

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

«НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ» (НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ, НГУ)

Факультет естественных наук  
Кафедра молекулярной биологии и биотехнологии

Направление подготовки \_\_\_\_\_ 06.04.01 \_\_\_\_\_

**ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА  
МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ**

**Болдырев Никита Дмитриевич**

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ IN VITRO И IN VIVO СЕЛЕКТИВНОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ  
НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА МАРГАНЦА ПРОТИВ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА**

**«К защите допущен»**

Заместитель заведующего кафедрой, к.х.н.,  
Мызина Светлана Дмитриевна

...../.....

(фамилия, И., О.) / (подпись)

«.....».....2020г.

**Научный руководитель:**

доктор биологических наук, с.н.с.  
Разумов Иван Алексеевич  
Лаборатория генетики  
лабораторных животных  
ИЦиГ СО РАН

...../.....

(фамилия, И., О.) / (подпись)

«.....».....2020г.

Новосибирск 2020

## Оглавление

|                                                                                                                                                   |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Введение .....                                                                                                                                    | 4         |
| <b>Глава 1 Литературный обзор .....</b>                                                                                                           | <b>6</b>  |
| <i>1.1 Наночастицы как перспективные агенты для лечения онкологических заболеваний .....</i>                                                      | <i>6</i>  |
| 1.1.1 Наночастицы и наномедицина - основные понятия.....                                                                                          | 6         |
| 1.1.2 Неорганические наночастицы в противоопухолевой терапии.....                                                                                 | 12        |
| <i>1.2 Онколитическая активность металлов и их оксидов in vitro и in vivo.....</i>                                                                | <i>13</i> |
| 1.2.1 Цитотоксичность наночастиц металлов и их оксидов на молекулярном и клеточном уровне .....                                                   | 13        |
| 1.2.2 Токсичность соединений марганца .....                                                                                                       | 17        |
| 1.2.3 Имеющиеся данные о цитотоксичности наночастиц оксидов марганца в отношении опухолевых клеток человека in vitro и in vivo, тераностика ..... | 18        |
| <b>Глава 2 Материалы и методы .....</b>                                                                                                           | <b>27</b> |
| <i>2.1 Материалы и реактивы .....</i>                                                                                                             | <i>27</i> |
| 2.1.1 Наночастицы оксидов и другие соединения марганца .....                                                                                      | 28        |
| <i>2.2 Культуры клеток.....</i>                                                                                                                   | <i>30</i> |
| 2.2.1 Характеристика культур клеток и паспортные данные .....                                                                                     | 30        |
| 2.2.2 Культивирование или пассирование клеток .....                                                                                               | 30        |
| 2.2.3 Подсчёт клеток на автосчётчике .....                                                                                                        | 31        |
| 2.2.4 Постановка МТТ-теста (микротитрационный анализ на основе тетразолевого красителя).....                                                      | 31        |
| <i>2.3 Модели и методы исследований in vivo.....</i>                                                                                              | <i>32</i> |
| 2.3.1 Характеристика мышей линии SCID .....                                                                                                       | 32        |
| 2.3.2 Инокуляция клеток животным и наблюдение за ростом опухоли .....                                                                             | 33        |
| <b>Глава 3 Практическая часть. Определение цитотоксичности наночастиц MnO in vitro и in vivo против клеток опухолей человека .....</b>            | <b>33</b> |
| <i>3.1 Определение избирательного действия наночастиц MnO in vitro против клеток линии SW620.....</i>                                             | <i>33</i> |
| <i>3.2 Определение местной токсичности препарата НЧ MnO у мышей SCID .....</i>                                                                    | <i>35</i> |
| 3.2.1 Токсические эффекты различных концентраций НЧ MnO при подкожном введении.....                                                               | 35        |
| 3.2.2 Токсические эффекты НЧ MnO при внутривенном и внутрибрюшинном введении .....                                                                | 37        |
| <i>3.3 Определение онколитической активности НЧ MnO in vivo на мышцах SCID с ксенографтами U87MG.....</i>                                         | <i>38</i> |
| <i>3.4 Определение онколитической активности НЧ MnO in vivo, на мышцах SCID с ксенографтами SW-620 .....</i>                                      | <i>43</i> |
| Заключение.....                                                                                                                                   | 46        |

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| Выводы .....                         | 46 |
| Список цитированной литературы ..... | 47 |

## Введение

В современной биомедицинской науке проблема лечения опухолевых заболеваний занимает второе место после болезней сердечно – сосудистой системы [120]. В Российской Федерации в 2016 г. выявлено 599348 первичных злокачественных новообразований (в том числе 273585 и 325763 у пациентов мужского и женского пола, соответственно). Прирост данного показателя по сравнению с 2015 г. составил 1,7% [119]. Многие годы основными способами лечения рака были только хирургическое вмешательство и химиотерапия. Большое значение имеет идентификация первичного очага, что является основным диагностическим критерием для этой группы заболеваний. В ряду случаев образование даже локального метастазирования усложняет процесс лечения и может привести к летальному исходу, как это происходит, например, при раке молочной железы.

