективность поглощения. Изучение этих параметров необходимо для определения временных интервалов инкубации экспериментальных образцов с клетками до применения низкочастотного магнитного поля. На Рисунках 3.28 и 3.29 приведены изображения, полученные на флуоресцентном микроскопе EVOS, которые демонстрируют динамику накопления образцов ЛНРНК-С и ЛНРНК-К во времени при инкубации с клеточными линиями гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 и Huh7.

Как видно из микрофотографий, представленных на Рисунках 3.28 и 3.29, для клеточной линии HepG2 уже через 1 час наблюдалось накопление (трансмембранный перенос) ЛНРНК-С и ЛНРНК-К, для клеточной линии Huh7 – через 2 часа, в последующие часы (до 6 часов инкубации) накопление становится более выраженным.

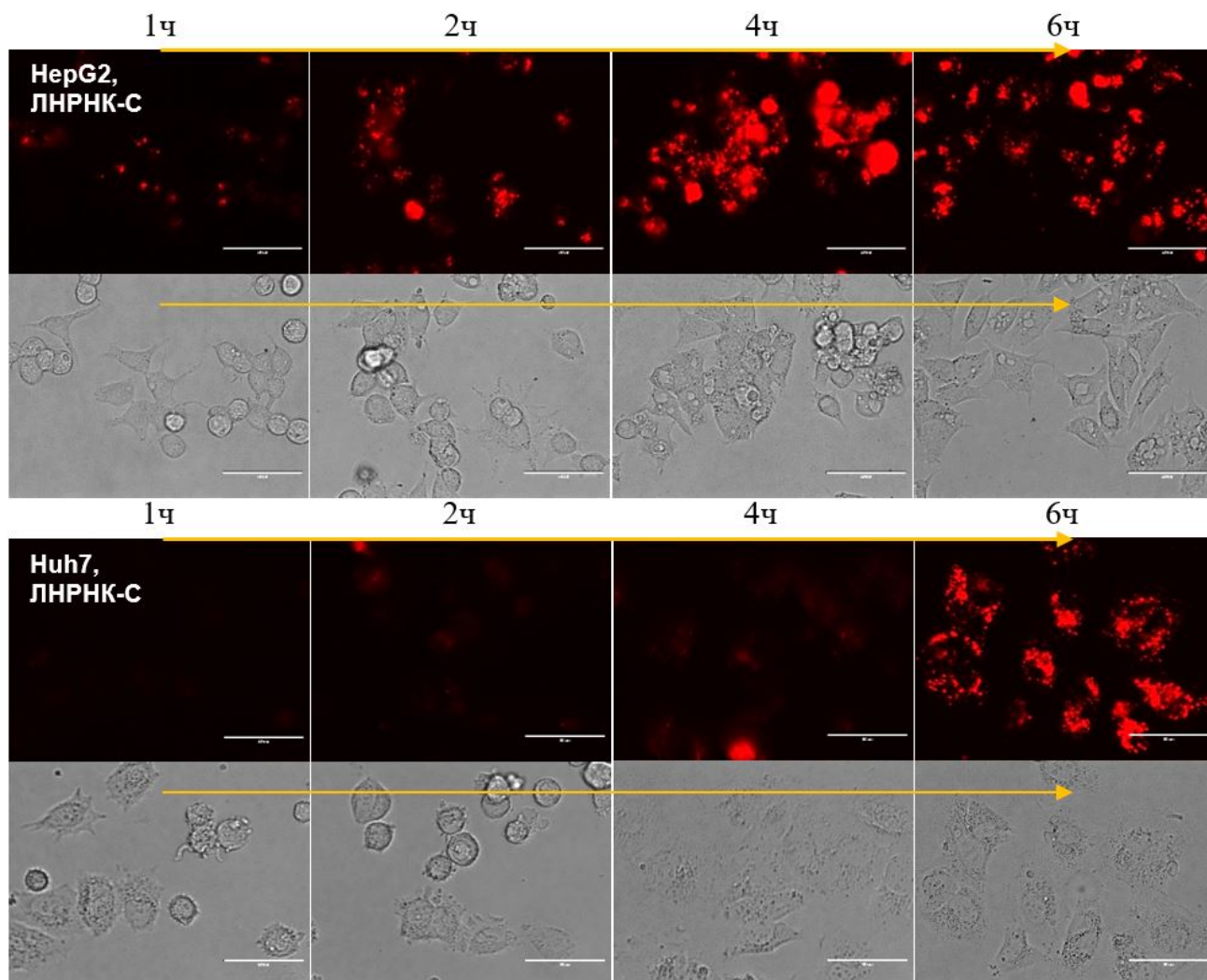


Рисунок 3.28 – Динамика накопления образца ЛНРНК-С, модифицированного флуоресцентной меткой DiD, в клетках линий HepG2 (сверху) и Huh7 (снизу)

В HepG2 уже через 4 часа инкубации с ЛНРНК-С наблюдается достаточно выраженное накопление, для Huh7 аналогичный по интенсивности сигнал виден только через 6 часов. Для образца ЛНРНК-К наблюдается схожая картина для разных клеточных линий, но выраженное накопление происходит ранее – через 2 часа для линии HepG2 и через 2-4 часа для Huh7, из чего можно заключить, что процесс накопления НЧ в большей степени зависит от природы клеточной линии, а не от формы магнитного ядра (сферическая, кубическая) в составе образцов, когда как динамика накопления между образцами различается.

Экспериментальный образец, имеющий в составе НЧ кубической формы (ЛНРНК-К), обладает более плотной укладкой НЧ в составе кластеров, чем ЛНРНК-С, который выстраивается в цепочечные структуры, что обеспечивает более тесный контакт ЛНРНК-К с мембраной клеток. Поэтому, можно предположить, что более быстрое и выраженное накопление образца ЛНРНК-К связано именно с плотной укладкой кубических НЧ оксида железа в его составе.

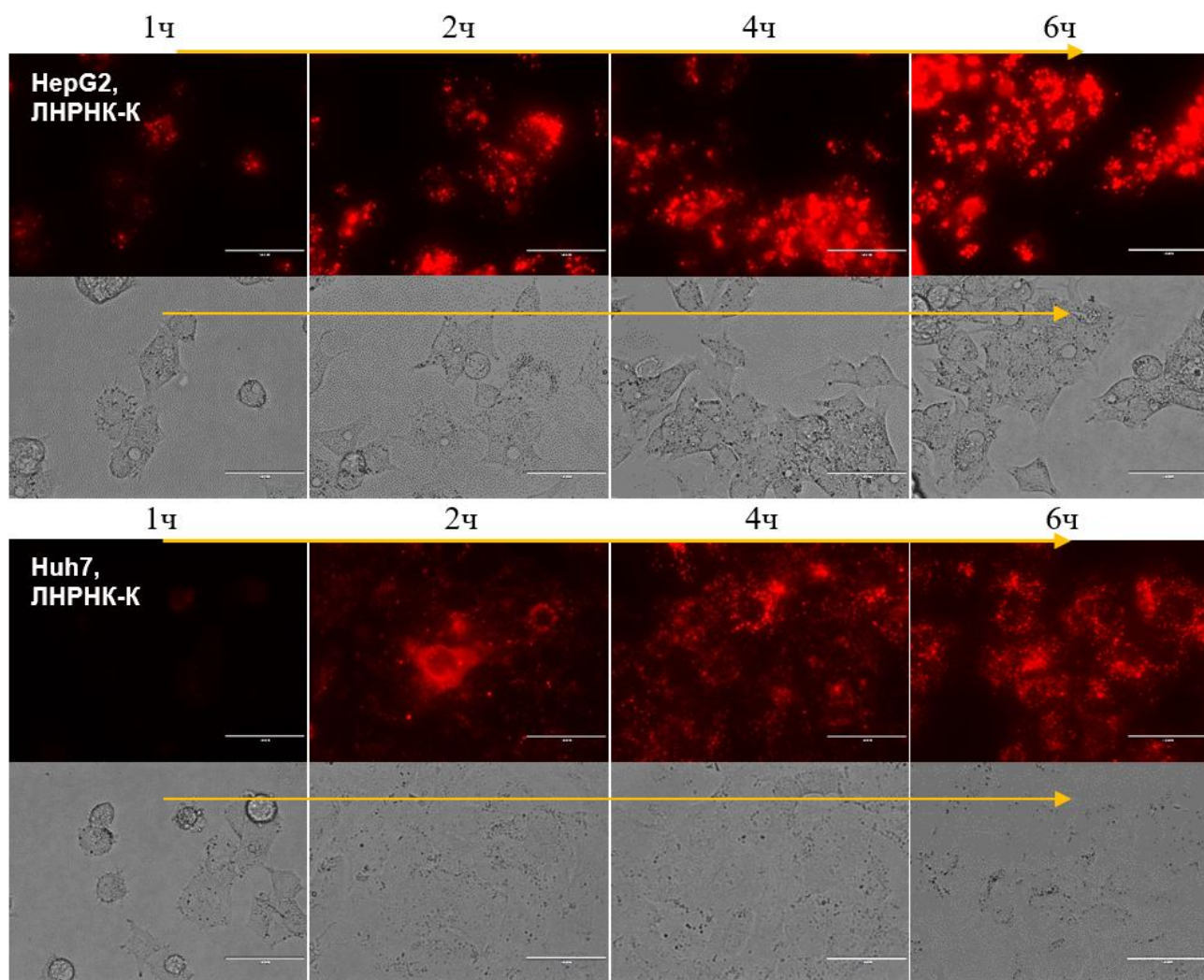


Рисунок 3.29 – Динамика накопления образца ЛНРНК-К, модифицированного флуоресцентной меткой DiD, в клетках линий HepG2 (сверху) и Huh7 (снизу)

Для проверки гипотезы, что одним из важных факторов, влияющим на взаимодействие НЧ с биологическими системами наряду с химическим составом ядра и модификацией поверхности, является ее геометрия, были проведены дополнительные исследования скорости проникновения НЧ в клетки. В качестве модельного терапевтического агента вместо миРНК был загружен противоопухолевый препарат доксорубицин, широко используемый в схемах терапии рака молочной железы [311–313], вместо липидной формуляции для функционализации поверхности использовался более подходящий для этого блок-сополимер полиэтиленгликоля с

полипропиленгликолем Pluronic F-127 [314; 315]. При формировании покрытия в этой полимерной оболочке присутствуют гидрофобные сайты, которые используются для загрузки гидрофобных лекарств. Для оценки динамики накопления кубических и сферических НЧ, загруженных доксорубицином, образцы инкубировали с клетками карциномы молочной железы мыши 4Т1, после чего промывали натрий-фосфатным буфером для удаления свободного доксорубицина и фиксировали раствором формалина для последующего анализа. Микрофотографии полученных препаратов показаны на Рисунке 3.30.

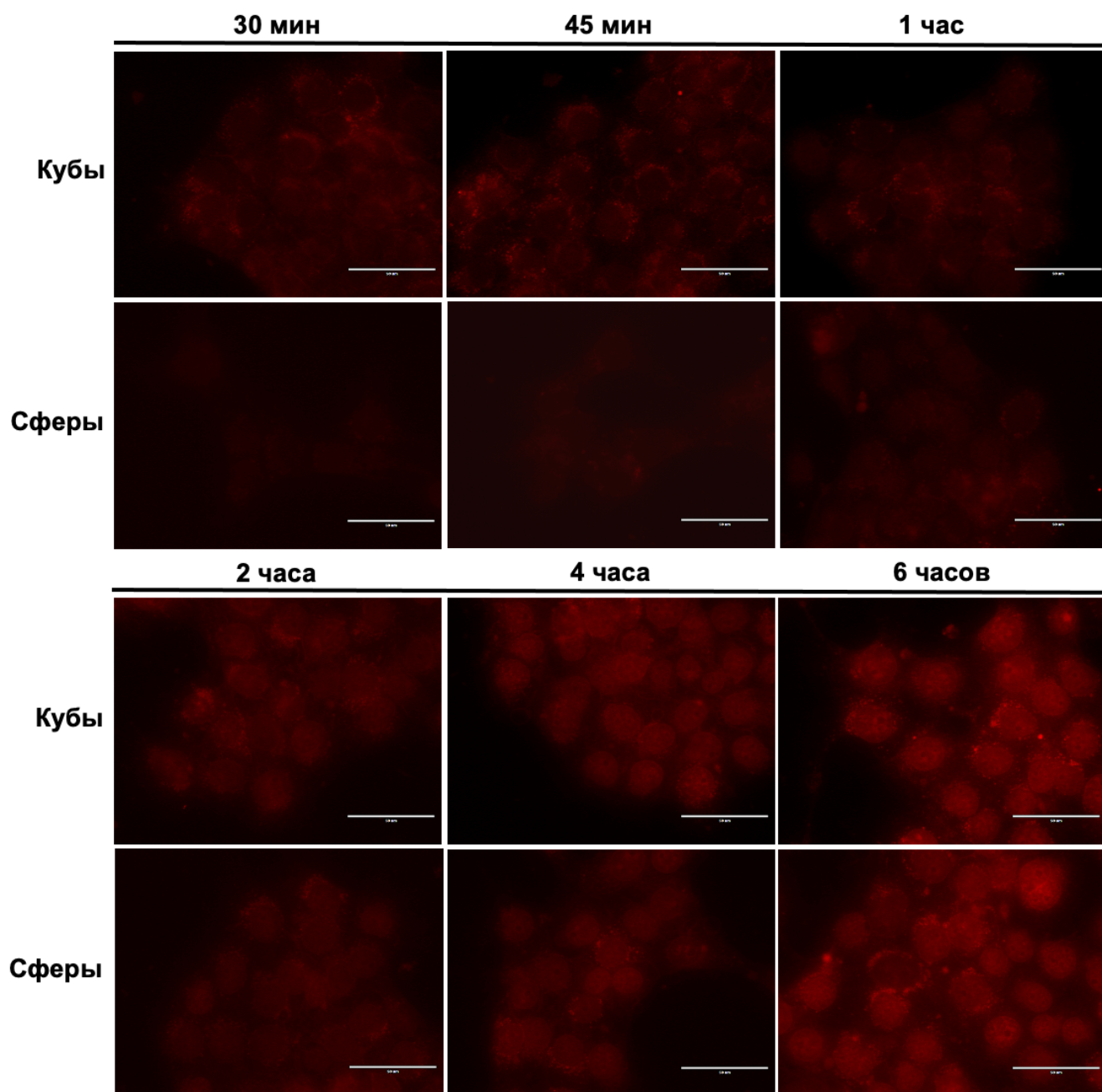


Рисунок 3.30 – Динамика накопления кубических и сферических НЧ, загруженных доксорубицином, в клетках линии 4Т1

На ранних временах инкубации (30 и 45 минут) наблюдается более выраженное накопление доксорубина, загруженного на НЧ кубической формы. Паттерн окраски говорит о локализации препарата в везикулах, располагающихся в околоядерной области. Интенсивность сигнала флуоресценции от доксорубина достоверно выше (30, 45 минут) для кубических НЧ относительно сферических, что показано на Рисунке 3.31.

