

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАЛТИЙСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ ИММАНУИЛА КАНТА»

На правах рукописи

Пшеничников Станислав Евгеньевич

«ПРИМЕНЕНИЕ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДОВ ЖЕЛЕЗА ДЛЯ ИНДУКЦИИ
ПРОЦЕССОВ РЕГУЛИРУЕМОЙ КЛЕТОЧНОЙ СМЕРТИ»

1.5.6. Биотехнология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат наук

Doktoral degree at the Faculty of
Mathematics, Computer Science and
Natural Science

доцент БФУ им. И. Канта
Левада Екатерина Викторовна

Калининград 2024

СОДЕРЖАНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Наночастицы оксидов железа – материалы с уникальными свойствами.....	11
1.2 Клеточная смерть, её формы и типы.....	18
1.3. Взаимосвязь форм регулируемой клеточной смерти	39
1.4 Механизмы индукции клеточной смерти наночастицами оксидов железа (НЧОЖ)	41
2. ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	48
2.1 Объекты исследований	48
2.1.1 Клеточные культуры.....	48
2.1.2 Характеристика наночастиц, использованных в исследовании.....	48
2.2 Методы исследований	50
2.2.1 Культивирование клеточных культур.....	50
2.2.2 Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови человека.....	52
2.2.3 Анализ цитотоксичности с использованием красителя WST-1	53
2.2.4 Анализ цитотоксичности с использованием красителя alamarBlue.....	55
2.2.5 Культивирование клеток в присутствии НЧМ и внешних источников постоянного магнитного поля.....	57
2.2.6 Анализ клеточной жизнеспособности и исследование образования АФК методом проточной цитометрии.....	59
2.2.7 Анализ апоптотических изменений в клетках	60
2.2.8 Анализ активности каспазы-3	63
2.2.9 Исследование морфологии митохондрий.....	64

2.2.10 Исследование процессов деполяризации митохондриальных мембран	64
2.2.11 Вестерн-блот	65
2.2.12 Исследование уровня экспрессии гена LC3 методом ПЦР в реальном времени	68
2.2.13 Анализ состояния лизосом	69
3. ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	70
3.1 Воздействие НЧМ на жизнеспособность клеток Jurkat и МНК	70
3.2 Влияние формы наночастиц на характер клеточного ответа	77
3.2.1. Воздействие НК и НКЛ вызывает эффект острой гепатотоксичности	77
3.2.2. Воздействие НК активирует процессы аутофагического потока в клеточных линиях Huh7 и Alexander	84
3.2.3 НК и НКЛ индуцируют прогрессивную пермеабиллизацию лизосомальных мембран	90
4. ВЫВОДЫ	97
5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	98

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АФК – активные формы кислорода

МП – магнитное поле

МНК - моноклеарные клетки крови человека

НК - нанокубы

НКЛ – наооластеры

НЧ – наночастицы

НЧМ – наночастицы магнетита

НЧОЖ – наночастицы оксидов железа

ПКС - программируемая клеточная смерть

ПЛМ - пермеабилзация лизосомальных мембран

РКС - регулируемая клеточная смерть

СОФК - скорректированная ооая флуоресценции клеток

Alexander – клеточная линия, гепатома человека (PLC/PRF/5)

Bcl-2 – клеточный регулятор апоптоза

HepG2 – клеточная линия, гепатокарцинома печени человека

Huh7 - клеточная линия, гепатокарцинома печени человека

Jurkat – клеточная линия Т-лимфобластного лейкоза человека

NCDD - Номенклатурный комитет по клеточной смерти (the Nomenclature Committee on Cell Death)

WST-1 – водорастворимые тетразолиевые соли (Water-soluble Tetrazolium salts) для определения клеточной жизнеспособности

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. В настоящее время биотехнология предоставляет широкие перспективы для развития биомедицинских приложений и инструментов наномедицины, открывая новые возможности в области диагностики и лечения заболеваний, а также регуляции отдельных биологических процессов. Активно развивающимися направлениями биотехнологии являются геномные технологии (генетическая инженерия, функциональная геномика, эпигенетика), области ДНК- и РНК-диагностики (секвенирование, использование биомаркеров заболеваний), клеточные технологии (трансплантация клеток, использование стволовых клеток, регуляция иммунного ответа), производство биологических препаратов (вакцины, моноклональные антитела) и другие [1].

Отдельного внимания заслуживает раздел биотехнологии, связанный с применением материалов нанометрового масштаба – бионанотехнология. Вследствие наноразмерности, соотношение площади поверхности наноматериалов к их объёму существенно выше по сравнению с микро- и макрообъектами. Это оказывает непосредственное влияние на механические, магнитные, каталитические, оптические и прочие физико-химические свойства [2]. Данная особенность позволяет получать наноматериалы с наборами характеристик, не достижимыми в макроматериалах, и позволяющих разрабатывать инструменты для проведения специфичных биомедицинских манипуляций [3].

Объектами пристального внимания исследователей, благодаря уникальным свойствам, определяющих широкий круг потенциальных применений в области биотехнологии, а также в рамках приложений для наномедицины является обширный класс наноматериалов - наночастицы (НЧ). Вариативность физических и химических свойств, возможность структурной модификации и функционализации НЧ определили широкую область использования данных материалов – в качестве контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии (МРТ) [4], антимикробных агентов [5], компонентов скаффолдов [6], магнитных эластомеров и композитных материалов [7], инструментов гипертермии

[8], противораковой терапии и тераностики [9,10], инструментов для систем магнитной манипуляции [11] и левитации [12].

Одними из наиболее перспективных видов НЧ являются наночастицы оксидов железа (НЧОЖ), обладающие высокой магнитной восприимчивостью [9]. Это делает НЧОЖ эффективными инструментами для магнитного мечения биологических структур [13,14], процессов *in vivo* и *in vitro* визуализации клеток [15–18], в системах магнитной клеточной манипуляции [11,19], адресной доставки лекарств [20,21], иммунотерапии [22]. Однако, современные исследования демонстрируют ряд токсических эффектов, связанных с воздействием НЧОЖ на клеточные структуры [23–30]. По этой причине ряд биомедицинских инструментов на основе НЧОЖ был отозван из медицинской практики [31–34]. При этом знания о механизмах, лежащих в основе токсичности, индуцированной воздействием НЧОЖ, а также прочих сопутствующих эффектах остаются довольно ограниченными [35,36].

Возможность эффективного использования НЧ в области наномедицины требует соблюдения ряда требований для данных материалов – низкой токсичности, высокой биосовместимости, диспергируемости, неиммуногенности и стабильности в физиологических средах [37]. Понимание механизмов цитотоксичности имеет решающее значение для заблаговременного предотвращения неблагоприятных последствий в ходе применения НЧ в практике [38,39].

Цитотоксические эффекты могут проявляться в виде механического повреждения и пермеабиллизации мембран [40], снижения активности и дисфункции митохондрий [9], конденсации хромосом [28], снижения пролиферативной активности, структуры цитоскелета [17], индукции процессов клеточной смерти. Одним из наиболее распространенных механизмов цитотоксичности НЧОЖ является генерация активных форм кислорода (АФК) [41].

Исследования в области цитотоксичности и биосовместимости НЧОЖ, существенно дополняют современные представления о взаимодействии НЧ с клеточными структурами, выявляют отдельные механизмы токсичности и

способствуют расширению сферы потенциальных применений НЧ и в итоге коммерциализации терапевтических инструментов на основе НЧ. При оптимальном подборе параметров используемых НЧ, возможно добиться получения материала с желаемыми свойствами. Особенности модификации поверхности, форма наночастиц, размер и другие свойства определяют характер их взаимодействия со здоровыми и опухолевыми клетками организма, что служит одним из важнейших факторов для разработки данных материалов и применения биомедицине и наномедицине.

Целью настоящей работы является выявление и исследование особенностей взаимодействия наночастиц на основе оксидов железа с рядом клеточных культур человека.

В задачи диссертационного исследования входило:

1. Определить уровень цитотоксичности наночастиц магнетита на примере клеточной линии Т-лимфобластного лейкоза человека (Jurkat) и мононуклеарных клеток крови человека.
2. Выявить и охарактеризовать механизмы, лежащие в основе цитотоксичности наночастиц магнетита.
3. Определить уровень цитотоксичности двух видов наночастиц оксидов железа, имеющих различную форму (представляющих собой нанокубы и нанокластеры), но одинаковый химический состав.
4. Идентифицировать механизмы, лежащие в основе цитотоксичности наночастиц и определяющих характер клеточного ответа.

Объектами данного исследования послужили наночастицы магнетита, а также два типа наночастиц оксида железа, обладающих схожими характеристиками, но имеющие различную морфологию; цитотоксические эффекты и процессы, индуцированных действием наночастиц оксидов железа в серии клеточных линиях человека Alexander, HepG2, Huh7 и Jurkat.

Методы исследования. В диссертационной работе использовали общенаучные и специальные методы исследования: физико-химические, биохимические, микробиологические и математические. Экспериментальные

результаты прошли статистическую обработку после обработки выборки из 3 опытов.

Научная новизна: впервые проведён комплексный анализ воздействия НЧОЖ различной формы и размеров на серию клеточных культур человека Alexander, HepG2, Huh7 и Jurkat. Установлена возможность серии НЧОЖ (имеющих одинаковые размеры и химический состав) индуцировать различные сценарии клеточного ответа (апоптоз или аутофагию) в зависимости от формы НЧ. Выявлена зависимость индукции интенсивной пермеабилзации лизосомальных мембран и апоптоза в клетках Alexander и Huh7 от действия НК. Впервые доказано, что НК вызывают слабый эффект ПЛМ, приводящий к аутофагии в клеточных линиях Alexander и Huh7. Экспериментальным путем подтверждено, что повышенный уровень экспрессии Bcl-2 в клетках HepG2, ингибирует процессы аутофагии и при воздействии НК и НКЛ, приводит к активации апоптических процессов в клетках. Установлено, что НЧМ индуцируют оксидативный стресс в клетках Jurkat, но не оказывают ингибирующего воздействия на МНК.

Теоретическая и практическая значимость. Получены новые и расширены существующие знания о взаимодействии НЧОЖ, в частности НЧМ, НК и НКЛ с биологическими структурами на примере серии различных культур клеток человека. В работе получены комплексные данные о характере индуцируемых НЧОЖ клеточных процессов. Детально изучен и подтверждён механизм ПЛМ, вызванный влиянием НК и НКЛ. Продемонстрировано влияние генетических особенностей клеточной культуры HepG2, на вид клеточного ответа, после воздействия НЧ. Продемонстрирована индукция цитотоксических процессов и усиление пермеабилзации НЧ внутрь клеток при приложении МП.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные результаты исследования подтверждены сравнительной проработкой информационно-патентных источников; использованием современных методов анализа и статистической обработкой результатов экспериментов.

Материалы диссертации доложены и обсуждены: на 10 конференциях: Международная научная конференция «Ломоносов-2019» и «Ломоносов-2021»

(Москва, 2019, 2021); 5th International Conference «Current Trends in Cancer Theranostics» СТСТ 5.0 (5я Международная Конференция «Текущие Тренды в Тераностике Рака», Тракай, Литва, 2019); International Baltic Conference on Magnetism 2019, 2021, 2023 (третья, четвертая и пятая Международная Балтийская Конференция по Магнетизму, Светлогорск, 2019, 2021, 2023); VI Съезд биофизиков России (Сочи, 2019); Samarkand International Symposium on Magnetism SISM-2023 (Самаркандский международный симпозиум по магнетизму, Самарканд 2023), III Научный семинар «Математическое и компьютерное моделирование свойств мягких магнитных материалов: от теории к экспериментам и приложениям» (Ставрополь, 2024), IV Балтийский симпозиум по иммунологии, молекулярной и регенеративной медицине (Калининград, 2024).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 15 научных работ, из них 3 статьи в рецензируемых изданиях, индексируемых в базах данных научного цитирования (Web of Science, Scopus, РИНЦ). Опубликовано 12 тезисов и материалов конференций (в т.ч. 2 тезисов, индексируемых РИНЦ).

Научные положения, выносимые на защиту:

- наночастицы на основе магнетита (в концентрации 100 мкг/мл при воздействии в течение 24 ч) индуцируют цитотоксические эффекты в клетках Т-клеточной лимфомы человека (Jurkat), но не ингибируют жизнеспособность мононуклеарных клеток крови человека. Снижение жизнеспособности (до 77,7%) связано с индукцией оксидативного стресса, внутриклеточной интернализацией наночастиц, а также усиливается при приложении постоянных магнитных полей (вплоть до 54,5% при 0.45 Т).

- наночастицы оксида железа одинакового состава, но различной формы – нанокубы и нанокластеры ингибируют жизнеспособность клеток Alexander, HepG2 и Huh7 в равной степени, при этом величина ингибирования имеет прямую концентрационную зависимость. При этом повышенный уровень экспрессии Bcl-2 в клетках HepG2, ингибирует процессы аутофагии, что, при воздействии нанокубов и нанокластеров, приводит к активации апоптотических процессов в клетках.

- нанокластеры индуцируют более интенсивную пермеабиллизацию лизосомальных мембран по сравнению с нанокубами, что приводит к апоптозу в клетках Alexander и Nuh7, вызванного массивным повреждением мембран. В тоже время, нанокубы индуцируют процессы аутофагии в клеточных линиях Alexander и Nuh7.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационное исследование соответствует п. 14 «Бионанотехнологии и наномедицина, включая применение наноматериалов в биотехнологии и медицине, использование биологических молекул в нанотехнологических целях» паспорта специальности 1.5.6 – «Биотехнология»

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации, состоит в проведении поиска и анализе информации по исследуемой теме, выборе направления исследований, непосредственном участие в постановке цели и задач исследовательской работы, планировании, подготовке и проведении экспериментов, а также анализе и обработке результатов. Автор осуществлял подготовку публикаций в международные научные журналы, а также представлял итоги исследований в ходе конференций.

Структура и объём работы. Диссертация изложена на 116 страницах машинописного текста, содержит 30 рисунков. Структура состоит из списка сокращений, введения, обзора литературы, объектов и методов исследований, результатов и обсуждения, выводов и списка литературы, состоящего из 201 наименования, в том числе 195 на иностранном языке.

1. ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Наночастицы оксидов железа – материалы с уникальными свойствами

Биотехнология представляет собой междисциплинарную область знания, изучающую возможности использования биологических систем для решения хозяйственных, медицинских, промышленных, экологических и прочих технологических задач. Будучи изначально отраслью, посвященной получению полезных продуктов из сырья с использованием живых организмов, биотехнология в настоящее время включает в себя множество отраслей науки [42]. Отдельного внимания заслуживает раздел биотехнологии, связанный с применением материалов нанометрового масштаба – бионанотехнология. Вследствие наноразмерности, соотношение площади поверхности наноматериалов к их объёму существенно выше по сравнению с микро- и макрообъектами. Это оказывает непосредственное влияние на механические, магнитные, каталитические, оптические и прочие физико-химические свойства [2]. Данная особенность позволяет получать наноматериалы с наборами характеристик, не достижимыми в макроматериалах, и позволяющих разрабатывать инструменты для проведения специфичных биомедицинских манипуляций [3]. Согласно «Комплексной программе развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 года» [43] выделяют девять основных разделов биотехнологии: биофармацевтика, биомедицина, промышленная биотехнология, биоэнергетика, сельскохозяйственная биотехнология, пищевая биотехнология, лесная биотехнология, природоохранная биотехнология, морская биотехнология. Также существуют подходы к классификации типов биотехнологии по цветам-типам [43], при этом количество цветов с течением времени увеличивается. Таким образом, биотехнология повсеместно вовлечена во многие аспекты человеческой деятельности. Её развитие определит уровень жизни человека в будущем и послужит значимым фактором развития научно-технического прогресса.

Особого внимания заслуживает вклад биотехнологии в развитие наномедицины и биомедицинских приложений. Она открывает новые возможности

в области диагностики и лечения заболеваний, а также регуляции отдельных биологических процессов. Активно развивающимися направлениями являются геномные технологии (генетическая инженерия, функциональная геномика, эпигенетика), области ДНК- и РНК-диагностики (секвенирование, использование биомаркеров заболеваний), клеточные технологии (трансплантация клеток, использование стволовых клеток, регуляция иммунного ответа), производство биологических препаратов (вакцины, моноклональные антитела) и другие [1]. Большие перспективы несёт раздел биотехнологии, связанный с применением материалов нанометрового масштаба – бионанотехнология.

Интенсивное развитие методов синтеза наноматериалов в последние десятилетия создаёт возможности для получения наноструктур с уникальными и гибкими характеристиками. Данные материалы обладают широким потенциалом для применения в химическом катализе [44], стоматологии [45], строительстве [46], системах биоремедиации [47] и биodeградации поллютантов [48], создании сенсоров [49], в сельском хозяйстве [50], энергетике [51].

Отдельного рассмотрения требует необходимость применения наноматериалов в медицине и для разработки биомедицинских приложений. Согласно докладу Всемирной организации здравоохранения [52] и современным исследованиям [53], развитие методов биомедицины неразрывно связано с разработкой новых инструментов на основе наноматериалов. Глобальные вызовы, такие как необходимость преодоления антибиотикорезистентности микроорганизмов [54], создания противовирусных агентов [55], разработки новых методик по борьбе с онкологическими заболеваниями [56], создания эффективных систем диагностики [57], развития репродуктивных технологий [58,59], разработки инструментов восстановления тканей и органов человека [60], требуют использования современных наноматериалов. Данные наноразмерные материалы можно использовать для выполнения задач, невозможных при применении только классических объёмных материалов [61].

Наноматериалы представляют собой моно- или полидисперсные объекты, функциональные свойства которых определяются наноразмерностью их

структуры, лежащей в пределах 1 - 100 нм [2]. Наноматериалы можно классифицировать по форме и структуре – наночастицы, нанотрубочки, нанокубы, нанокластеры, нанозвёзды, нанодиски и прочие производные формы, а также слоистые и 2D материалы [62,63]. Наноматериалы также различают по химическому составу (неорганические, органические, смешанного состава) [64]. Также отдельно выделяют нанообъекты, состоящие из двух или более наноразмерных функциональных компонентов – нанокомпозиты [64,65]. Наноматериалы могут быть модифицированы с использованием молекул и нанообъектов различной природы и характеристик, что значительно расширяет спектр их потенциальных применений и позволяет получить наноматериалы для решения специфичных задач [66,67].

Одними из наиболее перспективных разновидностей наноматериалов являются наночастицы (НЧ). Ввиду наноразмерности, НЧ обладают большим соотношением поверхности к объёму, по сравнению с микро- и макроматериалами [68]. Данная особенность придаёт НЧ уникальные каталитические, магнитные, механические, электрические, структурные и оптические свойства [2,68]. Это является основой для разработки НЧ, либо наноматериалов на их основе, со свойствами, недостижимыми при использовании объёмных материалов [69].

НЧ являются перспективными материалами в качестве терапевтических и диагностических инструментов для использования в биомедицине [10]. Для возможности использования в качестве инструмента для биомедицины НЧ должны быть нетоксичными, диспергируемыми в воде, биосовместимыми, неиммуногенными, химически стабильными в физиологических средах [37].

Свойства НЧ определяются размером, формой, химическим составом, магнитными и оптическими характеристиками, функциональными компонентами и структурными модификациями [2,9,70]. Контроль вышеперечисленных параметров необходим для получения монодисперсного и однородного наноматериала с требуемыми свойствами [71]. Это позволяет контролировать условия взаимодействия НЧ с биологическими и искусственными системами, что

обеспечивает воспроизводимость получаемых результатов в ходе исследований и терапевтических манипуляций [72].

По происхождению выделяют НЧ естественного происхождения, НЧ созданные искусственно в лабораторных условиях либо промышленными методами, а также НЧ образующиеся спонтанно как побочные продукты деятельности человека [73]. Согласно пространственной классификации [73] НЧ подразделяют на четыре группы – 0D (нульмерные), 1D (одномерные), 2D (двумерные) и 3D (трёхмерные). Это классификация основана на числе осей (сторон) нанообъектов, не превышающих по размерам 100 нм. Первая группа, 0D, представляет собой НЧ, размерность которых ограничена наномасштабами. Группа 1D включает НЧ, имеющие только одну размерность за пределами нанометрового диапазона и две других размерности в нанодиапазоне. Данные НЧ представлены нанопроводами, нанотрубочками, наностержнями и прочими объектами схожих конфигураций. 2D НЧ обладают двумя размерностями за пределами нанометрового масштаба. Данные наноматериалы относят к тонким плёнкам, нанолистам и нанопокровностям. 3D НЧ своим размерами превышают нанометровый диапазон. Подобные материалы структурно состоят из нанообъектов обладающих меньшей размерностью и проявляющих все свойства характерные для наноматериалов. К данной группе НЧ относят порошки, волокнистые и многослойные материалы [62,73]. Согласно химической структуре, выделяют органические НЧ (нанополимеры и липосомы), неорганические НЧ (НЧ металлов и оксидов металлов, квантовые точки, керамические НЧ), углеродные НЧ [37] и прочие [62,73].

Выраженные магнитные свойства способны значительно увеличить круг потенциальных применений НЧ [36]. Магнитные НЧ в настоящее время рассматриваются как перспективная основа для биомедицинских приложений. На основе магнитных НЧ разрабатываются системы адресной доставки лекарств, иммобилизации ферментов [70], регенеративной медицины [15], диагностики и лечения [74,75].

Среди различных типов магнитных наноматериалов, наночастицам оксидов железа (НЧОЖ), уделяется особенно пристальное внимание исследователей. Методы синтеза позволяют получать НЧОЖ, характеризующихся однородным распределением по размерам, биосовместимостью и выраженными магнитными свойствами, которые могут быть адаптированы для решения специфичных задач в области биомедицины [70].

Выделяют более десятка разновидностей оксидов железа с различными комбинациями атомов железа и кислорода [73]. Наиболее распространенными формами являются гематит ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), маггемит ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) и магнетит (Fe_3O_4) [36]. В случаях, когда размер ограничен 10 нм, НЧОЖ способны демонстрировать суперпарамагнитное поведение [76]. Также НЧОЖ не проявляют остаточной намагниченности, после изъятия из области магнитного поля. Это позволяет рассматривать НЧОЖ как перспективные материалы для использования в качестве контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии (МРТ), инструментов адресной доставки лекарственных препаратов и компонентов систем магнитного манипулирования [19,77], а также прочих методик требующих использования магнитных материалов [14,15].

Несмотря на то, что магнитные характеристики НЧ играют решающее значение, токсичность является одним из основных ограничений использования наноматериалов [73]. НЧОЖ демонстрируют больший уровень биосовместимости, по сравнению с другими видами магнитных НЧ (к примеру, содержащих никель и кобальт), ввиду меньшей оксидативной активности [62,73]. Цитотоксичность зависит от размера НЧ – к примеру генерация активных форм кислорода (АФК) усиливается при уменьшении размера используемых НЧ, что приводит к усугублению оксидативного стресса [78]. Также размер НЧ непосредственно влияет на процессы активации системы комплемента, распознавание НЧ иммунной системой, процессов опсонизации и формирования белковой короны при введении НЧ в кровь [78]. НЧ обладающие размером менее 5 нм интенсивно выводятся из кровотока через мочевыводящие пути, что является одним из препятствий для

достижения длительной циркуляции материала в системе кровоснабжения и достижения терапевтического эффекта [78].

Модификация поверхности НЧ позволяет снизить потенциальные побочные эффекты и повысить химическую стабильность НЧ [30]. Известно, что покрытие НЧОЖ с использованием декстрана или полиэтиленгликоля (ПЭГ) повышает стабильность и время циркуляции частиц в кровотоке [30]. К примеру, покрытие в виде ПЭГ препятствует опсонизации НЧ и способно повышать их химическую устойчивость [30].

В то же время процессы биodeградации НЧ, в т.ч. входящих в их состав компонентов биосовместимых покрытий и функциональных групп, должны быть изучены, ввиду возможной индукции клеточных реакций химически деградировавшими наночастицами [37]. НЧ способны активно взаимодействовать с компонентами биологических жидкостей, в частности с белками. В результате формируется белковая корона на поверхности НЧ, играющая ключевую роль во взаимодействии НЧ с биологическими структурами. Белковая корона может блокировать функциональные возможности НЧ, приводить к иммунному ответу и приводить к ускоренному выведению НЧ из организма [36]. НЧ могут быть введены в организм человека различными путями – вдыханием, проглатыванием, через кожу, путём инъекции [79]. После вдыхания НЧ могут перемещаться из дыхательных путей посредством эндоцитоза или транцитоза, и проникать в лимфатическую систему [79,80]. После введения НЧ в кровь они могут распространяться по всему организму и накапливаться в костном мозге, печени, сердце, селезенке и других органах. В данном процессе печень служит в качестве биологической системы фильтрации и способна поглощать от 30 до 99% введённых НЧ [81]. Этот процесс приводит к снижению эффективности доставки НЧ к тканям-мишеням и потенциально приводит к цитотоксическим эффектам в клетках печени – гепатотоксичности [36,81].

НЧ, введённые в организм сталкиваются с физическими и биологическими барьерами (диффузия, адсорбция белков, агрегация, ток кровеносных сосудов, почечный клиренс), препятствующими на пути к клеткам-мишеням [82]. Согласно

литературным источникам [82], в среднем только 0.7% от введенной дозы НЧ достигает опухолевых клеток. С другой стороны, НЧ способны накапливаться в теле опухоли под действием эффекта повышенной проницаемости и удерживания (EPR-эффект) [83,84]. Данный эффект вызван аномальным разрастанием кровеносных сосудов опухоли (размер межэндотелиальных пор в стенках кровеносных сосудов опухоли может достигать размеров до 2000 нм) и сдавливанием лимфатических сосудов. Это приводит к нарушению лимфатического оттока жидкости (нарушению лимфодренажа) и ограничению выхода НЧ из места локализации опухоли [84]. Образование АФК является одним из механизмов цитотоксичности НЧ, приводящий к оксидативному стрессу с последующим повреждением клеточных мембран, белков и генетического аппарата клетки [85].

Таким образом, НЧОЖ представляют собой перспективную основу для разработки терапевтических и диагностических инструментов. Наноразмерность обуславливает свойства НЧОЖ, не характерные для объемных материалов. Это проявляется в большом соотношении площади поверхности к объему, что придаёт НЧОЖ, как наноматериалу, большую удельную поверхность, высокую химическую и каталитическую активность. Также размеры НЧОЖ обуславливают специфику их магнитных, механических и оптических характеристик [37]. Подобное отличие от объемных материалов, позволяет получать НЧОЖ, способные интернализироваться в клетки и органеллы [32,79], длительное время циркулировать к кровотоку [75], участвовать в процессах гомеостаза железа в организме [86], служить индуктором процессов клеточной смерти [87]. Магнитные характеристики позволяют манипулировать НЧОЖ в условиях *in vitro* и *in vivo* с использованием внешних магнитных полей. Это используется в методах гипертермии [8], доставки и локализации НЧОЖ в теле опухоли, а также контролируемого высвобождения лекарственных препаратов посредством магнитных полей [88]. НЧОЖ используются для создания систем магнитной левитации [12] и формирования клеточных сфероидов [89].

Процессы, обусловленные взаимодействием наноматериалов, клеточных структур и внеклеточного микроокружения опухоли будут определять специфику индуцируемых клеточных процессов. При этом, систематизация знаний о взаимодействии различных НЧОЖ с клеточными структурами позволяет выявить основные закономерности между характеристиками применяемых наноматериалов и инициируемыми клеточными механизмами. С другой стороны, обнаруженные закономерности не являются всеобъемлющими и должны быть подтверждены экспериментальными данными в каждом отдельном случае - при изменении свойств НЧОЖ, выборе другого биологического объекта для манипуляций, либо изменения условий проведения терапии.

1.2 Клеточная смерть, её формы и типы

Долгое время клеточная смерть рассматривалась лишь как неизбежный этап окончания существования клеток. Изучение процессов клеточной смерти в последние десятилетия позволило накопить большое количество экспериментальных данных, изменивших устоявшиеся представления о данном явлении [90]. Это позволило выявить большое количество генетических и клеточных механизмов, ответственных за элиминацию лишних, необратимо повреждённых либо потенциально опасных клеток [91].

Особое значение для живых организмов играет регулируемая клеточная смерть (РКС) – форма клеточной смерти, возникающая при активации одного или нескольких клеточных сигнальных путей [90]. РКС вовлечена в два разнонаправленных процесса. В первом случае, РКС может возникать в отсутствие воздействий со стороны окружающей среды и служит эффектором физиологических программ развития. Подобные физиологические формы РКС относят к программируемой клеточной смерти (ПКС) [92]. Во втором случае, РКС служит следствием воздействия со стороны внутриклеточного или внеклеточного микроокружения. При этом воздействие имеет длительный (накопительный) характер либо достаточно интенсивно в короткий промежуток времени, чтобы нарушить клеточный гомеостаз и нарушить адаптивные клеточные механизмы

[90,92]. Таким образом, РКС, индуцированная стрессом, представляет собой механизм сохранения биологического равновесия. Однако, в то время как адаптивные реакции на стресс действуют на клеточном уровне, что в широком смысле обеспечивает поддержание гомеостаза организма, РКС действует на уровне организма, вопреки клеточному гомеостазу. Таким образом, РКС, обеспечивает гомеостаз тканей и участвует в восстановлении организма в условиях стресса [90]. Данный процесс также может быть индуцирован генетически, либо фармакологически для достижения терапевтического эффекта [90]. Подобная функциональность РКС обеспечивает не только элиминацию потенциально опасных либо не функциональных клеток, но и способность умирающих клеток высвобождать сигнальные молекулы, необходимые для борьбы с угрозой. РКС встречается также и у прокариотических организмов [90].

Другой формой клеточной смерти, в корне отличающейся от РКС, является случайная клеточная смерть (СКС) [91]. СКС представляет собой скоротечную и неконтролируемую гибель клеток, связанную с разрушением плазматической мембраны под влиянием физических (давление, температура, осмотическая сила), химических (колебания pH, химические соединения), или механических факторов (сдавливание, пермеабиллизация) [90].

Клеточная смерть сопровождается морфологическими изменениями, на основании которых можно классифицировать виды (морфотипы) клеточной смерти [90]. К первому типу относится апоптоз, сопровождающийся сморщиванием цитоплазмы, конденсацией хромосом, вздутием плазматической мембраны и фрагментацией клеточных ядер. Итогом служит образование апоптотических телец, которые в условиях *in vitro*, как правило, поглощаются клетками с фагоцитарной активностью и в последствии расщепляются в лизосомах [90,91]. Вторым типом клеточной смерти является аутофагия, характеризующаяся обильной цитоплазматической вакуолизацией, образованием аутофагосом и захватом клеточных компонентов с их последующей лизосомальной деградацией [93]. К третьему типу клеточной смерти относится некроз – гибель клетки, не проявляющая морфологические признаки апоптоза или аутофагии, связанная с

непосредственным разрушением клеточной структуры. Некроз не сопровождается выраженной фагоцитарной активностью или деградацией клеточных компонентов в лизосомах [91,94].

Описанная выше классификация видов клеточной смерти, основанная на морфологических признаках, всё ещё используется по настоящее время, несмотря на собственную неполноту и является устаревшей [90]. Номенклатурным комитетом по клеточной смерти (the Nomenclature Committee on Cell Death, NCDD), разработаны рекомендации по идентификации типов клеточной смерти и используемой терминологии. В дополнение к анализу клеточной морфологии, согласно NCDD, следует учитывать генетические, биохимические, функциональные и фармакологические изменения при идентификации процессов клеточной гибели. Необходимо различать причины клеточной смерти и сопутствующие ей клеточные процессы [90].

Согласно NCDD, различают внутренний и внешний апоптоз, митохондриально-опосредованную гибель (МРТ-опосредованный некроз), некроптоз, ферроптоз, пироптоз, партанатоз, энтоз, нетоз, лизосомально-зависимую гибель, аутофагию, иммуногенную гибель и прочие формы клеточной смерти [90]. В то же время, изучение клеточных механизмов, позволило исключить некоторые процессы из списка РКС, которые в последние десятилетия ошибочно классифицировались как процессы клеточной смерти. К ним относятся клеточное старение, митотическая катастрофа и случаи терминальной дифференцировки [90].

Апоптоз – регулируемый процесс клеточной гибели, в противопоставление некрозу, в классическом понимании. Изначально апоптоз рассматривали как синоним ПКС и единственный клеточный сигнальный путь приводящий к программируемой клеточной гибели [95]. В результате апоптоза клетка разделяется на апоптотические тельца и впоследствии поглощается клетками с фагоцитарной активностью, без инициации процессов воспаления [92]. По особенностям индукции и протекания клеточных механизмов выделяют внутренний и внешний апоптоз [91,92].

Внутренний апоптоз представляет собой форму РКС, инициируемую различными внутриклеточными стимулами. Факторами индуцирующими внутренний апоптоз являются оксидативный стресс, повреждение ДНК, стресс эндоплазматического ретикулума, изменения структуры микротрубочек, дефекты митоза, репликационный стресс, изъятие фактора роста и др. [76,78,79]. Внутренний апоптоз также может быть индуцирован нарушениями функционирования митохондрий [91]. Ключевым признаком данного пути является обширная и необратимая пермеабилзация наружной мембраны митохондрий (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP). Данный процесс контролируется белками семейства Bcl-2, проявляющими про- и антиапоптотическое действие. Помимо перечисленных выше факторов, индуцирующих апоптоз, MOMP может быть вызвана открытием ионных каналов в ответ на гиперэкспрессию Bcl-2 [92]. Помимо митохондриально-опосредованного пути, внутренний апоптоз может быть индуцирован в случае накопления белков с неправильной структурой (мисфолдинг белков) в эндоплазматическом ретикулуме клетки (ЭПР) [91]. При достижении критической концентрации белков с нарушенной структурой, происходит инициация апоптотических сигнальных путей, посредством рецепторов, расположенных на мембране ЭПР [91].