Последние 10 лет наблюдается значительный прорыв в области клеточной и молекулярной биологии, что значительно повлияло на понимание природы и механизмов злокачественной трансформации. Большое число исследований по выявлению фундаментальных механизмов злокачественной трансформации говорит о повышении академического интереса и увеличении числа критических замечаний по поводу традиционных методов лечения онкологических заболеваний [122]. Одна из основных причин роста числа случаев этих заболеваний - недостаток селективно действующих противоопухолевых соединений. Высокая подверженность всего организма влиянию противоопухолевых агентов часто приводит к общей токсичности, ограничивающей допустимую дозу препаратов. Таким образом, избирательная токсичность имеет первостепенное значение для преодоления имеющихся ограничений в противоопухолевой терапии.

Наночастицы, обладающие такими уникальными свойствами, как наноразмер, высокое соотношение площади поверхности к объему и другие полезные физико-химические характеристики, создают потенциал для улучшения как фармакокинетических, так и фармакодинамических свойств препаратов, улучшая их терапевтический индекс. Загрузка лекарств на наноносители может повысить их стабильность *in vivo*, увеличить время циркуляции в кровеносной системе и позволить проводить контролируемое высвобождение лекарства. Таким образом, наномедицинские соединения могут менять распределение лекарств в организме, позволяя им аккумулироваться преимущественно в опухоли. Этот феномен известен как эффект усиленного захвата и удержания (EPR) [20].

Согласно литературным данным, некоторые наночастицы, используемые для выявления глиом в MRT-технологии обладают цитотоксическим действием по отношению к опухолевым

клеткам, а, следовательно, имеют потенциал в отношении разработки онколитического агента для лечения этих опухолей человека [121].

Ранее в нашей лаборатории [107] были использованы НЧ MnO для получения МРТ контрастов глиобластомы U-87 в мозгу иммунодефицитных мышей SCID. Результаты исследования внутривенного введения НЧ MnO показали, что эти НЧ активно накапливаются в опухолевой ткани, при этом в здоровых тканях мозга в исследованный интервал времени достоверного увеличения концентрации частиц не наблюдалось. Далее *in vitro* была выявлена селективная цитотоксичность этих НЧ MnO в наномолярных концентрациях против клеток линий U-87 и U-251. Высокие показатели селективной цитотоксичности НЧ MnO *in vitro* против клеток этих линий глиобластом, например, в отличие от НЧ Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (US Research Nanomaterials, Inc), вероятно, являлись следствием их формы, размера, строения и других особенностей. Представляемая дипломная работа является продолжением этих работ по изучению цитотоксического и противоопухолевого действия наночастиц на опухолевые клетки в культуре и в виде ксенографтов у иммунодефицитных мышей.

**Объект исследования** – наночастицы оксида марганца (II). Тестируемый препарат является суспензией наночастиц MnO в воде, изготовлен в Институте катализа СО РАН по стандартной методике. Заявленный средний размер наночастиц 10-30 нм. Прежде препарат в медицине не использовался.

**Предмет исследования** – токсические эффекты наночастиц оксида марганца (II) на культурах опухолевых клеток *in vitro* и их противоопухолевые свойства на ксенографтах у иммунодефицитных мышей линии SCID SPF-статуса (свободных от специфических патогенов).

**Целью** данного исследования являлось выявление избирательного токсического действия наночастиц на опухолевые клетки в культуре SW-620 и в виде ксенографтов U87MG и SW-620 у иммунодефицитных мышей.

Задачи:

1. Определить с помощью МТТ-теста минимальные токсические концентрации наночастиц оксида марганца (II) в культуре клеток SW-620.
2. Выяснить местные токсические эффекты наночастиц оксида марганца (II) на иммунодефицитных мышцах линии SCID.
3. Выяснить противоопухолевое действие наночастиц оксида марганца (II) на ксенографтах U87MG и SW-620 у иммунодефицитных мышей линии SCID.