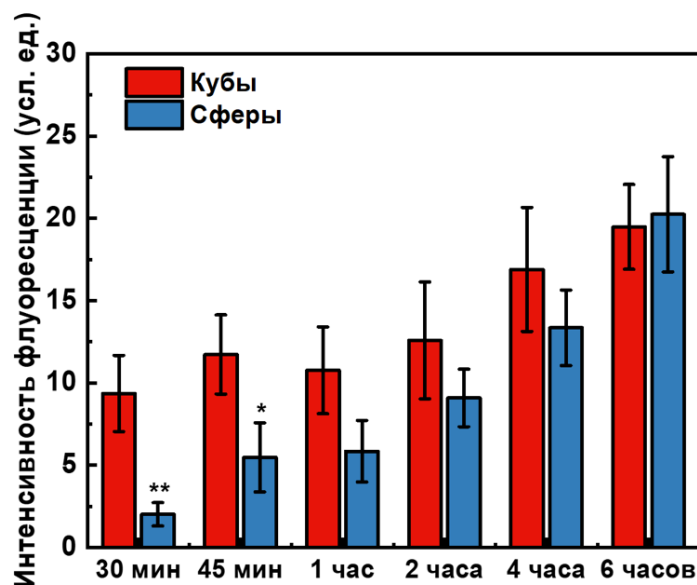


Рисунок 3.31 – Зависимости интенсивности флуоресценции доксорубина в клетках от продолжительности их инкубации с НЧ кубической и сферической формы (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, ANOVA, $n = 45$, показаны средние величины $\pm$ среднеквадратичное отклонение)

Тем не менее, с увеличением времени инкубации (1, 2, 4 и 6 часов) существенного отличия в интенсивности флуоресценции между двумя типами НЧ не наблюдалось. Через 2 часа инкубации противоопухолевый препарат преимущественно обнаруживается уже не в органеллах, а в ядрах клеток. Таким образом было установлено, что НЧ кубической формы активнее проникают в клетки по сравнению со сферами на ранних временах совместного культивирования и разница в эффективности проникновения становится менее выраженной при увеличении времени инкубации, что хорошо согласуется с ранее полученными результатами для экспериментальных образцов с загруженными миРНК.

Следующим шагом работы было более детальное изучение взаимодействия образцов, загруженных миРНК, с клетками, для оптимизации процедуры применения внешнего магнитного поля, которое будет положительно влиять на эффективность трансфекции. Для определения времени инкубации клеток с ЛНРНК-С и -К до применения поля необходимо учитывать множество факторов, в частности то, что образцы должны преодолеть клеточную мембрану, но при этом эндоцитарные везикулы (ранние эндосомы) не должны перейти в

эндолизосомы, где за счет лизосомальных ферментов происходит деградация нуклеиновых кислот. Поэтому были проведены исследования внутриклеточного распределения с помощью конфокальной микроскопии, где образцы ЛНРНК-С и ЛНРНК-К модифицировались флуоресцентными метками (метка DiI загружалась в липидное покрытие, комплекс миРНК-Cy5 использовался для визуализации РНК, лизосомы окрашивались трекером Red DND-99), полученные микрофотографии приведены на Рисунках 3.32 и 3.33.

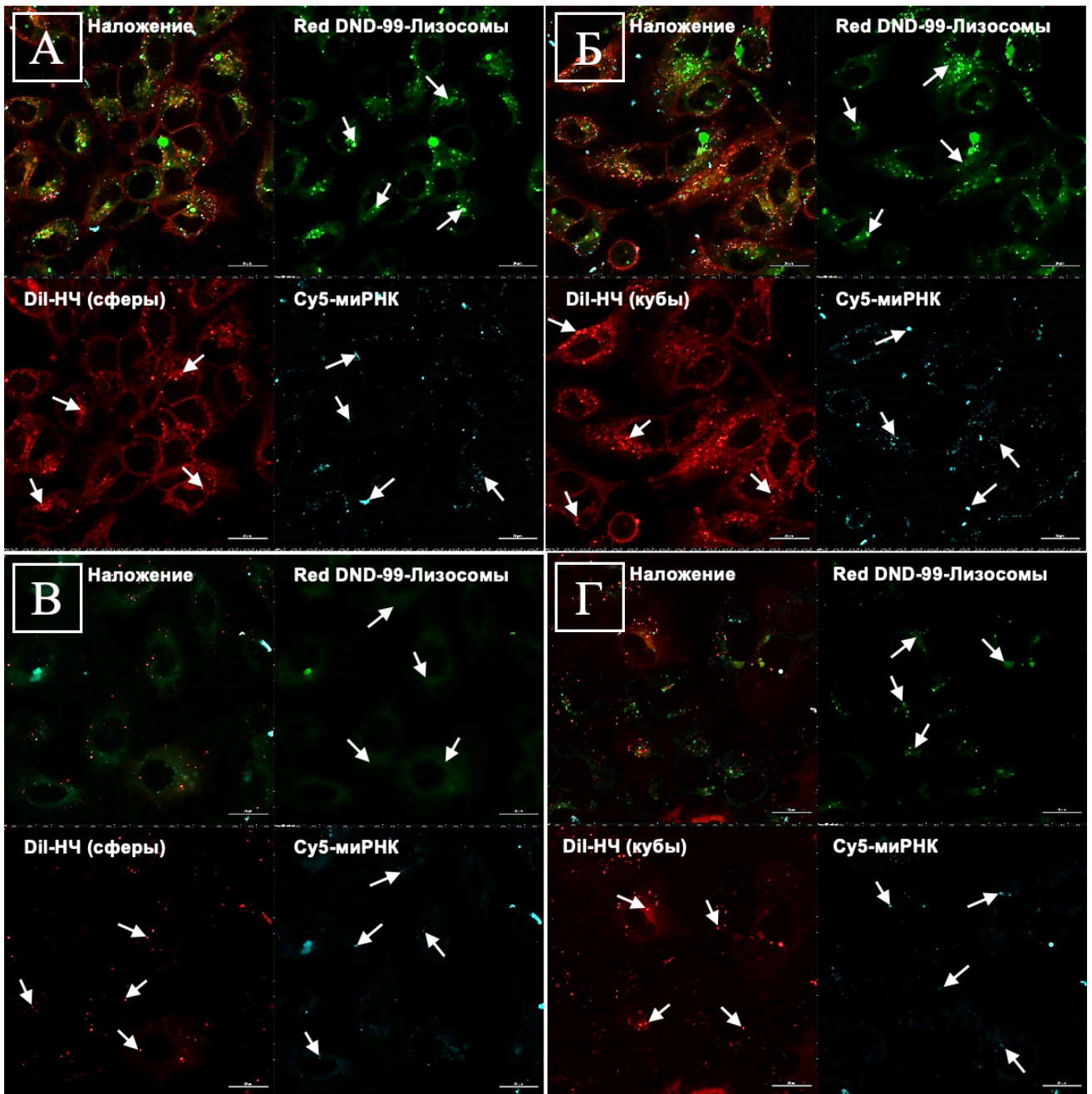


Рисунок 3.32 – Внутриклеточное распределение экспериментальных образцов ЛНРНК-С и ЛНРНК-К через 30 минут инкубации, конфокальная микроскопия. А, Б) клеточная линия HepG2; В, Г) клеточная линия Huh7

На Рисунке 3.32 видно, что через 30 минут инкубации образцов с клетками (Huh7 и HepG2), более выраженное накопление наблюдается для образца ЛНРНК-К, что подробно было обсуждено выше. При увеличении времени инкубации до 90 минут (Рисунок 3.33) оценить разницу между образцами затруднительно из-за высокой интенсивности сигнала.

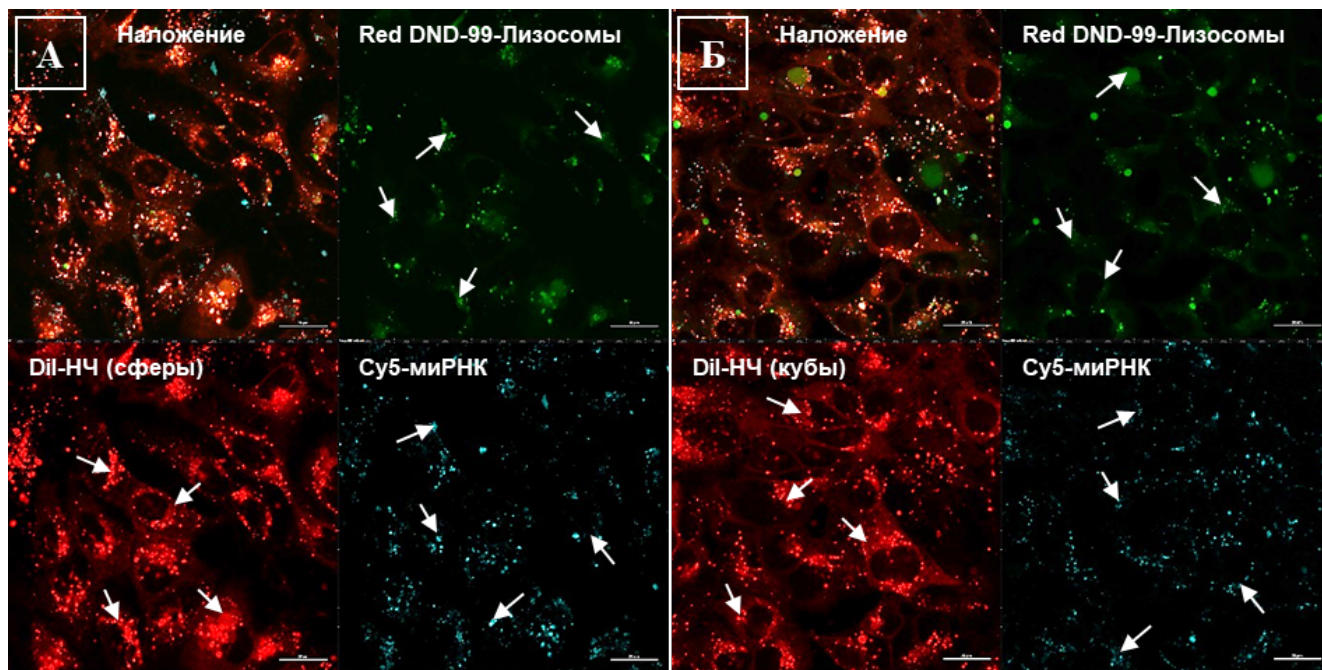


Рисунок 3.33 – Внутриклеточное распределение экспериментальных образцов в клетках линии HepG2 через 90 минут инкубации, конфокальная микроскопия. А) образец ЛНРНК-С; Б) образец ЛНРНК-К

В результате исследования интернализации образцов в клетки (HepG2) были получены колокализационные распределения сигнала между парами сравнения: НЧ-Лизо (ЛНЧ с меткой DiI – лизосомы, окрашенные трекером Red DND-99), НЧ-миРНК (ЛНЧ с меткой DiI – миРНК-Cy5), миРНК-Лизо (миРНК-Cy5 – лизосомы, окрашенные трекером Red DND-99), что показано на Рисунке 3.34. Степень перекрытия между каналами показана в виде коэффициента корреляции Пирсона (PCC) – полная колокализация соответствует коэффициенту 1, отсутствие колокализации 0. PCC для пары миРНК-Лизо = 0,06 демонстрирует абсолютное отсутствие пересечения между каналами, что говорит об успешном высвобождении целостной (не деградированной эндонуклеазами субклеточных компартментов) миРНК в цитоплазму клеток. Значение PCC = 0,39 для пары НЧ-Лизо демонстрирует частичную колокализацию, что, вероятно, связано со смешанным характером проникновения НЧ в клетку (как клатрин-опосредованным эндоцитозом, так и клатрин-независимым). При этом, PCC для пары НЧ-миРНК составляет 0,25 даже после 90 минут инкубации НЧ с клетками, демонстрируя пролонгированный релиз терапевтического агента из НЧ в цитозоль.

Таким образом, можно заключить, что ЛНЧ кубической и сферической формы являются подходящими носителями для эффективной доставки миРНК в клетки, так как сохраняют пролонгированный эффект высвобождения терапевтического агента при длительных временах инкубации с клетками. Использование экспериментальных образцов позволяет избежать заключения миРНК-загруженных ЛНЧ в лизосомы (что подразумевает под собой понижение рН и деградацию миРНК), и демонстрирует успешную доставку/высвобождение целостной миРНК в цитоплазму клетки.

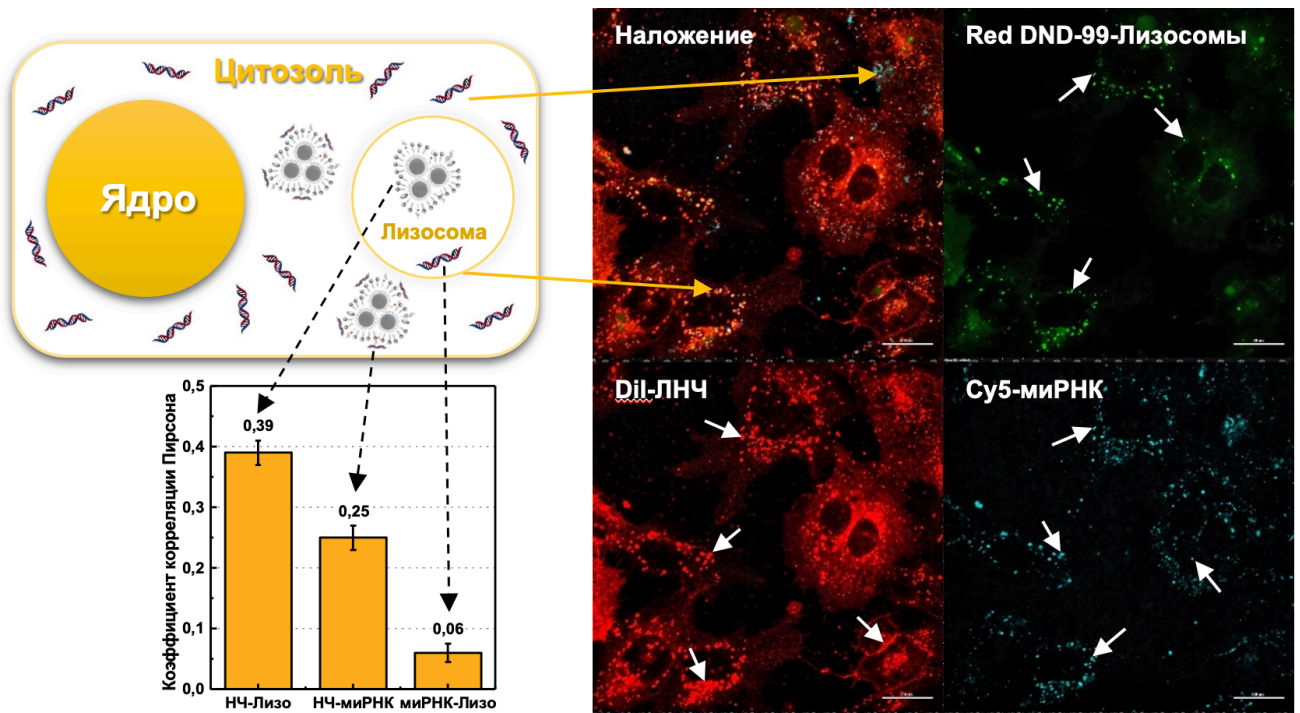


Рисунок 3.34 – Схема внутриклеточного распределения образцов миРНК-загруженных НЧ (клеточная линия НерG2, время инкубации 90 минут)

Для клеточной линии НерG2 уже через 30 минут наблюдалась интернализация экспериментальных образцов, поэтому для изучения влияния внешнего магнитного поля на эффективность проникновения НЧ внутрь клеток был выбран следующий режим: инкубация НЧ с клетками в течение 30 минут и последующее действие магнитного поля (МП) в течение 10, 20 и 30 минут. В качестве контроля образец ЛНРНК-С инкубировали с клетками в течение того же времени без воздействия поля. Параметры поля: частота – 45 Гц, магнитная индукция – 80 мТл, 30 секунд действие поля / 30 секунд пауза, температура – 37 °С. Все экспериментальные исследования были проведены на УНУ «Генератор переменного низкочастотного магнитного поля TOR 03/15 Electromagnet».