Внешний апоптоз представляет собой разновидность РКС, индуцированной нарушениями внеклеточного микроокружения и внешними стрессовыми факторами [90]. Индукция внешнего апоптоза происходит посредством трансмембранных рецепторов, называемых рецепторами смерти [92]. Наиболее изученными являются рецепторы фактора некроза опухоли (TNFR), Fas-рецепторы (FasR) и рецепторы смерти 3 (DR3). Данные рецепторы активируются при связывании со специфичными лигандами [92]. Также известны рецепторы, активирующиеся только при падении уровня специфичных лигандов ниже порогового значения. К ним относятся рецепторы, специфичные к нетринам (например Unc5A-D, DCC). Рецепторы клеточной смерти обладают внутриклеточными доменами, называемыми доменами смерти, которые включают белки, ассоциированные с TNFR1 (TRADD) и Fas (FADD) [91,92]. После

взаимодействия рецептора с лигандами происходит образование комплекса «рецептор-белок» с участием белков FADD, эндогенного ингибитора каспаз (с-FLIP), протеинкиназы-1 и других [91]. Образовавшаяся структура является сигнальным комплексом, индуцирующим клеточную смерть (death-inducing signaling complex, DISC) что активирует прокаспазу-8 (предшественника каспазы-8). В итоге активация каспазы-8 приводит к индукции апоптоза в клетке [90,91].

Апоптотические клетки сохраняют целостность плазматической мембраны и проявляют метаболическую активность, которая спадает по мере приближения к окончанию апоптоза. В условиях *in vivo* по окончании апоптоза клетки элиминируются благодаря эффероцитозу, в котором принимают участие макрофаги и клетки с фагоцитарной активностью [90,92].

Таким образом, морфологически для апоптоза характерно изменение формы клеток (округление, сморщивание), ретракция псевдоподий в условиях *in vitro*, сохранение целостности цитоплазматической мембраны, уплотнение цитоплазмы, конденсация хроматина, формирование апоптотических телец и их поглощение со стороны фагоцитирующих клеток. Биохимически апоптоз представляет каспазо-зависимый процесс, сопряженный с высвобождением в цитоплазму белков из межмембранного пространства митохондрий и процессами МОМР, активацией катепсинов и кальпайнов, процессами расщепления ДНК [90,91,95].

Некроз исторически рассматривался как нерегулируемая форма клеточной гибели, вызванная воздействием чрезмерного уровня стресса различной природы [95]. Некроз может быть индуцирован большой разновидностью физических, химических, механических, токсических и инфекционных воздействий. Также некроз отождествляют с патологическим состоянием тканей и клеток, связанным с их необратимыми изменениями и потерей функциональности [92,95]. Как правило некроз связывают с обширным нарушением целостности клеточных мембран, однако с открытием систем репарации мембран, данный признак стал не столь однозначным [90].

Согласно современным данным, некроз может быть индуцирован со стороны клеточных сигнальных путей и биохимических воздействий [90,95]. Таким

образом, некроз может представлять собой как нерегулируемый вид клеточной смерти, так и разновидность РКС [95].

Одной из разновидностей регулируемого некроза является митохондриально-опосредованная гибель клеток или МРТ-опосредованный некроз (mitochondrial permeability transition (MPT)-driven necrosis) [90]. Данный процесс представляет собой РКС, вызванную нарушениями внутриклеточного микроокружения. МРТ-опосредованный некроз может быть индуцирован сильным оксидативным стрессом или перегрузкой цитозоля Ca^{2+} , что приводит к формированию некротического морфотипа клеток. МРТ-опосредованный некроз связан с резкой потерей внутренней митохондриальной мембраной непроницаемости для растворенных веществ, что приводит к потере митохондриального трансмембранного потенциала ($\Delta\psi_m$) и осмотическому разрушению мембран. Резкое повышение проницаемости митохондриальных мембран связано с нарушением функциональности протеиновых комплексов РТПС (permeability transition pore complex). Среди факторов, ингибирующих функционирование РТПС выделяют белки семейства Bcl-2 (Bcl2, Bcl XL, BID, BAX, BAK), DRP1, p53. Регуляция и механизмы РТПС в настоящее время служат предметом исследования и дискуссии.

Отсутствие четких биохимических маркеров некроза привело исследователей к практике, при которой наблюдаемые процессы идентифицируются по остаточному принципу как некроз, в случае отсутствия у РКС апоптотических и аутофагических признаков [95]. Идентификация некроза осложняется в случаях сопутствующей активации апоптотических маркеров. К примеру, Аннексин V используется для распознавания ранних апоптотических клеток путем взаимодействия с фосфатидилсерином на внешней стороне плазматической мембраны клеток. В то же время, утечка и разрушение клеточной мембраны в ходе некроза также приводит к позитивному окрашиванию при использовании Аннексина.

Также важно отметить, что некроз может следовать после апоптоза, аутофагии и других форм гибели клеток. Различные факторы могут индуцировать

как апоптоз, так и некроз одновременно в пределах одной клеточной популяции [95]. Апоптотические клетки также могут принять некротическую морфологию. Данный процесс характерен для апоптотических клеток, не подверженных в последствии элиминации посредством эффероцитоза. Это приводит к индукции вторичного (аутолитического) некроза [95].

Таким образом, нерегулируемый некроз представляет собой скоротечную и неконтролируемую клеточную гибель, не проявляющую признаков апоптоза и аутофагии. Нерегулируемый некроз индуцируется воздействиями, значительно превышающими адаптационные возможности клеток. Для данного процесса характерно нарушение целостности клеточной мембраны, набухание органелл и цитоплазмы в целом, а также пикноз, кариорексис и кариолизис [95]. Часто некротические клетки подвергаются лизису со стороны протеолитических ферментов. Это приводит к конденсации хроматина, процессам деградации цитоплазматических компонентов, разрушению мембран и гибели клетки [90,95].

Некроптоз представляет собой форму РКС, протекающую с морфологическими признаками характерными некрозу, однако в отличие от последнего, индуцируется нарушениями внутриклеточного и внеклеточного микроокружения посредством специфичных рецепторов. Некроптоз инициируется рецепторами смерти FAS, TNFR1 или рецепторами, распознающими патогены (pathogen recognition receptors, PRRs) - TLR3, TLR4 (Toll-like receptor [92]).

Инициализация некроптоза в настоящее время связывают со взаимодействием специфического лиганда с TNFR1. Взаимодействие TNF с данным рецептором, приводит к образованию комплекса белков, включающего TNFR-ассоциированный домен гибели, белок клеточного ингибитора апоптоза (cellular inhibitor of apoptosis protein 1, CIAP), CYLD и RIP1 (ribosome inactivating proteins) [92]. Дальнейший молекулярный клеточный путь развивается по одному из двух сценариев. Первый вариант включает образование комплекса, включающего RIP1, FADD (Fas-associated protein with death domain) и каспазу-8. При отсутствии действия ингибиторов, к примеру zVAD, активируется клеточный апоптоз. Во втором случае происходит полиубиквитинирование RIP1, в результате

взаимодействия с CIAP. Результатом служит индукция ядерного фактора NF-κB и образование фактора, включающего MLKL, RIP3, RIP1, FADD, каспазу-8. Данный сценарий возможен только при дезактивации Nec-1, ингибитора RIP1. Последующее ингибирование каспазы-8 со стороны zVAD, приводит к образованию некрозом. Некросомы включаются комплексы белков MLKL, RIP3 и по структуре похожи на микрофиламенты. Согласно современным представлениям, некростома участвует в процессах респираторного взрыва, генерации АФК, увеличении проницаемости лизосомальных мембран, что приводит к повреждению органелл и клеточной гибели. В данном случае, в отличие от апоптоза, не происходит фрагментации ДНК, а сам процесс вызывает воспалительную реакцию организма.

Считается, что в случае идентификации процессов, лежащих в основе порообразования со стороны белков MLKL, возможно создание препаратов блокирующих некроптоз. Это необходимо для элиминации воспалительных процессов, сопровождающих заболевания (атеросклероз, панкреатит, нейродегенеративные заболевания, инсульт, инфаркт миокарда) [92].

Таким образом, некроптоз представляет собой форму РКС морфологически схожую с некрозом. Это проявляется в нарушении целостности мембран и высвобождении клеточных компонентов, грануляции цитоплазмы, набуханию клетки и органелл. Некроптоз индуцируется рецепторами смерти или PRRs. Некроптоз зависим от RIPK1 и/или RIPK3, MLKL и ингибируется действием каспаз. Некроптоз сопровождается митохондриальной дисфункцией, оксидативным стрессом, перегрузкой цитоплазмы Ca^{2+} и истощением АТФ [95].

Термин **ферроптоз** введен в 2012 году [95] для описания железозависимой гибели раковых клеток под действием эрастина – одного из Ras-селективных летальных соединений (Ras-selective lethal compound (RLS)). Изначально предполагалось, что ферроптоз характерен только для клеток, несущих онкоген Ras. В настоящее время, известно, что ферроптоз также встречается в обычных нетрансформированных клетках организма [95].

Ферроптоз инициируется независимо от каспаз, молекулярных механизмов аутофагии и некрсомных компонентов. Индукция ферроптоза может происходить посредством различных RLS [95]. Одним из известных путей инициации ферроптоза является ингибирование работы цистеин-глутаматного антипортера под действием эрастина. Это приводит к затормаживанию обмена внеклеточного L-цистеина на внутриклеточный L-глутамат. Результатом служит резкое снижение внутриклеточного цистеина и приводит к недостатку глутатиона, синтезируемого из цистеина. Отсутствие глутатиона приводит к гибели клетки [90].

Ферроптоз является каспазо-независимым процессом, а также морфологически и биохимически отличается от апоптоза, некроза и аутофагии. Ферроптоз не связан с конденсацией хроматина или образованием цитоплазматических вакуолей. Течение ферроптоза характеризуется снижением количества митохондрий, изменением их структуры (разрушение и/или уплотнение крист, разрыв внешней мембраны, сморщивание). Ферроптоз также сопровождается высвобождением иммуностимулирующих молекулярными паттернов, связанными с повреждениями (damage-associated molecular patterns, DAMP или алармины) [90]. Ферроптоз не подвержен влиянию соединений ингибирующих апоптоз (ингибиторы каспаз), аутофагию (ингибиторы лизосом) и некроз (ингибиторы катепсина). При этом ферроптоз может быть ингибирован под действием хелаторов железа, ингибиторов перекисного окисления липидов и антиоксидантов [95]. Индукция ферроптоза связана, предположительно, с канцерогенными процессами, вызванными нарушением работы p53, а также при аминокислотном голодании (при недостатке глутамина) и трансферрина. В то же время известны агенты ингибирующие ферроптоз – ферростатины и липроксстатины.

Таким образом, ферроптоз представляет собой форму РКС, индуцируемую нарушением внутриклеточных структур окислительными процессами, в частности интенсивным процессом перекисного окисления липидов, зависящего от железозависимой генерации АФК [90]. Ферроптоз вовлечен в различные патофизиологические процессы в организме человека – атеросклероз, диабет,

опухолевые и нейродегенеративные заболевания, а также гепатотоксический эффект лекарственных препаратов [90,95]. Модуляторы клеточных сигнальных путей, регулирующие течение ферроптоза, являются перспективными молекулярными мишенями для терапии.

Пироптоз – форма РКС, индуцированная нарушениями внутриклеточного и внеклеточного гомеостаза, а также связанная с врождённым иммунитетом. Как правило, пироптоз является противовоспалительным типом гибели лейкоцитов (в основном моноцитов, макрофагов). Пироптоз может быть индуцирован действием микробных инфекционных агентов, а также неинфекционными стимулами – DAMP, инсультом, инфарктом миокарда и опухолевыми процессами [95]. Пироптоз индуцируется при активации провоспалительных каспаз мультибелковыми сигнальными комплексами, называемыми инфламмасомами, называемыми также пироптосомами [90,95].

Один из видов инфламмасом состоит из членом семейства цитозольных под-подобных рецепторов (Nod-like-receptor, NLR). NLR функционируют схоже с Toll-подобными (Toll-like receptors, TLR) рецепторами плазматической мембраны и действуют как внутриклеточные рецепторы распознавания антигенов [90,95].

Проникновение в цитоплазму клеток бактериальных агентов, к примеру флагеллина, способного связываться с рецептором TLR5, приводит к выработке провоспалительных цитокинов. TLRs представлены большим разнообразием белковых рецепторов к антигенам, среди которых NLRP1, NLRP2, NLRP3 и NLRC4, которые участвуют в формировании инфламмасом. Инфламмасы являются белковыми комплексами, индуцирующими сборку каспазы-1. Активная форма каспазы-1 инициирует расщепление ингибитора белка GSDMD (Гасдермин D). На следующем этапе фрагмент белка GSDMD (GSDMD-N) встраивается в мембрану и приводит к образованию пор в плазматической мембране, что приводит к осмотическому набуханию и лизису клетки. В то же время происходит фрагментация ДНК под действием эндонуклеаз. Гибель клетки приводит к освобождению цитокинов в окологклеточное пространство, что приводит к активации иммунных клеток (макрофагов, Т-лимфоцитов, NK-клеток). Таким

образом, происходит аттракция лейкоцитов к месту проникновения инфекционных агентов [90,92,95].

Морфологические изменения в ходе гибели клеток путем пироптоза связаны с образованием в плазматической мембране и её разрывом. В то же время процессы деградации митохондрий протекают медленно [95].

Инфламмасомы являются важным компонентом борьбы с инфекционными агентами [95]. Пироптоз вызывает гибель микроорганизмов, попадающих в цитозоль, посредством высвобождения интерлейкина-1 из инфламмасом. Активация инфламмасом (пироптосом) и последующая секреция цитокинов, приводят к ограничению пролиферации патогенов внутри инфицированных клеток. В то же время пироптоз является причиной воспалительных реакций в организме [90,95], а также фиброза печени, инфаркта миокарда и болезни Альцгеймера [95].

Важной характеристикой пироптоза является его зависимость от каспазы 1. Каспаза 1 способна активировать и инициировать высвобождение интерлейкина 1 β и интерлейкина 8, инициируя процессы воспаления. Каспаза 1 не задействована в апоптотической гибели клеток, при этом проапоптотические каспазы не задействуются в процессах пироптоза [95].

Таким образом, пироптоз является каспазозависимой формой РКС, с отличными от процессов апоптоза, некроза и аутофагии, путями клеточной регуляции и сопутствующими морфологическими признаками. Пироптоз подобно некрозу, и в отличие от апоптоза и аутофагии, сопровождается высвобождением содержимого цитозоля во внеклеточное пространство (к примеру DAMP).

Партатоз является разновидностью РКС, индуцированной гиперактивацией фермента PARP-1 (Poly (ADP-ribose) polymerase), с последующей энергетической катастрофой клетки, связанной с повреждением ДНК. Партанатоз не ингибируется антиапоптотическими факторами, к примеру под воздействием IAPs (Inhibitors of apoptosis proteins).

Разрывы нитей ДНК индуцируют активацию фермента PARP-1, что приводит к образованию полимера PAR (Poly-ADP-ribose). Обширная активация PARP-1 приводит к значительному увеличению формирования PAR, что ингибирует

протекающие в клетке биохимические процессы. Активация PARP-1 сопряжена с расходом НАД⁺. Так как НАД⁺ участвует в энергетическом обмене клетки (цикл Кребса, гликолиз), его истощение за счёт активации PARP-1 приводит к клеточной гибели. PAR, образующийся в основном в ядре, способен перемещаться в цитозоль и митохондрии клетки. В митохондриях PAR способен взаимодействовать с апоптоз инициирующим фактором (AIF). Последующая транслокация AIF в ядро, индуцирует конденсацию хроматина и активирует эндонуклеазы, фрагментирующие ДНК, что в совокупности приводит к клеточной гибели. Партанатоз встречается в патологических случаях при инсульте, гипоксии, воспалении, оксидативном стрессе, нейродегенеративных заболеваниях.

Согласно NCCD [90], данная форма РКС, зависящая от PARP-1 и не связанная с активностью каспаз, имеет несколько характеристик, отличающих её от других форм РКС. Партанатоз связан с быстрой и избыточной активацией PARP1, что приводит к его накоплению. PARP1 обнаруживается в ядре клетки и вовлечен в процессы репарации ДНК и механизмы геномной стабильности. Партанатоз также связан с перемещением апоптоз индуцирующего фактора (apoptosis-inducing factor, AIF) из митохондрий в цитозоль и ядро. Данная транслокация AIF связана с процессами повреждения митохондрий под действием интенсивного геномного стресса, что способно запустить апоптотические изменения в клетке. Это может сопровождаться фрагментацией ДНК и конденсацией хроматина, а также деполяризацией митохондрий. При высоком уровне оксидативного стресса высокое содержание PARP1 способно переключить механизмы клеточной гибели с апоптоза на регулируемый некроз в ходе партанатоза. Данный процесс связывают с истощением НАД и АТФ в клетке, под действием PARP1. В настоящее время, ингибиторы PARP рассматриваются как средства по борьбе с неврологическими расстройствами и легочных заболеваний [95].

Энтоз является видом клеточной гибели, при которой жизнеспособные клетки поглощаются другими клетками, не проявляющими фагоцитарной активности [90]. Энтоз впервые описан для описания процессов интернализации клетки в цитоплазму другой клетки, с образованием структуры «клетка в клетке»

(cell-in-cell structures, CICS) [95]. Образование CISC индуцируется потерей физического контакта клетки с внеклеточным матриксом. Неприкрепленная клетка способна интернализироваться в клетку-хозяина и подвергаться неапоптотической форме клеточной гибели, под действием лизосомальных ферментов [95]. Энтоз также называют «клеточным каннибализмом». Энтоз может протекать в здоровых и опухолевых тканях, а также между клетками одной или разных гистологических принадлежностей (гомологический и гетерологический энтоз, соответственно). Течение энтоза не всегда оканчивается гибелью интернализированной (энтотической) клетки, вследствие чего она возвращается в межклеточное пространство [90].

Энтоз индуцируется при разрыве интегриновых связей у эпителиальных клеток с внеклеточным матриксом. Это приводит к перестройке цитоскелета (изменения миозиновых белков) и позволяет клетке перемещаться в межклеточном пространстве. Энтотическая клетка использует актин-миозиновый комплекс для интернализации в другую клетку. При этом данный процесс отличен от фагоцитоза. Клетки формируют химические связи на основе интегринов, после чего происходит инициация лизосомальных ферментов и, в большинстве случаев, энтотическая клетка погибает [90,92].

Также индукцию энтоза связывают с нарушением экспрессии миозинов при формировании межклеточных контактов и метаболическим стрессом опухолевых клеток, конкурирующих за пролиферацию. Дополнительно, в раковых клетках может протекать специфическая форма энтоза во время митоза (энтотический митоз). Данный процесс происходит вследствие аберрантного митотического округления и снижения клеточной адгезии. Это позволяет пролиферировать энтотическим клеткам в клетках-хозяевах [90].

Энтотические клетки обнаруживаются в опухолях человека, что предположительно связывает их с онкосупрессорными механизмами. Ингибирование энтоза приводит к росту опухолевых клеток без прикрепления к внеклеточному матриксу и соседним клеткам, что существенно влияет на их онкогенность [96]. В то же время, течение энтоза в тканях может способствовать

полиплоидизации и анеуплоидизации, что приводит к индукции образования опухоли. Предположительно энтоз участвует в регуляции тканевого гомеостаза [92]. Согласно рекомендациям NCCD, ввиду невозможности точной идентификации судьбы энтотических клеток, принято использовать термин «энтоз» только для обозначения процесса интернализации клеток [90].

В отличие от апоптоза энтоз протекает независимо от каспаз, но в тоже время зависим от трансмембранных белковых комплексов, обеспечивающих взаимодействие между клетками, белков, регулирующих внутриклеточную динамику актина, а также актинмиозин-зависимых механизмов, задействованных в процессах энтотической интернализации [95].

Нетоз – специфичная форма клеточной смерти, характерная для нейтрофилов и сопровождающаяся выбросом деконденсированного хроматина и гистонсодержащих волокон, а также связанных с ними гранулярных и цитоплазматических белков [95]. Данные компоненты образуют сложную сеть нейтрофильных внеклеточных ловушек (neutrophil extracellular traps, NET). Нетоз, индуцируемый в ответ на воздействие инфекционных агентов, либо при активации специфических рецепторов (в основном TLR), представляет собой механизм создания структур для захвата, иммобилизации и деградации микроорганизмов [90]. NET, попавшие в результате нетоза в межклеточное пространство, задерживают и уничтожают микроорганизмы, посредством пептидов из гранул нейтрофилов. Нетоз обнаружен у нейтрофилов, базофилов, макрофагов, тучных клеток и эозинофилов [90,95]. Нетоз не всегда заканчивается клеточной гибелью – при сборке NET из митохондриальной ДНК жизнеспособность нейтрофилов и эозинофилов сохраняется [90].

Являясь нефагоцитарным механизмом внеклеточной борьбы с бактериальными агентами, нетоз имеет важную роль для распознавания очагов инфекции. Нетоз задействован в механизмах элиминации грамотрицательных и грамположительных бактерий, грибов, внутриклеточных паразитов. После воздействия со стороны NET, инфекционные агенты подвергаются фагоцитозу со

стороны макрофагов [90,95]. Ингибирование способности клеток к формированию NET, приводит к сепсису и развитию инфекционных заболеваний [92].

Согласно NCCD, нетоз является разновидностью АФК-зависимой РКС, нечувствительной к действию некростатина и ингибированию каспазами, происходящей в клетках гемопоэтического происхождения и связанную с выбросом NET [90]. Данная форма РКС, способна индуцироваться зависимыми и независимыми от АФК клеточными сигнальными путями, при этом тонкие механизмы течения нетоза изучены не в полной мере [95].

Лизосомально-зависимая клеточная гибель является одной из разновидностей РКС, индуцируемой в результате повышения проницаемости лизосомальных мембран. Данный процесс приводит к лизосомальной утечке протеолитических ферментов (катепсинов) в цитоплазму и последующим повреждениям органелл. Это может привести к инициации каспаз и пермеабилзации внешней митохондриальной мембраны (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP) [90].

Механизмы повышения проницаемости лизосомальных мембран в настоящее время изучены недостаточно подробно, однако значительный вклад в данный процесс, предположительно, связан с оксидативным стрессом [92].

На биохимическом уровне индукцию лизосомально-зависимой клеточной гибели связывают с пермеабиллизацией лизосомальных мембран (lysosomal membrane permeabilization, LMP). LMP инициируется при активации лизосомальных Ca^{2+} -каналов под действием АФК - к примеру в результате реакций Фентона и при перекисном окислении липидов. Также дестабилизацию лизосомальных мембран связывают с порообразованием, под действием апоптотического белка BAX. Однако, в некоторых случаях, LMP рассматривают как следствие MOMP в клетке, инициированное апоптотическими сигнальными путями. Это позволяет отчасти охарактеризовать LMP как один из механизмов внутреннего апоптоза. LMP регистрируется в клетках при воздействии проапоптотических факторов, к примеру лизосомотропных агентов и вирусной инфекции [90,92].

Утечка катепсинов в цитозоль, вызванная LMP, воздействует на белки BID, BAX, антиапоптотические белки семейства Bcl-2, задействуя каскад клеточных реакций с участием каспаз и МОМР. Лизосомная дисфункция, индуцированная LMP, негативно воздействует на состояние митохондрий, ввиду нарушения митофагических реакций, ответственных за процессы деградации повреждённых митохондрий. Лизосомально-зависимая клеточная гибель не всегда связана с МОМР и активацией каспаз, а также может не проявлять признаки апоптотического морфотипа [90,92].

Гибель клеток может быть замедлена при ингибировании LMP или блокировании активности катепсина (к примеру ингибиторами протеазы) с помощью генетических или фармакологических средств. Также лизосомальные мембраны могут быть стабилизированы при изменении содержания лизосомального холестерина или при повышении эндогенной активности белков теплового шока (Hsp70) [90]. В то же время, опухолевые клетки могут проявлять повышенную чувствительность к лизосомотропным агентам и уязвимость к LMP, что может быть использовано для разработки противораковых препаратов, индуцирующих LMP [90].

Аутофагия – форма РКС, характеризующаяся деградацией органелл и прочего содержимого цитоплазмы, протекающая при активном участии аутофагосом и лизосом. Аутофагия может быть индуцирована повреждением генетического аппарата, ионизирующим излучением, воздействием АФК и прочими факторами [92]. Помимо этого, аутофагия является естественным механизмом катаболизма, позволяющим клетке перерабатывать как отдельные клеточные компоненты, так и подвергаться элиминации целиком в нормальных условиях [95]. Внутриклеточные компоненты, такие как белки и органеллы, изолируются в специализированных двухмембранных везикулах – аутофагосомах. Аутофагосомы сливаются с лизосомами, что приводит к расщеплению содержимого лизосомальными гидролазами, используемого в последствии в качестве материала для синтеза нового клеточного содержимого, либо удовлетворения энергетических потребностей [95].

Выделяют три формы аутофагии: макроаутофагия, микроаутофагия и шаперон-опосредованная аутофагия [92]. Макроаутофагия является процессом, при котором происходит элиминация поврежденных органелл и белковых компонентов. Регуляция макроаутофагии осуществляется посредством протеинкиназы mTOR, контролирующей образование аутофагосом. mTOR играет важную роль в контроле процессов трансляции и регуляции клеточного цикла, а также ингибирует аутофагию [95]. В условиях *in vitro*, богатых питательными веществами, mTOR подавляет образование аутофагосом. При снижении активности mTOR, активируется мультипротеиновый комплекс (PI3K, Vps34, Beclin 1, Ambra 1), который посредством Vps34 инициирует сборку аутофаговых комплексов (ATG5, ATG7, ATG12), участвующих в распознавании и упаковке в аутофагосомы клеточного материала, подлежащего переработке. Данный комплекс может быть ингибирован Bcl-2. Важное значение имеют белки семейства ATG (autophagosome-related proteins, ATG), участвующие в процессах инициации аутофагических процессов, а также формирования и созревания аутофагосом [95]. Связанный с микротрубочками белок 1A / 1B легкой цепи 3B (LC3) является одним из ключевых компонентов регуляции аутофагии. В ходе аутофагии цитозольная форма LC3 (LC3-I) путем связывания с фосфатидилэтаноламином (PE) липидизируется до LC3-II, который переносится на мембрану аутофагосом. Содержание LC3 положительно коррелирует с количеством активных аутофагосом в клетке [97]. С использованием методов иммуноблоттинга и иммунофлуоресценции LC3 применяется для оценки интенсивности протекания аутофагических процессов [95]. Внутри аутофагосом клеточные компоненты расщепляются под действием гидролаз. В случае, если уровень клеточного стресса является критическим, что вызывает обширную индукцию аутофагии, клетка способна полностью расщепить содержимое цитозоля, что приведет к клеточной смерти [90]. Микроаутофагия характеризуется процессами захвата клеточного материала из цитоплазмы в лизосомы путем инвагинации. При данном процессе клетка сохраняет жизнеспособность [92]. Третья разновидность аутофагии - шаперон-опосредованная аутофагия, связана с процессами распознавания

повреждённых белков цитоплазмы со стороны белков-шаперонов. При этом осуществляется выборочный транспорт белков к лизосомальным мембранам, их взаимодействие с трансмембранными протеинами лизосом, также последующее погружение и расщепление внутри лизосом. Шаперон-опосредованная аутофагия не характеризуется массовым поглощением клеточных органелл и направлена на избирательную элиминацию поврежденных белков, через распознавание комплексов содержащих белок Hsc70 [92].

Аутофагия занимает важную роль в ходе эмбриогенеза, процессах переработки клеток и их органелл. Ингибирование аутофагии в ходе эмбрионального развития стимулирует формирование пороков развития, вплоть до потери организмом жизнеспособности [92]. Процессы аутофагии позволяют клеткам восстановить запас питательных веществ и энергии (например, при длительном голодании), что позволяет восстановить клеточный гомеостаз. При уровне стресса, превышающего адаптационные возможности клетки, аутофагия приводит к гибели. Согласно NCCD, применение термина «аутофагия» в контексте клеточной смерти, рекомендуется только в случаях описания процессов, заканчивающихся клеточной гибелью и задействующих аутофагические механизмы клетки (а не всех типов компенсаторно-адаптивных изменений в клетках в ответ на стресс) [90].

Известно, что аутофагия является одним из механизмов выживания клеток и поддержания клеточного гомеостаза. При этом, не до конца ясна роль аутофагии в механизмах регуляции клеточной смерти - аутофагические процессы могут служить причиной РКС, либо наоборот, выступать адаптационным механизмом предотвращения клеточной гибели [95]. Согласно литературным источникам, в одних случаях аутофагия поддерживает гомеостаз клетки, при этом в других способствует клеточной гибели [95]. Важно отметить, что аутофагическая гибель клеток обнаруживается только в случае отсутствия или ингибирования апоптотических сигнальных путей [95]. Понимание взаимодействия механизмов аутофагии и процессов РКС, позволит разработать новые методы борьбы с заболеваниями человека. К примеру, ингибитор mTOR рапамицин, способен

индуцировать аутофагию у клеток даже находящихся в богатой питательными веществами среде [95]. В то же время, применение терапевтических препаратов, может сопровождаться аутофагической вакуолизацией печени и скелетных мышц человека [95].

Иммуногенная клеточная смерть представляет собой тип РКС, индуцируемой эндогенными (клеточными) и экзогенными (вирусными) антигенами, приводящей к инициации иммунной (воспалительной) реакции. Иммунный ответ индуцируется высвобождением клетками молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждениями (DAMP). Известно шесть видов DAMP, способных иницировать иммунологически-опосредованную клеточную смерть: аннексин A1, внеклеточный АТФ, амфотерин, кальретикулин, интерферон 1 и нуклеиновые кислоты раковых клеток. Данные агенты индуцируют внутриклеточные механизмы, приводящие к экспрессии на поверхности клеток маркеров, обеспечивающих распознавание и элиминацию клеток, со стороны иммунной системы (макрофагов и дендритных клеток). Распознавание DAMP со стороны рецепторов, распознающих патогены, приводит к возникновению иммунного ответа, обычно связанного с формированием иммунологической памяти. Иммуногенная клеточная смерть также может быть индуцирована химическими препаратами и ионизирующим излучением. Иммуногенность данной формы РКС подавляется действием некоторых каспаз. К примеру, каспаза 8 способна ингибировать некроптоз, который в свою очередь сопровождается выраженной иммунной реакцией. Каспаза 3 воздействует на процессы экстернализации фосфатидилсерина, обеспечивающих элиминации погибающих и мертвых клеток путем фагоцитоза со стороны иммунных клеток [90]. Это позволяет предположить, что специфические ингибиторы каспаз могут использоваться для изменения уровня иммуногенной реакции со стороны РКС. Согласно NCCD, иммуногенная клеточная смерть является формой РКС, сопровождающаяся выраженным иммунным ответом [90].

Также отдельно выделяют клеточные процессы, вовлеченные в механизмы клеточной гибели, такие как клеточное старение, митотическая катастрофа и терминальная дифференцировка.

Клеточное старение является патофизиологическим процессом, сопровождающимся утратой клетками пролиферативной активности, но сохранении жизнеспособности и метаболической активности. Стареющие клетки характеризуются морфологическими изменениями – уплощением и изменением размеров, вакуолизацией, изменением структуры хроматина. Индуцией процессов клеточного старения выступает как естественное старение организма, так и воздействие патогенов и химических препаратов. Также процессы старения клеток запускаются повреждениями ДНК, митохондриальной дисфункцией, инактивацией генов-онкосупрессоров, ингибированием и нарушением процессов репликации ДНК, а также механическими, лизосомальными, окислительными и прочими воздействиями [90]. Клеточное старение рассматривается как переход от нормального физиологического состояния к одному из вариантов клеточной гибели. Стареющие клетки накапливаются всё более интенсивно с повышением возраста организма, а также ввиду неэффективности процессов обновления тканей [90]. Таким образом, клеточное старение вовлечено в процессы естественного старения организма, сокращения продолжительности жизни, снижения функциональности тканей, этиологии возрастных заболеваний (к примеру атеросклероз, остеоартрит), онкогенеза. Поэтому ингибирование процессов клеточного старения рассматривается как перспективная терапевтическая мишень для повышения уровня жизни человека.

Митотическая катастрофа представляет собой адаптивный онкосупрессивный механизм, ингибирующий пролиферацию и выживание клеток, не способных завершить митоз. Митотическая катастрофа характеризуется морфологическими изменениями клеточного ядра (например, многоядерностью, макронуклеацией, микроядерностью). К митотической катастрофе может привести воздействие экзогенных и эндогенных факторов, приводящих к нарушению репликации ДНК, влияющих на динамику микротрубочек, нарушения сегрегации

хромосом, индукции аберрантной ploидности, обширного повреждения генетического аппарата клетки и прочих процессов нарушения течения митоза. В ходе митоза выделяют контрольные точки – моменты, в которые осуществляется контроль молекулярных механизмов над течением программы клеточного деления. В случае нарушения митоза клетки погибают путём некроза или апоптоза. Нарушение регуляции молекулярных механизмов, ответственных за реализацию митотической катастрофы, может привести к формированию полиплоидных и анеуплоидных клеток. Это может привести к нарушению систем контроля пролиферации и ингибированию механизмов клеточной гибели. Избегание клеток от митотической катастрофы является одним из основных механизмов прогрессии опухолей [90].