## Глава 1 Литературный обзор

### *1.1 Наночастицы как перспективные агенты для лечения онкологических заболеваний*

#### 1.1.1 Наночастицы и наномедицина - основные понятия

Создание новых безопасных, малотоксичных и в то же время весьма эффективных противоопухолевых препаратов является одной из главных задач современной науки.

Вместе с тем, в настоящее время наноматериалы успешно используются как диагностические инструменты, средства доставки и терапевтические противоопухолевые агенты [75, 85]. Ряд первых препаратов на основе наноматериалов и наноконструкций находится на стадии доклинических и клинических испытаний. Они продемонстрировали свою безопасность, что особенно важно для онколитических препаратов, способных проходить гематоэнцефалический барьер. Список медицинских нанопрепаратов, уже дошедших до практики, постоянно растёт. [76, 7].

Наноматериалы могут быть получены практически из любого вещества; наряду с липофильными коллоидными наночастицами (НЧ), получаемыми из твердых липидов и фосфолипидов, возможно использование наноматериалов на основе углерода, натуральных и синтетических полимеров, кварца, металлов и оксидов металлов. В области бионанотехнологий наноматериалы используются для биомедицинского применения, в том числе целевой доставки лекарственных препаратов, контрастирующих веществ и биосенсоров. Многие свойства наноматериалов, которые делают их полезными, могут в то же время делать их токсичными для живых клеток. Благодаря большой площади поверхности наноматериалы более реактивны и легкотранспортируемы через экологические барьеры, клеточные мембраны и в организме в целом. Для максимального использования потенциала нанотехнологий необходим рациональный научный подход в вопросах нанотоксикологии и безопасности. Среди способов приготовления НЧ существует множество различных подходов с использованием как общепринятых, так и нетрадиционных методик в твердых и жидких фазах [80]. Первостепенной задачей является получение НЧ, гомогенных по размеру и форме — для ее решения применяли ряд методов; в твердофазных протоколах без растворителей применялась механохимия, в то время как для синтеза в водных растворах использовали микроволновое излучение и ультразвук (УЗ) [116].

До настоящего времени основной проблемой, тормозящей развитие методов терапии опухолей, является неспособность противоопухолевых препаратов эффективно различать между собой больные и здоровые клетки. Сравнительно недавно было установлено [121], что

наночастицы оксида цинка могут избирательно уничтожать опухолевые клетки, практически никак не воздействуя на здоровые клетки. Это открытие обозначило новое направление в создании препаратов для лечения опухолевых заболеваний с помощью наночастиц металлов или их соединений с другими веществами или молекулами, обладающими противоопухолевой активностью [74, 85, 30]. Дальнейшие результаты исследования биологической активности подобных НЧ указывают на перспективность их применения в развитии методов диагностики и терапии глиом [45, 49].

Наночастицы, путем активного или пассивного нацеливания, могут повысить внутриклеточную концентрацию лекарств в опухолевых клетках, избегая токсичности в нормальных клетках [2, 63]. Кроме того, когда наночастицы связываются со специфическими рецепторами и затем проникают в клетку, они обычно попадают в эндосомы путем рецептор - опосредованного эндоцитоза, тем самым обходя распознавание Р-гликопротеином, одним из основных механизмов лекарственной устойчивости [52]. Однако, несмотря на то, что наночастицы обеспечивают множество преимуществ в качестве систем доставки лекарств, есть еще много ограничений, которые необходимо обойти: биодоступность при пероральном применении, нестабильность в кровеносной системе, неадекватное распределение в тканях и токсичность.

#### Характеристики наночастиц как противоопухолевых агентов

Для эффективной доставки лекарственного средства к целевой опухолевой ткани, наночастицы должны обладать способностью длительное время сохраняться в кровеносной системе без выведения. Обычные наночастицы с немодифицированной поверхностью обычно попадают в ретикулоэндотелиальную систему печени или селезенки, в зависимости от их размера и поверхностных характеристик. Соответственно, можно менять судьбу наночастиц в организме, регулируя эти характеристики.

Некоторые материалы, например металлы и керамика, обладают свойствами, позволяющими применять их в клинической практике: многие металлы легко намагничиваются, нагреваются или флуоресцируют при наложении магнитного или электрического полей [13, 114].