На Рисунке 3.35 представлены полученные с помощью EVOS микрофотографии, где миРНК-загруженные ЛНЧ визуализировали посредством загрузки флуоресцентной метки DiD в

липидное покрытие НЧ. Для качественного сравнения подбирались поля зрения с одинаковой конфлюентностью клеточного монослоя. Довольно выраженное отличие в накоплении от контроля наблюдается для двух режимов: 30 мин инкубация + 10 минут действие МП и 30 мин инкубация + 30 минут действие МП.

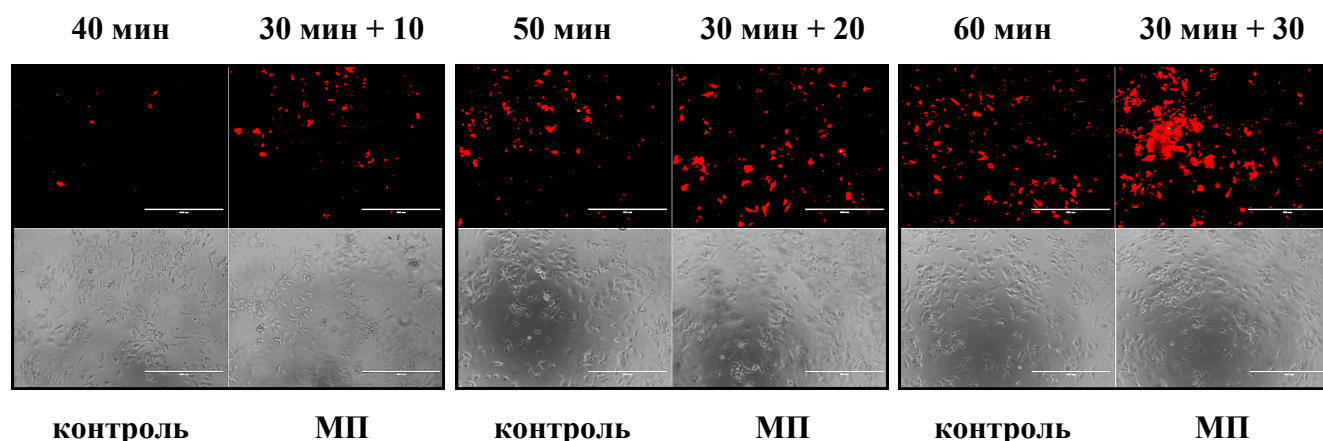


Рисунок 3.35 – Накопление экспериментального образца под влиянием переменного магнитного поля (клеточная линия НерG2), оцененное через 30 минут инкубации с клетками и дополнительными 10, 20 и 30 минутами в МП

Таким образом, предварительно было показано, что внешнее низкочастотное МП увеличивает эффективность интернализации экспериментальных образцов. Однако, оценка различия накопления между экспериментальными образцами с и без действия поля с помощью флуоресцентной микроскопии является неколичественным методом и полученные результаты требуют подтверждения с помощью анализа уровня экспрессии, используя ПЦР в реальном времени. Исходя из совокупности полученных данных в *in vitro* и *in vivo* исследованиях (динамика интернализации *in vitro*, биораспределение и локализация *in vivo*, токсичность и т.д.) был выбран следующий режим МП: частота – 45 Гц, магнитная индукция – 80 мТл, 30 секунд действие/ 30 секунд пауза, время экспозиции – 30 минут, в котором оценивалось влияние МП на эффективность ингибирования экспрессии мРНК *ApoB* под влиянием экспериментального образца ЛНРНК-С *in vitro*, полученные результаты представлены на Рисунке 3.36. Для клеточной линии НерG2 не было получено достоверных различий между экспрессией с и без действия МП. Однако, следует отметить, что между экспериментальными группами образцов под действием МП и Lipofectamine также не наблюдается достоверного отличия. Данный факт может быть связан с природой клеточной линии, поскольку НерG2 относится к трудно поддающимся трансфекции клеткам [316]. Для клеточной линии Нuh7 наблюдается достоверное снижение уровня экспрессии мРНК *ApoB* под влиянием экспериментального образца под действием поля, примененного через 2 часа инкубации НЧ с клетками, относительно контроля (ЛНРНК-С без

действия поля). Повышение эффективности ингибирования составляет 30 % (до 54 ± 4 % по сравнению с контролем – 24 ± 3 %) что говорит о том, что применение низкочастотного переменного МП позволяет добиться повышения эффективности ингибирования экспрессии целевого гена под действием экспериментального образца ЛНЧ с загруженными миРНК *in vitro*.

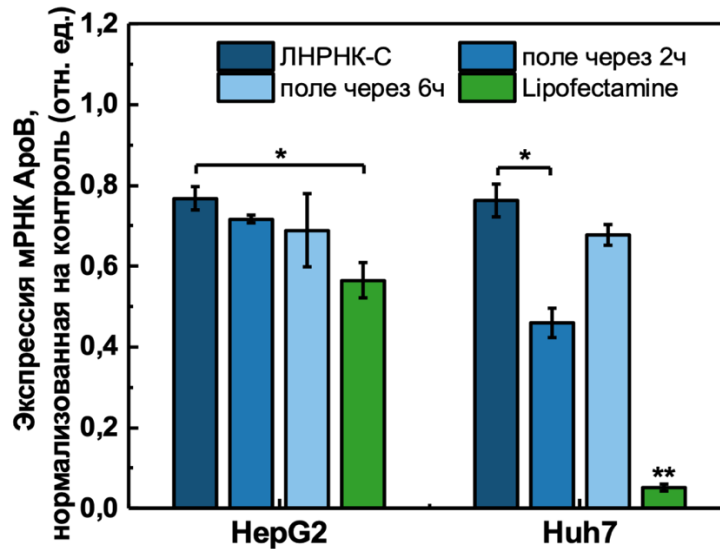


Рисунок 3.36 – Оценка эффективности ингибирования экспрессии мРНК *ApoB* под действием экспериментального образца ЛНРНК-С (с/без действия поля, концентрация миРНК 30 нМ) *in vitro*; время инкубации образца с клетками до применения поля составило 2 или 6 часов, клеточные линии Huh7 и HepG2 (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$, ANOVA, $n = 3$, показаны средние величины $\pm$ среднеквадратичное отклонение)

Таким образом, данные по оценке влияния внешнего низкочастотного МП на эффективность накопления, полученные с помощью флуоресцентной микроскопии, хорошо согласуются с количественной оценкой этого эффекта методом ПЦР в реальном времени. Введение дополнительного бокового компонента движения, которое обеспечивается вращением частиц в МП, позволяет существенно повлиять на вероятность более выраженного эндоцитоза комплекса частиц-генов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенной работы были получены НЧ оксида железа с различными размерами и геометрией. Рассмотрены закономерности изменения их физико-химических свойств в зависимости от таких параметров синтеза как температура реакции, выбор прекурсора и ПАВ. В качестве более гибкого инструмента настройки свойств НЧ был предложен новый двухстадийный метод синтеза с разделением стадий зародышеобразования и роста, который позволяет получать высокомонодисперсные НЧ с заданной формой и размером в широком диапазоне. Показано, что размер частиц определяется длительностью введения прекурсора, а форма – химическим потенциалом мономера в среде и изначальной формой используемых зародышей. Проведена функционализация НЧ формуляцией липидов, в результате которой были получены гидрофилизированные положительно заряженные мицеллы, во внутренней структуре которых располагаются 3-5 частиц. Формирование того или иного типа функционализированных агрегатов обуславливается дипольным параметром λ и формой НЧ, входящих в их состав. В случае, если энергия диполь-дипольного взаимодействия преобладает над вкладом тепловой энергии, сферические НЧ ориентируются по предпочтительному направлению намагниченности магнетита, формируя одно- и двухцепочечные структуры, скрещенные цепочки и кольца. Форма кубических НЧ не позволяет им выстраиваться по направлению $\langle 111 \rangle$, приводя к формированию агрегатов кластерного вида. Тип сформированных агрегатов влияет как на емкость загрузки миРНК (выше у цепочечных агрегатов из сферических НЧ), так и на скорость накопления НЧ в клетках и эффективность ингибирования экспрессии гена-мишени при проведении трансфекции (выше у кластеров из кубических НЧ).

Проведено исследование полученных НЧ, загруженных миРНК, *in vitro*, которое показало, что эффективность ингибирования экспрессии мРНК гена-мишени под действием экспериментального образца сопоставима с действием современных коммерчески доступных трансфецирующих агентов. В дополнение к этому, полученные НЧ не обладают цитотоксическим действием в концентрациях, необходимых для проведения трансфекции. Изучено влияние внешнего низкочастотного переменного МП на эффективность ингибирования экспрессии мРНК *ApoB* под действием НЧ, загруженных миРНК. Установлено, что использование МП приводит к более выраженному накоплению образцов в клетках и позволяет достоверно увеличить эффективность трансфекции. На основании проведенных исследований были разработаны новые, не описанные ранее подходы к проведению магнитофекции, которые могут стать решением в вопросе о переносе этой технологии с уровня *in vitro* (с использованием постоянного магнита) на уровень *in vivo*, преодолевая тем самым существующие ограничения этого метода.

Проведено исследование терапевтической эффективности экспериментальных образцов *in vivo*. Показано, что при внутривенном введении НЧ эффективно накапливаются в печени – выраженный T2-контрастный сигнал от них прослеживается в течение двух суток. Уровень холестерина после введения образцов достоверно снижается с более выраженным эффектом для кубических НЧ; концентрации АСТ и АЛТ в сыворотке лабораторных животных остаются в пределах нормы. Полученные результаты могут быть использованы в дальнейшем для создания эффективных систем доставки миРНК в печень на основе функционализированных липидами НЧ оксида железа с возможностью визуализации носителя методом МРТ.

ВЫВОДЫ

1. Разработан метод синтеза частиц с использованием зародышей, основанный на расширенном механизме ЛаМера, который позволяет получать высокомонодисперсные НЧ оксида железа. Установлено, что размер частиц определяется длительностью введения прекурсора, а форма – химическим потенциалом мономера в среде и изначальной геометрией используемых зародышей.

2. Проведенная функционализация НЧ липидами приводит к формированию гидрофилизированных положительно заряженных агрегатов. Ориентация НЧ в составе агрегатов зависит от их кристаллической структуры и геометрии: сферические НЧ образуют цепочечные структуры, кубические – агрегаты кластерного вида.

3. Эффективность ингибирования экспрессии мРНК *ApoB* под действием НЧ кубической формы, загруженных миРНК, сопоставима с современным коммерчески доступным агентом Lipofectamine 3000 (76 ± 6 % для клеточной линии Huh7 в концентрации миРНК 20 нМ); при этом образцы не продемонстрировали цитотоксического действия в исследуемых концентрациях. Установлено, что тип сформированных агрегатов влияет на скорость накопления НЧ в клетках и на эффективность ингибирования экспрессии гена-мишени при проведении трансфекции (выше у кластеров из кубических НЧ, чем у цепочечных структур из сфер).

4. Установлено, что использование МП приводит к более выраженному накоплению образцов в клетках и позволяет достоверно увеличить эффективность трансфекции (повышение на 30 % относительно частиц без поля, $p < 0,05$, клеточная линия Huh7, ЛНРНК-С).

5. Исследование *in vivo* показало, что при внутривенном введении НЧ эффективно накапливаются в целевом органе – печени (более 90 % от введенной дозы), контрастное усиление сигнала от них прослеживается в течение двух суток (визуализация методом МРТ). Предварительная оценка токсичности образцов показала, что концентрации АСТ и АЛТ в сыворотке лабораторных животных остаются в пределах нормы. После введения образцов в дозе 1,5 мг миРНК /кг уровень общего холестерина в сыворотке мышей достоверно снижается ($p < 0,005$).

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность научным руководителям д.х.н., проф. Клячко Наталье Львовне и к.х.н. Абакумову Максиму Артемовичу за наставничество, всестороннюю помощь и продуктивное обсуждение экспериментальных данных.

Автор благодарит внутренних рецензентов д.х.н., проф. Еремеева Николая Леонидовича и к.х.н. Никитина Алексея Андреевича, а также официальных оппонентов д.х.н., проф., член-корр. РАН Ярославов Александр Анатольевича, д.х.н., проф. Горина Дмитрия Александровича и к.ф.-м.н. Никитина Максима Петровича за внимательное прочтение работы и ценные комментарии.

Автор благодарна коллективам лаборатории «Биомедицинские наноматериалы» НИТУ «МИСиС» и кафедры химической энзимологии Химического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова за дружественную и продуктивную атмосферу.

Автор благодарит к.б.н. Абакумову Татьяну Олеговну и к.б.н. Салтыкову Ирину Владимировну за помощь в проведении *in vitro* и *in vivo* экспериментов по определению эффективности ингибирования экспрессии гена-мишени, которые расширили работу с точки зрения биомедицинских применений. Также автор благодарит к.б.н. Мельникова Павла Александровича за продуктивное сотрудничество и помощь в проведении и интерпретации исследований с помощью конфокальной микроскопии. Автор благодарит к.б.н. Семкину Алевтину Сергеевну за помощь в проведении гистологического анализа.

Автор благодарит к.х.н. Зацепина Тимофея Сергеевича за дизайн и синтез миРНК, использованных в исследовании. Также автор выражает благодарность к.х.н. Низамову Тимуру Радиковичу за помощь в планировании и проведении экспериментов по синтезу и функционализации наночастиц, а также за продуктивное обсуждение экспериментальных данных, что позволило улучшить как научную, так и репрезентативную составляющие работы. Автор благодарит к.б.н. Водопьянова Степана Сергеевича за помощь в проведении экспериментов по исследованию биораспределения и локализации образцов методом MPT *in vivo*.

Автор благодарит к.б.н. Кошкина Филиппа Александровича, к.б.н. Гаранину Анастасию Сергеевну и к.б.н. Сосновцеву Анастасию Олеговну за наставничество и обучение практическим микробиологическим навыкам работы.