Механизмы регуляции процессов ПКС, могут быть задействованы в дифференцировке различных типов клеток (гранулоцитов, нейронов, мегакариоцитов, остеокластов, сперматозоидов и др.). Данные процессы могут являться одним из этапов **терминальной дифференцировки** - механизма, в результате которого клетка покидает либо приостанавливает клеточный цикл, становится невосприимчива к пролиферативным сигналам и приобретает специфичные клеточные функции [98]. Терминальная дифференцировка как правило индуцируется путем реализации генетической программы клетки в ходе цитогенеза и гистогенеза. NCDD рекомендует различать понятия ПКС и случаев терминальной дифференцировки, приводящих к клеточной гибели. В случае ПКС клетки утрачивают жизнеспособность и перестают выполнять свою метаболическую функцию. В тоже время, когда ПКС является частью терминальной дифференцировки, мертвые клетки могут служить функциональной частью ткани. Примером подобного процесса является корнификация – каспаз-зависимая разновидность клеточной смерти, характерная для кератиноцитов и являющаяся одним из этапов их терминальной дифференцировки. Результатом корнификации является формирование рогового слоя, состоящего из погибших кератиноцитов. Предположительно, одновременно с течением корнификации в клетках происходит индукция апоптотических процессов [92]. При воздействии на

клетки УФ-излучения, инициализируются процессы повреждения ДНК и органелл, что может привести к индукции апоптоза. Повреждение митохондриальных мембран и последующее высвобождение цитохрома-С инициализирует активацию каспаз. Повреждения ДНК индуцируют повышения уровня p53, что также активирует механизмы апоптоза. При этом, погибшие клетки не могут быть утилизированы с помощью фагоцитоза, если локализованы в тканях не содержащих сосудов (к примеру, в роговом слое).

1.3. Взаимосвязь форм регулируемой клеточной смерти

Развитие методов визуализации внутриклеточных процессов, получение специфичных фармакологических ингибиторов и совершенствование методов исследования биологических систем в целом, позволило расширить понимание механизмов клеточной гибели [94]. Исследования привели к открытию новых форм РКС у различных типов клеток под действием естественных и искусственных факторов различной природы. Это изменило устоявшиеся представления о клеточной смерти. При этом, особое внимание уделяется РКС, обладающей важной ролью в процессах развития и роста организма, поддержании гомеостаза, процессах воспаления, иммунных реакциях и патофизиологических состояниях. С другой стороны, нарушения протекания РКС связаны с патологиями, обусловленными неконтролируемой пролиферацией клеток – раком и аутоиммунными заболеваниями. Поэтому механизмы РКС, являются перспективной терапевтической мишенью для лечения заболеваний человека [90]. При этом, терапевтические стратегии, направленные на индукцию клеточных процессов, направленных на развитие необходимой формы РКС, рассматриваются как более перспективные, нежели методики направленные на ингибирование отдельных клеточных процессов, связанных с РКС [90]. Данная особенность связана с необходимостью ингибирования всех клеточных сигнальных путей, индуцирующих нежелательную форму РКС. Важно отметить, что характер ответа отдельной клетки на стрессовые факторы, может иметь большое значение на форму воздействия РКС на местное и системное микроокружение. Это создаёт

возможности, для создания терапевтических методов, направленных на переключение формы РКС в клетках-мишенях, а не только на увеличение или уменьшение интенсивности протекания процессов клеточной гибели [90].

Различные формы клеточной гибели долгое время изучались обособленно друг от друга. Данный подход был связан со сложившимися представлениями о вариантах клеточной смерти, как об взаимоисключающих процессах. В то же время, современные данные свидетельствуют, что различные формы РКС регулируются схожими клеточными сигнальными путями, а также могут задействовать общие инициаторные и эффекторные молекулы [94]. Задачи, стоящие перед научным сообществом, связаны с интерпретацией полученных данных, поиском взаимосвязи между различными формами РКС, а также патологическими состояниями.

Изменения в механизмах РКС у раковых клеток, обеспечивающие их неограниченную пролиферацию или блокирующие пути клеточной гибели, являются перспективными мишенями для разработки противоопухолевых агентов [91,99]. Часто раковые клетки обладают устойчивостью к апоптозу, ввиду высокого уровня экспрессии противоапоптотических белков. Это приводит к образованию опухолей и выживанию раковых клеток в условиях, при которых здоровые клетки организма были бы элиминированы механизмами РКС [99]. Подобная устойчивость опухолевых клеток объясняет неэффективность противораковых методик, основанных на индукции апоптотических механизмов. Перспективной стратегией для терапии может послужить нарушение либо обход механизмов, обуславливающих устойчивость к апоптозу. Однако, ввиду сложности и взаимосвязи клеточных сигнальных путей, ответственных за механизмы апоптоза и других форм РКС, необходимо глубокое понимание лежащих в основе данных процессов механизмов. Управляемая индукция неапоптотических форм РКС, таких как некроптоз и аутофагия, также несет высокий потенциал для разработки противораковых методик [99].

1.4 Механизмы индукции клеточной смерти наночастицами оксидов железа (НЧОЖ)

Одним из перспективных подходов является использование НЧОЖ для индукции механизмов клеточной смерти. НЧОЖ способны индуцировать различные процессы РКС в опухолевых клетках посредством цитотоксических эффектов. Ранее данный эффект рассматривался лишь как побочный эффект биомедицинского применения НЧОЖ [99]. Потенциал НЧОЖ к индукции РКС усиливается при совмещении с химиотерапией, радиотерапией, иммунотерапией и фототермическим воздействием [99]. Таким образом, использование нескольких факторов воздействия на опухолевые клетки дополняет воздействие НЧОЖ и помимо усиления эффекта способно индуцировать прочие механизмы РКС. Действие EPR-эффекта, либо приложение внешних магнитных полей для направленной локализации НЧОЖ в опухоли, способны повысить избирательность действия на целевые клетки и снизить потенциальные побочные эффекты на здоровые ткани [99].

НЧОЖ способны индуцировать некроптоз в клетках. При этом основной известный механизм индукции связан с генерацией АФК, нарушением митохондриального трансмембранного потенциала, повреждением ДНК и в конечном итоге приводит к некроптозу. Другой механизм связывают с нарушением структуры лизосом и утечкой содержимого в цитозоль. При этом, систематизация литературных данных о некротической гибели клеток, индуцированной НЧОЖ, затруднена. Это связано со сложностями в идентификации конкретных процессов, индуцирующих тип клеточной смерти [99].

Размер НЧОЖ обуславливает характер клеточного ответа - при сохранении прочих параметров, НЧОЖ различного размера индуцируют апоптотические или некроптотические процессы, а также ферроптоз [100]. Это связано, предположительно, с различной интенсивностью интернализации и отличиями во внутриклеточной локализации НЧОЖ [100] в клеточных компартментах. К примеру, интернализация НЧОЖ в митохондрии приводит к резкому повышению образования АФК и активации механизмов апоптоза и ферроптоза. При этом

НЧОЖ большего размера, локализованные в цитоплазме индуцируют некроптоз [100]. Согласно данным [101], НЧОЖ эффективно поглощаются фибробластами, макрофагами и опухолевыми клетками. При этом поверхностные характеристики НЧОЖ оказывают большое значение интенсивность поглощения и интернализации [101].

Образование АФК является основной причиной цитотоксичности НЧОЖ [102]. В естественных условиях АФК образуются в ходе частичного восстановления молекулярного кислорода (O_2), необходимого для функционирования всех аэробных организмов. Реакции четырех-электронного восстановления молекулярного кислорода являются ключевым этапом клеточного метаболизма. Течение данного процесса сопряжено с самопроизвольными реакциями неполного, одноэлектронного, двуэлектронного или трехэлектронного восстановления, что приводит к образованию АФК [103]. Типичными примерами АФК являются супероксидный радикал ($O_2^{\cdot-}$), гидроксильный радикал ($\cdot OH$), перекись водорода (H_2O_2) и продукты перекисного окисления липидов. АФК разделяют на две группы: $O_2^{\cdot-}$ и $\cdot OH$ относят к свободным кислородным радикалам (радикальным формам АФК), а H_2O_2 к нерадикальным формам АФК [103]. АФК в малых концентрациях являются частыми спутниками многих биохимических процессов. Поэтому организмами в ходе эволюции были выработаны стратегии контроля образования АФК. Ферментная система клеток, а также низкомолекулярные соединения, инактивируют либо ингибируют действие АФК в клетке (к примеру, посредством каталазы, супероксиддисмутазы или глутатионпероксидазы). $O_2^{\cdot-}$ может быть преобразован в H_2O_2 под действием супероксиддисмутазы. В последствии H_2O_2 благодаря действию каталазы превращается в воду. Однако, значительное увеличение содержания АФК в клетке, способно привести к индукции механизмов РКС [103].

Ввиду высокой метаболической, пероксисомной, митохондриальной и онкогенной активности, опухолевые клетки вырабатывают больше АФК, чем здоровые [103]. Низкие уровни АФК участвуют в регуляции клеточных циклов и даже способны индуцировать клеточную пролиферацию. С другой стороны,

высокие уровни АФК, свойственные опухолевым клеткам, повреждают их клеточные компоненты. Наиболее распространенной формой АФК в раковых клетках является H_2O_2 . По сравнению с другими формами АФК H_2O_2 обладает относительно высокой стабильностью и способна легко проникать через биологические мембраны путем диффузии. Также в присутствии железа H_2O_2 может трансформироваться в $\bullet\text{OH}$ в ходе реакций Фентона [103].

Железо является жизненно важным элементом, участвующим в процессах роста клеток, пролиферации и переноса кислорода. Транспорт железа в организме обеспечивает белок трансферрин, а естественным депо являются белки ферритин и гемосидерин. Гомеостаз железа предусматривает постоянное поддержание равновесия между поглощением, транспортом, хранением и использованием железа путем клеточных механизмов. Ввиду оксидантной активности избыточное количество железа сопряжено с опасностью токсических эффектов в биологических системах. Известно, что увеличение количества железа в организме связано с индукцией онкологических процессов в печени, служащей основным депо железа в организме. В других случаях, избыток железа может индуцировать образование АФК в раковых клетках при взаимодействии с H_2O_2 в ходе реакции Фентона. Образующийся в результате $\bullet\text{OH}$ способен взаимодействовать и окислять большинство органических молекул. При этом $\bullet\text{OH}$ окисляет окружающие биомолекулы, а не диффундирует подобно H_2O_2 . Типичными процессами в подобных случаях являются перекисное окисление липидов, окисление аминокислот в белках, повреждение ДНК. НЧОЖ способны индуцировать митохондриальный окислительный стресс в иммунных клетках и как результат подавлять иммунную функцию Т-лимфоцитов человека [102]. При этом нарушение структуры и функционирования митохондрий взаимосвязаны со снижением пролиферативной активности митоген-активированных клеток и нарушением продукции цитокинов [102]. Ввиду высокого уровня H_2O_2 и $\bullet\text{OH}$ в опухолевых клетках, разработка терапевтических агентов, индуцирующих образование АФК, создаёт предпосылки для получения эффективных инструментов противораковой терапии [103].

Благодаря физическим характеристикам (подглавы 4.13.1 и 4.13.2), в частности, нанометровым размерам и большой площади поверхности, НЧОЖ являются перспективными инструментами для направленной индукции образования АФК путем реакции Фентона. Также, НЧОЖ Fe_3O_4 и $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ способны взаимодействовать непосредственно с эндогенной H_2O_2 в кислой среде, с образованием $\bullet\text{OH}$.

Способность НЧОЖ образовывать АФК в биологических системах определяется их физико-химическими свойствами, включая размер, форму, химический состав и структуру поверхности. Направленная индукция АФК может использоваться для прямого разрушения раковых клеток, а также для усиления фототермической терапии и химиотерапии. В то же время, в случае низкого уровня эндогенной H_2O_2 в раковых клетках, введение экзогенной H_2O_2 в клетки, способно повысить эффективность терапии. К примеру, проведение внутривенных инъекций НЧОЖ и инъекций H_2O_2 в тело опухоли, способно привести почти к полному её ингибированию по прошествии 17 дней [103]. Однако, данный подход по активации механизмов РКС, путём индукции образования АФК характеризуется рядом трудностей. В случае низкой концентрации H_2O_2 в раковых клетках, требуется повышать концентрацию НЧОЖ для достижения цитотоксических эффектов [103]. Известны также формы аморфных НЧОЖ, эффективно высвобождающих железо в раковых клетках, но в тоже время обладающих низкой химической стабильностью, плохой селективностью действия и тенденцией к образованию агрегатов [103]. Ввиду описанных ограничений, необходимы исследования посвященные разработке НЧОЖ, обладающих высокой химической стабильностью, селективностью действия и активно индуцирующих образование АФК в биологических системах.

Данные ограничения могут быть преодолены в случае разработки противоопухолевых агентов на основе НЧОЖ, индуцирующих желаемую форму РКС, а не только обладающих высокой способностью к индукции АФК. Большое разнообразие потенциальных инструментов терапии и высокая вариативность биологических систем создают необходимость в исследовании и поиске

механизмов индукции РКС. Процессы, обусловленные взаимодействием наноматериалов, клеточных структур и внеклеточного микроокружения опухоли будут определять специфику индуцируемых клеточных процессов. При этом, систематизация знаний о взаимодействии различных НЧОЖ с клеточными структурами позволяет выявить основные закономерности между характеристиками применяемых наноматериалов и индуцируемыми клеточными процессами. С другой стороны, обнаруженные закономерности не являются всеобъемлющими и должны быть подтверждены экспериментальными данными в каждом отдельном случае - при изменении свойств НЧОЖ, выборе другого биологического объекта для манипуляций, либо изменения условий проведения терапии.

Воздействие НЧОЖ на клеточные структуры, как правило, начинается с взаимодействия с клеточными рецепторами и мембранами, и последующим поглощением наноматериалов клетками.

НЧОЖ способны проникнуть в клетку посредством различных механизмов – путем фагоцитоза, микропиноцитоза, клатрин-опосредованного эндоцитоза (КОЭ), кавеол-опосредованного эндоцитоза (КвОЭ), а также клатрин- и кавеолин-независимого эндоцитоза [74]. Также возможна интернализация за счёт электростатических сил, стерических взаимодействий и сил Ван-дер-Ваальса [79]. Согласно исследованиям [36], основным механизмом интернализации НЧОЖ в клетки служит эндоцитоз. Эндоцитоз представляет собой активный энергозависимый процесс, включающий в себя этапы заключения материала в эндосомы (эндоцитарный захват) и высвобождения из эндосом [104]. Поглощение путём эндоцитоза приводит к накоплению НЧОЖ в эндоцитарных везикулах. Интенсивность интернализации и характер течения эндоцитоза определяются типом клеток, концентрацией и физико-химическими характеристиками НЧОЖ, интенсивностью процессов опсонизации, диффузионными и прочими процессами [104]. Механизмы проникновения НЧОЖ в клетку зависят от её типа. К примеру, макрофаги, моноциты и нейтрофилы обладают значительно большей фагоцитарной активностью, по сравнению с фибробластами и эпителиальными

клетками. НЧОЖ крупных размеров (более 0.5 мкм) поглощаются специализированными фагоцитирующими клетками. НЧОЖ меньшего размера поглощаются посредством КОЭ, КвОЭ, микропиноцитозом и клатрин-/кавеолин-независимым эндоцитозом.

После эндоцитарного захвата НЧОЖ переносятся из эндоцитарных везикул в эндосомы, путем слияния данных клеточных компартментов. На следующем этапе эндосомы сливаются с лизосомами, либо с плазматической мембраной клетки. В случае слияния эндосом с лизосомами, НЧОЖ подвергаются воздействию посредством лизосомальных ферментов и способны структурно и функционально деградировать. В некоторых случаях НЧОЖ избегают лизосомальной деградации путём эндосомального ускользания [36] и попадают непосредственно в цитоплазму и органеллы. При этом НЧОЖ демонстрируют низкую химическую стабильность в кислой среде, свойственной для лизосомального содержимого. НЧОЖ, введенные в организм, вовлекаются в механизмы гомеостаза железа в организме. В случае внутривенного введения НЧОЖ способны сохраняться в организме в течение нескольких недель, при этом длительные процессы внутриклеточной деградации индуцируют нарушения клеточной сигнализации и РКС [36].

Согласно имеющимся данным, не смотря на различные характеристики НЧОЖ (размеры, состав и тип модификации поверхности) индуцируемые ими клеточные механизмы и каскады сигнальных путей опосредованы состоянием и функциональностью лизосом [36]. Данная связь обусловлена базовой функцией лизосом – обеспечивать расщепление и деградацию биомолекул, а также прочих материалов, поглощенных клеткой. Функциональность лизосом регулируется клеточными сигнальными путями и доступностью питательных веществ, однако сами лизосомы также являются регуляторами фундаментальных клеточных процессов. Лизосомы участвуют в распознавании питательных веществ, регуляции процессов транскрипции и клеточного гомеостаза, процессов секреции, клеточного роста, метаболизма и восстановления клеточной мембраны. Это меняет классические представления о лизосомах и по современным представлениям

делает их одними из важных регуляторов клеточного ответа и процессов РКС на воздействие со стороны НЧОЖ [36].

2. ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Объекты исследований

2.1.1 Клеточные культуры

В рамках данной работы для исследования взаимодействия наноматериалов с клеточными структурами в условиях *in vitro* было использовано 5 видов клеточных линий человека:

- в качестве модели здоровых клеток крови использовались мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови человека, выделенные методом градиентного центрифугирования из крови потенциально здоровых доноров (раздел 2.2.2).

- клеточная линия Т-клеточной лимфомы человека (Jurkat) была использована в качестве модели опухолевых клеток крови человека. Клеточная культура Jurkat была получена из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия).

- в качестве моделей опухолевых клеток печени человека использовались клеточные линии гепатокарциномы Huh7 (Японская Исследовательская Коллекция, JCRB, Япония), Alexander (PLC/PRF/5, Коллекция Американских Типовых Культур, ATCC, США) и HepG2 (Коллекция Американских Типовых Культур, ATCC, США).

2.1.2 Характеристика наночастиц, использованных в исследовании

Ключевая информация о НЧ, использованных в исследованиях приведена на рисунке 1. Первым объектом исследования послужили НЧОЖ на основе магнетита (Fe_3O_4 , НЧМ). НЧМ были синтезированы с использованием метода соосаждения [105,106]. Размерные характеристики НЧМ были изучены с использованием просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Среднее распределение НЧМ по размерам составило 9 ± 3 нм [106]. Гидродинамический размер НЧМ, измеренный с использованием метода фотонной корреляционной спектроскопии (PCS) составил от 17 до 71 нм [105]. Анализ магнитных характеристик НЧМ был проведен с использованием SQUID-магнитометра в магнитном поле до 5 Тл и температурном диапазоне 5-300 К. Полевая зависимость намагниченности НЧМ от

магнитного поля, измеренная при 300 К, показала почти безгистерезисное поведение с близкими к нулю значениями коэрцитивной силы и остаточной намагниченности. Таким образом, НЧМ продемонстрировали суперпарамагнитное поведение при комнатной температуре и обладали однодоменной структурой. Данные НЧМ использовались в последующих биологических экспериментах, в качестве модели нанометровых частиц оксидов железа, не модифицированных и не покрытых оболочками (раздел 3.1). Подробная информация о физических характеристиках НЧМ описана в статье автора диссертации [106] и соавторов научных работ [105].

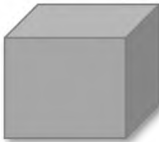
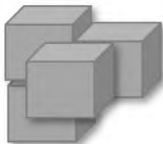
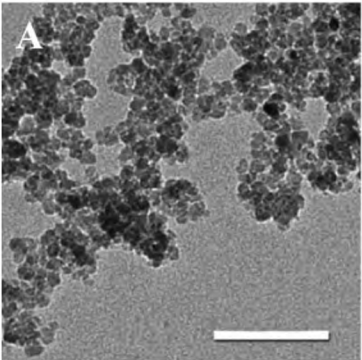
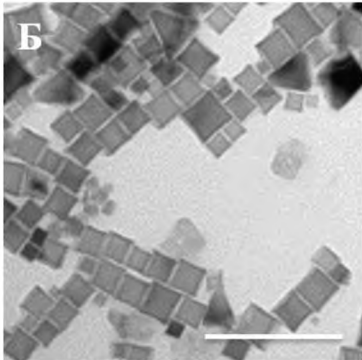
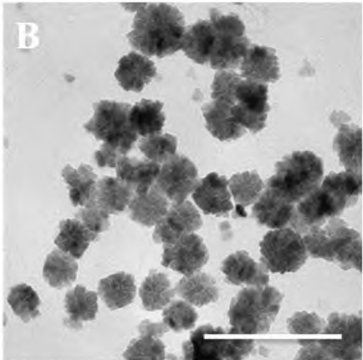
Название	Наночастицы магнетита (НЧМ)	Нанокубы (НК)	Нанокластеры (НКЛ)
Форма			
ПЭМ			
Размер	9 ± 3 нм	36 ± 8 нм	38 ± 10 нм
Состав	$\text{Fe}_3\text{O}_4 \cdot \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Fe_3O_4	Fe_3O_4
Описание	частицы околосферической формы	частицы кубической формы	кластеры частиц кубической формы
Покрывтие	отсутствует	нитродопамин-ПЭГ	нитродопамин-ПЭГ

Рисунок 1. Характеристика наночастиц, использованных в исследованиях. А, Б, В – изображения наночастиц магнетита, нанокубов и нанокластеров, соответственно, полученных с использованием просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Размер шкалы составляет 100 нм.

Следующими объектами исследования послужили НЧОЖ двух структурных форм: нанокубы (НК) и нанокластеры (НКЛ). Данные материалы были

синтезированы методом термического разложения [107]. Размерные характеристики НК и НКЛ были проанализированы с использованием просвечивающего электронного микроскопа (ПЭМ, рис. 1). Размеры полученных НЧ оказались схожи и составили 36 нм для НК и 38 нм для НКЛ. При этом, анализ с использованием динамического светорассеяния лазера в водной среде [107] показал равное значение гидродинамического размера для НК и НКЛ, составившее 140 нм. Анализ магнитных характеристик выявил аналогичные кривые намагничивания для НК и НКЛ. Анализ с использованием рентгеновской дифракции (XRD) был использован для подтверждения структуры и определения химической композиции НЧ (Fe_3O_4) [107]. В дальнейшем НК и НКЛ были модифицированы флуоресцентным красителем Cy5. Подробная информация о физико-химических характеристиках НЧ описана в статье автора диссертации [107].

2.2 Методы исследований

2.2.1 Культивирование клеточных культур

Манипуляции с клеточными культурами проводили в стерильных условиях с использованием бокса микробиологической безопасности (БМБ-II-«Ламинар-С»-1,5, NEOTERIC, Россия) согласно общепринятым методикам и протоколам [108–112]. Клеточные культуры культивировали в инкубаторе (New Brunswick Galaxy 170 S (Eppendorf, Германия)) в стабильных условиях при температуре 37 °C в увлажнённой атмосфере с содержанием 5% CO_2 . Для длительного хранения клеточных культур использовалась система хранения в жидком азоте ThermoScientific Locator JR Plus (Thermo Fisher Scientific, Германия).

Исследование клеточной морфологии вне и в ходе экспериментов проводилось с использованием инвертированного светового микроскопа (Olympus CKX53, Olympus, Япония). Центрифугирование клеток в ходе пассажирования и экспериментов осуществлялось с использованием центрифуги (Eppendorf Centrifuge 5702, Eppendorf, США).

Для контроля клеточной жизнеспособности в ходе экспериментов использовалась автоматическая система для подсчёта клеток Countess Automated Cell Counter (Countess II FL, Thermo Fisher Scientific, Сингапур). Окрашивание клеток проводилось с использованием красителя трипановый синий (Trypan blue stain 0.4%, Invitrogen, США). Для этого отбиралось 10 мкл клеточной суспензии и смешивалось с трипановым синим в пропорции 1:1. Затем 10 мкл от полученной смеси переносилось в лунку одноразового слайда счётчика клеток (Invitrogen, США). После этого осуществлялся подсчёт количества клеток в суспензии и определение клеточной жизнеспособности с использованием автоматического счётчика клеток, согласно протоколам производителя [113]. На следующем этапе, осуществлялся подсчёт требуемой пропорции для разведения клеточной суспензии питательной средой, необходимой для получения концентрации клеток, согласно протоколам эксперимента (разделы 2.2.3, 2.2.4) [109–112,114].

Для культивирования клеточной культуры Jurkat и МНК использовалась питательная среда RPMI-1640 (Gibco, Великобритания), содержащая 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США) и 1% раствора пенициллина и стрептомицина (Gibco, США). Клеточные линии Alexander, HepG2 и Huh7 культивировали в питательной среде EMEM (ATCC, США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco, США) и 1% раствора пенициллина и стрептомицина (Gibco, США). В экспериментах использовались клеточные линии 2-4 пассажей с жизнеспособностью не ниже 95%.

Культивирование клеток Alexander, HepG2 и Huh7 осуществлялось во флаконах для адгезивных клеточных культур (treated Cell Culture Flask T-25, Eppendorf, Германия). Для культивирования клеток Jurkat и МНК использовались флаконы для суспензионных клеточных культур (non-treated Cell Culture Flask T-25, Eppendorf, Германия). Пассажи́рование клеток Jurkat осуществлялось каждые 3-4 дня, с одновременным контролем численности и жизнеспособности при помощи автоматического счётчика клеток. Пассажи́рование клеток Alexander, HepG2 и Huh7 осуществлялось при достижении уровня конfluencéнтности около 80% (в среднем каждые 3-4 дня). Для открепления адгезивных клеток от

поверхности флакона использовался раствор трипсина (Trypsin (0.25%), Gibco, США). Для этого из флакона удалялась питательная среда с использованием серологических пипеток (Eppendorf, Германия) и автоматического дозатора (Easypet 3, Eppendorf, Германия). После этого флакон промывался теплым (37° С) фосфатно-солевым буфером (PBS, Gibco, Германия). На следующем этапе во флакон вносился предварительно разогретый (37°С) раствор трипсина и флакон помещался в инкубатор на 5-7 минут. Ход трипсинизации оценивался с использованием светового микроскопа. Затем действие трипсина нейтрализовывалось добавлением теплой питательной среды. На следующем этапе осуществлялся перенос суспензии в отдельную пробирку (Eppendorf, Германия) и центрифугирование (5 мин, 1000 об/мин). Затем проводилось изъятие надосадочной жидкости и смешивание осадка, состоящего из клеток, с тёплой питательной средой. На следующем шаге жизнеспособность и количество клеток оценивались с использованием автоматического счётчика клеток.

2.2.2 Выделение мононуклеарных клеток из периферической крови человека

Материалом для исследований являлись образцы венозной крови объемом 20 мл. Забор материала осуществлялся из локтевой вены с использованием вакуумных систем для забора крови «BD VACUTAINER TM» (Greiner bio-one, Австрия), с содержанием гепарина 20 Ед/мл. Забор крови осуществлялся у потенциально здоровых доноров (разрешение № 5 от 16 мая 2016 г. комитет по этике, Инновационный парк «Фабрика», Балтийский федеральный университет им. Иммануила Канта). Полученную гепаринизированную венозную кровь перемешивали в пропорции 1:1 с фосфатным буфером (Dulbecco's phosphate-buffered saline, Gibco, США). На следующем этапе полученную смесь наслаивали в соотношении 3:1 на раствор фикола (Paque Premium, $\rho = 1,077$, Sigma-Aldrich, США), предварительно добавленного в пробирку объёмом 50 мл (Biologix, Китай). После этого, пробирку с содержимым центрифугировали в течение 45 минут при 1500 об/мин (Eppendorf Centrifuge 5702, США). По окончании центрифугирования визуально определялось наличие кольца из МНК на границе плотностей растворов.

МНК изымали с использованием пипетки-дозатора, в стерильных условиях и перемещали в пробирку для последующей отмывки. Отмывка суспензии, содержащей, МНК осуществлялась посредством перемешивания с фосфатным буфером и последующим центрифугированием при 1500 об/мин в течение 15 минут. Полученный клеточный осадок смешивали с необходимым количеством тёплой (37 °C) питательной среды RPMI-1640 для получения клеточной суспензии для последующих экспериментов. На следующем этапе проводилось исследование клеточной жизнеспособности с использованием автоматического счётчика клеток и клеточного красителя трипанового синего. Затем, МНК немедленно вовлекались в эксперимент (подглавы 3.2, 3.4).

2.2.3 Анализ цитотоксичности с использованием красителя WST-1

Цитотоксический потенциал НЧМ оценивали с использованием клеточного красителя WST-1 (Roche Diagnostics GmbH, Германия). Метод основан на процессах расщепления тетразолиевой соли WST-1 клеточными митохондриальными дегидрогеназами с образованием растворимой соли формазана [115]. Это преобразование осуществляется только жизнеспособными клетками, что позволяет точно спектрофотометрически определять количество метаболически активных клеток в культуре. WST-1 и формазан обладают различными оптическими характеристиками (различной интенсивностью поглощения света, а также розовым и темно-красным цветом соответственно).

Для определения жизнеспособности клетки культивировались в 96-луночных планшетах в течение 24 ч. Для этого отбирали МНК, выделенные методом градиентного центрифугирования (раздел 2.2.2) либо клетки Jurkat (раздел 2.1.1) и перемещали в лунки 96-луночного планшета (рис. 2). Количество клеток составляло 5×10^4 на лунку. В лунки помещали суспензию НЧМ для достижения требуемых концентраций для эксперимента (10, 50 или 100 мкг/мл). Суммарный объём питательной среды в лунке составлял 100 мкл. На следующем этапе планшеты перемещали в инкубатор для культивирования в течение 24 ч.

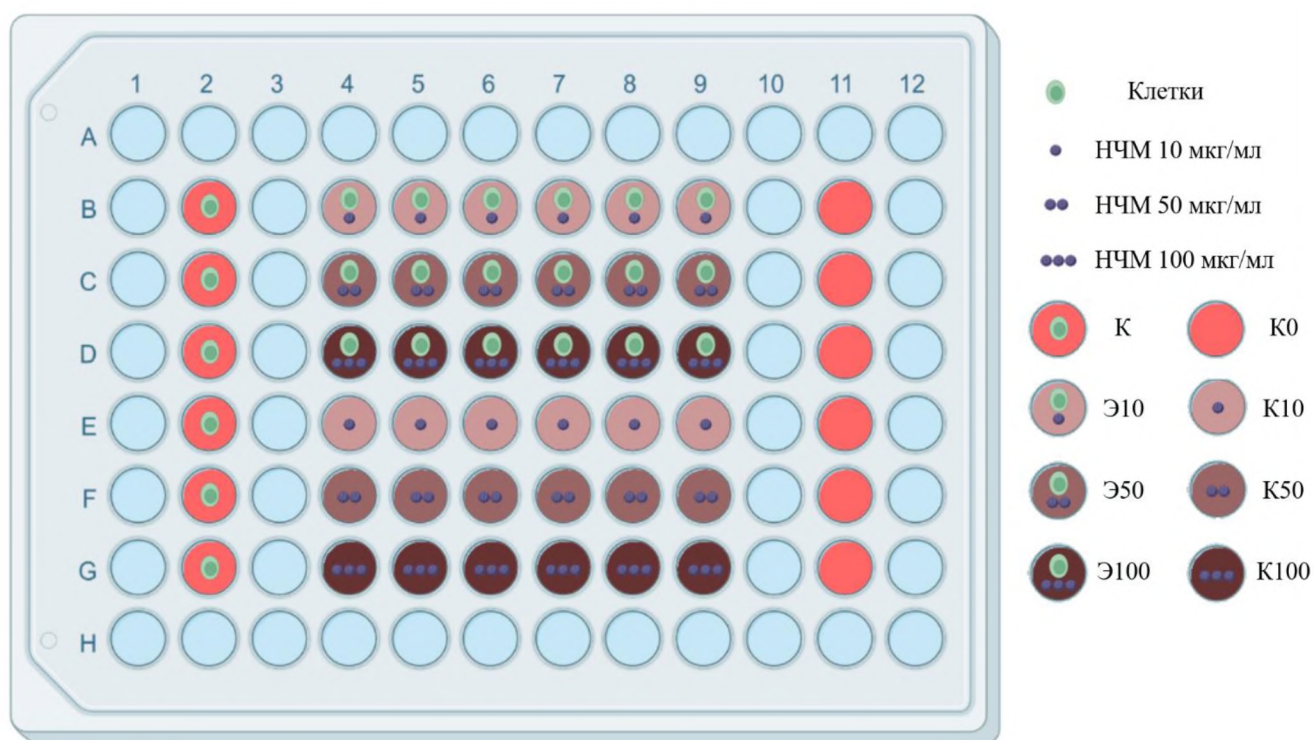


Рисунок 2. Схема экспериментального планшета для определения цитотоксичности НЧМ с использованием клеточного красителя WST-1 методом спектрофотометрии. К – контрольные лунки; Э10, Э50, Э100 – экспериментальные лунки с концентрацией НЧМ 10, 50 и 100 мкг/мл соответственно; К0, К10, К50 и К100 – калибровочные лунки, с концентрацией НЧМ 0, 10, 50 и 100 мкг/мл соответственно.