**Размер.** Одним из преимуществ наночастиц является то, что их размер можно контролировать. Размер наночастиц, используемых при доставке лекарств, должен быть достаточно большим для предотвращения их попадания в капилляры, но и одновременно достаточно маленьким для избегания захвата тканевыми макрофагами, которые находятся в ретикулоэндотелиальной системе, например, печени или селезенке. Просвет между

эндотелиальными клетками опухолей составляет от 100 до 600 нм, следовательно, размер наночастиц должен быть менее 100 нм для проникновения в опухоль. Так, поглощение, распределение и действие наночастиц оксида церия зависит от их размера, поверхностного заряда и агломерации внутри клеток. Частицы диаметром менее 20 нм дольше задерживаются в клетках, чем более крупные. Таким образом, размер наночастиц косвенно является доминирующим фактором, определяющим скорость поглощения, а концентрация и общая площадь поверхности имеют второстепенное значение [73, 57, 74].

Исследования  $\text{TiO}_2$  в фотодинамической терапии показывают неоднородность размера наноструктур, что ставит под угрозу воспроизводимость результатов фотодинамической терапии *in vivo* [61, 74]. Когда наночастицы вводятся в кровь *in vivo*, вокруг них может сформироваться белковая оболочка, меняющая их действие. Это обычно снижает цитотоксичность и иммунотоксичность, однако их можно уменьшить или усилить в зависимости от типа наночастиц и адсорбированного белка плазмы. В настоящее время знания о взаимосвязи между физико-химическими свойствами наночастиц и их физиологическими эффектами достаточно ограничены [74].

**Характеристики поверхности.** Помимо размеров, поверхностные характеристики наночастиц также являются важным фактором, определяющим продолжительность их существования до захвата тканевыми макрофагами. Наночастицы предпочтительно должны иметь гидрофильную поверхность, чтобы избежать этого захвата [66]. Это может быть достигнуто двумя способами: покрытие поверхности наночастицы гидрофильным полимером, таким как ПЭГ, что защищает их от опсонизации белками плазмы, либо наночастицы могут быть сформированы из сополимеров с гидрофильными и гидрофобными доменами [1, 33].

**Магнитные свойства.** Магнитные металлические наночастицы активно используются в магнитно-резонансной томографии (МРТ). Например, в качестве контрастного агента для МРТ применяют оксид железа, соединенный с декстраном. Кроме того, частицы железа связывали с инсулином для ослабления интернализации токсичных магнитных частиц. Возможно, в будущем такие частицы удастся соединить с молекулами лекарственных препаратов, что позволит создать магнитные наночастицы, пригодные как для получения изображений, так и для доставки лекарств [46, 74].

**Преимущества систем доставки на основе наночастиц.** Существует несколько способов доставки в организм стабильных и эффективных лекарственных препаратов. Чаще всего лекарства принимают внутрь перорально, вводят через кожу (трансдермально) или через нос (капли или средства для ингаляций) [4, 74]. Самым простым и распространенным способом



приема лекарств является прием через рот, однако этот путь не лишен недостатков. В частности, он снижает биодоступность препаратов. Например, пероральный прием белков и пептидов неэффективен из-за экстремальных значений рН в пищеварительной системе и необходимости прохождения через различные органы. Кроме того, большие дозы препаратов могут нарушать работу кишечника [71, 74]. Назальный и трансдермальный пути неудобны для пациентов, тем более они снижают эффективность действия препаратов. К другим недостаткам традиционных способов приема лекарств относятся: невозможность воспроизведения количества высвобождаемого препарата за определенный промежуток времени, плохая растворимость, а также невозможность направленной доставки препаратов к тканям-мишеням без побочного действия на здоровые ткани [26, 74]. Поэтому системы доставки лекарств на основе наночастиц имеют множество преимуществ и позволяют избежать многих из указанных проблем.

***Направленная доставка.*** Нанотехнологические системы доставки лекарств позволяют направлять препараты к специфическим участкам организма и определенным тканям так, что расположенные поблизости здоровые клетки не подвергаются их действию [56, 74]. Например, для таргетной (целевой) доставки противоопухолевых препаратов в составе наночастиц-переносчиков иногда используется магнитное поле. Для доставки и интернализации таких препаратов также применяются трансферрин, фолат или различные антитела [74].