Автор искренне благодарна своим родным и друзьям за постоянную моральную поддержку и конструктивную критику, которые помогли при написании работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Saurabh S. RNA interference: concept to reality in crop improvement / S. Saurabh, A. S. Vidyarthi, D. Prasad // *Planta*. – 2014. – Т. 239. – № 3. – С. 543-564.
2. Wittrup A. Knocking down disease: a progress report on siRNA therapeutics / A. Wittrup, J. Lieberman // *Nature Reviews Genetics*. – 2015. – Т. 16. – № 9. – С. 543-552.
3. Therapeutic miRNA and siRNA: Moving from Bench to Clinic as Next Generation Medicine / C. Chakraborty, A. R. Sharma, G. Sharma [и др.] // *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. – 2017. – Т. 8. – С. 132-143.
4. Saw P. E. siRNA therapeutics: a clinical reality / P. E. Saw, E.-W. Song // *Science China Life Sciences*. – 2020. – Т. 63. – № 4. – С. 485-500.
5. Roberts T. C. Advances in oligonucleotide drug delivery / T. C. Roberts, R. Langer, M. J. A. Wood // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2020. – Т. 19. – № 10. – С. 673-694.
6. Advances in lipid-lowering therapy through gene-silencing technologies / B. G. Nordestgaard, S. J. Nicholls, A. Langsted [и др.] // *Nature Reviews Cardiology*. – 2018. – Т. 15. – № 5. – С. 261-272.
7. Pharmacokinetic Behaviors of Intravenously Administered siRNA in Glandular Tissues / Y. Huang, Q. Cheng, J. L. Ji [и др.] // *Theranostics*. – 2016. – Т. 6. – № 10. – С. 1528-1541.
8. Image-based analysis of lipid nanoparticle-mediated siRNA delivery, intracellular trafficking and endosomal escape / J. Gilleron, W. Querbes, A. Zeigerer [и др.] // *Nature Biotechnology*. – 2013. – Т. 31. – № 7. – С. 638-646.
9. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date / D. Bobo, K. J. Robinson, J. Islam [и др.] // *Pharmaceutical Research*. – 2016. – Т. 33. – № 10. – С. 2373-2387.
10. Gene silencing mediated by magnetic lipospheres tagged with small interfering RNA / P. Del Pino, A. Munoz-Javier, D. Vlasskou [и др.] // *Nano Letters*. – 2010. – Т. 10. – № 10. – С. 3914-3921.
11. Lipidoid-Coated Iron Oxide Nanoparticles for Efficient DNA and siRNA delivery / S. Jiang, A. A. Eltoukhy, K. T. Love [и др.] // *Nano Letters*. – 2013. – Т. 13. – № 3. – С. 1059-1064.
12. Magnetic ternary nanohybrids for nonviral gene delivery of stem cells and applications on cancer therapy / R.-Y. Huang, Y.-H. Lin, S.-Y. Lin [и др.] // *Theranostics*. – 2019. – Т. 9. – № 8. – С. 2411-2423.
13. Magnetic nanoparticle-mediated gene transfer to oligodendrocyte precursor cell transplant populations is enhanced by magnetofection strategies / S. I. Jenkins, M. R. Pickard, N. Granger, D. M.

Chari // ACS Nano. – 2011. – Т. 5. – № 8. – С. 6527-6538.

14. Alternating magnetic field plate for enhanced magnetofection of iron oxide nanoparticle conjugated nucleic acids / M. K. Yapici, A. Al Nabulsi, N. Rizk [и др.] // Journal of Magnetism and Magnetic Materials. – 2019. – Т. 469. – № August 2018. – С. 598-605.

15. Iron oxide nanoparticles for magnetically-guided and magnetically-responsive drug delivery / J. Estelrich, E. Escribano, J. Queralt, M. A. Busquets // International Journal of Molecular Sciences. – 2015. – Т. 16. – № 4. – С. 8070-8101.

16. Neoadjuvant gene delivery of feline granulocyte-macrophage colony-stimulating factor using magnetofection for the treatment of feline fibrosarcomas: a phase I trial / C. Hüttinger, J. Hirschberger, A. Jahnke [и др.] // The Journal of Gene Medicine. – 2008. – Т. 10. – № 6. – С. 655-667.

17. Chi X. Safety of antisense oligonucleotide and siRNA-based therapeutics / X. Chi, P. Gatti, T. Papoian // Drug Discovery Today. – 2017. – Т. 22. – № 5. – С. 823-833.

18. Liu B. Identifying causal variants and genes using functional genomics in specialized cell types and contexts / B. Liu, S. B. Montgomery // Human Genetics. – 2020. – Т. 139. – № 1. – С. 95-102.

19. Therapeutic siRNA: state of the art / B. Hu, L. Zhong, Y. Weng [и др.] // Signal Transduction and Targeted Therapy. – 2020. – Т. 5. – № 101. – С. 1-25.

20. Bennett C. F. Therapeutic Antisense Oligonucleotides Are Coming of Age / C. F. Bennett // Annual Review of Medicine. – 2019. – Т. 70. – № 1. – С. 307-321.

21. Kim Y.-K. RNA Therapy: Current Status and Future Potential / Y.-K. Kim // Chonnam Medical Journal. – 2020. – Т. 56. – № 2. – С. 87-93.

22. Chery J. RNA therapeutics: RNAi and antisense mechanisms and clinical applications. / J. Chery // Postdoc journal : a journal of postdoctoral research and postdoctoral affairs. – 2016. – Т. 4. – № 7. – С. 35-50.

23. Matsui M. Non-coding RNAs as drug targets / M. Matsui, D. R. Corey // Nature Reviews Drug Discovery. – 2017. – Т. 16. – № 3. – С. 167-179.

24. Rupaimoole R. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases / R. Rupaimoole, F. J. Slack // Nature Reviews Drug Discovery. – 2017. – Т. 16. – № 3. – С. 203-222.

25. Zhou J. Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges / J. Zhou, J. Rossi // Nature Reviews Drug Discovery. – 2017. – Т. 16. – № 3. – С. 181-202.

26. Ning Y. Aptamers used for biosensors and targeted therapy. / Y. Ning, J. Hu, F. Lu // Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie. – 2020. – Т. 132. – № 110902. – С. 1-21.

27. Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery / P. S. Kowalski, A. Rudra, L. Miao, D. G. Anderson // *Molecular Therapy*. – 2019. – Т. 27. – № 4. – С. 710-728.
28. Delivery of mRNA Therapeutics for the Treatment of Hepatic Diseases / Z. Trepotec, E. Lichtenegger, C. Plank [и др.] // *Molecular Therapy*. – 2019. – Т. 27. – № 4. – С. 794-802.
29. Therapeutic mRNA delivery to leukocytes / Y. Granot-Matok, E. Kon, N. Dammes [и др.] // *Journal of Controlled Release*. – 2019. – Т. 305. – С. 165-175.
30. Rossor A. M. Antisense oligonucleotides and other genetic therapies made simple / A. M. Rossor, M. M. Reilly, J. N. Sleight // *Practical Neurology*. – 2018. – Т. 18. – № 2. – С. 126-131.
31. Pharmacology of Antisense Drugs / C. F. Bennett, B. F. Baker, N. Pham [и др.] // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. – 2017. – Т. 57. – № 1. – С. 81-105.
32. Aartsma-Rus A. The 10th Oligonucleotide Therapy Approved: Golodirsen for Duchenne Muscular Dystrophy / A. Aartsma-Rus, D. R. Corey // *Nucleic Acid Therapeutics*. – 2020. – Т. 30. – № 2. – С. 67-70.
33. RNase H1-Dependent Antisense Oligonucleotides Are Robustly Active in Directing RNA Cleavage in Both the Cytoplasm and the Nucleus / X. H. Liang, H. Sun, J. G. Nichols, S. T. Crooke // *Molecular Therapy*. – 2017. – Т. 25. – № 9. – С. 2075-2092.
34. Lennox K. A. Cellular localization of long non-coding RNAs affects silencing by RNAi more than by antisense oligonucleotides / K. A. Lennox, M. A. Behlke // *Nucleic Acids Research*. – 2016. – Т. 44. – № 2. – С. 863-877.
35. Hyjek M. RNases H: Structure and mechanism / M. Hyjek, M. Figiel, M. Nowotny // *DNA Repair*. – 2019. – Т. 84. – № 102672. – С. 1-13.
36. Precision Medicine through Antisense Oligonucleotide-Mediated Exon Skipping / D. Li, F. L. Mastaglia, S. Fletcher, S. D. Wilton // *Trends in Pharmacological Sciences*. – 2018. – Т. 39. – № 11. – С. 982-994.
37. Development of Exon Skipping Therapies for Duchenne Muscular Dystrophy: A Critical Review and a Perspective on the Outstanding Issues / A. Aartsma-Rus, V. Straub, R. Hemmings [и др.] // *Nucleic Acid Therapeutics*. – 2017. – Т. 27. – № 5. – С. 251-259.
38. Havens M. A. Splice-switching antisense oligonucleotides as therapeutic drugs / M. A. Havens, M. L. Hastings // *Nucleic Acids Research*. – 2016. – Т. 44. – № 14. – С. 6549-6563.
39. Gieron-Korthals M. New Developments in Diagnosis, Treatment, and Management of Duchenne Muscular Dystrophy / M. Gieron-Korthals, R. Fernandez // *Advances in Pediatrics*. – 2020. – Т. 67. – С. 183-196.
40. Therapeutic Approaches for Duchenne Muscular Dystrophy: Old and New / S. J. Mackenzie,

S. Nicolau, A. M. Connolly, J. R. Mendell // *Seminars in Pediatric Neurology*. – 2021. – Т. 37. – № 100877. – С. 1-7.

41. Flanigan K. M. Duchenne and Becker Muscular Dystrophies / K. M. Flanigan // *Neurologic Clinics*. – 2014. – Т. 32. – № 3. – С. 671-688.

42. Scharner J. Clinical Applications of Single-Stranded Oligonucleotides: Current Landscape of Approved and In-Development Therapeutics / J. Scharner, I. Aznarez // *Molecular Therapy*. – 2021. – Т. 29. – № 2. – С. 540-554.

43. Nonsense-mediated decay as a terminating mechanism for antisense oligonucleotides / A. J. Ward, M. Norrbom, S. Chun [и др.] // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – Т. 42. – № 9. – С. 5871-5879.

44. Setten R. L. The current state and future directions of RNAi-based therapeutics / R. L. Setten, J. J. Rossi, S. ping Han // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2019. – Т. 18. – № 6. – С. 421-446.

45. Wilson R. C. Molecular Mechanisms of RNA Interference / R. C. Wilson, J. A. Doudna // *Annual Review of Biophysics*. – 2013. – Т. 42. – № 1. – С. 217-239.

46. RNA-induced silencing complex (RISC) Proteins PACT, TRBP, and Dicer are SRA binding nuclear receptor coregulators / A. D. Redfern, S. M. Colley, D. J. Beveridge [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2013. – Т. 110. – № 16. – С. 6536-6541.

47. Pare J. M. Dicer: Structure, Function And Role In RNA-Dependent Gene-Silencing Pathways / J. M. Pare, T. C. Hobman // *Industrial Enzymes*. – Dordrecht : Springer Netherlands, 2007. – С. 421-438.

48. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing / J. K. W. W. Lam, M. Y. T. T. Chow, Y. Zhang, S. W. S. S. Leung // *Molecular therapy. Nucleic acids*. – 2015. – Т. 4. – № e252. – С. 1-20.

49. Wang Z. The principles of MiRNA-masking antisense oligonucleotides technology. / Z. Wang // *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. – 2011. – Т. 676. – С. 43-49.

50. Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy / D. H. Kim, M. A. Behlke, S. D. Rose [и др.] // *Nature Biotechnology*. – 2005. – Т. 23. – № 2. – С. 222-226.

51. Impact of Protein Kinase PKR in Cell Biology: from Antiviral to Antiproliferative Action / M. A. García, J. Gil, I. Ventoso [и др.] // *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. – 2006. – Т. 70. – № 4. – С. 1032-1060.

52. Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing / H. Y. Lee, K. Zhou, A. M. Smith [и др.] // *Nucleic Acids Research*. – 2013. – Т. 41. – № 13. – С. 6568-6576.

53. A novel miRNA processing pathway independent of dicer requires argonaute2 catalytic

activity / D. Cifuentes, H. Xue, D. W. Taylor [и др.] // *Science*. – 2010. – Т. 328. – № 5986. – С. 1694-1698.

54. Effect of asymmetric terminal structures of short RNA duplexes on the RNA interference activity and strand selection / M. Sano, M. Sierant, M. Miyagishi [и др.] // *Nucleic Acids Research*. – 2008. – Т. 36. – № 18. – С. 5812-5821.

55. Molecular basis for improved gene silencing by Dicer substrate interfering RNA compared with other siRNA variants / N. M. Snead, X. Wu, A. Li [и др.] // *Nucleic Acids Research*. – 2013. – Т. 41. – № 12. – С. 6209-6221.

56. 5'-(E)-Vinylphosphonate: A Stable Phosphate Mimic Can Improve the RNAi Activity of siRNA-GalNAc Conjugates / R. Parmar, J. L. S. Willoughby, J. Liu [и др.] // *ChemBioChem*. – 2016. – Т. 17. – № 11. – С. 985-989.

57. Rational siRNA design for RNA interference / A. Reynolds, D. Leake, Q. Boese [и др.] // *Nature Biotechnology*. – 2004. – Т. 22. – № 3. – С. 326-330.

58. Khvorova A. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias / A. Khvorova, A. Reynolds, S. D. Jayasena // *Cell*. – 2003. – Т. 115. – № 2. – С. 209-216.

59. Lewis B. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets / B. P. Lewis, C. B. Burge, D. P. Bartel // *Cell*. – 2005. – Т. 120. – № 1. – С. 15-20.

60. Riley K. J. Association of Argonaute proteins and microRNAs can occur after cell lysis / K. J. Riley, T. A. Yario, J. A. Steitz // *RNA*. – 2012. – Т. 18. – № 9. – С. 1581-1585.

61. Ender C. Argonaute proteins at a glance / C. Ender, G. Meister // *Journal of Cell Science*. – 2010. – Т. 123. – № 11. – С. 1819-1823.

62. BLAST+: Architecture and applications / C. Camacho, G. Coulouris, V. Avagyan [и др.] // *BMC Bioinformatics*. – 2009. – Т. 10. – № 421. – С. 1-9.

63. Gelinas A. D. Embracing proteins: Structural themes in aptamer-protein complexes / A. D. Gelinas, D. R. Davies, N. Janjic // *Current Opinion in Structural Biology*. – 2016. – Т. 36. – С. 122-132.

64. Geiger A. RNA aptamers that bind L-arginine with sub-micromolar dissociation constants and high enantioselectivity / A. Geiger // *Nucleic Acids Research*. – 1996. – Т. 24. – № 6. – С. 1029-1036.

65. High-Resolution Molecular Discrimination by RNA / R. D. Jenison, S. C. Gill, A. Pardi, B. Polisky // *Science*. – 1994. – Т. 263. – № 5152. – С. 1425-1429.

66. Sassanfar M. An RNA motif that binds ATP / M. Sassanfar, J. W. Szostak // *Nature*. – 1993. – Т. 364. – № 6437. – С. 550-553.

67. The isolation of an RNA aptamer targeting to p53 protein with single amino acid mutation /

L. Chen, F. Rashid, A. Shah [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2015. – Т. 112. – № 32. – С. 10002-10007.