После культивирования для определения клеточной жизнеспособности, в лунки планшета, содержащих 100 мкл клеточной суспензии, добавляли 10 мкл теплого (37° С) реагента WST-1. Содержимое лунок тщательно ресуспендировали. Затем планшет помещали в инкубатор на 45 минут. По прошествии времени, содержимое лунок повторно ресуспендировали и проводили измерение оптической плотности клеточной суспензии с помощью микропланшетного ридера Bio-Rad 680 (Bio-Rad, США). Измерение осуществлялось с использованием оптического фильтра 450 нм. Каждая исследуемая группа имела 6 повторностей в рамках одного эксперимента. Эксперименты проводились в трёх повторностях. Помимо экспериментальных лунок (рис. 1 Э10, Э50 и Э100), содержащих клетки и НЧМ, а также контрольных лунок (рис. 1 К), содержащих клетки, без добавления НЧМ, измерение проводили в калибровочных лунках (рис. 2 К0, К10, К50, К100),

содержащих чистую питательную среду и различные концентрации НЧМ (0, 10, 50 или 100 мкг/мл).

Данные, полученные в ходе измерения оптической плотности суспензий, нормализовались к среднему значению оптической плотности контрольной группы исследования. Затем, данные, полученные в ходе измерения оптической плотности калибровочных лунок, использовались для расчета и вычета вклада НЧМ различных концентраций в оптические характеристики суспензий экспериментальных групп. На следующем этапе рассчитывались величины стандартного отклонения, а также уровня статистической значимости (p , p -критерий) методом однофакторного дисперсионного анализа One-Way ANOVA, путём множественных попарных сравнений групп данных с поправкой Бонферрони. В зависимости от величины статистической значимости определялся ранг для каждой отдельной группы данных (* при $p \leq 0.05$, ** при $p \leq 0.01$, *** при $p \leq 0.001$, «****» при $p < 0.0001$, отсутствие звездочек – статистически значимая разница между экспериментальными группами отсутствует). Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы GraphPad Prism 7.04 (Graph Pad Software Inc., США).

2.2.4 Анализ цитотоксичности с использованием красителя alamarBlue

Для культивирования клеточных культур Alexander, HepG2 и Huh7 в ходе экспериментов по оценке цитотоксичности НК и НКЛ использовали 96-луночные культуральные планшеты (рис. 3, (Thermo Fisher Scientific, Германия)). В ходе эксперимента в каждую экспериментальную и контрольную лунку планшета переносилось 100 мкл питательной среды EMEM, содержащей 1×10^5 клеток. По прошествии 24 ч с помощью микроскопа (IM-2FL, Optika Microscopes, Италия) осуществлялся контроль клеточной морфологии и степень конfluence. На следующем этапе осуществляли смену питательной среды и добавляли свежую питательную среду, содержащую различные концентрации НК и НКЛ (10, 50 и 100 мкг/мл). Затем клетки культивировали в инкубаторе в течение 48 и 24 ч, согласно протоколам, описанным выше (раздел 2.2.1). В лунки положительного контроля

добавляли раствор 20 % этанола на 60 минут. По прошествии культивирования осуществлялся анализ клеточной жизнеспособности с использованием красителя alamarBlue (Thermo Fisher Scientific, Германия) [67]. Реагент alamarBlue добавляли в каждую лунку в количестве 10 мкл, тщательно перемешивали и инкубировали в течение 2 часов при 37 ° С в соответствии с инструкциями производителя [118]. Затем проводили измерение интенсивности флуоресценции в каждой отдельной лунке планшета с использованием микропланшетного ридера SpectraFluor Plus (TECAN, Швейцария). Согласно протоколу измерений [118] длина волны возбуждения составляла 530 и 560 нм, флуоресцентное излучение регистрировалось на длине волны 590 нм. Для каждого измерения было проведено три независимых эксперимента.

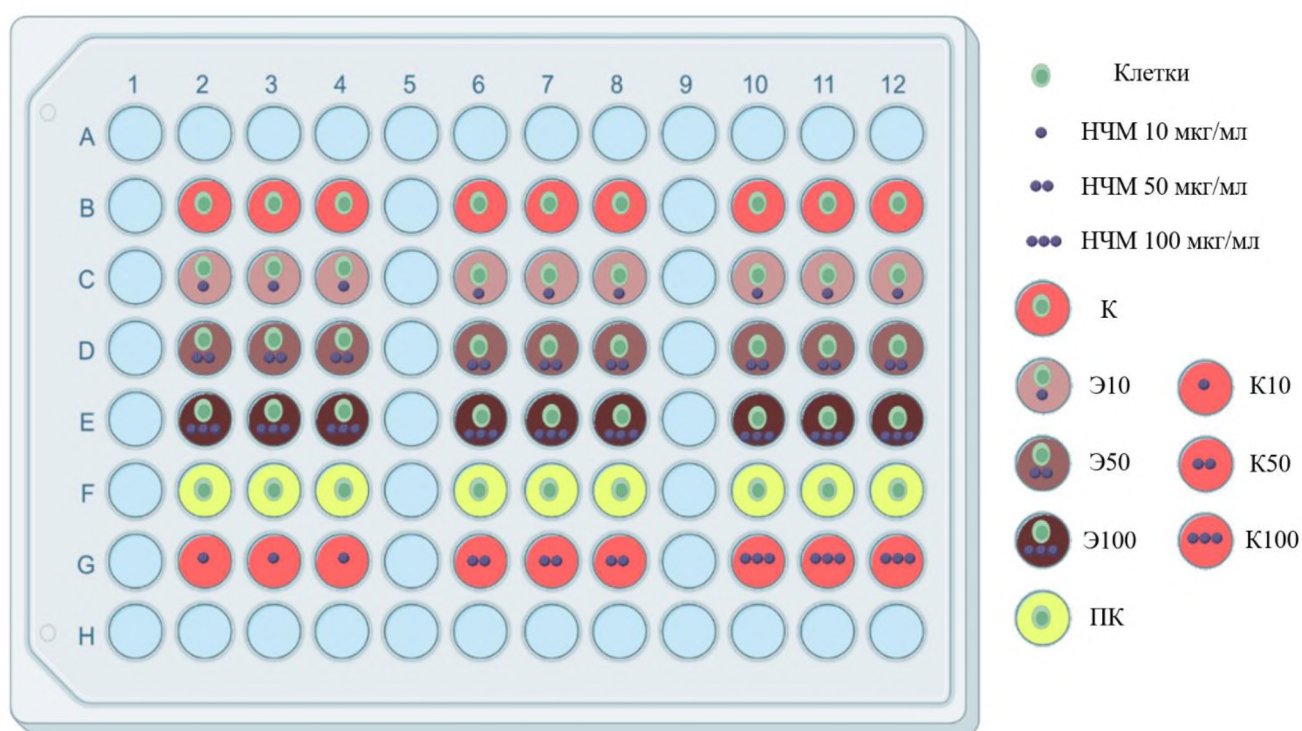


Рисунок 3. Схема экспериментального планшета для определения цитотоксичности НК и НКЛ с использованием клеточного красителя alamar blue методом спектрофотометрии. К – контрольные лунки; Э10, Э50, Э100 – экспериментальные лунки с концентрацией НЧ 10, 50 и 100 мкг/мл соответственно; К0, К10, К50 и К100 – калибровочные лунки, с концентрацией НЧ 0, 10, 50 и 100 мкг/мл соответственно; ПК – положительный контроль.

Данные, полученные в ходе измерения интенсивности флуоресценции экспериментальных лунок нормализовались к среднему значению интенсивности

флуоресценции лунок контрольной группы исследования. Затем, данные, полученные в ходе измерения калибровочных лунок, использовались для расчета и вычета вклада НЧМ различных концентраций в оптические характеристики суспензий экспериментальных групп. На следующем этапе рассчитывались величины стандартного отклонения, а также уровня статистической значимости (p , p -критерий) методом однофакторного дисперсионного анализа One-Way ANOVA, путём множественных попарных сравнений групп данных с поправкой Бонферрони. В зависимости от величины статистической значимости определялся ранг для каждой отдельной группы данных (* при $p \leq 0.05$, ** при $p \leq 0.01$, *** при $p \leq 0.001$, «****» при $p < 0.0001$, отсутствие звездочек – статистически значимая разница между экспериментальными группами отсутствует). Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы GraphPad Prism 7.04 (Graph Pad Software Inc., США) и MaxStat Pro 3.6. (MaxStat Software, Германия).

2.2.5 Культивирование клеток в присутствии НЧМ и внешних источников постоянного магнитного поля

Исследование цитотоксического воздействия НЧМ, а также совокупного воздействия НЧМ и постоянных магнитных полей различной напряжённости на клетки крови человека, было проведено с помощью метода проточной цитометрии. Для этого МНК и клетки Jurkat культивировались в 24-луночных культуральных планшетах для суспензионных клеток (Eppendorf, Германия). Количество клеток составляло 5×10^5 клеток на лунку. Объём питательной среды в лунке составлял 1 мл. Стоковый раствор НЧМ (водный раствор с концентрацией 36 мг/мл) в пробирке предварительно обрабатывали в ультразвуковой ванне (Elmasonic S 10H, Германия) в течение 10 мин и ресуспензировали в культуральной среде в пропорциях, необходимых для получения рабочих концентраций для эксперимента. На следующем этапе раствор НЧМ добавляли к клеточной суспензии в лунки планшета для получения концентраций 10, 50 и 100 мкг/мл. В контрольные лунки НЧМ не вносились. После 24 ч инкубации клеточную суспензию центрифугировали (в течение 10 минут при 1000 об/мин), удаляли надосадочную

жидкость и добавляли новую питательную среду для удаления НЧМ из раствора. Затем клетки переносили в лунки экспериментального планшета. На следующем этапе планшет с магнитами (рис. 4), помещали непосредственно под планшет, содержащий экспериментальные клетки. Постоянные магниты, использованные в качестве источника магнитного поля, располагались непосредственно под лунками экспериментального планшета.

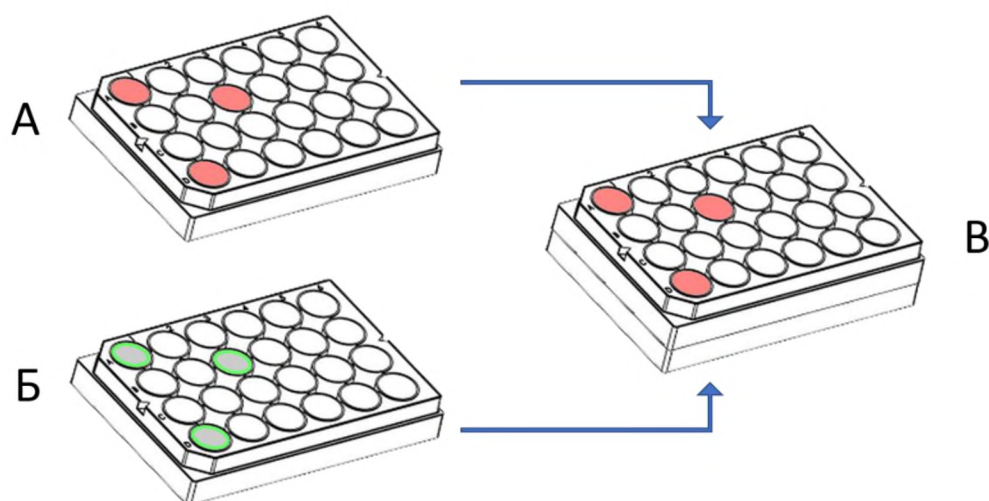


Рисунок 4. Схема сборки планшето́в для культивирования клеток Jurkat и МНК в присутствии НЧМ и при приложении постоянных магнитных полей. А – планшет с лунками для культивирования экспериментальных клеток. Б – планшет для удерживания постоянных магнитов различной напряженности. В – конфигурация совмещенных планшето́в (А и Б) для культивирования в ходе эксперимента.

Затем конструкция из совмещенных планшето́в (рис. 4, В) переносилась в инкубатор. Во время эксперимента в инкубаторе поддерживались постоянная температура (37°C) и влажность. При этом контрольная группа клеток культивировалась в условиях без источников внешнего магнитного поля. По истечению 24 часов был проведен анализ клеточной жизнеспособности с использованием метода спектрофотометрии (раздел 2.2.3) и проточной цитометрии (раздел 2.2.6). В случае измерения жизнеспособности с использованием красителя WST-1, клетки после культивирования в 24-луночных планшетах, переносили в 96-луночные планшеты и проводили окрашивание согласно методике, описанной ранее (раздел 2.2.3).

Во время экспериментов исследовались эффекты, оказываемые постоянными магнитными полями (МП) на процесс интернализации НЧ в клетки, и изучение

сопутствующих цитотоксических эффектов. В качестве источников МП низкой напряжённости использовались три вида постоянных неодимовых магнитов (рис. 5) диаметром 10 мм и толщиной 3, 5 и 10 мм (с напряженностью поля на поверхности магнитов 0.26 Т, 0.36 Т, 0.45 Т соответственно). Напряжённость МП была измерена с использованием датчика Холла (рис. 5).

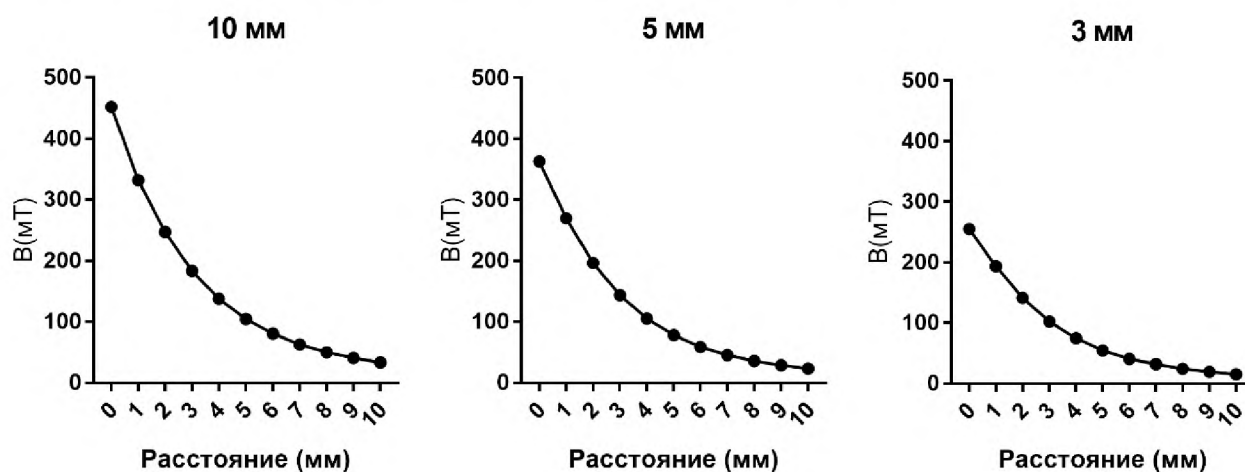


Рисунок 5. Величина магнитной индукции неодимовых магнитов различной толщины (10 мм, 5 мм, 3 мм) использованных для экспериментов.

2.2.6 Анализ клеточной жизнеспособности и исследование образования АФК методом проточной цитометрии

Метод проточной цитометрии был использован для оценки цитотоксичности НЧМ, а также для выделения отдельных субпопуляций исследуемых клеток согласно их размеру и гранулярности. Для окрашивания клеток использовался интеркалирующий краситель пропидий йодид (Thermo Fisher Scientific, Германия). Данный краситель, способный проникать в клетку только в случае пермеабиллизации клеточных мембран, является эффективным инструментом для разделения жизнеспособных и мертвых клеток [119].

Культивирование клеток проводилось согласно ранее описанным протоколам в 24-луночных (раздел 2.2.5) и 96-луночных планшетах (раздел 2.2.3). По окончании культивирования, клеточную суспензию центрифугировали в течение 5 минут и при 1000 об/мин. Затем проводилось изъятие надосадочной

жидкости и смешивание осадка, состоящего из клеток, с тёплым (37° C) раствором фосфатного буфера.

Окрашивание клеток осуществлялось с использованием раствора пропидий йодида с концентрацией 50 мкг/мл в течение 30 минут. Затем у исследуемых клеток анализировались параметры прямого светорассеяния (forward scatter, FSC), бокового светорассеяния (side scatter, SSC) и интенсивности флуоресценции. Параметры FSC и SSC использовались для разделения субпопуляций клеток по размеру и гранулярности соответственно. Различие в интенсивности флуоресценции клеточных субпопуляций, окрашенных пропидий йодидом, позволило разделить жизнеспособные и мертвые (флуоресцирующие) клетки. Для регистрации и анализа флуоресцентного сигнала использовался проточный цитометр FACS MACSQuant Analyzer («Miltenyi Biotec», Германия). Для обработки данных использовалось программное обеспечение Kaluza Analysis (Beckman Coulter Life Sciences, США).

Также, с использованием проточной цитометрии было проведено исследование образования активных форм кислорода (АФК) после воздействия НЧМ. Для этого использовали флуоресцентный краситель дигидроэтидий (DHE, Thermo Fisher Scientific, Германия). DHE специфично взаимодействует с внутриклеточным супероксидным радикалом ($O_2^{\cdot-}$) с образованием флуоресцентного 2-гидроксиэтидия (2-OH- E^+). DHE также неспецифично взаимодействует с гидроксильным радикалом ($\cdot OH$) и перекись водорода (H_2O_2) с образованием флуоресцентных молекул этидия (E^+). Таким образом, измерение уровня флуоресценции 2-OH- E^+ и E^+ является одним из критериев оценки уровня оксидативного стресса в клетке [120]. Для культивирования клеток использовался протокол, аналогичный описанному выше. Для окрашивания использовался 10 мкМ раствор DHE. Окрашивание проводилось в течение 45 минут.

2.2.7 Анализ апоптотических изменений в клетках

Для проведения экспериментов, требующих проведения флуоресцентного окрашивания (раздел 3.2), клетки (Alexander, HepG2 и Huh7) предварительно

культивировали в 4-луночных культуральных планшетах (рис. 6, μ -Slides, Ibidi, Германия) в инкубаторе в стандартных условиях (раздел 2.2.1). Количество клеток составляло 1×10^5 на каждую лунку слайда. Объем питательной среды в каждой лунке составлял 1 мл.

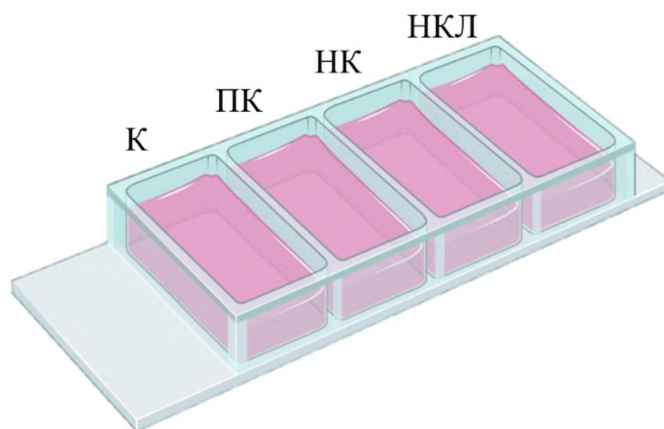


Рисунок 6. Схема культурального планшета для проведения экспериментов, требующих флуоресцентного окрашивания клеточных структур. К – контроль, ПК – положительный контроль, НК, НКЛ – лунки, содержащие экспериментальные клетки, а также нанокубы или нанокластеры, соответственно.

После культивирования в течение 24 ч, осуществлялся контроль клеточной морфологии и уровня конфлюэнтности с использованием светового микроскопа (раздел 2.2.1). На следующем этапе из лунок изымалась старая и вносилась новая питательная среда. В экспериментальных лунках питательная среда содержала также НК или НКЛ в концентрации 100 мкг/мл. Затем осуществлялось культивирование в течение 24 ч. Для получения положительного контроля в одну из лунок добавляли 2 мкМ раствор стауроспорина (Thermo Scientific Chemicals, Германия) и культивировали в течение 3 ч до начала эксперимента.

По окончании культивирования проводилось окрашивание клеточных структур, с использованием Dead Cell Apoptosis Kit (Thermo Fisher Scientific, США), согласно инструкции производителя [121], для оценки ранних апоптотических изменений в клетках. Для этого был приготовлен раствор для окрашивания на основе фосфатного буфера (PBS, Gibco, Германия), содержащий 1 мкг/мл Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, США), 1 мкг/мл Аннексина V (annexin V Alexa Fluor 488, Thermo Fisher Scientific, США) и 1 мкг/мл Пропидий

Йодида (Thermo Fisher Scientific, США). После этого из лунок планшета изымалась питательная среда и добавлялся раствор для окрашивания в объёме 1 мл на каждую лунку. После окрашивания в течение 45 минут, раствор для окрашивания изымался из лунок и клетки фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение 10 мин. После этого культуральный планшет накрывали покровными стёклами. Экспрессия фосфатидилсерина была проанализирована с использованием клеточного красителя Аннексин V. Проницаемость клеточных мембран была оценена с использованием Пропидий Йодида. Окрашивание клеточных ядер проводили с использованием Hoechst 33342. Флуоресцентные изображения регистрировали с помощью эпифлуоресцентного микроскопа IM-2FL (Optika Microscopes, Италия). Программное обеспечение ImageJ (National Institutes of Health, США) использовалось для обработки изображений и количественной оценки флуоресцентных микрофотографий. Для расчёта интенсивности клеточной флуоресценции проводили нормализацию общей флуоресценции клеток в области интереса к среднему значению интенсивности флуоресценции единичных клеток. Количественный анализ данных флуоресцентной микроскопии (анализ размера и целостности лизосом (раздел 2.2.13), активности каспазы-3 (раздел 2.2.8)) проводился согласно протоколам по обработке данных, описанных в литературе [122,123].

Для оценки апоптотических изменений в клетках также использовали anti-LC3A/B antibody (разведение 1:100, #12741, Cell Signaling Technology, США) в ходе микроскопического анализа. Для этого клетки культивировали согласно протоколу, описанному выше. После культивирования клетки фиксировали 4% раствором параформальдегида в течение 10 минут, а затем пермеабелизировали мембраны с использованием 0.5% TritonX в течение 20 минут. После этого клетки окрашивали с использованием антитела (anti-LC3A/B antibody) с прикрепленной флуоресцентной меткой (anti-rabbit Alexa Fluor 488, #A-11008, Thermo Fisher Scientific).

2.2.8 Анализ активности каспазы-3

Для дальнейшей оценки апоптотических изменений была исследована активность каспазы-3 в клетках после воздействия НК и НКЛ. Клетки культивировали в 4-луночных слайдах, согласно протоколу описанному ранее (раздел 2.2.7). После проведения культивирования клетки инкубировали в 10 мкМ растворе ингибитора каспазы VAD-FMK (Abcam, Великобритания) в течение 1 ч. До начала эксперимента VAD-FMK был предварительно конъюгирован с флуоресцентной меткой FITC (FITC-VAD-FMK, Abcam, Великобритания). Данный ингибитор нетоксичен, проникает через клеточные мембраны и необратимо связывается с активированными каспазами в апоптотических клетках [124]. Для положительного контроля клетки предварительно обрабатывали 2 мкМ раствором стауроспорина (Thermo Scientific Chemicals, Германия) в течение 3 ч. После инкубации окрашенные клетки визуализировали с помощью спиннинг-диск конфокальной микроскопии высокого разрешения IXplore SpinSR (Olympus, Япония). Интенсивность флуоресценции на полученных микрофотографиях была измерена с помощью программного обеспечения ImageJ (National Institutes of Health, США). Интенсивность флуоресценции определялась в виде скорректированной общей флуоресценции клеток (СОФК) и измерялась в относительных единицах флуоресценции (relative fluorescence units, RFU) согласно протоколам [125–127]. Интенсивность флуоресценции была измерена путем нормализации СОФК области интереса к средней флуоресценции отдельной клетки. При подсчёте область, не содержащая флуоресцентных объектов, использовалась для расчёта фоновой флуоресценции (вычитания фона). СОФК была определена как сумма интенсивности флуоресценции пикселей для одного изображения с вычетом фоновой флуоресценции для области (фона). Для определения средней флуоресценции отдельной клетки рассчитывали средние значения нормализованной интенсивности по меньшей мере 15 морфологически идентичных клеток.

2.2.9 Исследование морфологии митохондрий

Морфология митохондрий экспериментальных клеток была проанализирована с использованием конфокальной микроскопии высокого разрешения и клеточного красителя MitoTracker Green (Thermo Fisher Scientific, Германия). Для этого клетки культивировали согласно протоколу, описанному выше (раздел 2.2.7). Для получения положительного контроля в одну из лунок, не содержащей НЧ, был добавлен 20% раствором этанола за 20 минут до начала измерений. После окончания культивирования из лунок планшета удалялась питательная среда и добавлялся 0.5 мкМ раствор MitoTracker Green. Одновременно добавлялся краситель Hoechst 33342 в концентрации 1 мкг/мл для окрашивания клеточных ядер. Затем планшет помещался в инкубатор в стандартные для культивирования условия (раздел 2.2.1) на 15 минут. На следующем этапе из лунок изымался раствор PBS (Gibco, Германия), содержащий красители, и добавлялся чистый PBS объемом 1 мл. После этого проводилась визуализация клеточных структур с использованием конфокальной микроскопии. Для обработки флуоресцентных изображений использовалась программа ImageJ (National Institutes of Health, США).

2.2.10 Исследование процессов деполяризации митохондриальных мембран

Для оценки изменений трансмембранного потенциала митохондрий в клетках, после воздействия НК и НКЛ, был использован клеточный краситель JC-1 (Thermo Fisher Scientific, Германия). Клетки культивировались согласно протоколам, описанным ранее (раздел 2.2.7). Окрашивание проводилось согласно протоколу производителя [128]. По окончании культивирования из лунок удалялась питательная среда и добавлялся раствор PBS (Gibco, Германия), содержащий JC-1 в концентрации 10 мкг/мл. Затем планшет помещался в инкубатор на 30 минут, в стандартные для культивирования условия (раздел 2.2.1). После инкубации раствор для окрашивания удалялся и добавлялся чистый раствор PBS. После этого проводилась визуализация клеточных структур с использованием системы конфокальной микроскопии IXplore SpinSR (Olympus, Япония).

Обработка данных проводилась с использованием программного обеспечения конфокального микроскопа CellSens (Olympus, Япония). В ходе эксперимента измерялись интенсивности флуоресценции в красном (~590 нм) и зеленом спектре (~529 нм), свойственных для J-агрегатов и мономеров JC-1, соответственно. После этого было рассчитано соотношение величины флуоресценции красного спектра к зеленому. Это позволило определить относительное количество J-агрегатов и мономеров JC-1. Полученные относительные единицы использовались для сравнения экспериментальных групп клеток друг с другом, а также с контролем. Статистическая обработка результатов проводилась с помощью программы GraphPad Prism 7.04 (Graph Pad Software Inc., США) согласно методикам, описанным выше (Раздел 2.2.3).

2.2.11 Вестерн-блот

Для идентификации клеточных белков был использован метод вестерн-блота согласно стандартным протоколам [26,117,129,130]. Клетки предварительно культивировали в 6-луночных планшетах (Thermo Fisher Scientific, Германия) в количестве 1×10^6 на лунку. Объем питательной среды EMEM (ATCC, США) составлял 3 мл на лунку. После 24 ч культивирования в стандартных условиях в инкубаторе, согласно методикам, описанным выше (раздел 2.1.1), осуществлялась смена питательной среды. В лунки с экспериментальными клетками добавлялась питательная среда, с содержанием НК или НКЛ в концентрации 100 мкг/мл. После этого проводилось повторное культивирование в течение 24 ч. За 3 часа до окончания культивирования в одну из лунок добавлялся 2 мкМ раствор стауроспорина (Thermo Scientific Chemicals, Германия) для получения положительного контроля.

После окончания культивирования питательная среда удалялась из лунок и клетки промывались холодным (4°C) раствором PBS (Gibco, Германия). После этого из лунок изымался PBS и вносился холодный (4°C) раствор лизис-буфера RIPA (Thermo Fisher Scientific, Германия).

На следующем этапе эксперимента клетки откреплялись от поверхности культурального планшета с использованием скребка (Nunc Cell Scraper, Thermo Fisher Scientific, Германия). Затем клеточный лизат переносился в пластиковые пробирки (Eppendorf, Германия) для перемешивания в течение 30 минут с использованием термошейкера (Biosan, Латвия), а также последующего центрифугирования в течение 20 минут при 12000 об/мин и 4°C. После этого была собрана надосадочная жидкость, содержащая белки. На следующем этапе отбирался небольшой объём для определения концентрации белков в растворе с использованием спектрофотометра NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, Германия).

Разделение белков, согласно их молекулярной массе, было проведено методом электрофореза белков в полиакриламидном геле (SDS-PAGE, Thermo Fisher Scientific, Германия). Предварительно были приготовлены растворы SureCast Acrylamide (40%), SureCast Resolving Buffer и SureCast APS (10%) путём смешения сухого порошка с требуемыми объемами деионизированной воды согласно инструкции производителя (Thermo Fisher Scientific, Германия) [131]. После этого был приготовлен разделяющий гель (resolving gel), путем смешения 2 мл SureCast Acrylamide (40%), 2 мл SureCast Resolving Buffer, 3.9 мл деионизированной воды и 80 мкл SureCast APS (10%). После этого в гель добавлялось 8 мкл SureCast TEMED на каждые 8 мл разделяющего геля. После этого готовый разделяющий гель наливали с использованием с дозатора в систему заливки гелей для Mini Trans-Blot (Bio-Rad, Германия). После этого в течение 10 минут происходила полимеризация геля.

Концентрирующий гель (stacking gel) был получен путем смешения 0.30 мл SureCast Acrylamide (40%), 0.75 мл SureCast Stacking Buffer, 1.92 мл деионизированной воды и 30 мкл 10% SureCast APS. После этого в гель добавлялось 3 мкл SureCast TEMED на каждые 3 мл концентрирующего геля. После этого к рабочую камеру системы заливки гелей, содержащую полимеризованный гель, заливали концентрирующий гель. Затем с верхнего края в гель погружали гребенку для последующего формирования лунок в ходе

полимеризации геля. После этого в течение 10 минут происходила полимеризация геля и изымалась гребенка. После этого с использованием пипетки лунки геля промывались подвижным буфером (running buffer, Thermo Fisher Scientific, Германия). После этого система Mini-PROTEAN Tetra Cell собиралась в рабочее положение и в лунки наливался контрольный маркер (Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Electron GmbH, Германия)) и исследуемые образцы белков. Затем к системе Mini-PROTEAN Tetra Cell подключался источник постоянного тока PowerPac (Bio-Rad, Германия) с приложением постоянного тока напряжением 100 V в течение 2 ч. После этого гели изымались из системы Mini-PROTEAN Tetra Cell и хранились в пластиковых контейнерах во влажной атмосфере до следующего этапа эксперимента.

На следующем этапе исследования белки были перенесены с полиакриламидных гелей на мембраны из поливинилиденфторида (ПВДФ, 0.2 мкм, Bio-Rad, Германия). Для этого гели, бумага для блоттинга и мембраны сперва переносились в буфер для переноса (transfer buffer, Thermo Fisher Scientific, Германия) на 10 минут. После этого гели и мембраны собирали в конструкцию в виде сэндвича, в заданной последовательности: пластина камеры – бумага для блоттинга – гель – мембрана - бумага для блоттинга - пластина камеры. После этого камеру для переноса помещали в аппарат для переноса гелей и заливали буферным раствором. После этого осуществлялся перенос белков на мембраны при приложении тока в 100 V в течение 80 минут. Затем мембраны помещали раствор TBST (Thermo Fisher Scientific, Германия), содержащий 5% сухого обезжиренного молока (Thermo Fisher Scientific, Германия) и перемешивали в шейкере в течение 1 ч, для предотвращения неспецифического связывания антител на следующем этапе эксперимента.

Затем, мембраны были проинкубированы со специфичными первичными антителами anti-RIP1 (разведение 1:1000, #ab72139, Abcam, Великобритания), anti-LC3A/B (разведение 1:1000, #12741, Cell Signaling Technology, США), anti- β -actin (разведение 1:2000, #10D10, Thermo Fisher Scientific, Германия) в течение 24 ч при 4 °C согласно протоколам [26,117,129]. Антитело anti- β -actin было использовано в

качестве контроля. Затем мембраны трижды промывались в течение 10 минут раствором TBST (Thermo Fisher Scientific, Германия). После этого проводилась инкубация со вторичными антителами anti-mouse-HRP (разведение 1:10000, #G21040, Thermo Fisher Scientific, Германия), anti-rabbit-HRP (разведение 1:10000, #G21234, Thermo Fisher Scientific, Германия) в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем мембраны повторно трижды промывались в течение 10 минут раствором TBST. После этого проводилась детекция с использованием системы GBox Chemi XRQ Bio – Imaging system (Syngene, Synoptics Group, Великобритания). Полученные изображения обрабатывались с использованием ImageJ (National Institutes of Health, США). Денситометрический анализ был использован для сравнительного анализа уровня белка LC3A/B II в экспериментальных группах клеток. Для этого проводилось измерение оптической плотности изображений образцов, полученных в ходе детекции результатов вестерн-блоттинга.

2.2.12 Исследование уровня экспрессии гена LC3 методом ПЦР в реальном времени

Клетки культивировали с различными типами наночастиц (НК или НКЛ) в концентрации 100 мкг/мл в течение 24 ч в стандартных условиях, описанных ранее (раздел 2.2.1). После окончания культивирования мРНК из клеток выделяли с помощью набора реактивов mini kit RNeasy (Qiagen, Германия). Для расщепления ДНК в образцах использовалась ДНКаза I из набора реактивов RNeasy Kit (Qiagen, Германия). Качество и количество полученной мРНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 8000 (Thermo Fisher Scientific, Германия). При этом 2 мкг РНК транскрибировали в кДНК помощью набора для синтеза кДНК Maxima H Minus First Strand (Thermo Fisher Scientific, Германия). Количественная ПЦР в реальном времени была проведена с использованием Vii7 Real Time PCR system (Applied Biosystems, Invitrogen, США), Fast Advanced TaqMan Gene expression Master mix (Thermo Fisher Scientific, Германия) и Bio-Rad Prime PCR Probe Assays (MAB1LC3B, GAPDH, Bio-Rad, США). Общий ввод РНК в одну реакцию составлял

20 нг. Образцы анализировали в четырех повторностях для каждой группы. GAPDH Probe Assay использовался в качестве внутреннего контроля. Данные анализировали с помощью программ Microsoft Excel 2018 (Microsoft Corporation, США) и MaxStat Pro 3.6 (MaxStat Software, Германия). Экспрессию целевого гена нормализовали по уровню экспрессии GAPDH с использованием метода $2^{-\Delta\Delta CT}$ [132].