***Контролируемая доставка.*** Основанные на нанотехнологических принципах системы позволяют вводить в организм токсичные лекарственные препараты и комплексы, а также ДНК и вирусные векторы в оптимальной дозировке и с определенными временными интервалами [19, 74]. Профиль высвобождения препарата зависит от строения системы доставки. Этот параметр можно менять путем подбора материала для синтеза наночастиц [35, 74]. Кроме того, нанотехнологии позволяют модифицировать свойства материалов на атомном уровне и создавать носители с контролируемой скоростью доставки [15, 74].

***Эффект усиленной проницаемости и удержания.*** Наночастицы, которые удовлетворяют требованиям к поверхности и размерам, описанным выше, реже захватываются ретикулоэндотелиальной системой, дольше сохраняются в кровеносной системе, и имеют больше шансов достичь опухолевых тканей. Уникальные патофизиологические характеристики опухолевых сосудов позволяют макромолекулам, и в том числе, наночастицам, избирательно накапливаться в опухолевой ткани [63]. Быстрорастущие опухолевые клетки требуют роста новых сосудов (неоваскуляризации) или перенаправления существующих сосудов вблизи опухоли. В результате, дисбаланс ангиогенных факторов, таких как факторы роста и липопроотеазы матрикса делают сосуды опухоли высоко дезорганизованными и пронизанными

множеством пор с увеличенными пространствами между эндотелиальными клетками и нарушенным дренажем лимфы [8]. Эти особенности и называются эффектом повышенной проницаемости и удержания, который представляет собой важный механизм, с помощью которого макромолекулы, включая наночастицы, с молекулярным весом выше 50 кДа, могут избирательно накапливаться в межклеточном пространстве опухоли.

**Микроокружение опухоли.** Еще один фактор пассивного нацеливания - уникальное микроокружение опухоли, состоящее из клеток, отличающихся от нормальных. Быстрорастущие, высокопролиферативные опухолевые клетки проявляют высокую скорость метаболизма, а кислорода и питательных веществ обычно недостаточно для их поддержки. Следовательно, опухолевые клетки начинают использовать гликолиз для получения дополнительной энергии, что приводит к закислению среды [72]. В связи с этим, рН-чувствительные липосомы разрабатываются так, чтобы быть стабильными при физиологическом значении  $pH=7,4$ , но разрушаются и высвобождают лекарственное средство в ткани-мишени, в которой  $pH$  меньше физиологических значений, в частности, среди опухолевых клеток [106].

Система доставки лекарственного средства, содержащая бинарное соединение (то есть конъюгат полимер - лекарственное средство), который зависит только от пассивного механизма таргетирования, неизбежно сталкивается с ограничениями по специфичности. Одним из подходов преодоления этих ограничений является включение нацеливающего лиганда или антитела в конъюгат полимер - лекарственное средство.

Недавние разработки и внедрение широкого спектра липосом и полимеров в качестве носителей для доставки лекарств увеличили потенциальное количество лекарств, которые могут быть связаны с целевыми наночастицами без ущерба для их средства по сравнению с ранними конъюгатами антитело - лекарственное средство. Используя преимущества такой комбинации носителей, таргетирующих групп и лекарственных препаратов, в последнее время были разработаны конъюгаты с активным нацеливанием, состоящие из аффинного лиганда или антитела в качестве таргетного фрагмента, полимера или липида в качестве носителя и активного химиотерапевтического препарата. При построении таких тройных наночастиц необходимо учитывать некоторые факторы для создания более эффективных систем доставки.

**Экспрессия антигена или рецептора.** В идеале, антигены клеточной поверхности и рецепторы должны иметь несколько свойств, которые делают их особенно подходящими опухолеспецифичными мишенями [2]. Во-первых, они должны экспрессироваться исключительно в опухолевых клетках и отсутствовать в нормальных. Во-вторых, они должны

быть однородно выражены во всех опухолевых клетках. Наконец, антигены клеточной поверхности не должны попадать в систему кровообращения.

**Интернализация целевых конъюгатов.** После нацеливания, конъюгаты должны внедриться в клетку после связывания с клетками-мишенями. Интернализация обычно происходит через рецептор - опосредованный эндоцитоз. Примером может быть фолат - ориентированный конъюгат, который связывается с фолатным рецептором на поверхности клетки, интернализирующаяся цитоплазматическая мембрана охватывает комплекс рецептора и лиганда для формирования эндосомы. Поскольку значение рН во внутренней части эндосомы становится кислым, препарат высвобождается из конъюгата и входит в цитоплазму при условии, что препарат имеет подходящие физико-химические свойства для преодоления эндосомальной мембраны. Высвобожденные препараты затем воздействуют на специфичные для них органеллы. Тем временем, рецептор фолата возвращается на клеточную мембрану, чтобы начать следующий раунд транспорта путем связывания с новыми конъюгатами с фолатом [53].