68. Keefe A. D. Aptamers as therapeutics / A. D. Keefe, S. Pai, A. Ellington // *Nature Reviews Drug Discovery* 2010 9:7. – 2010. – Т. 9. – № 7. – С. 537-550.

69. Therapeutic RNA aptamers in clinical trials / P. Sundaram, H. Kurniawan, M. E. Byrne, J. Wower // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. – 2013. – Т. 48. – № 1-2. – С. 259-271.

70. Ecker D. M. The therapeutic monoclonal antibody market / D. M. Ecker, S. D. Jones, H. L. Levine // *mAbs*. – 2015. – Т. 7. – № 1. – С. 9-14.

71. Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease / E. W. M. Ng, D. T. Shima, P. Calias [и др.] // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2006. – Т. 5. – № 2. – С. 123-132.

72. Siddiqui M. A. A. Pegaptanib / M. A. A. Siddiqui, G. M. Keating // *Drugs*. – 2005. – Т. 65. – № 11. – С. 1571-1577.

73. Mousa S. A. Current Status of Vascular Endothelial Growth Factor Inhibition in Age-Related Macular Degeneration / S. A. Mousa, S. S. Mousa // *BioDrugs*. – 2010. – Т. 24. – № 3. – С. 183-194.

74. Ferrara N. Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy / N. Ferrara, A. P. Adamis // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2016. – Т. 15. – № 6. – С. 385-403.

75. Sahin U. mRNA-based therapeutics — developing a new class of drugs / U. Sahin, K. Karikó, Ö. Türeci // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2014. – Т. 13. – № 10. – С. 759-780.

76. mRNA vaccines — a new era in vaccinology / N. Pardi, M. J. Hogan, F. W. Porter, D. Weissman // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2018. – Т. 17. – № 4. – С. 261-279.

77. An RNA toolbox for cancer immunotherapy / F. Pastor, P. Berraondo, I. Etxeberria [и др.] // *Nature Reviews Drug Discovery*. – 2018. – Т. 17. – № 10. – С. 751-767.

78. Tan L. Recent advances in mRNA vaccine delivery / L. Tan, X. Sun // *Nano Research*. – 2018. – Т. 11. – № 10. – С. 5338-5354.

79. Evading innate immunity in nonviral mRNA delivery: don't shoot the messenger / J. Devoldere, H. Dewitte, S. C. De Smedt, K. Remaut // *Drug Discovery Today*. – 2016. – Т. 21. – № 1. – С. 11-25.

80. Preclinical and Clinical Demonstration of Immunogenicity by mRNA Vaccines against H10N8 and H7N9 Influenza Viruses / K. Bahl, J. J. Senn, O. Yuzhakov [и др.] // *Molecular Therapy*. – 2017. – Т. 25. – № 6. – С. 1316-1327.

81. Davidson B. L. Current prospects for RNA interference-based therapies / B. L. Davidson, P. B. McCray // *Nature Reviews Genetics*. – 2011. – Т. 12. – № 5. – С. 329-340.

82. Kissler S. From genome-wide association studies to etiology: probing autoimmunity genes

by RNAi / S. Kissler // *Trends in Molecular Medicine*. – 2011. – Т. 17. – № 11. – С. 634-640.

83. Host gene targets for novel influenza therapies elucidated by high-throughput RNA interference screens / V. A. Meliopoulos, L. E. Andersen, K. F. Birrer [и др.] // *The FASEB Journal*. – 2012. – Т. 26. – № 4. – С. 1372-1386.

84. A Highly Durable RNAi Therapeutic Inhibitor of PCSK9 / K. Fitzgerald, S. White, A. Borodovsky [и др.] // *New England Journal of Medicine*. – 2017. – Т. 376. – № 1. – С. 41-51.

85. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016 / M. Naghavi, A. A. Abajobir, C. Abbafati [и др.] // *The Lancet*. – 2017. – Т. 390. – № 10100. – С. 1151-1210.

86. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90 056 participants in 14 randomised trials of statins / C. Baigent, A. Keech, P. M. Kearney [и др.] // *The Lancet*. – 2005. – Т. 366. – № 9493. – С. 1267-1278.

87. Rosuvastatin to Prevent Vascular Events in Men and Women with Elevated C-Reactive Protein / P. M. Ridker, E. Danielson, F. A. H. Fonseca [и др.] // *New England Journal of Medicine*. – 2008. – Т. 359. – № 21. – С. 2195-2207.

88. Efficacy and safety of more intensive lowering of LDL cholesterol: A meta-analysis of data from 170 000 participants in 26 randomised trials / C. Baigent, L. Blackwell, J. Emberson [и др.] // *The Lancet*. – 2010. – Т. 376. – № 9753. – С. 1670-1681.

89. Ezetimibe Added to Statin Therapy after Acute Coronary Syndromes / C. P. Cannon, M. A. Blazing, R. P. Giugliano [и др.] // *New England Journal of Medicine*. – 2015. – Т. 372. – № 25. – С. 2387-2397.

90. Evolocumab and Clinical Outcomes in Patients with Cardiovascular Disease / M. S. Sabatine, R. P. Giugliano, A. C. Keech [и др.] // *New England Journal of Medicine*. – 2017. – Т. 376. – № 18. – С. 1713-1722.

91. Cardiovascular Efficacy and Safety of Bococizumab in High-Risk Patients / P. M. Ridker, J. Revkin, P. Amarengo [и др.] // *New England Journal of Medicine*. – 2017. – Т. 376. – № 16. – С. 1527-1539.

92. Effects of Combination Lipid Therapy in Type 2 Diabetes Mellitus / H. Ginsberg, M. Elam, L. Lovato [и др.] // *New England Journal of Medicine*. – 2010. – Т. 362. – № 17. – С. 1563-1574.

93. Effects of Anacetrapib in Patients with Atherosclerotic Vascular Disease / L. Bowman, J. C. Hopewell, F. Chen [и др.] // *New England Journal of Medicine*. – 2017. – Т. 377. – № 13. – С. 1217-1227.

94. Antiinflammatory Therapy with Canakinumab for Atherosclerotic Disease / P. M. Ridker, B. M. Everett, T. Thuren [и др.] // *New England Journal of Medicine*. – 2017. – Т. 377. – № 12. –

C. 1119-1131.

95. The Evolving Understanding and Approach to Residual Cardiovascular Risk Management / D. S. Dhindsa, P. B. Sandesara, M. D. Shapiro, N. D. Wong // *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. – 2020. – Т. 7. – № 88. – С. 1-11.

96. Revisiting biomarker discovery by plasma proteomics / P. E. Geyer, L. M. Holdt, D. Teupser, M. Mann // *Molecular Systems Biology*. – 2017. – Т. 13. – № 942. – С. 1-15.

97. Nordestgaard B. G. A Test in Context: Lipid Profile, Fasting Versus Nonfasting / B. G. Nordestgaard // *Journal of the American College of Cardiology*. – 2017. – Т. 70. – № 13. – С. 1637-1646.

98. Nordestgaard B. G. Triglycerides and cardiovascular disease. / B. G. Nordestgaard, A. Varbo // *Lancet (London, England)*. – 2014. – Т. 384. – № 9943. – С. 626-635.

99. Nordestgaard B. G. Triglyceride-Rich Lipoproteins and Atherosclerotic Cardiovascular Disease / B. G. Nordestgaard // *Circulation Research*. – 2016. – Т. 118. – № 4. – С. 547-563.

100. Current Understanding of Atherogenesis / R. A. Brown, E. Shantsila, C. Varma, G. Y. H. Lip // *The American Journal of Medicine*. – 2017. – Т. 130. – № 3. – С. 268-282.

101. Mechanisms of plaque formation and rupture / J. F. Bentzon, F. Otsuka, R. Virmani, E. Falk // *Circulation Research*. – 2014. – Т. 114. – № 12. – С. 1852-1866.

102. Boffa M. B. Lipoprotein (a): truly a direct prothrombotic factor in cardiovascular disease? / M. B. Boffa, M. L. Koschinsky // *Journal of Lipid Research*. – 2016. – Т. 57. – № 5. – С. 745-757.

103. Low-density lipoproteins cause atherosclerotic cardiovascular disease. 1. Evidence from genetic, epidemiologic, and clinical studies. A consensus statement from the European Atherosclerosis Society Consensus Panel / B. A. Ference, H. N. Ginsberg, I. Graham [и др.] // *European Heart Journal*. – 2017. – Т. 38. – № 32. – С. 2459-2472.

104. Triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoprotein cholesterol in patients at high risk of cardiovascular disease: evidence and guidance for management / M. J. Chapman, H. N. Ginsberg, P. Amarencu [и др.] // *European Heart Journal*. – 2011. – Т. 32. – № 11. – С. 1345-1361.

105. The polygenic nature of hypertriglyceridaemia: implications for definition, diagnosis, and management / R. A. Hegele, H. N. Ginsberg, M. J. Chapman [и др.] // *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. – 2014. – Т. 2. – № 8. – С. 655-666.

106. Nordestgaard B. G. Lipoprotein (a) as a cause of cardiovascular disease: insights from epidemiology, genetics, and biology / B. G. Nordestgaard, A. Langsted // *Journal of Lipid Research*. – 2016. – Т. 57. – № 11. – С. 1953-1975.

107. Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status / B. G. Nordestgaard, M. J. Chapman, K. Ray [и др.] // *European Heart Journal*. – 2010. – Т. 31. – № 23. – С. 2844-2853.

108. Kronenberg F. Lipoprotein(a): resurrected by genetics / F. Kronenberg, G. Utermann // *Journal of Internal Medicine*. – 2013. – Т. 273. – № 1. – С. 6-30.
109. Gaudet D. Gene-based therapies in lipidology / D. Gaudet, D. Brisson // *Current Opinion in Lipidology*. – 2015. – Т. 26. – № 6. – С. 553-565.
110. Effect of an RNA interference drug on the synthesis of proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9) and the concentration of serum LDL cholesterol in healthy volunteers: A randomised, single-blind, placebo-controlled, phase 1 trial / K. Fitzgerald, M. Frank-Kamenetsky, S. Shulga-Morskaya [и др.] // *The Lancet*. – 2014. – Т. 383. – № 9911. – С. 60-68.
111. Horton J. Molecular biology of PCSK9: its role in LDL metabolism / J. Horton, J. Cohen, H. Hobbs // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2007. – Т. 32. – № 2. – С. 71-77.
112. Dissection of the endogenous cellular pathways of PCSK9-induced low density Lipoprotein receptor degradation. Evidence for an intracellular route / S. Poirier, G. Mayer, V. Poupon [и др.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – Т. 284. – № 42. – С. 28856-28864.
113. A Highly Durable RNAi Therapeutic Inhibitor of PCSK9 / K. Fitzgerald, S. White, A. Borodovsky [и др.] // <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1609243>. – 2016. – Т. 376. – № 1. – С. 41-51.
114. Lamb Y. N. Inclisiran: First Approval / Y. N. Lamb // *Drugs*. – 2021. – Т. 81. – № 3. – С. 389-395.
115. Inclisiran: A New Promising Agent in the Management of Hypercholesterolemia / C. Kosmas, A. Muñoz Estrella, A. Sourlas [и др.] // *Diseases*. – 2018. – Т. 6. – № 63. – С. 1-6.
116. Loss-of-function mutations in APOC3 and risk of ischemic vascular disease / A. B. Jørgensen, R. Frikke-Schmidt, B. G. Nordestgaard, A. Tybjaerg-Hansen // *New England Journal of Medicine*. – 2014. – Т. 371. – № 1. – С. 32-41.
117. Antisense oligonucleotide inhibition of apolipoprotein c-iii reduces plasma triglycerides in rodents, nonhuman primates, and humans / M. J. Graham, R. G. Lee, T. A. Bell [и др.] // *Circulation Research*. – 2013. – Т. 112. – № 11. – С. 1479-1490.
118. Wang X. Clinical and genetic analysis of a family diagnosed with familial hypobetalipoproteinemia in which the proband was diagnosed with diabetes mellitus / X. Wang, D. Wang, Z. Shan // *Atherosclerosis*. – 2015. – Т. 239. – № 2. – С. 552-556.
119. Silencing of ANGPTL 3 (angiopoietin-like protein 3) in human hepatocytes results in decreased expression of gluconeogenic genes and reduced triacylglycerol-rich VLDL secretion upon insulin stimulation / A. Tikka, J. Soronen, P. P. Laurila [и др.] // *Bioscience Reports*. – 2014. – Т. 34. – № 6. – С. 811-821.
120. Cardiovascular and Metabolic Effects of ANGPTL3 Antisense Oligonucleotides / M. J. Graham, R. G. Lee, T. A. Brandt [и др.] // *New England Journal of Medicine*. – 2017. – Т. 377. – № 3.

– C. 222-232.

121. Genetically Elevated Lipoprotein(a) and Increased Risk of Myocardial Infarction / P. R. Kamstrup, A. Tybjaerg-Hansen, R. Steffensen, B. G. Nordestgaard // JAMA. – 2009. – Т. 301. – № 22. – C. 2331-2339.

122. Genetic Variants Associated with Lp(a) Lipoprotein Level and Coronary Disease / R. Clarke, J. F. Peden, J. C. Hopewell [и др.] // New England Journal of Medicine. – 2009. – Т. 361. – № 26. – C. 2518-2528.

123. Kamstrup P. R. Elevated lipoprotein(a) and risk of aortic valve stenosis in the general population / P. R. Kamstrup, A. Tybjaerg-Hansen, B. G. Nordestgaard // Journal of the American College of Cardiology. – 2014. – Т. 63. – № 5. – C. 470-477.

124. Antisense therapy targeting apolipoprotein(a): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 1 study / S. Tsimikas, N. J. Viney, S. G. Hughes [и др.] // The Lancet. – 2015. – Т. 386. – № 10002. – C. 1472-1483.

125. Antisense oligonucleotides targeting apolipoprotein(a) in people with raised lipoprotein(a): two randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trials / N. J. Viney, J. C. van Capelleveen, R. S. Geary [и др.] // The Lancet. – 2016. – Т. 388. – № 10057. – C. 2239-2253.

126. Kamstrup P. R. Lipoprotein(a) concentrations, isoform size, and risk of type 2 diabetes: A Mendelian randomisation study / P. R. Kamstrup, B. G. Nordestgaard // The Lancet Diabetes and Endocrinology. – 2013. – Т. 1. – № 3. – C. 220-227.

127. The association between circulating lipoprotein(a) and type 2 diabetes: Is it causal? / Z. Ye, P. C. Haycock, D. Gurdasani [и др.] // Diabetes. – 2014. – Т. 63. – № 1. – C. 332-342.

128. Familial defective apolipoprotein B-100: A review / L. H. Andersen, A. R. Miserez, Z. Ahmad, R. L. Andersen // Journal of Clinical Lipidology. – 2016. – Т. 10. – № 6. – C. 1297-1302.

129. Complex effects of inhibiting hepatic apolipoprotein B100 synthesis in humans. / G. Reyes-Soffer, B. Moon, A. Hernandez-Ono [и др.] // Science translational medicine. – 2016. – Т. 8. – № 323. – C. 1-10.

130. Alterations in the hepatic transcriptional landscape after RNAi mediated ApoB silencing in cynomolgus monkeys / M. S. Hamza, C. Kumar, S. M. Chia [и др.] // Atherosclerosis. – 2015. – Т. 242. – № 2. – C. 383-395.