2.2.13 Анализ состояния лизосом

Для оценки состояния лизосом клетки предварительно культивировали согласно ранее описанной методике (подглавы 2.2.1 и 2.2.7) в присутствии НК или НКЛ в питательной среде. После культивирования клетки из лунок изымалась питательная среда и добавлялся тёплый раствор PBS (Gibco, Германия), содержащий LysoTracker Green (Thermo Fisher Scientific, Германия) в концентрации 200 нМ и 1 мкг/мл красителя Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific, США). Hoechst 33342 использовался для окрашивания клеточных ядер. LysoTracker Green применялся для визуализации лизосом. Данный краситель окрашивает клеточные компартменты с высокой кислотностью, при этом с его накоплением происходит повышение интенсивности флуоресценции [133]. При пермеабиллизации лизосомальных мембран происходит утечка накопленного красителя и снижение флуоресцентного сигнала. Данные процессы можно детектировать методами флуорометрии и конфокальной микроскопии [133]. Для регистрации данных изменений была использована спиннинг-диск конфокальная микроскопия высокого разрешения (IXplore SpinSR, Olympus). Интенсивность флуоресценции измеряли с помощью программного обеспечения ImageJ (National Institutes of Health, США). Для получения положительного контроля в одну из лунок, не содержащей НЧ, добавляли 20% раствор этанола на 20 мин.

3. ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Воздействие НЧМ на жизнеспособность клеток Jurkat и МНК

Физические, химические и структурные свойства наноматериалов определяют характер их взаимодействия с биологическими объектами [37]. Данные свойства определяют уровень цитотоксичности наноматериалов, степень биосовместимости, возможные побочные и сопутствующие эффекты, стабильность в биологических средах и тканях, а также область и эффективность потенциального применения [72,134].

Физическая и структурная характеристика, использованных в данном исследовании наноматериалов – наночастиц магнетита (НЧМ), нанокубов (НК) и нанокластеров (НКЛ), выполнена научными коллегами автора диссертации и опубликована в совместных научных публикациях [106,135]. На рисунке 1 приведена ключевая информация о НЧ, использованных в исследованиях по теме диссертации, необходимая для корректной интерпретации результатов биологических экспериментов.

Использование НЧ в качестве терапевтического инструмента сопряжено с рядом потенциальных побочных эффектов. При этом цитотоксичность является одним из основных лимитирующих факторов использования НЧ в качестве основы для биомедицинских приложений [136]. Наноматериалы могут быть введены непосредственно в кровоток испытуемого (либо экспериментального животного) для достижения необходимого терапевтического эффекта [137], либо другими путями, к примеру перорально, что также может привести к проникновению НЧ в кровеносную систему организма через кишечник и накапливаться в клетках печени, легких и мозге [134,138]. При этом терапевтический эффект НЧ зависит от селективности действия, времени циркуляции в кровотоке [137], химической стабильности [139,140], интенсивности формирования белковой короны и процессов опсонизации [141].

Таким образом, при оценке биосовместимости необходимо исследовать воздействие НЧ на клетки крови. Ранний ответ на чужеродные материалы,

локализованные в крови, связан с лейкоцитами и иммунными модулирующими клетками, взаимодействующими с наноматериалами [142,143]. Обязательным компонентом иммунной системы организма человека являются мононуклеарные клетки (МНК) периферической крови. Популяция МНК представляет собой клетки с одиночным округлым ядром и включает лимфоциты (70-90%), моноциты (10-30%) и дендритные клетки (1-2%) [144]. Процентное соотношение перечисленных клеточных компонентов может варьироваться [145].

Высокая восприимчивость данных клеток к воздействию лекарственных препаратов и химических соединений, сделало их удобным и чувствительным объектом для изучения процессов цитотоксичности [145,146]. Поэтому, в ходе данного исследования, МНК были выбраны в качестве модели здоровых клеток крови человека.

Известно, что характер токсического эффекта НЧ в отношении здоровых и раковых клеток крови может отличаться, в следствие, например, различий клеточного гомеостаза [41,147] и меньшей устойчивости опухолевых клеток к оксидативному стрессу [148]. Данные различия должны быть приняты во внимание для разработки эффективных противораковых инструментов на основе НЧ.

В качестве модели опухолевых клеток была выбрана клеточная линия Т-лимфобластного лейкоза (Jurkat) [149]. Клетки Jurkat, проявляют высокую пролиферативную активность, схожи по своим характеристикам со здоровыми Т-лимфоцитами человека, а также способны запустить иммунный ответ [149,150]. В ряде исследований, клеточная линия Jurkat широко используется для изучения иммунных и цитотоксических механизмов клеточного ответа в условиях *in vitro* [151,152], индуцированных в ответ на биоматериалы [153], что послужило основанием выбрать клетки линии Jurkat в качестве модели опухолевых клеток крови человека.

На первом этапе экспериментов была проведено исследование цитотоксичности НЧМ с использованием проточной цитометрии и клеточного красителя пропидий йодида (Раздел 2.2.5). Установлено, что после культивирования с НЧМ в концентрации 10, 50 и 100 мкг/мл в течение 24 ч

жизнеспособность клеток Jurkat не была ингибирована (данные не показаны). Изменения жизнеспособности МНК также не было обнаружено.

На следующем этапе для оценки клеточной жизнеспособности был использован метод спектрофотометрии с использованием клеточного красителя WST-1 (Раздел 2.2.3). Как показали результаты, НЧМ продемонстрировали цитотоксическое воздействие на клетки Jurkat: при культивировании клеток с добавлением НЧМ в концентрации 100 мкг/мл, жизнеспособность клеток Jurkat была снижена ($p \leq 0.001$) по истечении 24 часов (рис. 7). Однако, после культивирования МНК в аналогичных условиях снижения жизнеспособности не было обнаружено.

Различие в данных, полученных двумя разными методами, предположительно, связано с особенностями действия клеточных красителей. Пропидий йодид способен окрашивать ядра клеток только с повреждённой мембраной, т.о. выявляя клетки только на поздних этапах клеточной смерти [119]. В тоже время, редукция WST-1 происходит на поверхности живых клеток [154]. При этом, интенсивность окрашивания напрямую будет зависеть от метаболической активности клеток, что позволяет зарегистрировать ингибирование клеточных процессов начиная с ранних этапов воздействия НЧМ [154].

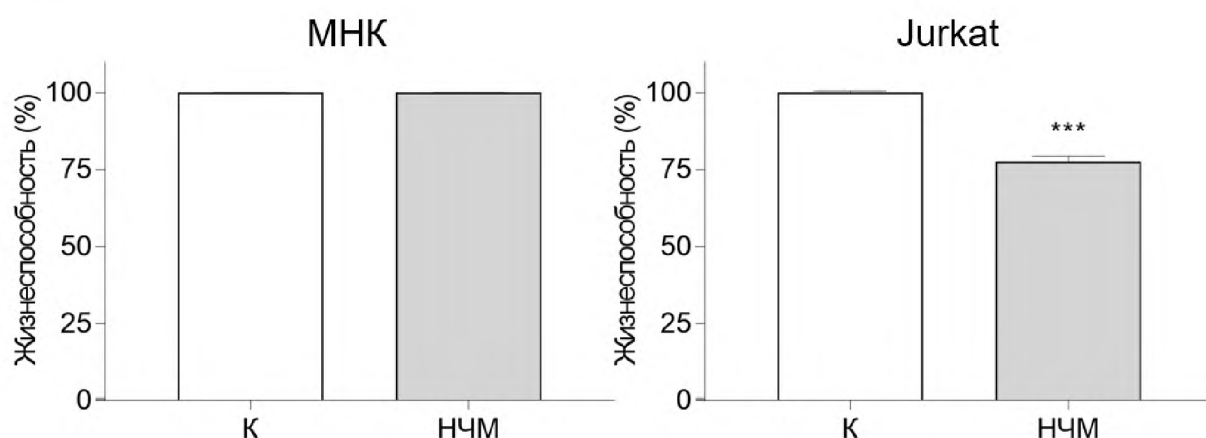


Рисунок 7. Уменьшение жизнеспособности клеток Jurkat после культивирования с НЧМ в концентрации 100 мкг/мл. Данные получены методом спектрофотометрии и окрашиванием при помощи красителя WST-1. Данные нормализованы к контролю (жизнеспособность контрольной группы клеток принята за единицу и

использована для нормализации). Уровень статистической значимости данных между контрольной и экспериментальной группами представлен звездочками («***») для значения $p < 0,001$, отсутствие звездочек – статистически значимая разница между экспериментальными группами отсутствует).

Приложение внешнего магнитного поля (МП), в дополнение к действию магнитных НЧ, является перспективным подходом для разработки биомедицинских приложений (гипертермия, клеточная манипуляция, индукция интернализации НЧМ, механическое разрушение клеток) [18,126,155,156]. Постоянное МП способно увеличивать поглощение магнитных НЧ, ввиду действия механических сил со стороны НЧ на клеточную мембрану, в диапазоне десятков пиконьютонов [157]. Таким образом, происходит индукция цитотоксических процессов, что может быть использовано для достижения терапевтического эффекта. Также данный подход позволяет производить магнитные манипуляции клеток и клеточных структур в пространстве для нужд тканевой инженерии и регенеративной медицины [158,159].

На следующем этапе исследования, воздействие НЧМ на экспериментальные клетки было модифицировано приложением постоянных МП умеренной напряженности (Раздел 2.2.5). Анализ клеточной жизнеспособности показал значительное снижение жизнеспособности клеток Jurkat, культивируемых в постоянных МП различной напряженности (0.26, 0.36 и 0.45 Т) в присутствии наночастиц (рис. 8).

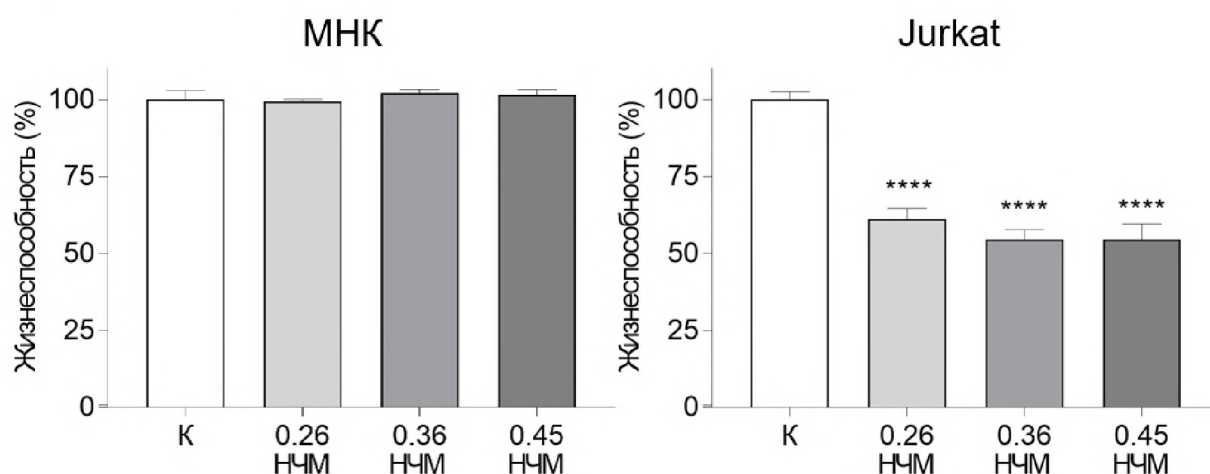


Рисунок 8. Уменьшение жизнеспособности клеток Jurkat после культивирования с наночастицами магнетита при приложении постоянных магнитных полей. Данные

получены методом спектрофотометрии и окрашиванием при помощи красителя WST-1. Данные нормализованы к контролю. Уровень статистической значимости данных между контрольной и экспериментальной группами представлен звездочками («****») для значения $p < 0,0001$, отсутствие звездочек – статистически значимая разница между экспериментальными группами отсутствует).

Ингибирование жизнеспособности клеток Jurkat при воздействии НЧМ усиливалось по мере увеличения напряжённости МП. Жизнеспособность МНК, напротив, не была снижена совместным действием НЧМ и МП, и демонстрировала флуктуации в пределах статистической погрешности. Данные различия клеточного ответа связаны, предположительно, с нарушением окислительно-восстановительного гомеостаза в раковых клетках [148]. Полученные результаты согласуются с литературными данными [74], в которых показана различная восприимчивость здоровых и раковых клеток к АФК-опосредованному воздействию НЧОЖ. Из этого следует, что методы элиминации клеток, основанные на различиях в окислительно-восстановительном гомеостазе раковых и здоровых клеток организма, могут предоставить эффективные стратегии избирательной индукции клеточной смерти [148].

Известны методы индукции клеточной смерти, основанные на индукции активных форм кислорода (АФК) посредством МНЧ [160]. К примеру, НЧОЖ способны индуцировать образование АФК в результате реакции Фентона [74]. При этом, приложение внешних МП усиливает интернализацию МНЧ в клетки [161] и соответственно усиливает цитотоксический эффект. МП также используются для достижения эффекта гипертермии, что дополнительно усиливает генерацию АФК [162]. Рост цитотоксичности в данном случае может быть связан с повышением интенсивности протекания реакции Фентона при увеличении температуры [162]. Способность раковых клеток утилизировать АФК также снижается при повышении температуры [162].

На следующем этапе, для идентификации процессов, лежащих в основе цитотоксических эффектов, было проведено исследование образования АФК в клетках Jurkat. С помощью клеточного красителя дигидроэтидия (DHE), методом проточной цитометрии была оценена интенсивность окислительных процессов в

экспериментальных клетках (рис. 9 зеленые и синие линии) по сравнению с контрольными (рис. 9 красные линии). Экспериментальные условия были аналогичны предыдущему эксперименту. На полученных данных, представленных в виде графика, четко выделяются позитивно окрашенные пики (показаны стрелками), что говорит о выраженном оксидативном стрессе, вызванном воздействием НЧМ и МП. В то же время обнаружено изменение гранулярности экспериментальных клеток (рис. 9 Б). Возросшая гранулярность клеток – один из признаков внутриклеточной интернализации НЧ.

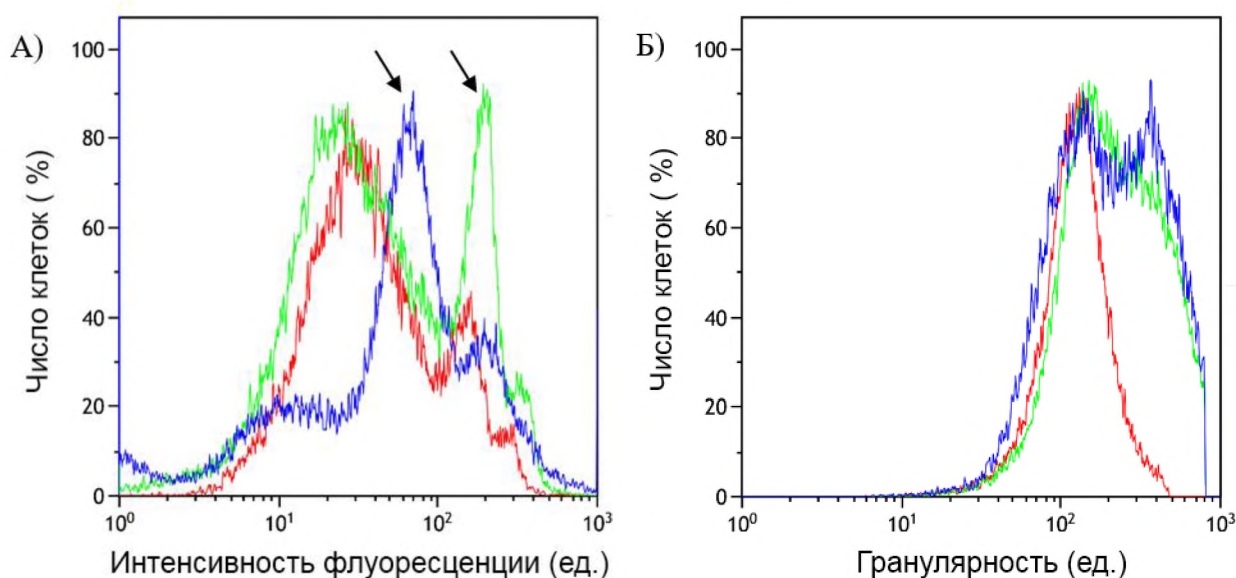


Рисунок 9. Индукция образования АФК в клетках Jurkat после культивирования с наночастицами оксидов железа при приложении МП. Красные, зеленые и синие линии отображают показания для контрольных клеток, клеток культивированных в присутствии 100 мкг/мл НЧ, а также клеток культивированных в присутствии 100 мкг/мл НЧ и МП 0.45 Т соответственно. Графики отображают интенсивность флуоресценции красителя DHE (А) и клеточную гранулярность (Б).

Для подтверждения процесса интернализации НЧМ в клетки Jurkat был использован метод проточной цитометрии с использованием красителя пропидий йодид. При изучении данного процесса были четко выделены две клеточные субпопуляции (рис. 10, I, II). В результате культивирование в течение 24 ч с добавлением НЧМ и при приложении МП повысило гранулярность субпопуляций Jurkat (рис. 10, показано стрелками).

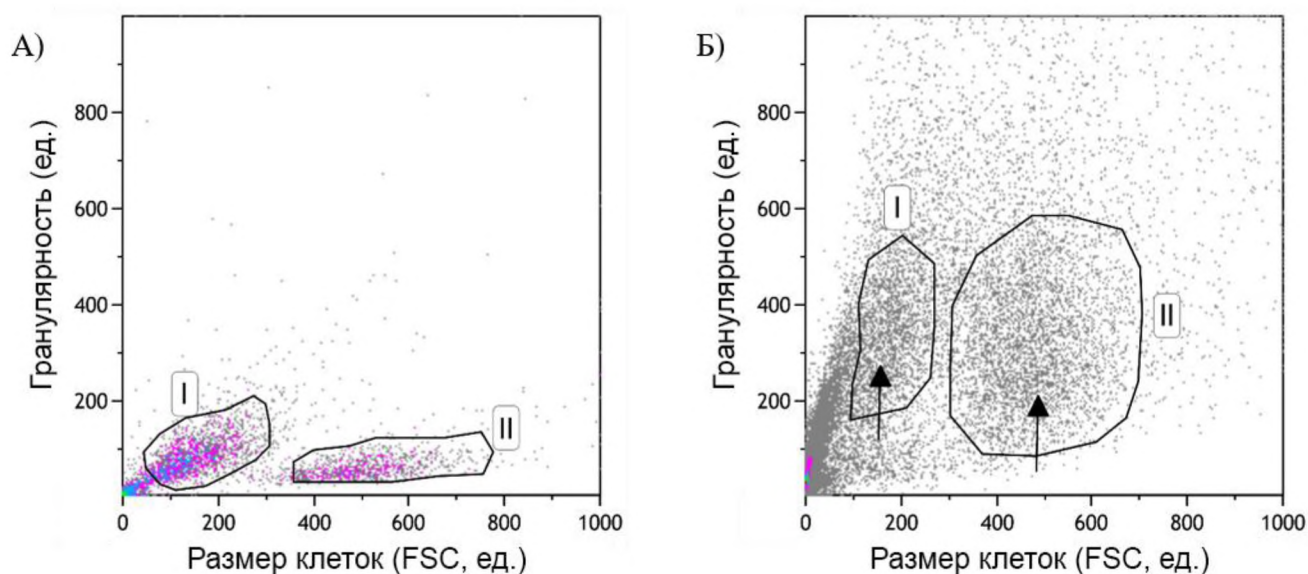


Рисунок 10. Изменение гранулярности клеток Jurkat после культивирования с наночастицами оксидов железа при приложении МП напряжённостью 0.45 Т. А – контрольные клетки, Б – экспериментальные клетки.

Таким образом, выявлено цитотоксическое действие НЧМ на клеточную линию Jurkat (рис. 11 А), при этом приложение МП в дополнение к действию НЧМ, усиливало цитотоксический эффект (рис. 11 Б). В то же время, МНК продемонстрировали устойчивость к воздействию НЧМ, а также совместного действия НЧМ и МП. Исследование воздействия НЧМ на клеточную жизнеспособность позволил выявить различия в чувствительности здоровых клеток (МНК) и раковых клеток (Jurkat) к данному воздействию.

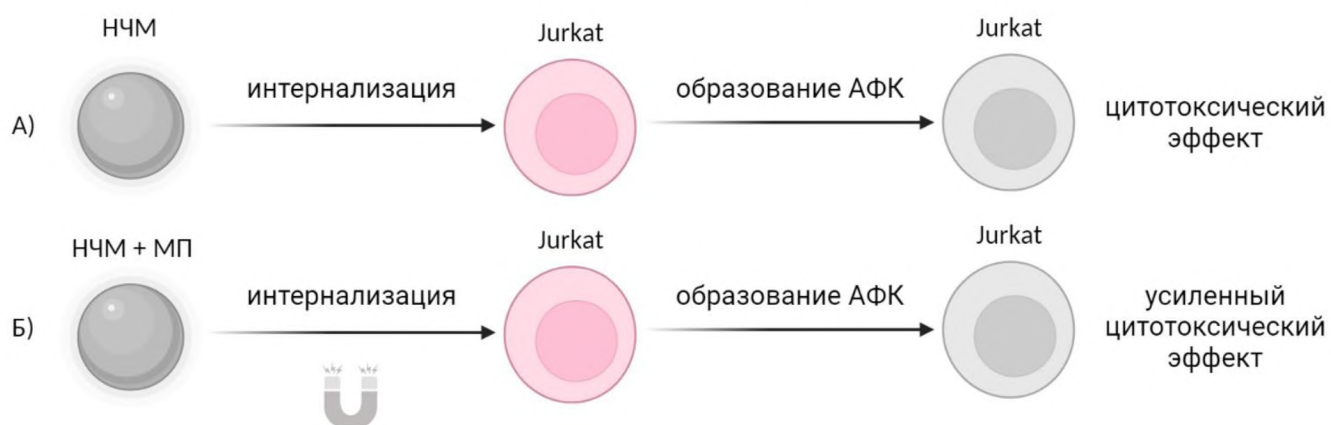


Рисунок 11. Цитотоксическое действие НЧМ на клетки Jurkat — приложение МП в дополнение к действию НЧМ, усиливает цитотоксический эффект.

Эти данные позволят разработать концепт инструмента для биомедицины, позволяющего избирательного ингибировать жизнеспособность раковых клеток

посредством использования комбинации НЧМ и МП. Полученные результаты, согласуются с литературными источниками, подтверждающих усиление токсичности НЧМ под действием МП [163,164].

3.2 Влияние формы наночастиц на характер клеточного ответа

3.2.1. Воздействие НК и НКЛ вызывает эффект острой гепатотоксичности

Для дальнейшего изучения цитотоксического потенциала НЧОЖ были использованы НЧ, представляющие собой нанокубы (НК) и нанокластеры (НКЛ) (рис. 6).

Многочисленные исследования показали острую цитотоксичность НЧОЖ в отношении различных клеточных линий человека [23–26,28,165,166]. Известно, что использование НЧОЖ в качестве основы для терапевтических инструментов в условиях *in vivo* сопряжено с эффектом гепатотоксичности, причины и механизмы которого до конца не исследованы [167]. При этом только небольшая часть работ сфокусирована на клетках, выделенных из печени человека [75,168–170]. Поскольку гепатоциты участвуют во множестве жизненно важных метаболических процессов, важно знать, насколько велики вызываемые побочные эффекты НЧОЖ.

В работе, для изучения данного процесса использовались клеточные линии гепатоцеллюлярной карциномы человека Alexander (PLC/PRF/5), HepG2 и Huh7 (Раздел 2.1.1). Данные раковые клеточные линии являются удобными объектами для изучения процессов гепатотоксичности, обладая при этом различиями в экспрессии серии генов [107]. Различия генетического фона опухолевых клеток должны быть учтены в ходе разработки противораковых препаратов [80], т.к. данные особенности вносят дополнительный фактор вариабельности свойств раковых клеток, что определяет возможности по поиску клеточных мишеней для противораковой терапии.

Для определения фармакологического окна исследуемых НЧОЖ, как инструментов биомедицины, был проведен тест цитотоксичности с тремя различными концентрациями. По прошествии 48 ч жизнеспособность всех трёх клеточных линий гепатоцеллюлярной карциномы была ингибирована под

воздействием НК (рис. 12) и НКЛ (рис. 13). При этом величина токсического эффекта возрастала ($p < 0.001$) с увеличением концентрации НЧ.

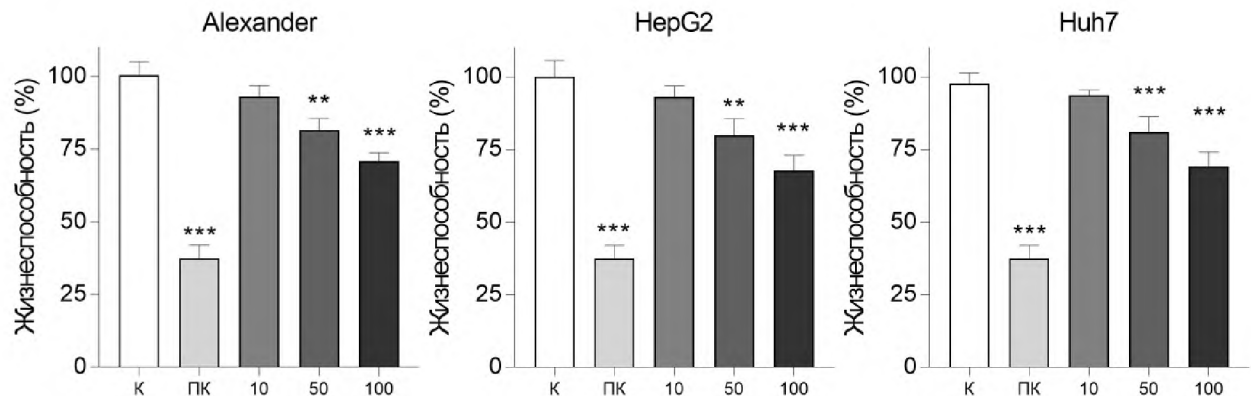


Рисунок 12. Снижение клеточной жизнеспособности клеточных линий Alexander, HepG2 и Huh7 после культивирования с различными концентрациями НК в течение 48 ч. Анализ проведен с использованием красителя alamarBlue. Данные нормализованы к контролю. Контрольные клетки культивировались без наночастиц. Уровень статистической значимости данных между контрольной и экспериментальной группами представлен звездочками («**» для $p < 0,01$, «***» для значения $p < 0,001$).

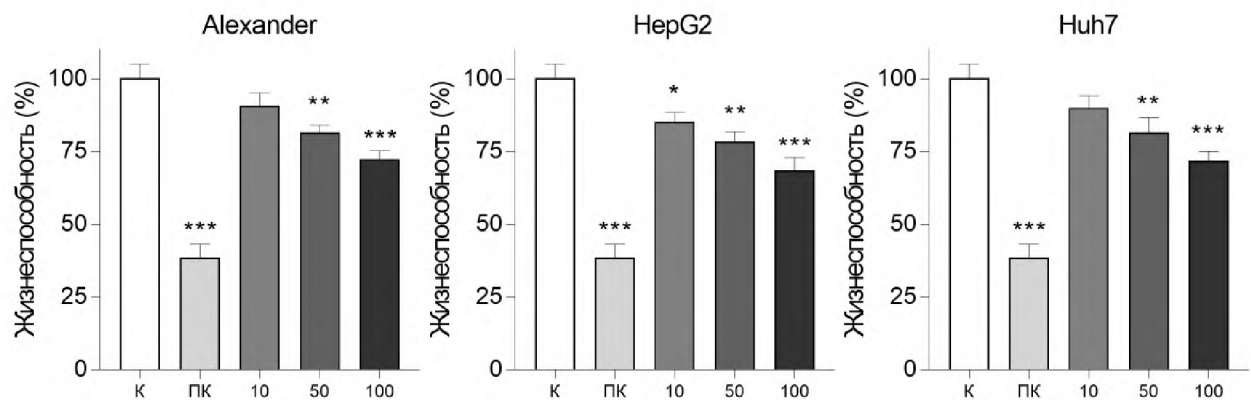


Рисунок 13. Снижение клеточной жизнеспособности клеточных линий Alexander, HepG2 и Huh7 после культивирования с различными концентрациями НКЛ в течение 48 ч. Анализ проведен с использованием красителя alamarBlue. Данные нормализованы к контролю. Контрольные клетки культивировались без наночастиц. Уровень статистической значимости данных между контрольной и экспериментальной группами представлен звездочками («*» для $p < 0,05$, «**» для $p < 0,01$, «***» для значения $p < 0,001$).

Воздействие обоих видов НЧ снизило жизнеспособность клеточных линий (рис. 14) приблизительно на 30 % ($p < 0.001$). Таким образом, 48-часовое

воздействие концентрации 100 мкг/мл НК и НКЛ приводит к эффекту острой токсичности в клетках печени (гепатотоксичности).

Известно, что долго циркулирующие НЧ способны проникать в опухоль через сеть сосудов и аккумулироваться преимущественно в ней [84,171]. Такой тип пассивного таргетинга называется эффектом повышенной проницаемости и удержания (enhanced permeability and retention effect, EPR-эффект) [84,171]. EPR-эффект служит основой для создания пассивной наноразмерной системы доставки лекарств [84,171]. EPR-эффект способен повысить эффективность доставки лекарств в целевые клетки вдвое [84,171]. Контроль пермеабиллизации материалов, воздействие на кровеносные сосуды и модификация микроокружения опухоли (к примеру, с использованием фибробластов) позволяют преодолеть биологические барьеры для доставки НЧ в целевые участки организма [84,171,172]. При этом, необходимо учитывать высокую генетическую гетерогенность опухолевых клеток, приводящую к высокой вариабельности EPR-эффекта [84,171,172].

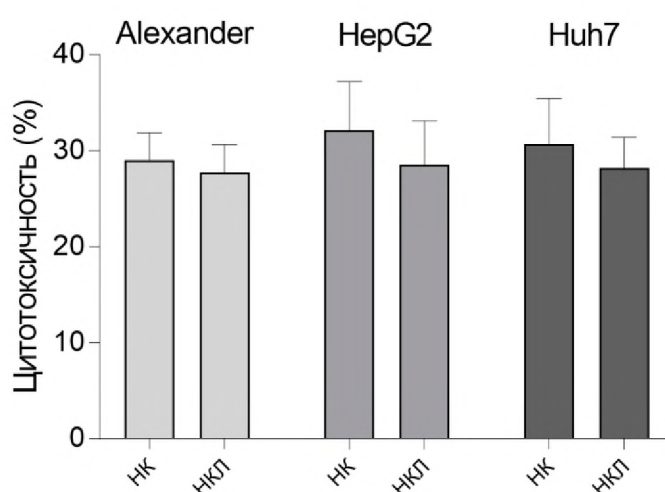


Рисунок 14. Сравнение цитотоксического эффекта (указан процент мертвых клеток) для клеточных линий Alexander, HepG2 и Huh7, вызванного влиянием нанокубов и нанокластеров в течение 48 ч при концентрации 100 мкг/мл.

На следующем этапе исследования было оценено цитотоксическое действие НК и НКЛ, с использованием клеточных красителей Аннексин V, Hoechst 33342 и пропидий йодид (Раздел 2.2.7). По прошествии 24 ч воздействия, с использованием эпифлуоресцентной микроскопии были обнаружены клетки позитивно окрашенные Аннексином, что является индикатором транслокации

фосфатидилсерина с внутренней на внешнюю поверхность клеточных мембран (рис. 15).

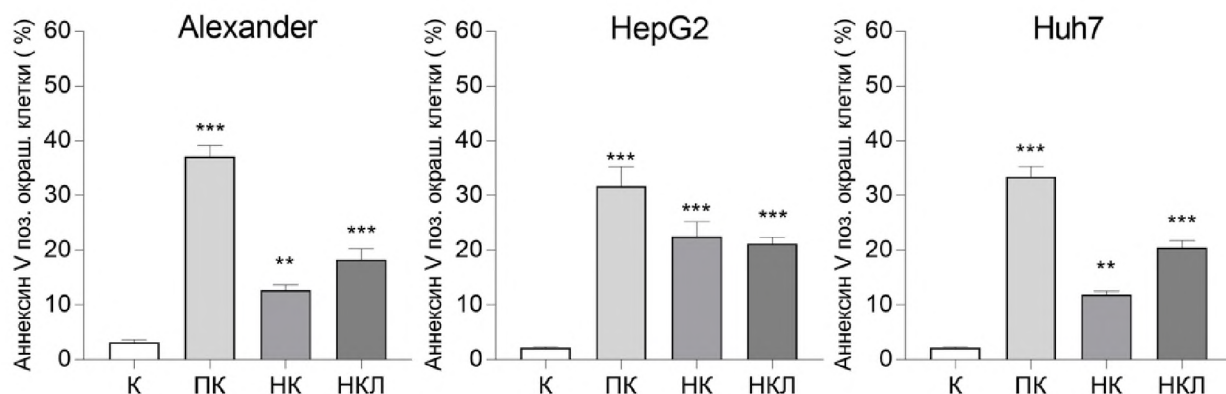


Рисунок 15. Сравнение цитотоксического эффекта для клеточных линий Alexander, HepG2 и Huh7, вызванного воздействием НК и НКЛ в концентрации 100 мкг/мл течение 24 ч. Клеточный краситель Аннексин V был использован для оценки экспрессии фосфатидилсерина и определения процента положительно окрашенных клеток. Уровень статистической значимости данных между контрольной и экспериментальной группами представлен звездочками («*» для $p < 0,05$, «**» для $p < 0,01$, «***» для значения $p < 0,001$).

Транслокация фосфатидилсерина является одним из ранних признаков апоптоза [173,174]. Краситель Hoechst 33342 использовался для выявления клеточных ядер, пропидий йодид использовался для обнаружения мертвых клеток. Исследуемые НЧ продемонстрировали меньший цитотоксический эффект после 24 ч воздействия (рис. 16), по сравнению с 48 ч (рис. 14).

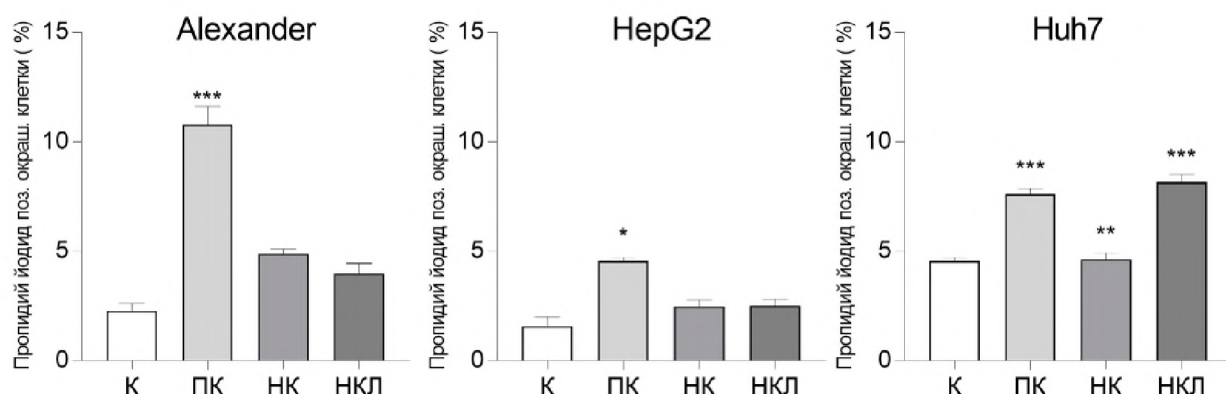


Рисунок 16. Сравнение цитотоксического эффекта для клеточных линий Alexander, HepG2 и Huh7, вызванного воздействием НК и НКЛ в концентрации 100 мкг/мл в течение 24 ч. Пропидий йодид был использован для контроля выживаемости клеток (доли клеток с пермеабилizованными мембранами). Уровень

статистической значимости данных между контрольной и экспериментальной группами представлен звездочками («*» для $p < 0,05$, «**» для $p < 0,01$, «***» для значения $p < 0,001$).

НКЛ оказали наибольший токсический эффект в клетках Huh7 (рис. 16). НК также снизили жизнеспособность клеток Huh7, при этом воздействие на клеточные линии Alexander и HepG2 лежало в пределах статистической погрешности.

После оценки величины цитотоксических эффектов НК и НКЛ, было проведено исследование клеточной морфологии. С помощью конфокальной микроскопии высокого разрешения было обнаружено, что клетки после воздействия НК и НКЛ демонстрируют характерные признаки апоптоза [175]. Были обнаружены фрагментация ядер, формирование и отделение отдельных пузырьков цитоплазматических мембран, а также сморщивание клеток в целом (рис. 17). Согласно представленным результатам, интенсивность процесса фрагментации ядер наиболее интенсивно проходит в клеточных линиях Alexander и Huh7. В то же время процессы фрагментации цитоплазматических мембран обнаружены во всех трех исследуемых клеточных линиях.

Таким образом, были получены экспериментальные данные, показывающие, что НК и НКЛ оказывают схожее воздействие на все три исследованные клеточные линии (рис. 18). При этом, количество жизнеспособных клеток уменьшалось при повышении концентрации НЧ, а клетки демонстрировали внешние апоптотические признаки.

На следующем этапе исследования, в экспериментальных клетках была проведено исследование активности каспазы-3 – клеточного маркера апоптоза [176]. После 24 ч воздействия НК и НКЛ экспериментальные клетки были проинкубированы с флуоресцеин-конъюгированным ингибитором панкаспазы (VAD-FMK). Количественная характеристика полученных флуоресцентных изображений проводилась с использованием методики скорректированной общей флуоресценции клеток (СОФК) с помощью конфокальной микроскопии высокого разрешения [107]. Исследование активности каспазы-3 показала, что воздействие

НКЛ индуцировало массивную активацию каспазы-3 в клетках HepG2, Huh7 и Alexander (рис. 19).

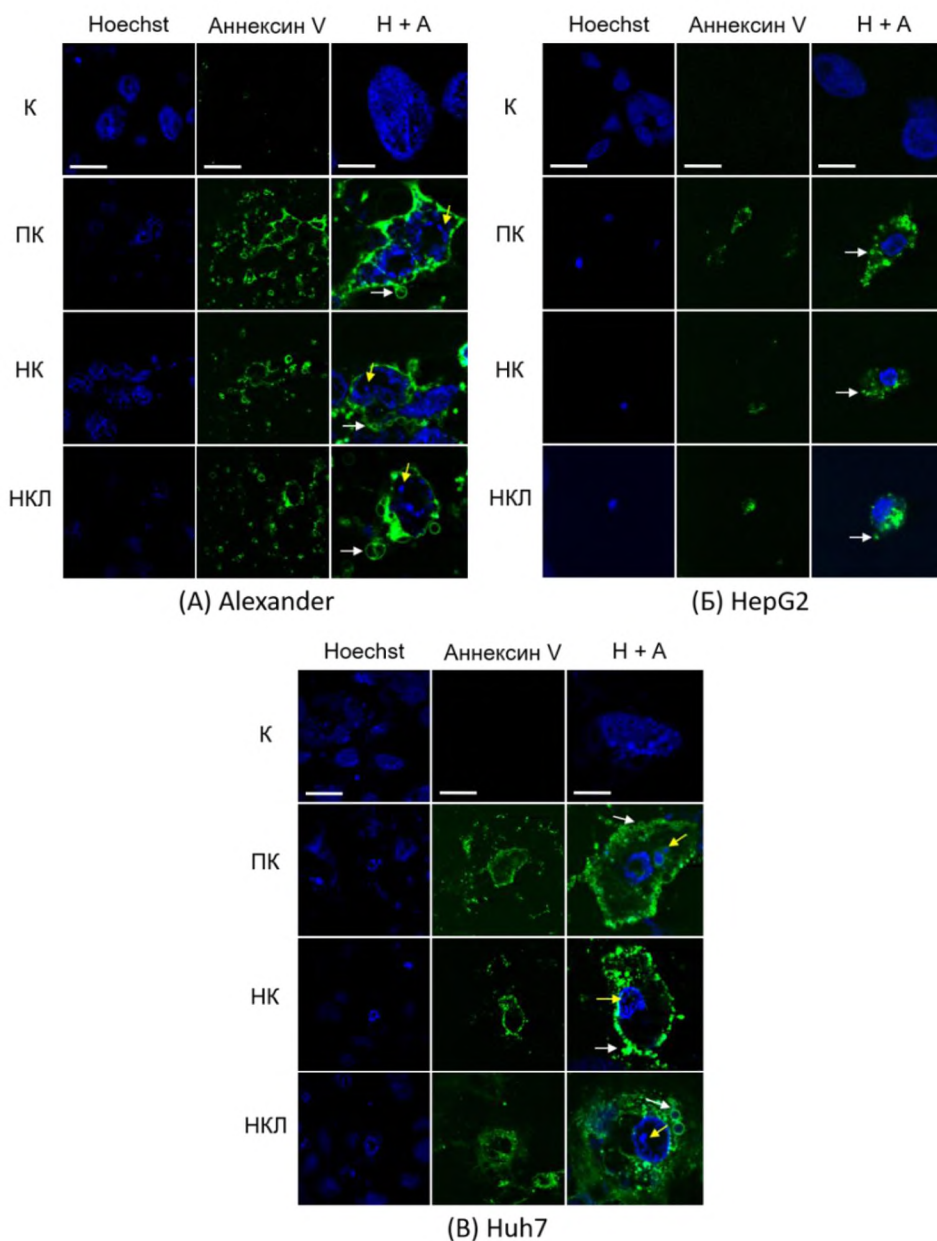


Рисунок 17. Фрагментация ядер и нарушение целостности цитоплазматических мембран в клеточных линиях Alexander (А), HepG2 (Б) и Huh7 (В) после культивирования с НК и НКЛ (100 мкг/мл) в течение 24 ч. Для идентификации клеточных ядер использован краситель Hoechst 33342 (синий цвет). Для оценки состояния клеточных мембран использован краситель Annexin V (зелёный цвет). Для определения колокализации анализируемых объектов флуоресцентные каналы Hoechst 33342 и Annexin V были объединены на увеличенном изображении (H + A). Для позитивного контроля (ПК) клетки были простимулированы 2 мкМ раствором стауроспорина в течение 3 ч. Изображения окрашенных клеток были получены с использованием конфокальной микроскопии высокого разрешения. Размер шкалы составляет 5 мкм для H + A. Размер шкалы для Hoechst и Annexin

составляет 15 мкм. Желтые стрелки обозначают фрагментацию ядер. Белые стрелки обозначают отделившиеся пузырьки лизосомальных мембран.

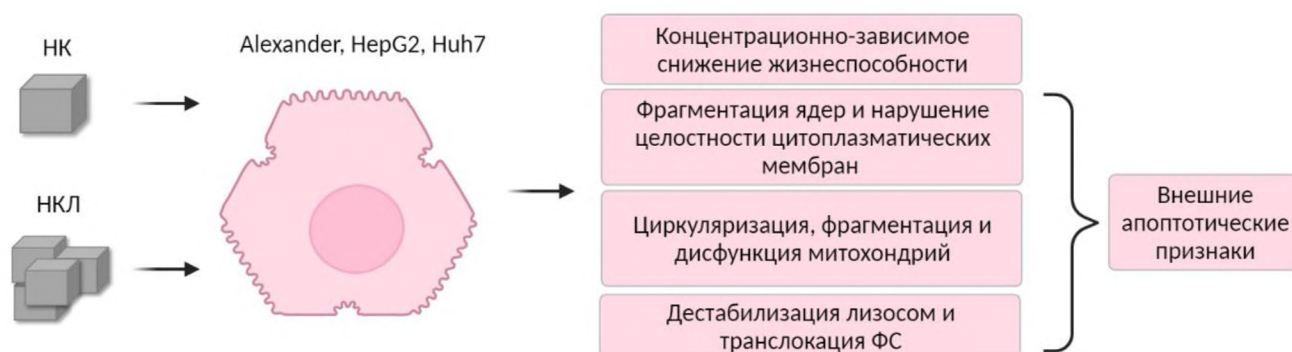


Рисунок 18. Схема воздействия НК на исследуемые клетки. НК и НКЛ оказывают дозозависимый эффект снижения жизнеспособности клеток Alexander, HepG2 и Huh7, сопровождающийся проявлением внешних апоптотических признаков.

Полученные данные подтверждают индукцию апоптоза во всех трех изученных клеточных линиях после воздействия НКЛ. В то же время, как видно из рисунка, воздействие НК приводит к небольшому либо незначительному повышению уровня каспазы-3 в клетках Alexander и Huh7 (рис. 19). При этом, НК как и НКЛ, вызвали массивную активацию каспазы-3 в клетках HepG2 (рис. 19).

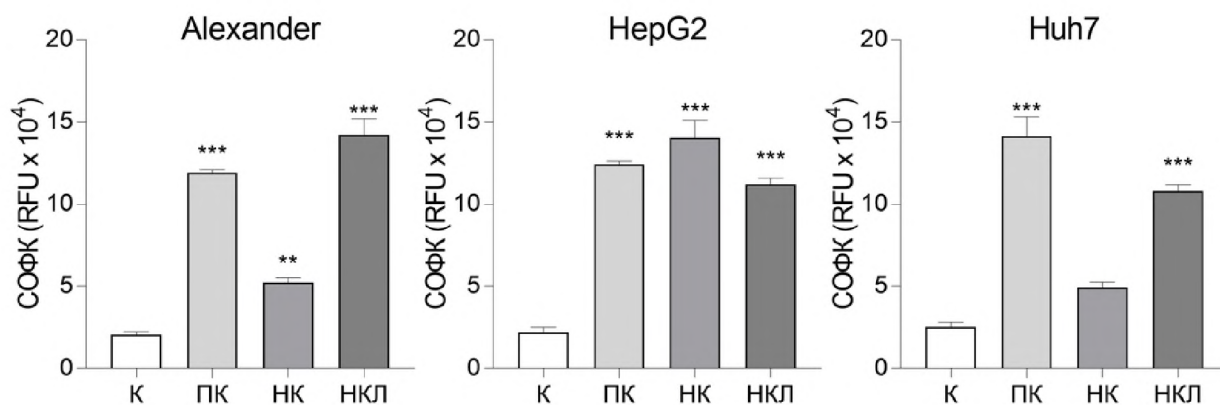


Рисунок 19. Активация Каспазы-3 в клеточных линиях Alexander, HepG2 и Huh7. Клеточные линии были прокультивированы с НК и НКЛ (100 мкг/мл) в течение 24 ч. Клетки были проинкубированы с флуоресцеин-конъюгированным ингибитором панкаспазы (VAD-FMK). Анализ окрашенных клеток проведён с использованием конфокальной микроскопии высокого разрешения. Квантификация проведена с использованием программы ImageJ (National Institutes of Health, США). Скорректированная общая флуоресценция клеток представлена в виде относительных единиц флуоресценции (RFU). Уровень статистической значимости данных между контрольной и экспериментальной группами представлен звездочками («*» для $p < 0,05$, «**» для $p < 0,01$, «***» для значения $p < 0,001$). Для

ПК клетки были простимулированы 2 мкМ раствором стауроспорина в течение 3 ч. Подробная методика указана в разделе 2.2.8

3.2.2. Воздействие НК активирует процессы аутофагического потока в клеточных линиях Huh7 и Alexander

Ранее в данной работе показано, что цитотоксичность НЧОЖ связана с индукцией оксидативного стресса (Раздел 3.2.1). Полученные результаты согласуются с литературными данными [17,25–28,177]. Согласно исследованиям, оксидативный стресс, посредством формирования АФК, вызывает перекисное окисление липидов, повреждение митохондриальной и ядерной ДНК. При этом главным источником АФК в клетке являются митохондрии [178]. Известно, что нарушение функций митохондрий связано с сигнальными путями клеточной гибели – от некроза до апоптоза [179–181]. Поэтому митохондрии являются актуальной целью для НЧОЖ-опосредованной индукции цитотоксичности [182]. При этом знания о влиянии воздействия НЧОЖ на активность митохондрий в клетках печени носят фрагментированный характер [28,183,184].

Учитывая вышесказанное, на следующем этапе было изучено влияние НК и НКЛ на функциональность митохондрий. С использованием конфокальной микроскопии высокого разрешения и клеточного красителя MitoTracker Green была визуализирована морфология митохондрий экспериментальных клеток, после воздействия НК и НКЛ в течение 24 ч (рис. 20). Согласно полученным результатам, в клеточных линиях Alexander, HepG2 и Huh7 обнаружены слияние и фрагментация митохондрий. Зарегистрированная чрезмерная фрагментация является признаком митохондриальной дисфункции [185,186]. Было обнаружено повышение циркуляризации митохондрий после воздействия и НК, и НКЛ, во всех трёх исследуемых клеточных линиях, по сравнению с контролем (рис. 20).

Помимо изменения морфологии, процесс митохондриальной дисфункции сопровождается деполяризацией мембран митохондрий [187,188]. Поэтому на следующем этапе экспериментов проведено исследование изменений трансмембранного потенциала митохондрий, с использованием красителя JC-1 (Раздел 2.2.10), который способен свободно проникать в цитоплазму клеток через

клеточную мембрану и накапливаться в митохондриях с образованием J-агрегатов. В то же время, деполяризация митохондриальных мембран приводит к распаду J-агрегатов. Различия в спектрах флуоресценции J-агрегатов и мономеров (свободной формы) JC-1, позволяют количественно зарегистрировать степень деполяризации митохондриальных мембран с применением конфокальной микроскопии [117].

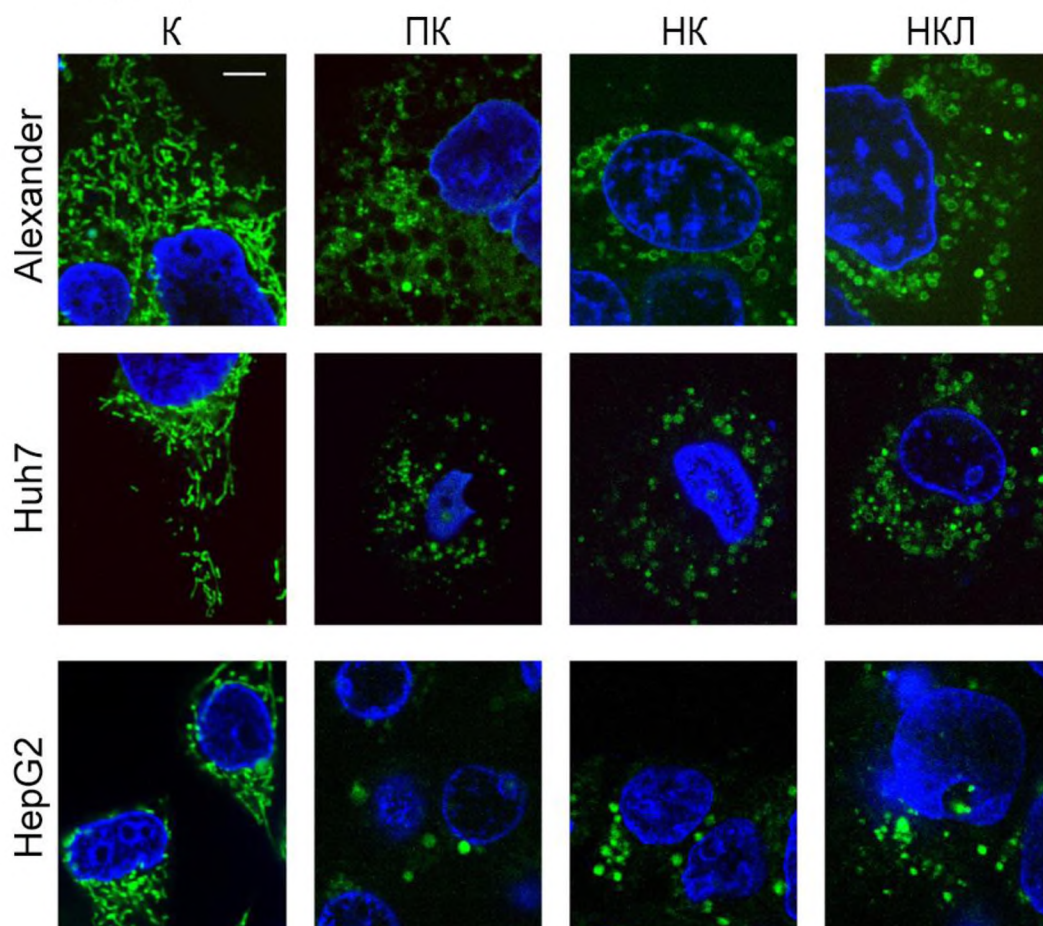


Рисунок 20. Изменение морфологии митохондрий под воздействием НК и НКЛ. Клетки культивировали с НК и НКЛ в концентрации 100 мкг / мл в течение 24 часов. Клетки окрашены флуоресцентным красителем MitoTracker Green (митохондрии зелёного цвета). Для позитивного контроля клетки были обработаны 20% раствором этанола в течение 20 мин. Клеточные ядра (синий цвет) окрашены флуоресцентным красителем Hoechst 33342. Размер шкалы составляет 5 мкм.

Проведенный анализ показывает соотношение интенсивности флуоресценции J-агрегатов и мономеров JC-1 в митохондриях клеток Alexander, HepG2 и Huh7, после культивирования с НК и НКЛ в течение 24 ч (рис. 21). Полученные значения интенсивности флуоресценции J-агрегатов и мономеров JC-

1 подсчитаны и представлены в виде соотношения интенсивности красного спектра флуоресценции (~590 нм) к зеленому (~529 нм). Понижение данного значения служит индикатором деполяризации мембраны в экспериментальных клетках по сравнению с контролем.

Таким образом НК и НКЛ, индуцировали морфологические изменения митохондрий (рис. 20) и вызывали деполяризацию митохондриальных мембран во всех трех исследованных клеточных линиях (рис. 21).

Функциональные состояния митохондрий (особенно дисфункция) являются ключевыми факторами регуляции аутофагии [187]. При этом, согласно современным представлениям НЧОЖ представляют собой перспективный класс наноматериалов-индукторов аутофагии [189–192]. На этом основании в данной работе выдвинута гипотеза, что особенности течения аутофагического потока в исследуемых клеточных линиях гепатокарцином являются причиной различий в активации апоптоза посредством НК и НКЛ.

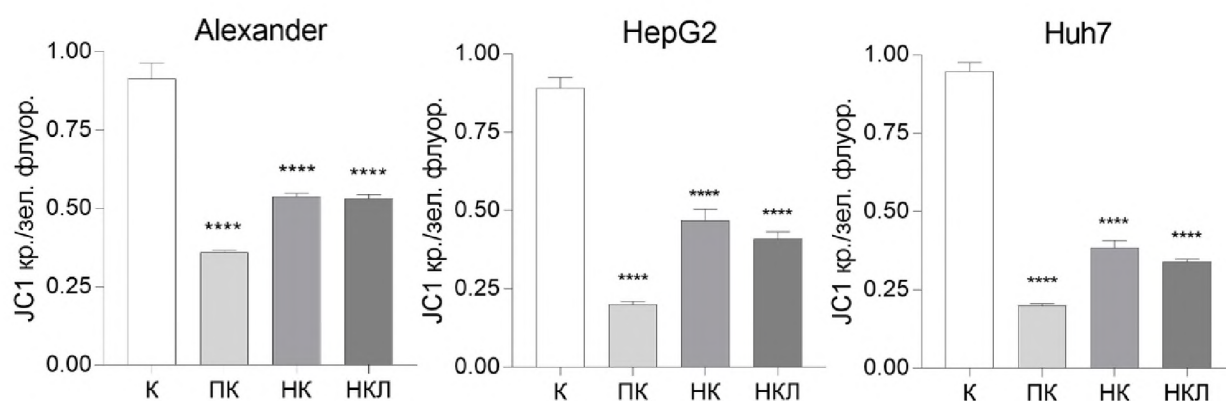


Рисунок 21. Деполяризация митохондриальных мембран клеток Alexander, HepG2 и Huh7, после воздействия НК и НКЛ в течение 24 ч. Данные представлены в относительных единицах, демонстрирующих соотношение интенсивностей флуоресценции митохондрий в длинах волн красного (~590 нм) и зеленого (~529 нм) спектров (JC-1 кр./зел. флуор.). Данные получены с использованием красителя JC-1 и конфокальной микроскопии высокого разрешения.

Течение аутофагии сопровождается деградацией цитоплазматических компонентов и клеточных органелл. Данный процесс связан с формированием аутофагосом – двухмембранных везикул, содержащих клеточные компоненты, для последующего переноса в лизосомы и переработки. Аутофагия может быть

индуцирована клеточным голоданием, гормональной стимуляцией или воздействием искусственных препаратов [193].

Оценить интенсивность течения аутофагических процессов в клетке возможно с помощью оценки экспрессии белка LC-3. LC-3, как правило, присутствует в клетке в двух формах - LC-3 I и в виде липидизированной формы - LC-3 II. LC-3 I локализован в клеточной цитоплазме, а LC-3 II связан с мембраной аутофагосом. При этом, количество LC-3 II в клетке коррелирует с интенсивностью образования аутофагосом. Таким образом, образование белка (липидация LC-3) на мембранах является надежным индикатором аутофагии [174].

В данной работе использовано первичное антитело anti-LC3A/B, с последующим мечением вторичным флуоресцентным антителом (Раздел 2.2.11) в ходе иммуноблоттинга, для изучения индукции аутофагии в ответ на воздействие НК и НКЛ. Была оценена экспрессия двух форм LC3, что позволило оценить степень липидации LC3 в клетках. Обнаружено, что НК индуцировали липидацию LC3-II в клетках Alexander и Huh7, но не в клетках HepG2 (рис. 22). НКЛ, напротив, не оказали эффекта на липидацию LC3 во всех трёх клеточных линиях.

Дополнительно, была проанализирована экспрессия клеточного маркера некроптоза RIP1. Оба вида НЧ не продемонстрировали значимого влияния на экспрессию RIP1 во всех трёх клеточных линиях (рис. 22). Это позволяет исключить возможное влияние некроптотических процессов.

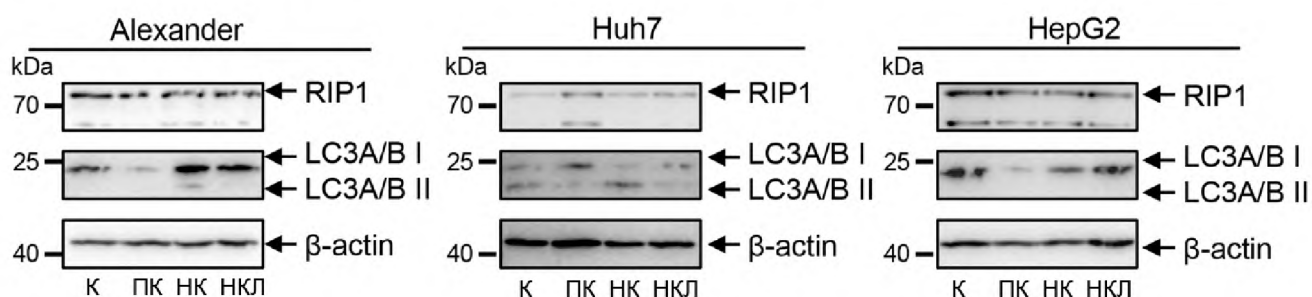


Рисунок 22. Липидация LC3 в клетках Alexander и Huh7, индуцированная воздействием НК. Иммуноблот белков клеточного лизата, получен из клеток обработанных НК и НКЛ в концентрации 100 мкг/мл в течение 24 часов. β-актин был использован в качестве загрузочного контроля. Для получения позитивного контроля (ПК) клетки обрабатывали 2 мМ раствором стауроспорина в течение 3 ч.

Последующий денситометрический анализ (рис. 23) полученных результатов вестерн-блоттинга (рис. 22) подтвердил липидацию LC3 в клетках Alexander и Huh7, но не в клетках HepG2.

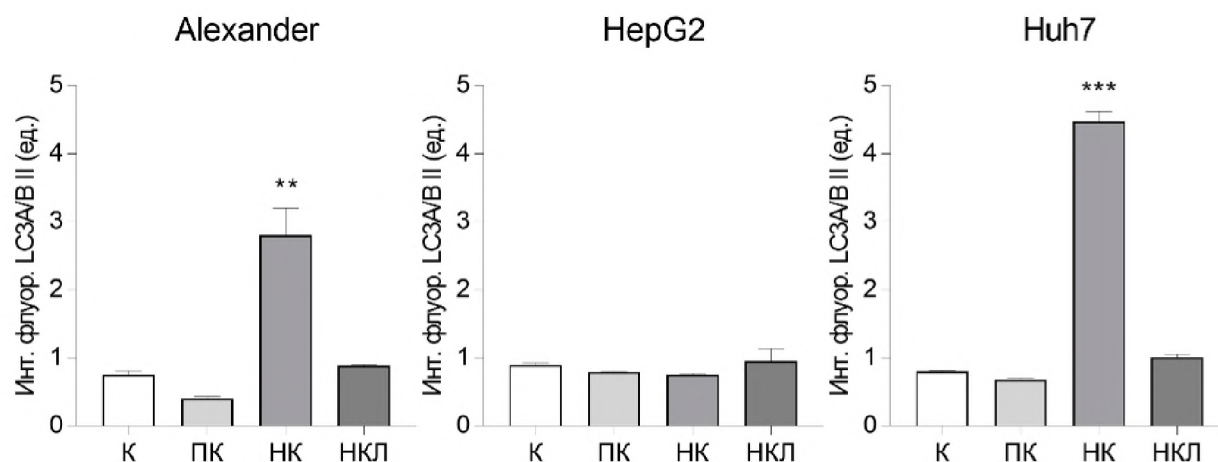


Рисунок 23. Липидация LC3 в клетках Alexander и Huh7 после воздействия НК и НКЛ. Данные получены методом денситометрии результатов иммуноблота. Уровень статистической значимости данных между контрольной и экспериментальной группами представлен звездочками («**» для $p < 0,01$, «***» для значения $p < 0,001$). Денситометрический анализ проведен с использованием программного обеспечения ImageJ software (National Institutes of Health, США).

На следующем этапе был проанализирован уровень экспрессии гена LC3 с помощью метода ПЦР в реальном времени (рис. 24, раздел 2.2.12). Проведенный анализ подтвердил данные, полученные с помощью вестерн-блоттинга ранее. Выявлена активация гена LC3 в клетках Alexander и Huh7, но не в клетках HepG2, после воздействия НК.

Чтобы подтвердить индукцию аутофагии в ответ на воздействие НК, был использован иммунофлуоресцентный анализ с использованием антитела к LC3A/B в ходе микроскопического анализа (раздел 2.2.7). На полученных изображениях (рис. 24) были обнаружены позитивно окрашенные флуоресцирующие точки, представляющие собой скопления LC3A/B-специфичных антител и являющиеся маркерами аутофагосом [194]. Таким образом выявлено массовое образование аутофагосом в клетках Alexander и Huh7 после воздействия НК. В клетках HepG2, напротив, данный процесс не был зарегистрирован (рис. 25).

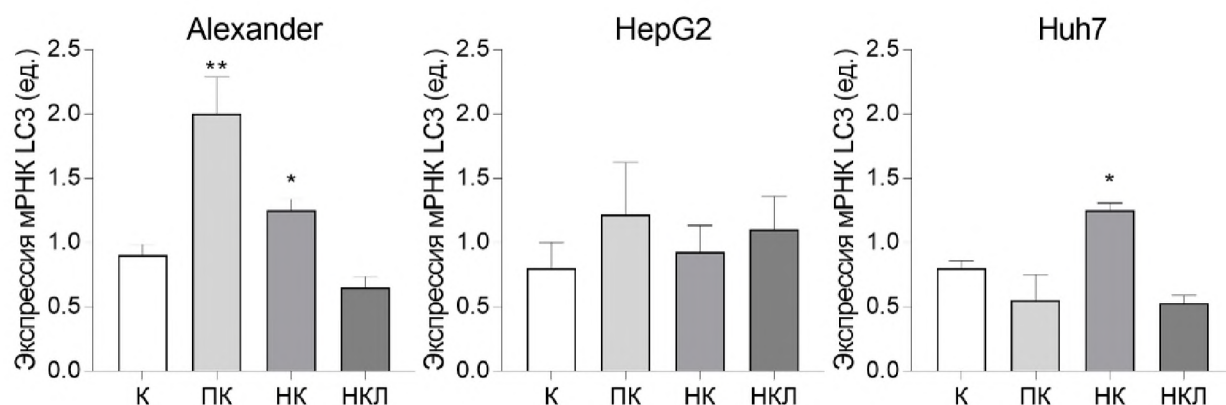


Рисунок 24. Активация экспрессии гена LC3 в клетках Alexander и Huh7 после воздействия НК и НКЛ (100 мкг/мл) в течение 24 ч. Уровень экспрессии в клеточной линии HepG2 остался без изменений. Для ПК клетки были проинкубированы 3 мкМ раствором стауроспорина в течение 3 ч. Уровень статистической значимости данных между контрольной и экспериментальной группами представлен звездочками («*» для $p < 0,05$, «**» для $p < 0,01$).