131. Quick nuclear transportation of siRNA and in vivo hepatic ApoB gene silencing with galactose-bearing polymeric carrier / Y. Tachibana, M. C. Munisso, W. Kamata [и др.] // Journal of Biotechnology. – 2014. – Т. 175. – № 1. – C. 15-21.

132. Mipomersen and other therapies for the treatment of severe familial hypercholesterolemia / J. Burnett, Bell, Hooper, Watts // Vascular Health and Risk Management. – 2012. – Т. 8. – № 1. –

C. 651-659.

133. Randomized, Placebo-Controlled Trial of Mipomersen in Patients with Severe Hypercholesterolemia Receiving Maximally Tolerated Lipid-Lowering Therapy / M. P. McGowan, J.-C. Tardif, R. Ceska [и др.] // PLoS ONE. – 2012. – Т. 7. – № 11. – С. e49006.

134. Effect of apolipoprotein-B synthesis inhibition on liver triglyceride content in patients with familial hypercholesterolemia / M. E. Visser, F. Akdim, D. L. Tribble [и др.] // Journal of Lipid Research. – 2010. – Т. 51. – № 5. – С. 1057-1062.

135. ApoB siRNA-induced Liver Steatosis is Resistant to Clearance by the Loss of Fatty Acid Transport Protein 5 (Fatp5) / B. Ason, J. Castro-Perez, S. Tep [и др.] // Lipids 2011 46:11. – 2011. – Т. 46. – № 11. – С. 991-1003.

136. Chemical and structural modifications of RNAi therapeutics / S. H. Ku, S. D. Jo, Y. K. Lee [и др.] // Advanced Drug Delivery Reviews. – 2016. – Т. 104. – С. 16-28.

137. Zuckerman J. E. Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer / J. E. Zuckerman, M. E. Davis // Nature Reviews Drug Discovery. – 2015. – Т. 14. – № 12. – С. 843-856.

138. Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs / C. Wolfrum, S. Shi, K. N. Jayaprakash [и др.] // Nature Biotechnology. – 2007. – Т. 25. – № 10. – С. 1149-1157.

139. An ionizable lipid toolbox for RNA delivery / X. Han, H. Zhang, K. Butowska [и др.] // Nature Communications. – 2021. – Т. 12. – № 7233. – С. 1-6.

140. Doherty G. J. Mechanisms of Endocytosis / G. J. Doherty, H. T. McMahon // Annual Review of Biochemistry. – 2009. – Т. 78. – № 1. – С. 857-902.

141. Pei D. Overcoming Endosomal Entrapment in Drug Delivery / D. Pei, M. Buyanova // Bioconjugate Chemistry. – 2019. – Т. 30. – № 2. – С. 273-283.

142. White J. M. Fusion of Enveloped Viruses in Endosomes / J. M. White, G. R. Whittaker // Traffic. – 2016. – Т. 17. – № 6. – С. 593-614.

143. Visualizing lipid-formulated siRNA release from endosomes and target gene knockdown / A. Wittrup, A. Ai, X. Liu [и др.] // Nature Biotechnology. – 2015. – Т. 33. – № 8. – С. 870-876.

144. Freeman E. C. Modeling the proton sponge hypothesis: Examining proton sponge effectiveness for enhancing intracellular gene delivery through multiscale modeling / E. C. Freeman, L. M. Weiland, W. S. Meng // Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. – 2013. – Т. 24. – № 4. – С. 398-416.

145. Rational design of cationic lipids for siRNA delivery / S. C. Semple, A. Akinc, J. Chen [и др.] // Nature Biotechnology. – 2010. – Т. 28. – № 2. – С. 172-176.

146. Dominska M. Breaking down the barriers: siRNA delivery and endosome escape / M.

Dominska, D. M. Dykxhoorn // *Journal of Cell Science*. – 2010. – Т. 123. – № 8. – С. 1183-1189.

147. Hepatic Tumor Metastases Cause Enhanced PEGylated Liposome Uptake by Kupffer Cells / M. Ukawa, Y. Fujiwara, H. Ando [и др.] // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. – 2016. – Т. 39. – № 2. – С. 215-220.

148. Efficiency of siRNA delivery by lipid nanoparticles is limited by endocytic recycling / G. Sahay, W. Querbes, C. Alabi [и др.] // *Nature Biotechnology*. – 2013. – Т. 31. – № 7. – С. 653-658.

149. The Endosomal Escape of Nanoparticles: Toward More Efficient Cellular Delivery / S. A. Smith, L. I. Selby, A. P. R. R. Johnston, G. K. Such // *Bioconjugate Chemistry*. – 2019. – Т. 30. – № 2. – С. 263-272.

150. Endosomal escape of polymeric gene delivery complexes is not always enhanced by polymers buffering at low pH / A. M. Funhoff, C. F. van Nostrum, G. A. Koning [и др.] // *Biomacromolecules*. – 2004. – Т. 5. – № 1. – С. 32-39.

151. The Possible “Proton Sponge” Effect of Polyethylenimine (PEI) Does Not Include Change in Lysosomal pH / R. V. Benjaminsen, M. A. Mattheijer, J. R. Henriksen [и др.] // *Molecular Therapy*. – 2013. – Т. 21. – № 1. – С. 149-157.

152. Rehman Z. U. Mechanism of polyplex- and lipoplex-mediated delivery of nucleic acids: real-time visualization of transient membrane destabilization without endosomal lysis / Z. U. Rehman, D. Hoekstra, I. S. Zuhorn // *ACS nano*. – 2013. – Т. 7. – № 5. – С. 3767-3777.

153. Nanoescapology: progress toward understanding the endosomal escape of polymeric nanoparticles / L. I. Selby, C. M. Cortez-Jugo, G. K. Such, A. P. R. Johnston // *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. – 2017. – Т. 9. – № 5. – С. 1-23.

154. Bobbin M. L. RNA Interference (RNAi)-Based Therapeutics: Delivering on the Promise? / M. L. Bobbin, J. J. Rossi // *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. – 2016. – Т. 56. – № 1. – С. 103-122.

155. Delivery materials for siRNA therapeutics / R. Kanasty, J. R. Dorkin, A. Vegas, D. Anderson // *Nature Materials*. – 2013. – Т. 12. – № 11. – С. 967-977.

156. Non-viral vectors for gene-based therapy / H. Yin, R. L. Kanasty, A. A. Eltoukhy [и др.] // *Nature Reviews Genetics*. – 2014. – Т. 15. – № 8. – С. 541-555.

157. Gao Y. Research progress on siRNA delivery with nonviral carriers. / Y. Gao, X. Liu, X.-R. Li // *International journal of nanomedicine*. – 2011. – Т. 6. – С. 1017-1025.

158. Bridging small interfering RNA with giant therapeutic outcomes using nanometric liposomes / Y. Singh, S. Tomar, S. Khan [и др.] // *Journal of Controlled Release*. – 2015. – Т. 220. – С. 368-387.

159. Leung A. K. K. Lipid Nanoparticles for Short Interfering RNA Delivery / A. K. K. Leung,

- Y. Y. C. Tam, P. R. Cullis // *Advances in Genetics*. – Academic Press Inc., 2014. – Т. 88. – С. 71-110.
160. Hope M. J. Enhancing siRNA delivery by employing lipid nanoparticles / M. J. Hope // *Therapeutic Delivery*. – 2014. – Т. 5. – № 6. – С. 663-673.
161. Cationic lipid saturation influences intracellular delivery of encapsulated nucleic acids / J. Heyes, L. Palmer, K. Bremner, I. MacLachlan // *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. – 2005. – Т. 107. – № 2. – С. 276-287.
162. Maximizing the potency of siRNA lipid nanoparticles for hepatic gene silencing in vivo / M. Jayaraman, S. M. Ansell, B. L. Mui [и др.] // *Angewandte Chemie (International ed. in English)*. – 2012. – Т. 51. – № 34. – С. 8529-8533.
163. Membrane-destabilizing ionizable phospholipids for organ-selective mRNA delivery and CRISPR–Cas gene editing / S. Liu, Q. Cheng, T. Wei [и др.] // *Nature Materials*. – 2021. – Т. 20. – № 5. – С. 701-710.
164. A combinatorial library of lipid-like materials for delivery of RNAi therapeutics / A. Akinc, A. Zumbuehl, M. Goldberg [и др.] // *Nature biotechnology*. – 2008. – Т. 26. – № 5. – С. 561-569.
165. Lipopeptide nanoparticles for potent and selective siRNA delivery in rodents and nonhuman primates / Y. Dong, K. T. Love, J. R. Dorkin [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2014. – Т. 111. – № 11. – С. 3955-3960.
166. Lipid-like materials for low-dose, in vivo gene silencing / K. T. Love, K. P. Mahon, C. G. Levins [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Т. 107. – № 5. – С. 1864-1869.
167. Biodegradable lipids enabling rapidly eliminated lipid nanoparticles for systemic delivery of RNAi therapeutics / M. A. Maier, M. Jayaraman, S. Matsuda [и др.] // *Molecular Therapy*. – 2013. – Т. 21. – № 8. – С. 1570-1578.
168. A Novel Amino Lipid Series for mRNA Delivery: Improved Endosomal Escape and Sustained Pharmacology and Safety in Non-human Primates / S. Sabnis, E. S. Kumarasinghe, T. Salerno [и др.] // *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*. – 2018. – Т. 26. – № 6. – С. 1509-1519.
169. Wan C. Lipid nanoparticle delivery systems for siRNA-based therapeutics / C. Wan, T. M. Allen, P. R. Cullis // *Drug Delivery and Translational Research*. – 2014. – Т. 4. – № 1. – С. 74-83.
170. CRISPR-Cas9 In Vivo Gene Editing for Transthyretin Amyloidosis / J. D. Gillmore, E. Gane, J. Taubel [и др.] // *The New England journal of medicine*. – 2021. – Т. 385. – № 6. – С. 493-502.
171. Cheng X. The role of helper lipids in lipid nanoparticles (LNPs) designed for oligonucleotide delivery / X. Cheng, R. J. Lee // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2016. – Т. 99. – С. 129-137.
172. Shielding of Lipid Nanoparticles for siRNA Delivery: Impact on Physicochemical

Properties, Cytokine Induction, and Efficacy / V. Kumar, J. Qin, Y. Jiang [и др.] // *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. – 2014. – Т. 3. – № e210. – С. 1-7.

173. Xia Y. Effect of surface properties on liposomal siRNA delivery / Y. Xia, J. Tian, X. Chen // *Biomaterials*. – 2016. – Т. 79. – С. 56-68.

174. The effect of neutral helper lipids on the structure of cationic lipid monolayers / A. P. Dabkowska, D. J. Barlow, A. V. Hughes [и др.] // *Journal of the Royal Society Interface*. – 2012. – Т. 9. – № 68. – С. 548-561.

175. Tenchov B. G. Cubic phases in phosphatidylcholine-cholesterol mixtures: Cholesterol as membrane «fusogen» / B. G. Tenchov, R. C. MacDonald, D. P. Siegel // *Biophysical Journal*. – 2006. – Т. 91. – № 7. – С. 2508-2516.

176. Sokolova V. Inorganic Nanoparticles as Carriers of Nucleic Acids into Cells / V. Sokolova, M. Epple // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2008. – Т. 47. – № 8. – С. 1382-1395.

177. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles: Cytotoxicity, Metabolism, and Cellular Behavior in Biomedicine Applications. / H. Wei, Y. Hu, J. Wang [и др.] // *International journal of nanomedicine*. – 2021. – Т. 16. – С. 6097-6113.

178. Uptake, distribution, clearance, and toxicity of iron oxide nanoparticles with different sizes and coatings / Q. Feng, Y. Liu, J. Huang [и др.] // *Scientific Reports*. – 2018. – Т. 8. – № 1. – С. 1-13.

179. Repurposing ferumoxytol: Diagnostic and therapeutic applications of an FDA-approved nanoparticle / Y. Huang, J. C. Hsu, H. Koo, D. P. Cormode // *Theranostics*. – 2022. – Т. 12. – № 2. – С. 796-816.

180. Engineering Nanoparticles for Targeted Delivery of Nucleic Acid Therapeutics in Tumor / Y. Xiao, K. Shi, Y. Qu [и др.] // *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*. – 2019. – Т. 12. – С. 1-18.

181. 15 years on siRNA delivery: Beyond the State-of-the-Art on inorganic nanoparticles for RNAi therapeutics / J. Conde, A. Ambrosone, Y. Hernandez [и др.] // *Nano Today*. – 2015. – Т. 10. – № 4. – С. 421-450.

182. Design of iron oxide-based nanoparticles for MRI and magnetic hyperthermia / C. Blanco-Andujar, A. Walter, G. Cotin [и др.] // *Nanomedicine*. – 2016. – Т. 11. – № 14. – С. 1889-1910.

183. Structural effects on the magnetic hyperthermia properties of iron oxide nanoparticles / E. C. Abenojar, S. Wickramasinghe, J. Bas-Concepcion, A. C. S. Samia // *Progress in Natural Science: Materials International*. – 2016. – Т. 26. – № 5. – С. 440-448.

184. Suriyanto. Physical mechanism and modeling of heat generation and transfer in magnetic fluid hyperthermia through Néelian and Brownian relaxation: a review / Suriyanto, E. Y. K. Ng, S. D. Kumar // *BioMedical Engineering OnLine*. – 2017. – Т. 16. – № 36. – С. 1-22.

185. Chen W. Spatial, Temporal, and Dose Control of Drug Delivery using Noninvasive Magnetic Stimulation. / W. Chen, C.-A. Cheng, J. I. Zink // *ACS nano*. – 2019. – T. 13. – № 2. – С. 1292-1308.
186. Externally Triggered Heat and Drug Release from Magnetically Controlled Nanocarriers / E. G. Fuller, H. Sun, R. D. Dhavalikar [и др.] // *ACS Applied Polymer Materials*. – 2019. – Т. 1. – № 2. – С. 211-220.
187. Nanoparticle uptake: The phagocyte problem / H. H. Gustafson, D. Holt-Casper, D. W. Grainger, H. Ghandehari // *Nano Today*. – 2015. – Т. 10. – № 4. – С. 487-510.
188. Hegyi G. Hyperthermia versus Oncothermia: Cellular Effects in Complementary Cancer Therapy / G. Hegyi, G. P. Szigeti, A. Szász // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. – 2013. – Т. 2013. – С. 1-12.
189. Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: From fundamental principles to advanced applications / J. Beik, Z. Abed, F. S. Ghoreishi [и др.] // *Journal of Controlled Release*. – 2016. – Т. 235. – С. 205-221.
190. Magnetic fluid hyperthermia: Advances, challenges, and opportunity / B. Kozissnik, A. C. Bohorquez, J. Dobson, C. Rinaldi // *International Journal of Hyperthermia*. – 2013. – Т. 29. – № 8. – С. 706-714.
191. Hedayatnasab Z. Review on magnetic nanoparticles for magnetic nanofluid hyperthermia application / Z. Hedayatnasab, F. Abnisa, W. M. A. W. Daud // *Materials and Design*. – 2017. – Т. 123. – С. 174-196.
192. Heim E. Binding assays with streptavidin-functionalized superparamagnetic nanoparticles and biotinylated analytes using fluxgate magnetorelaxometry / E. Heim, F. Ludwig, M. Schilling // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2009. – Т. 321. – № 10. – С. 1628-1631.
193. Dieckhoff J. Fluxgate based detection of magnetic nanoparticle dynamics in a rotating magnetic field / J. Dieckhoff, M. Schilling, F. Ludwig // *Applied Physics Letters*. – 2011. – Т. 99. – № 112501. – С. 1-3.
194. Xu C. New forms of superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications / C. Xu, S. Sun // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2013. – Т. 65. – № 5. – С. 732-743.
195. Yu M. K. Magnetic nanoparticles and their applications in image-guided drug delivery / M. K. Yu, J. Park, S. Jon // *Drug Delivery and Translational Research*. – 2012. – Т. 2. – № 1. – С. 3-21.
196. Parkinson G. S. Iron oxide surfaces / G. S. Parkinson // *Surface Science Reports*. – 2016. – Т. 71. – № 1. – С. 272-365.
197. Superparamagnetic Colloids: Controlled Synthesis and Niche Applications / U. Jeong, X. Teng, Y. Wang [и др.] // *Advanced Materials*. – 2007. – Т. 19. – № 1. – С. 33-60.

198. Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles / A. Kolhatkar, A. Jamison, D. Litvinov [и др.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2013. – Т. 14. – № 8. – С. 15977-16009.
199. Synthesis, characterization, applications, and challenges of iron oxide nanoparticles / A. Ali, H. Zafar, M. Zia [и др.] // Nanotechnology, Science and Applications. – 2016. – Т. 9. – С. 49-67.
200. Iron oxide nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in diagnosis and treatment of cancer / A. A. Hernández-Hernández, G. Aguirre-Álvarez, R. Cariño-Cortés [и др.] // Chemical Papers. – 2020. – Т. 74. – № 11. – С. 3809-3824.
201. Review of Green Methods of Iron Nanoparticles Synthesis and Applications / H. M. Fahmy, F. M. Mohamed, M. H. Marzouq [и др.] // BioNanoScience. – 2018. – Т. 8. – № 2. – С. 491-503.
202. Fernández-Barahona I. Microwave-Driven Synthesis of Iron-Oxide Nanoparticles for Molecular Imaging / I. Fernández-Barahona, M. Muñoz-Hernando, F. Herranz // Molecules. – 2019. – Т. 24. – № 1224. – С. 1-35.
203. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Functionalization for Biomedical Applications in the Central Nervous System / S. Ansari, E. Ficiara, F. Ruffinatti [и др.] // Materials. – 2019. – Т. 12. – № 465. – С. 1-24.
204. Massart R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media / R. Massart // IEEE Transactions on Magnetics. – 1981. – Т. 17. – № 2. – С. 1247-1248.
205. Highly stable monodisperse PEGylated iron oxide nanoparticle aqueous suspensions: A nontoxic tracer for homogeneous magnetic bioassays / A. Lak, J. Dieckhoff, F. Ludwig [и др.] // Nanoscale. – 2013. – Т. 5. – № 23. – С. 11447-11455.
206. Vidal-Vidal J. Synthesis of monodisperse maghemite nanoparticles by the microemulsion method / J. Vidal-Vidal, J. Rivas, M. A. López-Quintela // Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects. – 2006. – Т. 288. – № 1-3. – С. 44-51.
207. Schmid G. Nanoparticles - From Theory to Application / G. Schmid. – Wiley-VCH, 2010. – 434 с.
208. Wang Y. Hydrothermal and biomineralization synthesis of a dual-modal nanoprobe for targeted near-infrared persistent luminescence and magnetic resonance imaging / Y. Wang, C.-X. Yang, X.-P. Yan // Nanoscale. – 2017. – Т. 9. – № 26. – С. 9049-9055.
209. Synthesis, Characterization, and Applications of Magnetic Nanoparticles Featuring Polyzwitterionic Coatings / P. Biehl, M. von der Lühe, S. Dutz, F. Schacher // Polymers. – 2018. – Т. 10. – № 91. – С. 1-28.
210. Murray C. B. Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites / C. B. Murray, D. J. Norris, M. G. Bawendi // Journal of the American Chemical Society. – 1993. – Т. 115. – № 19. – С. 8706-8715.

211. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals / J. Park, K. An, Y. Hwang [и др.] // *Nature Materials*. – 2004. – Т. 3. – № 12. – С. 891-895.
212. Standardizing Size- and Shape-Controlled Synthesis of Monodisperse Magnetite (Fe₃O₄) Nanocrystals by Identifying and Exploiting Effects of Organic Impurities / L. Qiao, Z. Fu, J. Li [и др.] // *ACS Nano*. – 2017. – Т. 11. – № 6. – С. 6370-6381.
213. Magnetite Fe₃O₄(111): surface structure by LEED crystallography and energetics / A. Barbieri, W. Weiss, M. A. Van Hove, G. A. Somorjai // *Surface Science*. – 1994. – Т. 302. – № 3. – С. 259-279.
214. Nonclassical nucleation and growth of inorganic nanoparticles / J. Lee, J. Yang, S. G. Kwon, T. Hyeon // *Nature Reviews Materials*. – 2016. – Т. 1. – № 16034. – С. 1-16.
215. Precise Size Control of the Growth of Fe₃O₄ Nanocubes over a Wide Size Range Using a Rationally Designed One-Pot Synthesis / J. Muro-Cruces, A. G. Roca, A. López-Ortega [и др.] // *ACS Nano*. – 2019. – Т. 13. – № 7. – С. 7716-7728.
216. Becker R. Kinetische Behandlung der Keimbildung in übersättigten Dämpfen / R. Becker, W. Döring // *Annalen der Physik*. – 1935. – Т. 416. – № 8. – С. 719-752.
217. Polte J. Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective / J. Polte // *CrystEngComm*. – 2015. – Т. 17. – № 36. – С. 6809-6830.
218. Finney E. E. Nanocluster nucleation and growth kinetic and mechanistic studies: A review emphasizing transition-metal nanoclusters / E. E. Finney, R. G. Finke // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2008. – Т. 317. – № 2. – С. 351-374.
219. Mer V. K. La. Nucleation in Phase Transitions. / V. K. La Mer // *Industrial & Engineering Chemistry*. – 2002. – Т. 44. – № 6. – С. 1270-1277.
220. Enhanced Nanoparticle Size Control by Extending LaMer's Mechanism / R. Rakhshae, Y. Noorani, E. C. Vreeland [и др.] // *Chemistry of Materials*. – 2015. – Т. 27. – № 17. – С. 6059-6066.
221. Rakhshae R. Extending LaMer's mechanism using open system for increasing forced and controlled growth of Au nano particles: Desired decreasing Fe₃O₄ nano particles size during simultaneous synthesis in optimized conditions / R. Rakhshae, Y. Noorani // *Advanced Powder Technology*. – 2017. – Т. 28. – № 7. – С. 1797-1814.
222. Rempel J. Y. Insights into the kinetics of semiconductor nanocrystal nucleation and growth / J. Y. Rempel, M. G. Bawendi, K. F. Jensen // *Journal of the American Chemical Society*. – 2009. – Т. 131. – № 12. – С. 4479-4489.
223. Evolution of colloidal nanocrystals: Theory and modeling of their nucleation and growth / J. Van Embden, J. E. Sader, M. Davidson, P. Mulvaney // *Journal of Physical Chemistry C*. – 2009. – Т. 113. – № 37. – С. 16342-16355.

224. Privman V. Mechanisms of Diffusional Nucleation of Nanocrystals and Their Self-Assembly into Uniform Colloids / V. Privman // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 2009. – T. 1161. – № 1. – C. 508-525.
225. Karthika S. A Review of Classical and Nonclassical Nucleation Theories / S. Karthika, T. K. Radhakrishnan, P. Kalaichelvi // *Crystal Growth and Design*. – 2016. – T. 16. – № 11. – C. 6663-6681.
226. Whitehead C. B. LaMer's 1950 model of particle formation: a review and critical analysis of its classical nucleation and fluctuation theory basis, of competing models and mechanisms for phase-changes and particle formation, and then of its application to silver halide, semiconductor, metal, and metal-oxide nanoparticles / C. B. Whitehead, S. Özkar, R. G. Finke // *Materials Advances*. – 2021. – T. 2. – № 1. – C. 186-235.
227. Ikai A. Force in biology / A. Ikai, R. Afrin. – 1st ed. – Amsterdam, The Netherlands ; : Elsevier, 2008. – 1-21 c.
228. Grissom C. B. Magnetic Field Effects in Biology: A Survey of Possible Mechanisms with Emphasis on Radical-Pair Recombination / C. B. Grissom // *Chemical Reviews*. – 1995. – T. 95. – № 1. – C. 3-24.
229. Golovin Y. I. Magnetoplastic effects in solids / Y. I. Golovin // *Physics of the Solid State*. – 2004. – T. 46. – № 5. – C. 789-824.
230. Milyaev V. A. On the physical nature of magnetobiological effects / V. A. Milyaev, V. N. Binhi // *Quantum Electronics*. – 2006. – T. 36. – № 8. – C. 691-701.
231. Binhi V. N. The effects of weak magnetic fields on biological systems: Physical aspects / V. N. Binhi, A. V. Savin // *Uspekhi Fizicheskikh Nauk*. – 2003. – T. 173. – № 3. – C. 265-300.
232. Towards nanomedicines of the future: Remote magneto-mechanical actuation of nanomedicines by alternating magnetic fields / Y. I. Golovin, S. L. Gribovsky, D. Y. Golovin [и др.] // *Journal of Controlled Release*. – 2015. – T. 219. – C. 43-60.
233. Controlled cell death by magnetic hyperthermia: Effects of exposure time, field amplitude, and nanoparticle concentration / L. Asín, M. R. Ibarra, A. Tres, G. F. Goya // *Pharmaceutical Research*. – 2012. – T. 29. – № 5. – C. 1319-1327.
234. Cell death induced by the application of alternating magnetic fields to nanoparticle-loaded dendritic cells / I. Marcos-Campos, L. Asín, T. E. Torres [и др.] // *Nanotechnology*. – 2011. – T. 22. – № 205101. – C. 1-13.
235. Induced cell toxicity originates dendritic cell death following magnetic hyperthermia treatment / L. Asín, G. F. Goya, A. Tres, M. R. Ibarra // *Cell Death & Disease*. – 2013. – T. 4. – № e596. – C. 1-4.

236. Goya G. F. Cell death induced by AC magnetic fields and magnetic nanoparticles: Current state and perspectives / G. F. Goya, L. Asín, M. R. Ibarra // *International Journal of Hyperthermia*. – 2013. – T. 29. – № 8. – C. 810-818.
237. EGFR-Targeted Magnetic Nanoparticle Heaters Kill Cancer Cells without a Perceptible Temperature Rise / M. Creixell, A. C. Bohórquez, M. Torres-Lugo, C. Rinaldi // *ACS Nano*. – 2011. – T. 5. – № 9. – C. 7124-7129.
238. Lysosomal membrane permeabilization by targeted magnetic nanoparticles in alternating magnetic fields / M. Domenech, I. Marrero-Berrios, M. Torres-Lugo, C. Rinaldi // *ACS Nano*. – 2013. – T. 7. – № 6. – C. 5091-5101.
239. Synthesis of oleic acid functionalized Fe₃O₄ magnetic nanoparticles and studying their interaction with tumor cells for potential hyperthermia applications / N. V. Jadhav, A. I. Prasad, A. Kumar [и др.] // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2013. – T. 108. – C. 158-168.
240. Hyperthermia HeLa Cell Treatment with Silica-Coated Manganese Oxide Nanoparticles / A. Villanueva, P. de la Presa, J. M. Alonso [и др.] // *The Journal of Physical Chemistry C*. – 2010. – T. 114. – № 5. – C. 1976-1981.
241. Dynamic Magnetic Fields Remote-Control Apoptosis via Nanoparticle Rotation / E. Zhang, M. F. Kircher, M. Koch [и др.] // *ACS Nano*. – 2014. – T. 8. – № 4. – C. 3192-3201.
242. Tomasini M. D. Molecular dynamics simulations of rupture in lipid bilayers / M. D. Tomasini, C. Rinaldi, M. S. Tomassone // *Experimental Biology and Medicine*. – 2010. – T. 235. – № 2. – C. 181-188.
243. Single-domain magnetic nanoparticles as force generators for the nanomechanical control of biochemical reactions by low-frequency magnetic fields / Y. I. Golovin, N. L. Klyachko, M. Sokolsky-Papkov, A. V. Kabanov // *Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics*. – 2013. – T. 77. – № 11. – C. 1350-1359.
244. Gazeau F. Optimizing magnetic nanoparticle design for nanothermotherapy / F. Gazeau, M. Lévy, C. Wilhelm // *Nanomedicine*. – 2008. – T. 3. – № 6. – C. 831-844.
245. Plank C. Magnetically enhanced nucleic acid delivery. Ten years of magnetofection-Progress and prospects / C. Plank, O. Zelphati, O. Mykhaylyk // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2011. – T. 63. – № 14-15. – C. 1300-1331.
246. Advances in magnetofection—magnetically guided nucleic acid delivery / U. Schillinger, T. Brill, C. Rudolph [и др.] // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2005. – T. 293. – № 1. – C. 501-508.
247. Streptavidin Paramagnetic Particles Provide a Choice of Three Affinity-Based Capture and Magnetic Concentration Strategies for Retroviral Vectors / C. Hughes, J. Galea-Lauri, F. Farzaneh, D.

Darling // *Molecular Therapy*. – 2001. – Т. 3. – № 4. – С. 623-630.

248. Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo / F. Scherer, M. Anton, U. Schillinger [и др.] // *Gene Therapy*. – 2002. – Т. 9. – № 2. – С. 102-109.

249. The magnetofection method: Using magnetic force to enhance gene delivery / C. Plank, U. Schillinger, F. Scherer [и др.] // *Biological Chemistry*. – 2003. – Т. 384. – № 5. – С. 737-747.

250. Magnetofection—A highly efficient tool for antisense oligonucleotide delivery in vitro and in vivo / F. Krötz, C. de Wit, H.-Y. Sohn [и др.] // *Molecular Therapy*. – 2003. – Т. 7. – № 5. – С. 700-710.

251. Gene delivery to respiratory epithelial cells by magnetofection / S. W. Gersting, U. Schillinger, J. Lausier [и др.] // *The Journal of Gene Medicine*. – 2004. – Т. 6. – № 8. – С. 913-922.

252. Magnetofection potentiates gene delivery to cultured endothelial cells / F. Krötz, H. Y. Sohn, T. Gloe [и др.] // *Journal of Vascular Research*. – 2003. – Т. 40. – № 5. – С. 425-434.

253. Enhancement of the efficiency of non-viral gene delivery by application of pulsed magnetic field / S. W. Kamau, P. O. Hassa, B. Steitz [и др.] // *Nucleic acids research*. – 2006. – Т. 34. – № 5. – С. 1-8.

254. Magnetic nanoparticles as gene delivery agents: enhanced transfection in the presence of oscillating magnet arrays / S. C. McBain, U. Griesenbach, S. Xenariou [и др.] // *Nanotechnology*. – 2008. – Т. 19. – № 405102. – С. 1-5.