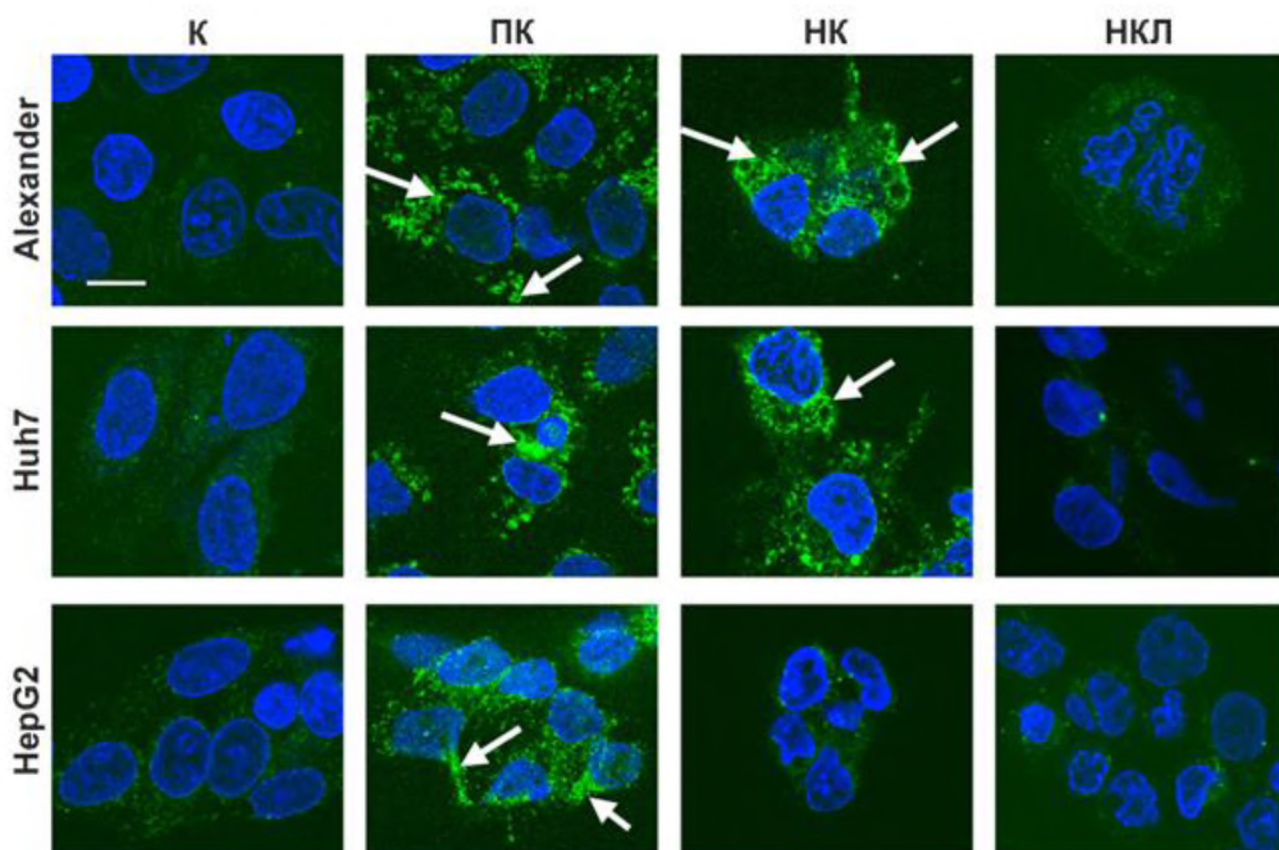


Рисунок 25. Образование аутофагосом в клетках Alexander и Huh7 после 24 ч воздействия НК. Изображения окрашенных клеток были получены с использованием конфокальной микроскопии высокого разрешения. Белые стрелки указывают на скопления аутофагосом. Размер шкалы – 10 мкм.

Согласно данным, полученным с использованием тестов цитотоксичности (рис. 12 – 14), экспериментов с оценкой ранних признаков апоптоза (рис. 15) и выживаемости клеток (рис. 16), исследования изменений клеточной морфологии (рис. 17), анализа активации Каспазы-3 (рис. 19), изучения изменения морфологии митохондрий (рис. 20) и их мембранного потенциала (рис. 21), оценки трансформации LC3-II (рис. 22 – 23), анализа экспрессии гена LC3 (рис. 24) и визуализации процесса образования аутофагосом (рис. 25), можно сделать вывод, что НК индуцируют аутофагический тип клеточной смерти в клеточных линиях Alexander и Huh7. НКЛ, напротив, запускают процессы апоптоза в клетках Alexander и Huh7. Отметим, что в случае с клетками HepG2, воздействие НК и НКЛ приводит к апоптозу. При этом клетки HepG2 демонстрируют более высокие уровни экспрессии Bcl-2, по сравнению клеточными линиями Alexander и Huh7 [116,117,195,196]. Данный факт согласуется с результатами экспериментов, поскольку Bcl-2 является блокатором аутофагии [197–199]. Полученные результаты могут объяснить причины преимущественной активации апоптотических процессов, нежели аутофагии в клетках HepG2, после воздействия НК и НКЛ.

3.2.3 НК и НКЛ индуцируют прогрессивную пермеабиллизацию лизосомальных мембран

На данном этапе исследования оставался открытым вопрос различия в действии химически идентичных НК и НКЛ на активацию механизмов клеточной смерти в клеточных линиях Alexander и Huh7. Согласно современным представлениям, индукция аутофагии под влиянием НЧОЖ инициируется с лизосомального уровня [189–192,200].

Известно, что НЧ способны индуцировать пермеабиллизацию лизосомальных мембран (ПЛМ) [40]. Данный процесс представляет собой повреждение лизосомальных мембран, которое приводит к высвобождению содержимого в цитозоль. Массивная утечка лизосомального содержимого приводит к повышению кислотности цитозоля и неконтролируемому разрушению клеточных компонентов.

Данный процесс усугубляется с течением времени и приводит к переключениям клеточных сигнальных путей между аутофагией и апоптозом [40]. Последующее состояние клеток зависит от количества дестабилизированных лизосом и, соответственно, интенсивности протекания ПЛМ. ПЛМ может быть инициирована различными путями: проапoptотическими факторами семейства Bcl-2, АФК, НЧ, а также другими факторами, вызывающими порообразующее (пермеабилзирующее) воздействие на лизосомальную мембрану [135].

На этом основании была выдвинута гипотеза, что индукция различных сценариев клеточной смерти под воздействием НК и НКЛ, связана с активацией ПЛМ.

Для идентификации данного процесса проведен анализ морфологии лизосом клеток, после воздействия НК и НКЛ в течение 24 ч (рис. 26), а также внутриклеточной локализации НЧ (рис. 27). На изображениях, полученных с помощью конфокальной микроскопии, обнаружены дестабилизированные (поврежденные) лизосомы в клеточных линиях Alexander, HepG2 и Huh7. На изображениях (рис. 26 – рис. 27) обнаружены флуоресцентные НК и НКЛ, локализованные в цитоплазме клеток, что подтверждает внутриклеточную интернализацию исследованных НЧ. Также обнаружено изменение окраски лизосом в клетках, культивированных с НЧ. Данные изменения вызваны локализацией НК и НКЛ в лизосомах экспериментальных клеток (рис. 26 и рис. 27, желтый цвет). Как видно из рисунков, воздействие НК и НКЛ в концентрации 100 мкг / мл в течение 24 ч вызывает дестабилизацию и нарушение целостности лизосом в клетках Alexander, HepG2 и Huh7.

На следующем этапе исследования, с помощью конфокальной микроскопии было оценено изменение размера лизосом в клеточных линиях Alexander, HepG2 и Huh7 после культивирования с НК и НКЛ в течение 24 ч. Обнаружено, что воздействие как НК, так и НКЛ приводило к набуханию и укрупнению лизосом во всех трёх клеточных линиях, что является индикатором дестабилизации данных структур (рис. 28).

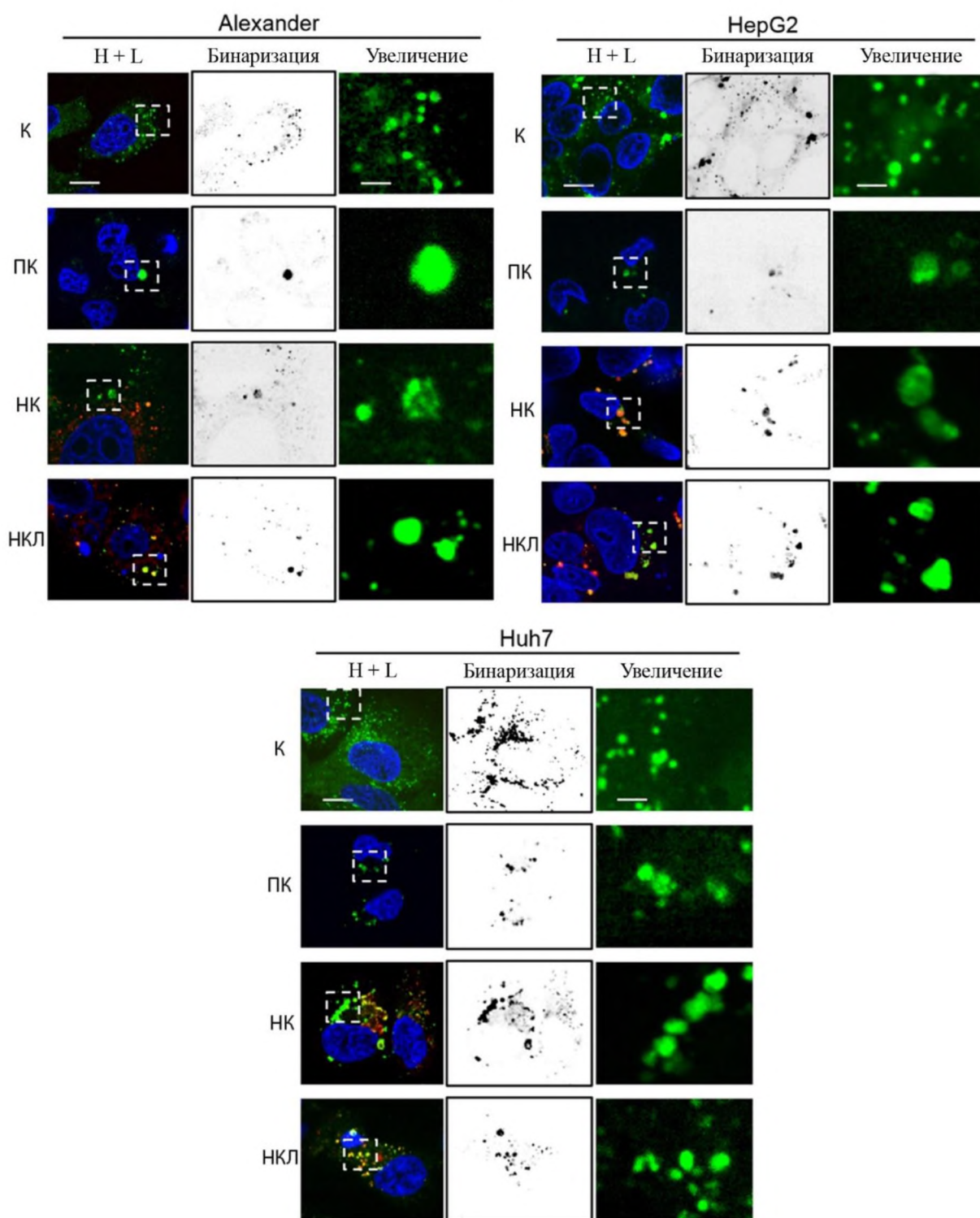


Рисунок 26. Воздействие НК и НКЛ в концентрации 100 мкг / мл в течение 24 ч вызывает дестабилизацию и нарушение целостности лизосом в клетках Alexander, HepG2 и Huh7. Размер шкалы составляет 10 мкм. Используются красители клеточных ядер (Hoechst 33342, синий) и лизосом (LysoTracker, зеленый). НК и НКЛ модифицированы флуоресцентными метками (Cy5, красный). В колонке «Увеличение» представлены увеличенные изображения лизосом (размер шкалы – 2 мкм). В колонке «Бинаризация» указаны бинаризованные изображения лизосом. Желтый цвет указывает на колокализацию наночастиц и лизосом. Для ПК

клетки были проинкубированы в 20% растворе этанола. Изображения получены с использованием конфокальной микроскопии высокого разрешения.

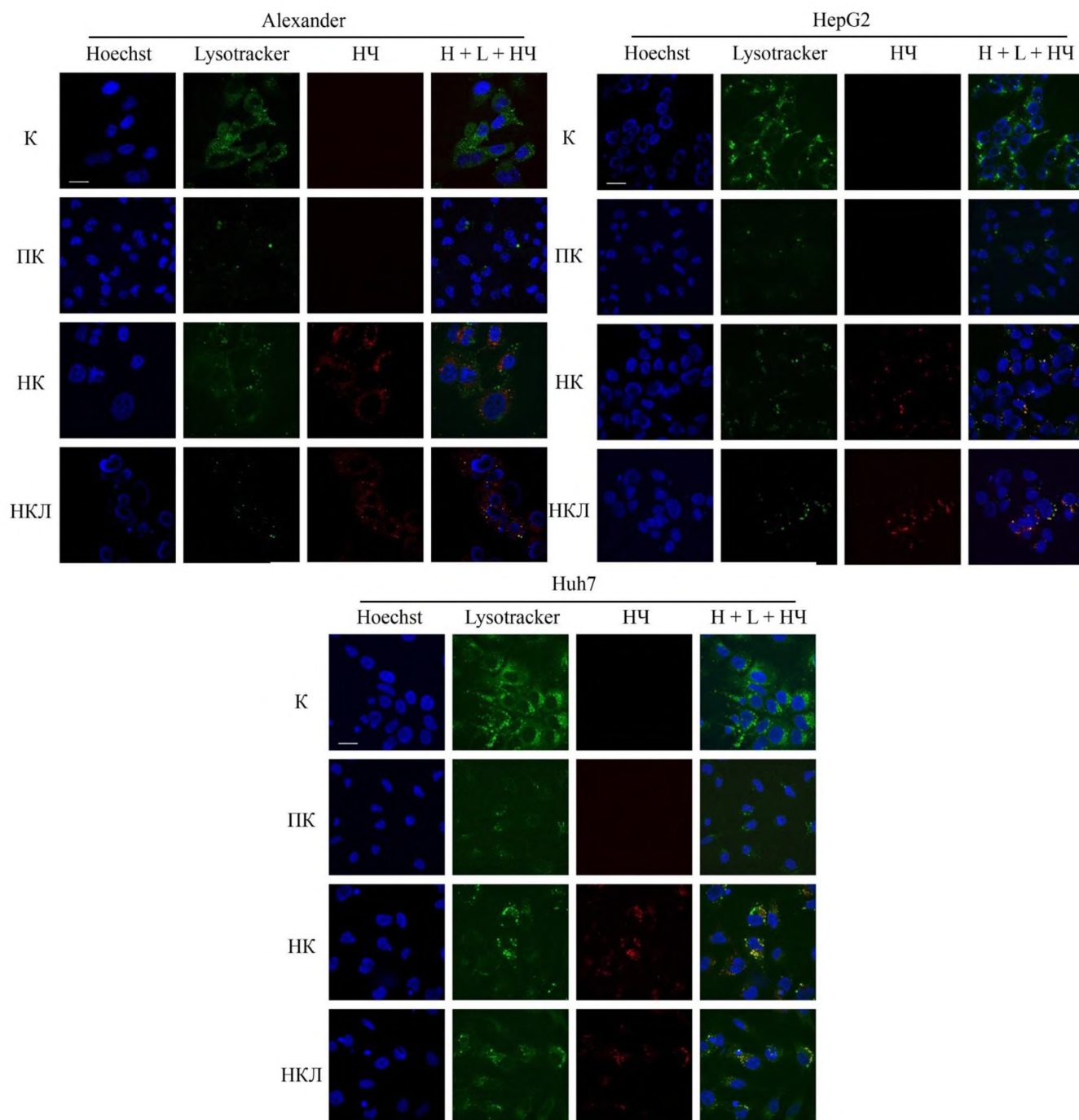


Рисунок 27. Колокализация НК и НКЛ (красный) и лизосом (зеленый) в клетках Alexander, HepG2 и Huh7. Экспериментальные клетки прокультивированы в течение 24 ч с НК и НКЛ в концентрации 100 мкг/мл. Для окрашивания клеточных ядер (синий) и лизосом использованы красители Hoechst 33342 и Lysotracker, соответственно. Желтый цвет служит индикатором локализации НК и НКЛ в лизосомах. Для ПК клетки были проинкубированы с 20% раствором этанола в течение 20 мин. Изображения получены с использованием конфокальной микроскопии высокого разрешения.

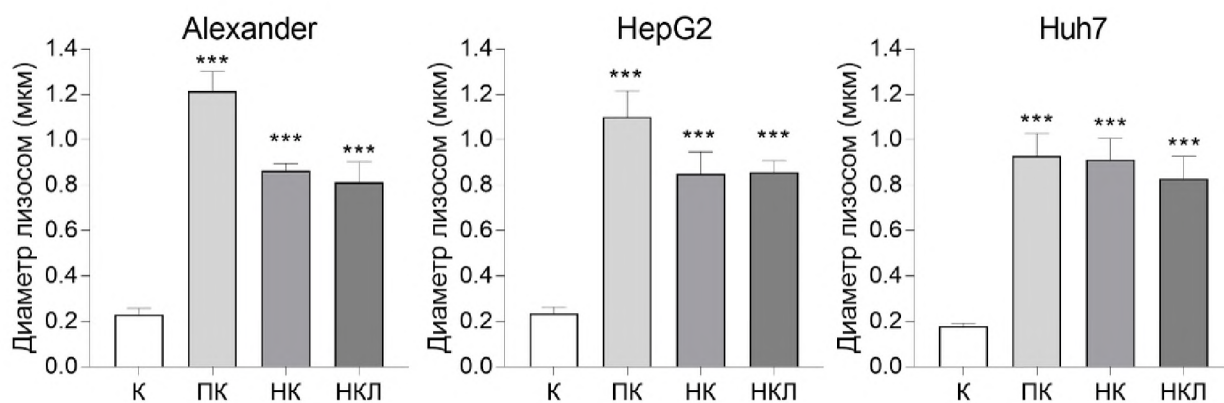


Рисунок 28. Изменение размера лизосом (набухание) в клеточных линиях Alexander, HepG2 и Huh7 после культивирования в течение 24 ч с НК и НКЛ в концентрации 100 мкг / мл. Клетки окрашены флуоресцентным красителем LysoTracker. Данные получены с использованием спиннинг-диск конфокальной микроскопии высокого разрешения IXplore SpinSR (Olympus).

Далее была оценена интенсивность флуоресценции красителя LysoTracker в экспериментальных клетках для определения интенсивности протекания ПЛМ. Обнаружено, что НК индуцировали более высокий уровень ПЛМ в клетках Alexander и Huh7 по сравнению с НКЛ (рис. 29). Стоит отметить, что воздействие НК и НКЛ продемонстрировало сходный уровень индукции ПЛМ. Таким образом, данные показывают, что НК и НКЛ индуцируют ПЛМ, имеющую прогрессирующий характер и приводящую к аутофагии или апоптозу в клетках Alexander и Huh7. НК и НКЛ вызывают аналогичный уровень ПЛМ в клетках HepG2, однако, это приводит только к апоптотическому пути клеточной гибели.

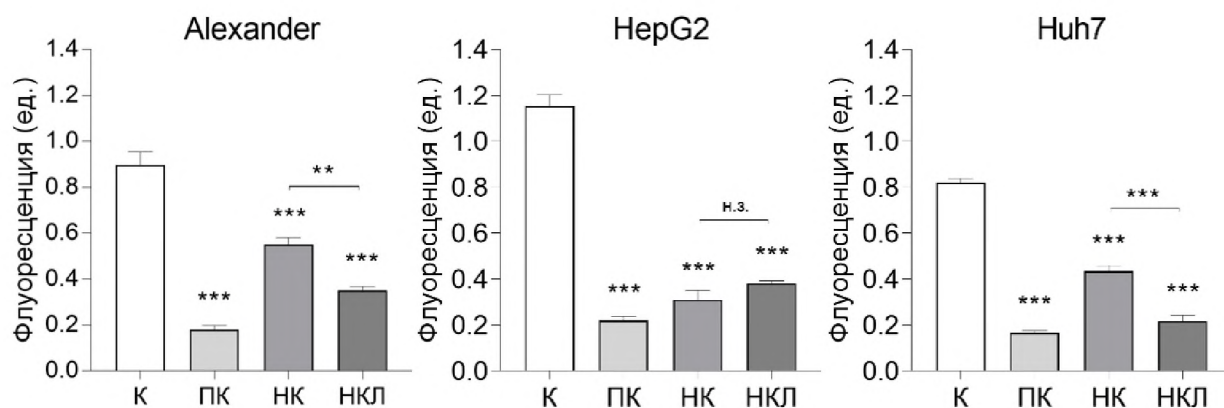


Рисунок 29. Индукция ПЛМ в клетках Alexander, HepG2 и Huh7 в результате воздействия НК и НКЛ в течение 24 в концентрации 100 мкг / мл. Клетки окрашены флуоресцентным красителем LysoTracker. Данные получены с использованием

спиннинг-диск конфокальной микроскопии высокого разрешения IXplore SpinSR (Olympus).

Таким образом, в клетках HepG2 воздействие НК и НКЛ запускало апоптотический сценарий клеточной гибели (рис. 30). В то же время, воздействие НК на клетки Alexander и Huh7 индуцировало аутофагию. НКЛ, напротив вызывали апоптоз в клетках Alexander и Huh7. Известно, что уровень экспрессии Bcl-2 в клетках HepG2, выше чем в клетках Alexander и Huh7 [117,195,196], при этом Bcl-2 ингибирует процессы аутофагии [197–199]. Так как процессы апоптоза и аутофагии взаимосвязаны [94,201], экспрессия Bcl-2 в клетках HepG2 приводит к индукции апоптоза, а не аутофагии, после воздействия НК и НКЛ. Высокий уровень экспрессии Bcl-2 ингибирует течение аутофагического потока в клетках HepG2, после воздействия НК и НКЛ. Однако, ПЛМ вызванная действием НЧ усугубляется со временем и приводит к апоптозу. Таким образом, генетические особенности имеют решающее значение в определении характера клеточного ответа на воздействие НЧОЖ.

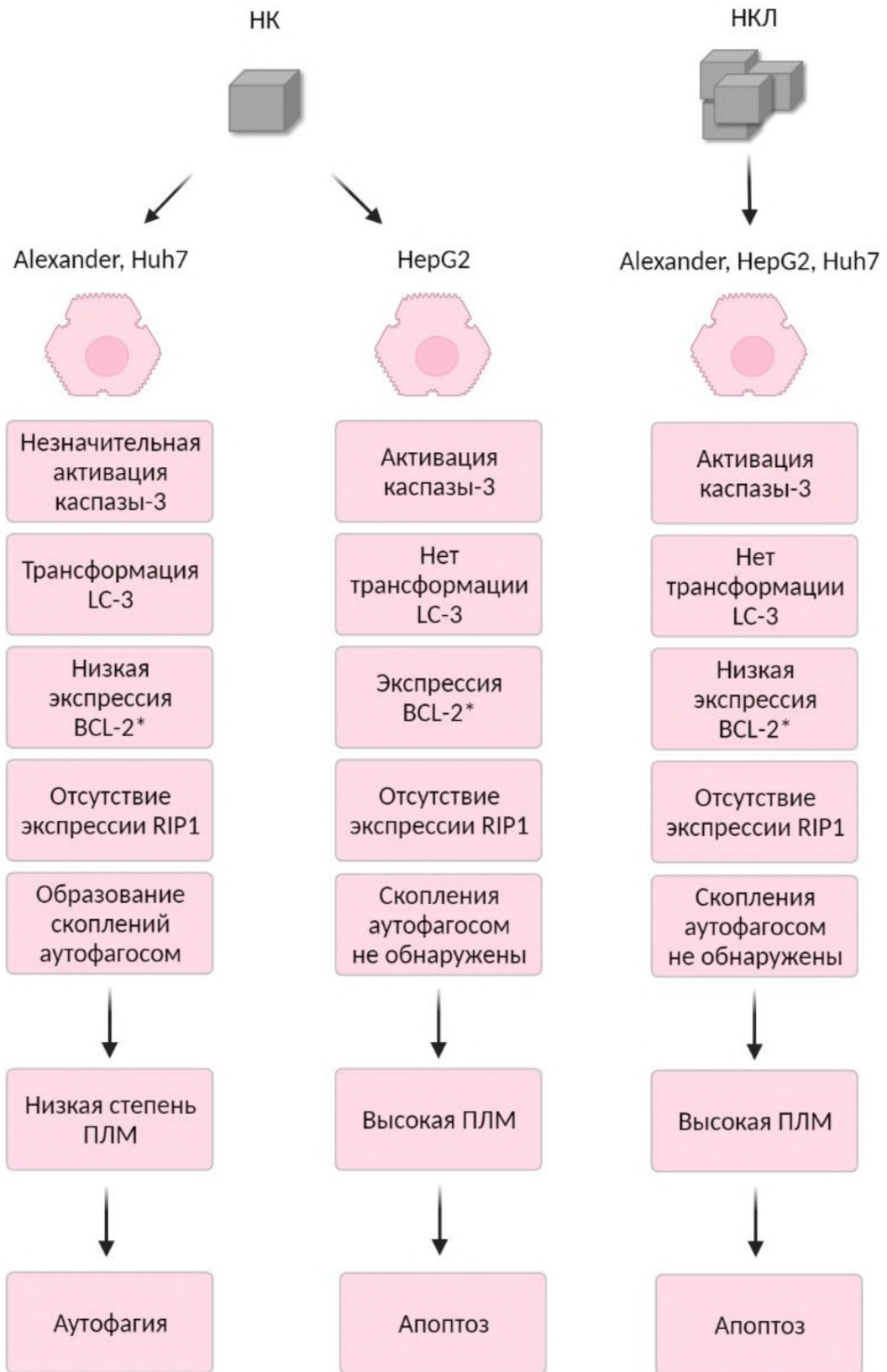


Рисунок 30. Схема индукции аутофагии и апоптоза в клетках Alexander, HepG2 и Huh7, после воздействия НК и НКЛ. Данные по экспрессии Bcl-2 представлены из литературных источников [117,195,196].

4. ВЫВОДЫ

- 1) НЧМ ингибируют жизнеспособность клеток Т-клеточной лимфомы человека, при этом цитотоксическое воздействие связано с их интернализацией в клетки Jurkat и сопутствующей генерацией АФК (оксидативным стрессом). Интернализация НЧМ приводит к увеличению гранулярности субпопуляций клеток Jurkat. Приложение внешнего постоянного МП умеренной напряжённости увеличивает цитотоксический эффект НЧМ.
- 2) Воздействие НЧМ вне источников магнитного поля и с приложением внешнего магнитного поля умеренной напряженности не оказывает цитотоксического воздействия на моноклеарные клетки крови человека, в отличие от выраженного цитотоксического эффекта в клетках Jurkat.
- 3) Воздействие НК и НКЛ на клеточные линии Alexander, HepG2 и Huh7 вызывает цитотоксический эффект, усиливающийся при повышении концентрации НЧ. Характер клеточного ответа зависит от формы НЧ - НК и НКЛ индуцируют различные виды клеточного ответа (апоптоз, аутофагия) опухолевых клеточных линий.
- 4) НК, вызывают более слабую пермеабиллизацию лизосомальных мембран, по сравнению с НКЛ, что приводит к аутофагии в клеточных линиях Alexander и Huh7. НКЛ, напротив, индуцируют более интенсивную пермеабиллизацию лизосомальных мембран, что приводит к апоптозу в клетках Alexander и Huh7, вызванного массивным повреждением мембран.
- 5) Характер клеточного ответа на воздействие НК и НКЛ зависит от генетических особенностей клеток. Это продемонстрировано на клеточной линии HepG2, обладающей повышенным уровнем экспрессии Bcl-2, ингибирующего процессы аутофагии. Данный фактор привёл к формированию апоптоза в клетках HepG2, после воздействия НК и НКЛ.

5. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мустафаев Х.М. Биотехнология в биомедицине : прогресс и перспективы *Biotechnology in biomedicine : progress and prospects*. 2023. Vol. 4, № 12. С. 118–128.
2. Khan S. et al. A review on nanotechnology: Properties, applications, and mechanistic insights of cellular uptake mechanisms // *Journal of Molecular Liquids*. Elsevier B.V., 2021. P. 118008.
3. Selmani A., Kovačević D., Bohinc K. Nanoparticles: From synthesis to applications and beyond // *Advances in Colloid and Interface Science*. Elsevier BV, 2022. Vol. 303. P. 102640.
4. Gambino G., Gambino T., Angelovski G. Combination of bioresponsive chelates and perfluorinated lipid nanoparticles enables: In vivo MRI probe quantification // *Chemical Communications*. Royal Society of Chemistry, 2020. Vol. 56, № 66. P. 9433–9436.
5. Gao Y. et al. Size and Charge Adaptive Clustered Nanoparticles Targeting the Biofilm Microenvironment for Chronic Lung Infection Management // *ACS Nano*. 2020. Vol. 14, № 5. P. 5686–5699.
6. Hu Y. et al. Scaffolds with anisotropic structure for neural tissue engineering // *Engineered Regeneration*. Elsevier B.V., 2022. Vol. 3, № 2. P. 154–162.
7. Omelyanchik A. et al. Boosting magnetoelectric effect in polymer-based nanocomposites // *Nanomaterials*. 2021. Vol. 11, № 5.
8. Nandhini G., Shobana M.K. Role of ferrite nanoparticles in hyperthermia applications // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. Elsevier B.V., 2022. Vol. 552, № March. P. 169236.
9. Dadfar S.M. et al. Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications // *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2019. Vol. 138. P. 302–325.
10. Li Y. et al. Surface-enhanced Raman nanoparticles for tumor theranostics applications // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. Elsevier B.V., 2018. Vol. 8, № 3. P. 349–359.

11. Omelyanchik A. et al. Design of Conductive Microwire Systems for Manipulation of Biological Cells // *IEEE Transactions on Magnetics*. 2018. Vol. 54, № 6. P. 2–6.
12. Ashkarran A.A., Mahmoudi M. Magnetic Levitation Systems for Disease Diagnostics // *Trends in Biotechnology*. Elsevier Ltd, 2021. Vol. 39, № 3. P. 311–321.
13. Omelyanchik A. et al. Ferromagnetic glass-coated microwires for cell manipulation // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. Elsevier B.V., 2020. Vol. 512, № May. P. 166991.
14. Krishnan K.M. Fundamentals and applications of magnetic materials. Oxford University Press, 2016.
15. Liu X.L. et al. Magnetic Nanomaterials for Advanced Regenerative Medicine: The Promise and Challenges // *Advanced Materials*. 2019. Vol. 31, № 45. P. 1–13.
16. Andreas K. et al. Highly efficient magnetic stem cell labeling with citrate-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for MRI tracking // *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 2012. Vol. 33, № 18. P. 4515–4525.
17. Soenen S.J.H. et al. Cytotoxic effects of iron oxide nanoparticles and implications for safety in cell labelling // *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 2011. Vol. 32, № 1. P. 195–205.
18. Ahrens E.T., Bulte J.W.M. Tracking immune cells in vivo using magnetic resonance imaging // *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 2013. Vol. 13, № 10. P. 755–763.
19. Huang C.Y. et al. Magnetic micro/nano structures for biological manipulation // *Spin*. 2016. Vol. 6, № 1. P. 1–7.
20. Pandey D.K. et al. Iron oxide nanoparticles loaded smart hybrid hydrogel for anti-inflammatory drug delivery: Preparation and characterizations // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. Elsevier B.V., 2022. Vol. 650, № July. P. 129631.
21. Kurawattimath V., Wilson B., Geetha K.M. Nanoparticle-based drug delivery across the blood-brain barrier for treating malignant brain glioma // *OpenNano*. Elsevier Inc., 2023. Vol. 10, № December 2022. P. 100128.

22. Chen J., Cong X. Surface-engineered nanoparticles in cancer immune response and immunotherapy: Current status and future prospects // *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS, 2023. Vol. 157, № October 2022. P. 113998.
23. Hsiao J.K. et al. Macrophage physiological function after superparamagnetic iron oxide labeling // *NMR in Biomedicine*. 2008. Vol. 21, № 8. P. 820–829.
24. Oude Engberink R.D. et al. Comparison of SPIO and USPIO for in vitro labeling of human monocytes: MR detection and cell function // *Radiology*. 2007. Vol. 243, № 2. P. 467–474.
25. Lunov O. et al. The effect of carboxydextran-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles on c-Jun N-terminal kinase-mediated apoptosis in human macrophages // *Biomaterials*. 2010. Vol. 31, № 19. P. 5063–5071.
26. Lunov O. et al. Lysosomal degradation of the carboxydextran shell of coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles and the fate of professional phagocytes // *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 2010. Vol. 31, № 34. P. 9015–9022.
27. Erofeev A. et al. Novel method for rapid toxicity screening of magnetic nanoparticles // *Scientific Reports*. Springer US, 2018. Vol. 8, № 1. P. 1–11.
28. Patil R.M. et al. Comprehensive cytotoxicity studies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles // *Biochemistry and Biophysics Reports*. Elsevier B.V., 2018. Vol. 13, № December 2017. P. 63–72.
29. Bae J.E. et al. The effect of static magnetic fields on the aggregation and cytotoxicity of magnetic nanoparticles // *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 2011. Vol. 32, № 35. P. 9401–9414.
30. Feng Q. et al. Uptake, distribution, clearance, and toxicity of iron oxide nanoparticles with different sizes and coatings // *Scientific Reports*. Springer US, 2018. Vol. 8, № 1. P. 1–14.
31. Wang Y.-X.J. Superparamagnetic iron oxide based MRI contrast agents: Current status of clinical application. // *Quantitative imaging in medicine and surgery*. 2011. Vol. 1, № 1. P. 35–40.
32. Wáng Y.X.J., Idée J.M. A comprehensive literatures update of clinical researches

- of superparamagnetic resonance iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging // *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*. 2017. Vol. 7, № 1. P. 88–122.
33. Bobo D. et al. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date // *Pharmaceutical Research*. Pharmaceutical Research, 2016. Vol. 33, № 10. P. 2373–2387.
 34. Kendall M., Lynch I. Long-term monitoring for nanomedicine implants and drugs // *Nature Nanotechnology*. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 11, № 3. P. 206–210.
 35. Adeyemi J.A. et al. Cytotoxicity, mutagenicity, oxidative stress and mitochondrial impairment in human hepatoma (HepG2) cells exposed to copper oxide, copper-iron oxide and carbon nanoparticles. // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Elsevier Inc., 2020. Vol. 189, № November 2019. P. 109982.
 36. Frtús A. et al. Analyzing the mechanisms of iron oxide nanoparticles interactions with cells: A road from failure to success in clinical applications // *Journal of Controlled Release*. Elsevier, 2020. Vol. 328, № May. P. 59–77.
 37. Nikzamir M., Akbarzadeh A., Panahi Y. An overview on nanoparticles used in biomedicine and their cytotoxicity // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. Elsevier B.V., 2021. Vol. 61, № August 2020. P. 102316.
 38. Nikzamir M., Akbarzadeh A., Panahi Y. An overview on nanoparticles used in biomedicine and their cytotoxicity // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. Elsevier B.V., 2021. Vol. 61, № December 2020. P. 102316.
 39. Dawidczyk C.M. et al. State-of-the-art in design rules for drug delivery platforms: Lessons learned from FDA-approved nanomedicines // *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V., 2014. Vol. 187. P. 133–144.
 40. Wang F., Salvati A., Boya P. Lysosome-dependent cell death and deregulated autophagy induced by amine-modified polystyrene nanoparticles // *Open Biology*. 2018. Vol. 4, № 8.
 41. Gaharwar U.S., Meena R., Rajamani P. Iron oxide nanoparticles induced cytotoxicity, oxidative stress and DNA damage in lymphocytes // *Journal of*

- Applied Toxicology. 2017. Vol. 37, № 10. P. 1232–1244.
42. Gupta V. et al. Basic and applied aspects of biotechnology // Basic and Applied Aspects of Biotechnology. 2016. P. 1–520.
 43. Кудрявцева О. В., Яковлева Е. Ю. Биотехнологические Отрасли В России И Море: Типология И Развитие // Современные Технологии Управления. 2014. Vol. 7, № 43. С. 1–7.
 44. Khalil M., Kadja G.T.M., Ilmi M.M. Advanced nanomaterials for catalysis: Current progress in fine chemical synthesis, hydrocarbon processing, and renewable energy // Journal of Industrial and Engineering Chemistry. The Korean Society of Industrial and Engineering Chemistry, 2021. Vol. 93. P. 78–100.
 45. Umapathy V.R. et al. Current trends and future perspectives on dental nanomaterials – An overview of nanotechnology strategies in dentistry // Journal of King Saud University - Science. The Author(s), 2022. Vol. 34, № 7. P. 102231.
 46. Kuda A., Yadav M. Opportunities and challenges of using nanomaterials and nanotechnology in architecture: An overview // Materials Today: Proceedings. Elsevier Ltd, 2022. Vol. 65. P. 2102–2111.
 47. Ajith M.P. et al. Recent innovations of nanotechnology in water treatment: A comprehensive review // Bioresource Technology. Elsevier Ltd, 2021. Vol. 342, № September. P. 126000.
 48. Khan A. et al. Nanomaterials: An alternative source for biodegradation of toxic dyes // Food and Chemical Toxicology. Elsevier Ltd, 2022. Vol. 164, № January. P. 112996.
 49. Ghosh T., Raj G.V.S.B., Dash K.K. A comprehensive review on nanotechnology based sensors for monitoring quality and shelf life of food products // Measurement: Food. Elsevier Ltd, 2022. Vol. 7, № February. P. 100049.
 50. Feugang J.M. et al. Treatment of boar sperm with nanoparticles for improved fertility // Theriogenology. Elsevier Ltd, 2019. Vol. 137. P. 75–81.
 51. İnada A.A., Arman S., Safaei B. A novel review on the efficiency of nanomaterials for solar energy storage systems // Journal of Energy Storage. 2022. Vol. 55, № April. P. 105661.

52. Martuzzi M., Hansen S.F., Grieger K. Nanotechnology and Human Health: Scientific Evidence and Risk Governance // ISEE Conference Abstracts. 2014. Vol. 2014, № 1.
53. Pokrajac L. et al. Nanotechnology for a Sustainable Future: Addressing Global Challenges with the International Network4Sustainable Nanotechnology // ACS Nano. 2021. Vol. 15, № 12. P. 18608–18623.
54. Abdulazeem L., Abdalkareem Jasim S., Rajab W.J. Anti-bacterial activity of gold nanoparticles against two type of antibiotic resistance pathogenic bacteria in Al-Hilla city // Materials Today: Proceedings. Elsevier Ltd, 2022. № xxxx. P. 5–8.
55. Sarkar J. et al. Antiviral potential of nanoparticles for the treatment of Coronavirus infections // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. Elsevier GmbH, 2022. Vol. 72, № September 2021. P. 126977.
56. Attia N.F. et al. Iron oxide nanoparticles and their pharmaceutical applications // Applied Surface Science Advances. Elsevier B.V., 2022. Vol. 11, № August. P. 100284.
57. Liu R. et al. Advances of nanoparticles as drug delivery systems for disease diagnosis and treatment // Chinese Chemical Letters. Elsevier B.V., 2022.
58. Barkalina N. et al. Nanotechnology in reproductive medicine: Emerging applications of nanomaterials // Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. Elsevier Inc., 2014. Vol. 10, № 5. P. e921–e938.
59. Falchi L. et al. Perspectives of nanotechnology in male fertility and sperm function // International Journal of Veterinary Science and Medicine. Elsevier B.V., 2018. Vol. 6, № 2. P. 265–269.
60. Chen F. et al. Porous Polyhydroxyalkanoates (PHA) Scaffolds with Antibacterial Property for Oral Soft Tissue Regeneration // Chemical Engineering Journal. Elsevier B.V., 2022. Vol. 451, № P3. P. 138899.
61. Selmani A., Kovačević D., Bohinc K. Nanoparticles: From synthesis to applications and beyond // Advances in Colloid and Interface Science. 2022. Vol. 303, № December 2021. P. 102640
62. Sajid M. Nanomaterials: types, properties, recent advances, and toxicity concerns //

- Current Opinion in Environmental Science and Health. Elsevier B.V., 2022. Vol. 25. P. 100319.
63. He X. et al. Bioactive 2D nanomaterials for neural repair and regeneration // Advanced Drug Delivery Reviews. 2022. Vol. 187. P. 114379.
 64. Baig N. et al. Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges // Materials Advances. Royal Society of Chemistry, 2021. Vol. 2, № 6. P. 1821–1871.
 65. Fatimah I., Fadillah G., Yudha S.P. Synthesis of iron-based magnetic nanocomposites: A review // Arabian Journal of Chemistry. The Author(s), 2021. Vol. 14, № 8. P. 103301.
 66. Chen L., Liang J. An overview of functional nanoparticles as novel emerging antiviral therapeutic agents // Materials Science and Engineering C. Elsevier, 2020. Vol. 112, № January 2019. P. 110924.
 67. Marques A.C. et al. Functionalizing nanoparticles with cancer-targeting antibodies: A comparison of strategies // Journal of Controlled Release. Elsevier, 2020. Vol. 320, № January. P. 180–200.
 68. Bharathala S., Sharma P. Biomedical applications of nanoparticles // Nanotechnology in Modern Animal Biotechnology: Concepts and Applications. Elsevier, 2019. 113–132 p.
 69. Rashidi Dafeh S., Iranmanesh P., Salarizadeh P. Fabrication, optimization, and characterization of ultra-small superparamagnetic Fe₃O₄ and biocompatible Fe₃O₄@ZnS core/shell magnetic nanoparticles: Ready for biomedicine applications // Materials Science and Engineering C. Elsevier, 2019. Vol. 98, № December 2018. P. 205–212.
 70. Materón E.M. et al. Magnetic nanoparticles in biomedical applications: A review // Applied Surface Science Advances. 2021. Vol. 6. P. 100163.
 71. Xu W. et al. Insights into the Synthesis, types and application of iron Nanoparticles: The overlooked significance of environmental effects // Environment International. 2022. Vol. 158. P. 106980.
 72. Musielak M., Piotrowski I., Suchorska W.M. Superparamagnetic iron oxide

- nanoparticles (SPIONs) as a multifunctional tool in various cancer therapies // Reports of Practical Oncology and Radiotherapy. Greater Poland Cancer Centre, 2019. Vol. 24, № 4. P. 307–314.
73. Khan S., Hossain M.K. Classification and properties of nanoparticles // Nanoparticle-Based Polymer Composites. Elsevier Ltd., 2022. P. 15–54
 74. Ansari M.O. et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles based cancer theranostics: A double edge sword to fight against cancer // Journal of Drug Delivery Science and Technology. Elsevier, 2018. Vol. 45, № March. P. 177–183.
 75. Thorat N.D. et al. Superparamagnetic iron oxide nanocargoes for combined cancer radiotherapy and MRI applications // Physical Chemistry Chemical Physics. Royal Society of Chemistry, 2016. Vol. 18, № 31. P. 21331–21339.
 76. Sachdeva V. et al. Iron Oxide Nanoparticles: The precise strategy for targeted delivery of genes, oligonucleotides and peptides in cancer therapy // Journal of Drug Delivery Science and Technology. Elsevier B.V., 2022. Vol. 74, № April. P. 103585.
 77. Lee C.S., Lee H., Westervelt R.M. Microelectromagnets for the control of magnetic nanoparticles // Applied Physics Letters. 2001. Vol. 79, № 20. P. 3308–3310.
 78. Liu Y. et al. Nanotechnology-based antimicrobials and delivery systems for biofilm-infection control // Chemical Society Reviews. Royal Society of Chemistry, 2019. Vol. 48, № 2. P. 428–446.
 79. Подколотная О.А. et al. Пути Поступления Наночастиц В Организм Млекопитающих, Их Биосовместимость И Клеточные Эффекты // Успехи Современной Биологии. 2012. Vol. 132, № 1. С. 3–15.
 80. Zhang Y.N. et al. Nanoparticle–liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination // Journal of Controlled Release. Elsevier B.V., 2016. Vol. 240. P. 332–348.
 81. Zhang Y.N. et al. Nanoparticle–liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination // Journal of Controlled Release. Elsevier B.V., 2016. Vol. 240. P. 332–348.
 82. Stefan Willhelm et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours // Nature

- Reviews Materials. 2016. Vol. 1. P. 16014.
83. Wu J. The enhanced permeability and retention (Epr) effect: The significance of the concept and methods to enhance its application // *Journal of Personalized Medicine*. 2021. Vol. 11, № 8.
 84. Golombek S.K. et al. Tumor targeting via EPR: Strategies to enhance patient responses // *Advanced Drug Delivery Reviews*. Elsevier B.V., 2018. Vol. 130. P. 17–38.
 85. Wang X. et al. Non-apoptotic cell death-based cancer therapy: Molecular mechanism, pharmacological modulators, and nanomedicine // *Acta Pharmaceutica Sinica B*. Chinese Pharmaceutical Association and Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, 2022. Vol. 12, № 9. P. 3567–3593.
 86. Chitambar C.R. The therapeutic potential of iron-targeting gallium compounds in human disease: From basic research to clinical application // *Pharmacological Research*. Elsevier Ltd, 2017. Vol. 115. P. 56–64.
 87. Sankaranarayanan S.A. et al. Iron oxide nanoparticles for theranostic applications - Recent advances // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. Elsevier B.V., 2022. Vol. 70, № September 2021. P. 103196.
 88. Gambhir R.P., Rohiwal S.S., Tiwari A.P. Multifunctional surface functionalized magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications: A review // *Applied Surface Science Advances*. Elsevier B.V., 2022. Vol. 11, № September. P. 100303.
 89. Kim W. et al. Therapeutic strategies of three-dimensional stem cell spheroids and organoids for tissue repair and regeneration // *Bioactive Materials*. KeAi Communications Co., Ltd, 2023. Vol. 19, № March 2022. P. 50–74.
 90. Galluzzi L. et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 // *Cell Death and Differentiation*. 2018. Vol. 25, № 3. P. 486–541.
 91. Solano-Gálvez S. et al. Apoptosis: Activation and Inhibition in Health and Disease // *Medical Sciences*. 2018. Vol. 6, № 3. P. 54.
 92. Deev R. V., Bilyalov A.I., Zhampeisov T.M. Modern ideas about cell death // *Genes and Cells*. 2018. Vol. 13, № 1. P. 6–19.

93. Carneiro B.A., El-Deiry W.S. Targeting apoptosis in cancer therapy // *Nature Reviews Clinical Oncology*. Springer US, 2020. Vol. 17, № 7. P. 395–417.
94. Nikolettoulou V. et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V., 2013. Vol. 1833, № 12. P. 3448–3459.
95. Davila J.C., Levin S., Radi Z.A. Cell Injury and Necrosis // *Comprehensive Toxicology*. Third Edit. Elsevier, 2018. 404–453 p.
96. Tamura M., Matsuzuka T. Anchorage-Independent Cell Growth // *Encyclopedia of Cancer*. 2011. 173 p.
97. Луговая А. В., Эмануэль В.С., Артемова А.В. М.В.Ф. СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ АУТОФАГИИ И АПОПТОЗА ПРИ ОСТРОМ ИШЕМИЧЕСКОМ ИНСУЛЬТЕ // *Современные проблемы науки и образования*. 2020. № №4 2020. С. 112–112.
98. Buttitta L.A., Edgar B.A. Mechanisms controlling cell cycle exit upon terminal differentiation // *Current Opinion in Cell Biology*. 2007. Vol. 19, № 6. P. 697–704.
99. Sepand M.R. et al. Targeting non-apoptotic cell death in cancer treatment by nanomaterials: Recent advances and future outlook // *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. Elsevier Inc., 2020. Vol. 29. P. 102243.
100. Zhang Y. et al. The toxicity mechanism of different sized iron nanoparticles on human breast cancer (MCF7) cells // *Food Chemistry*. Elsevier, 2021. Vol. 341, № February 2020. P. 128263.
101. Patil R.M. et al. Comprehensive cytotoxicity studies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles // *Biochemistry and Biophysics Reports*. Elsevier B.V., 2018. Vol. 13, № December 2017. P. 63–72.
102. Paunovic J. et al. Iron-based nanoparticles and their potential toxicity: Focus on oxidative stress and apoptosis // *Chemico-Biological Interactions*. 2020. Vol. 316, № December 2019.
103. Ranji-Burachaloo H. et al. Cancer Treatment through Nanoparticle-Facilitated Fenton Reaction // *ACS Nano*. 2018. Vol. 12, № 12. P. 11819–11837.
104. Кулинич Т.М., Иванов А.В., Захаренко М.В., Джикия Е.Л., Шишкин А.М.

- Б.В.К.Ф. Интернализуемые пептиды (cell-penetrating peptides, CPPs) и возможности их терапевтического применения // ВЕСТНИК РОССИЙСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА РЕНТГЕНОРАДИОЛОГИИ. 2020. С. 106–126.
105. Omelyanchik A. et al. Magnetic and Optical Properties of Gold-Coated Iron Oxide Nanoparticles // Journal of Nanoscience and Nanotechnology. 2019. Vol. 19, № 8. P. 4987–4993.
 106. Pshenichnikov S. et al. Control of oxidative stress in Jurkat cells as a model of leukemia treatment // Journal of Magnetism and Magnetic Materials. Elsevier B.V., 2021. Vol. 523, № December 2020. P. 167623.
 107. Levada K. et al. Progressive lysosomal membrane permeabilization induced by iron oxide nanoparticles drives hepatic cell autophagy and apoptosis // Nano Convergence. Springer Singapore, 2020. Vol. 7, № 1. P 17.
 108. Дроздов А.С., Богатырев В.А. Общие Принципы Работы С Клеточными Линиями // Методы Работы С Клеточными Культурами И Определение Токсичности Наноматериалов. 2019. С. 13.
 109. CLS Product Information: HuH7 // CLS Cell Lines Service GmbH, Dr Eckener-StraSe 8 - 69214 Eppelheim - Germany. [Electronic resource]. URL: <https://cls.shop/HuH7/300156>.
 110. CLS Product Information: HepG2 [Electronic resource] // CLS Cell Lines Service GmbH - Dr.Eckener-StraSe 8 - 69214 Eppelheim - Germany. URL: <https://cls.shop/HepG2/300198>.
 111. CLS Product Information: PLC/PRF/5 [Electronic resource] // CLS Cell Lines Service GmbH - Dr -Eckener-Stralie 8 - 69214 Eppelheim - Germany. URL: <https://cls.shop/PLC-PRF-5/300315>.
 112. ATCC Product Sheet Jurkat // Protocol TIB 152, American Type Culture Collection. 2014. P. 1–3.
 113. Invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc.), Countess II FL automated cell counter User Guide // Pub.No. MAN0010644 E.0) // ThermoFisher Scientific. 2019. P. 1–82.
 114. Biotec M., Bio-one G. Isolation of mononuclear cells from human peripheral blood

- by density gradient centrifugation // Cell. P. 1–2.
115. Roche. Cell Proliferation Reagent WST-1 // Content Version: January 2021. 2021. Vol. 13. P. 1–13.
 116. Lunova M. et al. Light-induced modulation of the mitochondrial respiratory chain activity: possibilities and limitations // Cellular and Molecular Life Sciences. Springer International Publishing, 2020. Vol. 77, № 14. P. 2815–2838.
 117. Smolková B. et al. Non-thermal plasma, as a new physicochemical source, to induce redox imbalance and subsequent cell death in liver cancer cell lines // Cellular Physiology and Biochemistry. 2019. Vol. 52, № 1. P. 119–140.
 118. Invitrogen. Invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc.) alamarBlue® Cell Viability Reagent //User Guide MP 01025 16–July–2008 // Copyright 2008, Molecular Probes. 2008. P. 1–10.
 119. MolecularProbesInc. Propidium Iodide Nucleic Acid Stain // Invitrogen detection technologies, Protocol MP 01304 16–March–2006. 2006.
 120. Zhang Y., Dai M., Yuan Z. Methods for the detection of reactive oxygen species // Analytical Methods. Royal Society of Chemistry, 2018. Vol. 10, № 38. P. 4625–4638.
 121. Thermo Fisher Scientific. Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V Alexa Fluor™ 488 & Propidium Iodide (PI) // Invitrogen - User Guide. 2022. Vol. MAN0002108. P. 1–3.
 122. Hamilton N. Quantification and its applications in fluorescent microscopy imaging // Traffic. 2009. Vol. 10, № 8. P. 951–961.
 123. Clark V. Sample size determination // Plastic and Reconstructive Surgery. 1991. Vol. 87, № 3. P. 569–573.
 124. Invivogen. Z-VAD-FMK Inhibitor Pan-caspase technical information // Protocol tlr1-vad. 2021. Vol. Version 21. P. 1.
 125. Lynnyk A. et al. Manipulating the mitochondria activity in human hepatic cell line Huh7 by low-power laser irradiation // Biomedical Optics Express. 2018. Vol. 9, № 3. P. 1283.
 126. Tukmachev D. et al. An effective strategy of magnetic stem cell delivery for spinal

- cord injury therapy // *Nanoscale*. 2015. Vol. 7, № 9. P. 3954–3958.
127. Gavet O., Pines J. Progressive Activation of CyclinB1-Cdk1 Coordinates Entry to Mitosis // *Developmental Cell*. Elsevier Ltd, 2010. Vol. 18, № 4. P. 533–543.
 128. Invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc.) JC-1 and JC-9 Mitochondrial Potential Sensors // User Guide MP 03168 16–March–2006 // Sensors (Peterborough, NH). 2006. P. 1–3.
 129. Lunov O. et al. Chemically different non-thermal plasmas target distinct cell death pathways // *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7, № 1. P. 600.
 130. Mahmood D.F.D. et al. Truncated thioredoxin (Trx-80) promotes pro-inflammatory macrophages of the M1 phenotype and enhances atherosclerosis // *Journal of Cellular Physiology*. 2013. Vol. 228, № 7. P. 1577–1583.
 131. Invitrogen (Thermo Fisher Scientific Inc.) User Guide SureCast™ Handcast System // Publication Number MAN0014073. 2021. P. 1–19.
 132. Schmittgen T.D., Livak K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method // *Nature Protocols*. 2008. Vol. 3, № 6. P. 1101–1108.
 133. Wubbolts R. et al. Direct vesicular transport of MHC class II molecules from lysosomal structures to the cell surface // *Journal of Cell Biology*. 1996. Vol. 135, № 3. P. 611–622.
 134. Iranpour S. et al. Application of smart nanoparticles as a potential platform for effective colorectal cancer therapy // *Coordination Chemistry Reviews*. Elsevier B.V., 2021. Vol. 442. P. 213949.
 135. Wang F., Gómez-Sintes R., Boya P. Lysosomal membrane permeabilization and cell death // *Traffic*. 2018. Vol. 19, № 12. P. 918–931.
 136. Li X. et al. Magnetic nanoparticles for cancer theranostics: Advances and prospects // *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V., 2021. Vol. 335, № February. P. 437–448.
 137. Wei D. et al. Noninvasive monitoring of nanoparticle clearance and aggregation in blood circulation by in vivo flow cytometry // *Journal of Controlled Release*. Elsevier, 2018. Vol. 278, № January. P. 66–73.
 138. Xiao J. et al. Results of a 30-day safety assessment in young mice orally exposed to

- polystyrene nanoparticles // *Environmental Pollution*. Elsevier Ltd, 2021. 118184 p.
139. Aboushoushah S. et al. Toxicity and biodistribution assessment of curcumin-coated iron oxide nanoparticles: Multidose administration // *Life Sciences*. Elsevier Inc., 2021. Vol. 277, № November 2020. P. 119625.
 140. Zelepukin I. V. et al. Fast processes of nanoparticle blood clearance: Comprehensive study // *Journal of Controlled Release*. Elsevier, 2020. Vol. 326, № July. P. 181–191.
 141. Caprifico A.E. et al. Overcoming the protein corona in chitosan-based nanoparticles // *Drug Discovery Today*. 2021. Vol. 26, № 8. P. 1825–1840.
 142. Ferretti A.M. et al. Towards bio-compatible magnetic nanoparticles: Immune-related effects, in-vitro internalization, and in-vivo bio-distribution of zwitterionic ferrite nanoparticles with unexpected renal clearance // *Journal of Colloid and Interface Science*. Elsevier Inc., 2021. Vol. 582. P. 678–700.
 143. Avila-Alejo J.O. et al. Low cytotoxicity of anisotropic gold nanoparticles coated with lysine on peripheral blood mononuclear cells “in vitro” // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Elsevier, 2017. Vol. 56, № 550. P. 210–218.
 144. Martínez-Rodríguez N.L., Tavárez S., González-Sánchez Z.I. In vitro toxicity assessment of zinc and nickel ferrite nanoparticles in human erythrocytes and peripheral blood mononuclear cell // *Toxicology in Vitro*. Elsevier, 2019. Vol. 57, № October 2018. P. 54–61.
 145. Verhoeckx K. et al. The impact of food bioactives on health: In vitro and Ex Vivo models // *The Impact of Food Bioactives on Health: In Vitro and Ex Vivo Models*. 2015. 1–327 p.
 146. Dowlath M.J.H. et al. Comparison of characteristics and biocompatibility of green synthesized iron oxide nanoparticles with chemical synthesized nanoparticles // *Environmental Research*. Elsevier Inc., 2021. Vol. 201, № May. P. 111585.
 147. Callens C. et al. Targeting iron homeostasis induces cellular differentiation and synergizes with differentiating agents in acute myeloid leukemia // *Journal of Experimental Medicine*. 2010. Vol. 207, № 4. P. 731–750.

148. Gorrini C., Harris I.S., Mak T.W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy // *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group, 2013. Vol. 12, № 12. P. 931–947.
149. Stevens M.J. et al. Oxide-dependent adhesion of the jurkat Line of T Lymphocytes // *Langmuir*. ACS Publications, 2009. Vol. 25, № 11. P. 6270–6278.
150. Litvinova L.S. et al. Imbalance of morphofunctional responses of Jurkat T lymphoblasts at short-term culturing with relief zinc-or copper-containing calcium phosphate coating on titanium // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. Springer, 2017. Vol. 472, № 1. P. 35–39.
151. Chen X. et al. Inhibition of CD147 gene expression via RNA interference reduces tumor cell proliferation, activation, adhesion, and migration activity in the human Jurkat T-lymphoma cell line // *Cancer Investigation*. 2008. Vol. 26, № 7. P. 689–697.
152. Liao H.-F. et al. Norcantharidin induces cell cycle arrest and inhibits progression of human leukemic Jurkat T cells through mitogen-activated protein kinase-mediated regulation of interleukin-2 production // *Toxicology in Vitro*. Elsevier, 2011. Vol. 25, № 1. P. 206–212.
153. Gamucci O. et al. Detection of fluorescent nanoparticle interactions with primary immune cell subpopulations by flow cytometry // *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*. 2014. № 85. P. e51345.
154. Abcam. Technical Bulletin: WST-1 Cell Proliferation Reagent (ready to use) // Version 3. 2018. № 21 December. P. 1–11.
155. Kamau S.W. et al. Enhancement of the efficiency of non-viral gene delivery by application of pulsed magnetic field // *Nucleic Acids Research*. 2006. Vol. 34, № 5.
156. Mykhaylyk O. et al. Generation of magnetic nonviral gene transfer agents and magnetofection in vitro // *Nature Protocols*. 2007. Vol. 2, № 10. P. 2391–2411.
157. Zablotskii V. et al. Nanomechanics of magnetically driven cellular endocytosis // *Applied Physics Letters*. 2011. Vol. 99, № 18. P. 1–4.
158. Del Pino P. et al. Gene silencing mediated by magnetic lipospheres tagged with

- small interfering RNA // Nano Letters. 2010. Vol. 10, № 10. P. 3914–3921.
159. Pankhurst Q.A. et al. Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine // Journal of Physics D: Applied Physics. 2009. Vol. 42, № 22.
 160. Zanganeh S. et al. Iron oxide nanoparticles inhibit tumour growth by inducing pro-inflammatory macrophage polarization in tumour tissues // Nature Nanotechnology. Nature Publishing Group, 2016. Vol. 11, № 11. P. 986–994.
 161. Shin J. et al. Cell response induced by internalized bacterial magnetic nanoparticles under an external static magnetic field // Biomaterials. 2012. Vol. 33, № 22. P. 5650–5657.
 162. Wydra R.J. et al. The role of ROS generation from magnetic nanoparticles in an alternating magnetic field on cytotoxicity // Acta Biomaterialia. Elsevier Ltd, 2015. Vol. 25. P. 284–290.
 163. Lunov O. et al. Remote actuation of apoptosis in liver cancer cells via magneto-mechanical modulation of iron oxide nanoparticles // Cancers. 2019. Vol. 11, № 12. P. 1–20.
 164. Golovin Y.I. et al. Towards nanomedicines of the future: Remote magneto-mechanical actuation of nanomedicines by alternating magnetic fields // Journal of Controlled Release. 2015. Vol. 219. P. 43–60.
 165. Martin A.L. et al. Enhanced cell uptake of superparamagnetic iron oxide nanoparticles functionalized with dendritic guanidines // Bioconjugate Chemistry. 2008. Vol. 19, № 12. P. 2375–2384.
 166. Wang Y. et al. Formulation of superparamagnetic iron oxides by nanoparticles of biodegradable polymers for magnetic resonance imaging // Advanced Functional Materials. 2008. Vol. 18, № 2. P. 308–318.
 167. Onakpoya I.J., Heneghan C.J., Aronson J.K. Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: A systematic review of the world literature // BMC Medicine. BMC Medicine, 2016. Vol. 14, № 1. P. 1–11.
 168. Hussain S.M. et al. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells // Toxicology in Vitro. 2005. Vol. 19, № 7. P. 975–983.
 169. Huang G. et al. Asialoglycoprotein receptor-targeted superparamagnetic iron oxide

- nanoparticles // *International Journal of Pharmaceutics*. 2008. Vol. 360, № 1–2. P. 197–203.
170. Shi X. et al. Synthesis, characterization, and intracellular uptake of carboxyl-terminated poly(amidoamine) dendrimer-stabilized iron oxide nanoparticles // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2007. Vol. 9, № 42. P. 5712–5720.
 171. Rosenblum D. et al. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics // *Nature Communications*. Springer US, 2018. Vol. 9, № 1.
 172. Nakamura Y. et al. Nanodrug Delivery: Is the Enhanced Permeability and Retention Effect Sufficient for Curing Cancer? // *Bioconjugate Chemistry*. 2016. Vol. 27, № 10. P. 2225–2238.
 173. Taylor R.C., Cullen S.P., Martin S.J. Apoptosis: Controlled demolition at the cellular level // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008. Vol. 9, № 3. P. 231–241.
 174. Singh R., Letai A., Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Springer US, 2019. Vol. 20, № 3. P. 175–193.
 175. Lane J.D., Allan V.J., Woodman P.G. Active relocation of chromatin and endoplasmic reticulum into blebs in late apoptotic cells // *Journal of Cell Science*. 2005. Vol. 118, № 17. P. 4059–4071.
 176. Brentnall M. et al. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis // *BMC Cell Biology*. 2013. Vol. 14, № 1. P. 32.
 177. Bae J.E. et al. The effect of static magnetic fields on the aggregation and cytotoxicity of magnetic nanoparticles // *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 2011. Vol. 32, № 35. P. 9401–9414.
 178. Vyas S., Zaganjor E., Haigis M.C. Mitochondria and Cancer // *Cell*. Elsevier Inc., 2016. Vol. 166, № 3. P. 555–566.
 179. Kinnally K.W. et al. Is mPTP the gatekeeper for necrosis, apoptosis, or both? // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. Elsevier B.V., 2011. Vol. 1813, № 4. P. 616–622.
 180. Berghe T. Vanden et al. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on

- similar cellular disintegration features // Cell Death and Differentiation. Nature Publishing Group, 2010. Vol. 17, № 6. P. 922–930.
181. Vakifahmetoglu-Norberg H., Ouchida A.T., Norberg E. The role of mitochondria in metabolism and cell death // Biochemical and Biophysical Research Communications. Elsevier Ltd, 2017. Vol. 482, № 3. P. 426–431.
 182. He C. et al. Mitochondrial electron transport chain identified as a novel molecular target of SPIO nanoparticles mediated cancer-specific cytotoxicity // Biomaterials. Elsevier Ltd, 2016. Vol. 83. P. 102–114.
 183. Kornberg T.G. et al. Potential toxicity and underlying mechanisms associated with pulmonary exposure to iron oxide nanoparticles: Conflicting literature and unclear risk // Nanomaterials. 2017. Vol. 7, № 10. P. 1–26.
 184. Ying H. et al. Iron oxide nanoparticles size-dependently activate mouse primary macrophages via oxidative stress and endoplasmic reticulum stress // International Immunopharmacology. Elsevier B.V., 2022. Vol. 105.
 185. Wu S. et al. Mitochondrial oxidative stress causes mitochondrial fragmentation via differential modulation of mitochondrial fission–fusion proteins // The FEBS Journal. 2011. Vol. 278, № 6. P. 941–954.
 186. Youle R.J., van der Bliek A.M. Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress // Science. 2012. Vol. 337, № 6098. P. 1062–1065.
 187. Eisner V., Picard M., Hajnóczky G. Mitochondrial dynamics in adaptive and maladaptive cellular stress responses // Nature Cell Biology. Springer US, 2018. Vol. 20, № 7. P. 755–765.
 188. Leonart M.E. et al. Mitochondrial dysfunction and potential anticancer therapy // Medicinal Research Reviews. 2017. Vol. 37, № 6. P. 1275–1298.
 189. Zhang X. et al. Iron oxide nanoparticles induce autophagosome accumulation through multiple mechanisms: Lysosome impairment, mitochondrial damage, and ER stress // Molecular Pharmaceutics. 2016. Vol. 13, № 7. P. 2578–2587.
 190. Jin R. et al. Iron oxide nanoparticles promote macrophage autophagy and inflammatory response through activation of toll-like Receptor-4 signaling // Biomaterials. Elsevier, 2019. Vol. 203, № November 2018. P. 23–30.

191. Wu Q. et al. Iron oxide nanoparticles and induced autophagy in human monocytes // International Journal of Nanomedicine. 2017. Vol. Volume 12. P. 3993–4005.
192. Ren X. et al. Blocking Autophagic Flux Enhances Iron Oxide Nanoparticle Photothermal Therapeutic Efficiency in Cancer Treatment // ACS Applied Materials and Interfaces. 2018. Vol. 10, № 33. P. 27701–27711.
193. Klionsky D.J. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition) // Autophagy. Taylor and Francis Inc., 2016. Vol. 12, № 1. P. 1–222.
194. Mizushima N., Yoshimori T., Levine B. Methods in Mammalian Autophagy Research // Cell. 2010. Vol. 140, № 3. P. 313–326.
195. Ni Z. et al. HCC cells with high levels of Bcl-2 are resistant to ABT-737 via activation of the ROS-JNK-autophagy pathway // Free Radical Biology and Medicine. Elsevier, 2014. Vol. 70. P. 194–203.
196. Guo L. et al. Similarities and differences in the expression of drug-metabolizing enzymes between human hepatic cell lines and primary human hepatocytes // Drug Metabolism and Disposition. 2011. Vol. 39, № 3. P. 528–538.
197. Pattingre S., Levine B. Bcl-2 inhibition of autophagy: A new route to cancer? // Cancer Research. 2006. Vol. 66, № 6. P. 2885–2888.
198. Marquez R.T., Xu L. Bcl-2:Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. // American journal of cancer research. 2012. Vol. 2, № 2. P. 214–221.
199. Lindqvist L.M. et al. Prosurvival Bcl-2 family members affect autophagy only indirectly, by inhibiting Bax and Bak // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2014. Vol. 111, № 23. P. 8512–8517.
200. Wang L. et al. Deciphering active biocompatibility of iron oxide nanoparticles from their intrinsic antagonism // Nano Research. 2018. Vol. 11, № 5. P. 2746–2755.
201. Vanden Berghe T. et al. Molecular crosstalk between apoptosis, necroptosis, and survival signaling // Molecular and Cellular Oncology. 2015. Vol. 2, № 4. P. e975093.