255. Multivalent N -acetylgalactosamine-conjugated siRNA localizes in hepatocytes and elicits robust RNAi-mediated gene silencing / J. K. Nair, J. L. S. Willoughby, A. Chan [и др.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2014. – Т. 136. – № 49. – С. 16958-16961.

256. Easy Synthesis and Magnetic Properties of Iron Oxide Nanoparticles / K. Woo, J. Hong, S. Choi [и др.] // *Chemistry of Materials*. – 2004. – Т. 16. – № 14. – С. 2814-2818.

257. Precise control over shape and size of iron oxide nanocrystals suitable for assembly into ordered particle arrays / E. Wetterskog, M. Agthe, A. Mayence [и др.] // *Science and Technology of Advanced Materials*. – 2014. – Т. 15. – № 055010. – С. 1-9.

258. Fatty Acid Salts as Stabilizers in Size- and Shape-Controlled Nanocrystal Synthesis: The Case of Inverse Spinel Iron Oxide / M. V Kovalenko, M. I. Bodnarchuk, R. T. Lechner [и др.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2007. – Т. 129. – № 20. – С. 6352-6353.

259. Colorimetric ferrozine-based assay for the quantitation of iron in cultured cells / J. Riemer, H. H. Hoepken, H. Czerwinska [и др.] // *Analytical Biochemistry*. – 2004. – Т. 331. – № 2. – С. 370-375.

260. Gold–Pluronic core–shell nanoparticles: synthesis, characterization and biological

evaluation / T. Simon, S. Boca, D. Biro [и др.] // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2013. – Т. 15. – № 1578. – С. 1-8.

261. Gonzales M. Phase transfer of highly monodisperse iron oxide nanocrystals with Pluronic F127 for biomedical applications / M. Gonzales, K. M. Krishnan // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2007. – Т. 1. – № 311. – С. 59-62.

262. Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs / D. V Morrissey, J. A. Lockridge, L. Shaw [и др.] // *Nature Biotechnology*. – 2005. – Т. 23. – № 8. – С. 1002-1007.

263. Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery / A. Schroeder, C. G. Levins, C. Cortez [и др.] // *Journal of Internal Medicine*. – 2010. – Т. 267. – № 1. – С. 9-21.

264. Kesharwani P. A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA / P. Kesharwani, V. Gajbhiye, N. K. Jain // *Biomaterials*. – 2012. – Т. 33. – № 29. – С. 7138-7150.

265. CHOMZYNSKI P. Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction / P. CHOMZYNSKI // *Analytical Biochemistry*. – 1987. – Т. 162. – № 1. – С. 156-159.

266. Livak K. J. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method / K. J. Livak, T. D. Schmittgen // *Methods*. – 2001. – Т. 25. – № 4. – С. 402-408.

267. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR / A. Radonić, S. Thulke, I. M. Mackay [и др.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2004. – Т. 313. – № 4. – С. 856-862.

268. Simple and rapid monitoring of doxorubicin using streptavidin-modified microparticle-based time-resolved fluorescence immunoassay / J. Liang, Z. Zhang, H. Zhao [и др.] // *RSC Advances*. – 2018. – Т. 8. – № 28. – С. 15621-15631.

269. Rockenberger J. A New Nonhydrolytic Single-Precursor Approach to Surfactant-Capped Nanocrystals of Transition Metal Oxides / J. Rockenberger, E. C. Scher, A. P. Alivisatos // *Journal of the American Chemical Society*. – 1999. – Т. 121. – № 49. – С. 11595-11596.

270. Synthesis of Highly Crystalline and Monodisperse Maghemite Nanocrystallites without a Size-Selection Process / T. Hyeon, S. S. Lee, J. Park [и др.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2001. – Т. 123. – № 51. – С. 12798-12801.

271. Sun S. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles / S. Sun, H. Zeng // *Journal of the American Chemical Society*. – 2002. – Т. 124. – № 28. – С. 8204-8205.

272. Magnetic nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in bioimaging and magnetic energy storage. / N. A. Frey, S. Peng, K. Cheng, S. Sun // *Chemical Society reviews*. – 2009. – Т. 38. – № 9. – С. 2532-2542.

273. Seeded Growth Synthesis of Au-Fe₃O₄ Heterostructured Nanocrystals: Rational Design and Mechanistic Insights / E. Fantechi, A. G. Roca, B. Sepúlveda [и др.] // *Chemistry of Materials*. – 2017. – Т. 29. – № 9. – С. 4022-4035.
274. Nanoscale size effect on surface spin canting in iron oxide nanoparticles synthesized by the microemulsion method / M. Darbandi, F. Stromberg, J. Landers [и др.] // *Journal of Physics D: Applied Physics*. – 2012. – Т. 45. – № 195001. – С. 1-11.
275. Magnetic iron oxide nanoparticles: Reproducible tuning of the size and nanosized-dependent composition, defects, and spin canting / W. Baaziz, B. P. Pichon, S. Fleutot [и др.] // *Journal of Physical Chemistry C*. – 2014. – Т. 118. – № 7. – С. 3795-3810.
276. Anomalous magnetic properties of nanoparticles arising from defect structures: Topotaxial oxidation of Fe_{1-x}O/Fe_{3-δ}O₄ core/shell nanocubes to single-phase particles / E. Wetterskog, C. W. Tai, J. Grins [и др.] // *ACS Nano*. – 2013. – Т. 7. – № 8. – С. 7132-7144.
277. Synthesis and Characterization of Iron/Iron Oxide Core/Shell Nanocubes / A. Shavel, B. Rodríguez-González, M. Spasova [и др.] // *Advanced Functional Materials*. – 2007. – Т. 17. – № 18. – С. 3870-3876.
278. Characterization of monodisperse wüstite nanoparticles following partial oxidation / C. J. Chen, R. K. Chiang, H. Y. Lai, C. R. Lin // *Journal of Physical Chemistry C*. – 2010. – Т. 114. – № 10. – С. 4258-4263.
279. Synthesis of size-tuneable β-FeOOH nanoellipsoids and a study of their morphological and compositional changes by reduction / G. Kasparis, A. S. Erdocio, J. M. Tuffnell, N. T. K. Thanh // *CrystEngComm*. – 2019. – Т. 21. – № 8. – С. 1293-1301.
280. Correlation between particle size/domain structure and magnetic properties of highly crystalline Fe₃O₄ nanoparticles / Q. Li, C. W. Kartikowati, S. Horie [и др.] // *Scientific Reports*. – 2017. – Т. 7. – № 1. – С. 1-7.
281. Magnetite-maghemite nanoparticles in the 5-15 nm range: Correlating the core-shell composition and the surface structure to the magnetic properties. A total scattering study. / R. Frison, G. Cernuto, A. Cervellino [и др.] // *Chemistry of Materials*. – 2013. – Т. 25. – № 23. – С. 4820-4827.
282. Size-dependent properties of magnetic iron oxidenanocrystals / A. Demortière, P. Panissod, B. P. Pichon [и др.] // *Nanoscale*. – 2011. – Т. 3. – № 1. – С. 225-232.
283. Guardia P. Tuning the size, the shape, and the magnetic properties of iron oxide nanoparticles / P. Guardia, A. Labarta, X. Batlle // *Journal of Physical Chemistry C*. – 2011. – Т. 115. – № 2. – С. 390-396.
284. Shavel A. Shape control of iron oxide nanoparticles / A. Shavel, L. M. Liz-Marzán // *Physical Chemistry Chemical Physics*. – 2009. – Т. 11. – С. 3762-3767.

285. Nanoscale magnetism control via surface and exchange anisotropy for optimized ferrimagnetic hysteresis / S. H. Noh, W. Na, J. T. Jang [и др.] // *Nano Letters*. – 2012. – Т. 12. – № 7. – С. 3716-3721.
286. High-performance iron oxide nanoparticles for magnetic particle imaging-guided hyperthermia (hMPI) / L. M. Bauer, S. F. Situ, M. A. Griswold, A. C. S. Samia // *Nanoscale*. – 2016. – Т. 8. – № 24. – С. 12162-12169.
287. Influence of iron oleate complex structure on iron oxide nanoparticle formation / L. M. Bronstein, X. Huang, J. Retrum [и др.] // *Chemistry of Materials*. – 2007. – Т. 19. – № 15. – С. 3624-3632.
288. Gas-bubble effects on the formation of colloidal iron oxide nanocrystals / J. Lynch, J. Zhuang, T. Wang [и др.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2011. – Т. 133. – № 32. – С. 12664-12674.
289. Enhanced Nanoparticle Size Control by Extending LaMer's Mechanism / E. C. Vreeland, J. Watt, G. B. Schober [и др.] // *Chemistry of Materials*. – 2015. – Т. 27. – № 17. – С. 6059-6066.
290. Kinetics of monodisperse iron oxide nanocrystal formation by «heating-up» process / G. K. Soon, Y. Piao, J. Park [и др.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2007. – Т. 129. – № 41. – С. 12571-12584.
291. A novel synthetic route for high-index faceted iron oxide concave nanocubes with high T2 relaxivity for in vivo MRI applications / S. F. Situ-Loewenstein, S. Wickramasinghe, E. C. Abenojar [и др.] // *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. – 2018. – Т. 29. – № 58. – С. 1-10.
292. Reduction of maghemite to magnetite over 304SS, in the presence of silver nanoparticles / I. Martínez-Mera, C. Gutiérrez-Wing, C. Argánis-Juárez, A. R. Vilchis-Nestor // *Surface and Coatings Technology*. – 2017. – Т. 324. – С. 338-344.
293. Jung H. Photochemical reduction of nanocrystalline maghemite to magnetite / H. Jung, A. M. Schimpf // *Nanoscale*. – 2021. – Т. 13. – № 41. – С. 17465-17472.
294. Gupta A. K. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. / A. K. Gupta, M. Gupta // *Biomaterials*. – 2005. – Т. 26. – № 18. – С. 3995-4021.
295. Origin of the long-range attraction between surfactant-coated surfaces / E. E. Meyer, Q. Lin, T. Hassenkam [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2005. – Т. 102. – № 19. – С. 6839-6842.
296. Gonzales M. Synthesis of magnetoliposomes with monodisperse iron oxide nanocrystal cores for hyperthermia / M. Gonzales, K. M. Krishnan // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2005. – Т. 293. – № 1. – С. 265-270.
297. A novel magnetic crystal-lipid nanostructure for magnetically guided in vivo gene delivery

/ Y. Namiki, T. Namiki, H. Yoshida [и др.] // *Nature Nanotechnology*. – 2009. – Т. 4. – № 9. – С. 598-606.

298. Liu Y. Designer Lipids Advance Systemic siRNA Delivery / Y. Liu, L. Huang // *Molecular Therapy*. – 2010. – Т. 18. – № 4. – С. 669-670.

299. Huh-7 or HepG2 cells: which is the better model for studying human apolipoprotein-B100 assembly and secretion? / S. J. R. Meex, U. Andreo, J. D. Sparks, E. A. Fisher // *Journal of Lipid Research*. – 2011. – Т. 52. – № 1. – С. 152-158.

300. In vitro cellular models of human hepatic fatty acid metabolism: differences between Huh7 and HepG2 cell lines in human and fetal bovine culturing serum. / P. J. Gunn, C. J. Green, C. Pramfalk, L. Hodson // *Physiological reports*. – 2017. – Т. 5. – № 24. – С. 1-12.

301. Gupta A. K. Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles / A. K. Gupta, M. Gupta // *Biomaterials*. – 2005. – Т. 26. – № 13. – С. 1565-1573.

302. Gupta A. K. Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors / A. K. Gupta, A. S. G. Curtis // *Biomaterials*. – 2004. – Т. 25. – № 15. – С. 3029-3040.

303. High intracellular iron oxide nanoparticle concentrations affect cellular cytoskeleton and focal adhesion kinase-mediated signaling / S. J. H. Soenen, N. Nuytten, S. F. De Meyer [и др.] // *Small*. – 2010. – Т. 6. – № 7. – С. 832-842.

304. Schubert M. A. Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): Influence of lecithin and nonionic emulsifier / M. A. Schubert, C. C. Müller-Goymann // *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. – 2005. – Т. 61. – № 1-2. – С. 77-86.

305. Shape evolution of «multibranched» Mn-Zn ferrite nanostructures with high performance: A transformation of nanocrystals into nanoclusters / J. Xie, C. Yan, Y. Zhang, N. Gu // *Chemistry of Materials*. – 2013. – Т. 25. – № 18. – С. 3702-3709.

306. Lalatonne Y. Van der Waals versus dipolar forces controlling mesoscopic organizations of magnetic nanocrystals / Y. Lalatonne, J. Richardi, M. P. Pileni // *Nature Materials* 2004 3:2. – 2004. – Т. 3. – № 2. – С. 121-125.

307. Octapod iron oxide nanoparticles as high-performance T₂ contrast agents for magnetic resonance imaging / Z. Zhao, Z. Zhou, J. Bao [и др.] // *Nature Communications*. – 2013. – Т. 4. – № 2266. – С. 1-7.

308. Quantification and biodistribution of iron oxide nanoparticles in the primary clearance organs of mice using T₁ contrast for heating / J. Zhang, H. L. Ring, K. R. Hurley [и др.] // *Magnetic Resonance in Medicine*. – 2017. – Т. 78. – № 2. – С. 702-712.

309. Apolipoprotein B knockdown by AAV-delivered shRNA lowers plasma cholesterol in mice / A. Koornneef, P. MacZuga, R. Van Logtenstein [и др.] // *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. – 2011. – Т. 19. – № 4. – С. 731-740.
310. An in vivo evaluation of amphiphilic, biodegradable peptide copolymers as siRNA delivery agents / S. E. Barrett, M. T. Abrams, R. Burke [и др.] // *International journal of pharmaceutics*. – 2014. – Т. 466. – № 1-2. – С. 58-67.
311. Perez E. A. Doxorubicin and paclitaxel in the treatment of advanced breast cancer: efficacy and cardiac considerations / E. A. Perez // *Cancer investigation*. – 2001. – Т. 19. – № 2. – С. 155-164.
312. A review on the efficacy and toxicity of different doxorubicin nanoparticles for targeted therapy in metastatic breast cancer / A. Shafei, W. El-Bakly, A. Sobhy [и др.] // *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. – 2017. – Т. 95. – С. 1209-1218.
313. Use of liposomal doxorubicin for adjuvant chemotherapy of breast cancer in clinical practice / M. Zhao, X. feng Ding, J. yu Shen [и др.] // *Journal of Zhejiang University. Science. B*. – 2017. – Т. 18. – № 1. – С. 15-26.
314. Magnetic resonance imaging of multifunctional pluronic stabilized iron-oxide nanoparticles in tumor-bearing mice / T. K. Jain, S. P. Foy, B. Erokwu [и др.] // *Biomaterials*. – 2009. – Т. 30. – № 35. – С. 6748-6756.
315. Doxorubicin loaded magneto-niosomes for targeted drug delivery / L. Tavano, M. Vivacqua, V. Carito [и др.] // *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. – 2013. – Т. 102. – С. 803-807.
316. Construction of EGFP Expressing HepG2 Cell Line Using Electroporation / M. Cemazar, I. Hreljac, G. Sersa, M. Filipic. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2009. – 128-131 с.