**Увеличение скорости циркуляции и объема доставки.** В силу того, что размер частиц влияет на скорость выведения лекарства, наноносители могут повысить время циркуляции лекарства в организме. Крупные частицы удаляются значительно быстрее мелких. При введении больших частиц в организм модельного животного они в большей концентрации накапливаются в селезенке и печени, чем в органе-мишени. Мелкие же частицы с высокой вероятностью захватываются другими клетками организма, включая и клетки-мишени [109, 74].

**Растворимость лекарств.** Методы нанотехнологий позволяют осуществить направленную доставку всех типов лекарств. В частности, применение нанотехнологий особенно эффективно относительно введения в ткани малорастворимых веществ. Например, мицеллы часто имеют гидрофобное ядро, окруженное гидрофильной оболочкой. Гидрофобные молекулы легко включаются внутрь ядра мицеллы, а внешняя гидрофильная часть позволяет увеличивать распределение этих веществ в водных средах организма [108, 47, 81, 74].

**Внутриклеточные системы доставки лекарств.** Способ доставки лекарства внутрь клетки имеет несомненное достоинство: токсическое действие препарата снижается, а эффективность его применения повышается [14, 74]. Гидрофобные нанопереносчики легко проникают через клеточные мембраны [28, 74]. Максимальный размер частиц, способных проникать через клеточную мембрану, составляет 500 нм.

**Прохождение через биологические мембраны.** Слабое проникновение лекарств через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), желудочно-кишечный тракт и эндотелий сосуда является

серьезной проблемой. Традиционные методы доставки лекарственных препаратов - внутривенное введение, пероральный прием или трансдермальный способ введения не подходят для случаев, когда лекарство должно проникнуть через ГЭБ или желудочно-кишечный тракт, что связано с физиологическими условиями - разные значения pH или ограничения по размерам частиц. Методы нанотехнологий позволяют создавать системы доставки лекарств, для которых биологические мембраны не являются препятствием. Эти исследования включают исследование наноматериалов на основе металлов, полимерных носителей и систем доставки на основе липидов [74].

**Увеличение площади поверхности.** Чем меньше частицы, тем больше их площадь поверхности. Это также используется для создания систем доставки лекарств с повышенной нагрузенностью препаратами и эффективностью их высвобождения [74].

**Потенциал наночастиц для преодоления устойчивости к лекарствам.** Лекарственная устойчивость стала основным препятствием, ограничивающим терапевтическую эффективность химиотерапевтических средств. Среди нескольких механизмов лекарственной устойчивости, Р-гликопротеин является самым известным и наиболее широко исследованным [27]. Было высказано предположение, что наночастицы могут обойти Р-гликопротеин-опосредованную устойчивость. Одним из возможных механизмов является то, что наночастицы могут избегать распознавания Р-гликопротеином путем попадания в эндосомы и повышения концентрации препарата в клетке [103]. Лиганд - ориентированные стратегии, особенно те, которые используют рецептор - ориентированные лиганды могут проявлять потенциал для преодоления лекарственной устойчивости, путем проникновения конъюгата в клетку через рецептор - опосредованный эндоцитоз [51].

### 1.1.2 Неорганические наночастицы в противоопухолевой терапии

Неорганические наночастицы имеют множество применений, включая визуализацию опухолей, увеличение эффективности радиотерапии или доставку лекарств. Наночастицы оксида железа в основном используются для диагностических целей, некоторые проходят клинические испытания на визуализацию опухолей в МРТ [113].

Недавно начались клинические испытания наночастиц оксида гафния. Наночастицы испытываются в качестве радиосенсибилизатора на пациентах с саркомой мягких тканей [113].

Еще не существует коммерчески доступных неорганических наночастиц для доставки лекарств. Некоторые из них проходят первую стадию клинических испытаний, например, покрытые ПЭГ коллоидные наночастицы золота с ФНО- $\alpha$  для терапии онкологических заболеваний и кремниевые наноносители для парентеральной доставки пептидов [113].

Наночастицы оксида марганца, по имеющимся данным [80], ввиду высокой проникающей способности могут поступать внутрь головного мозга, накапливаться в клетках и вызывать морфофункциональные нарушения отделов головного мозга даже в небольших концентрациях. Анализ распределения МРТ контраста при внутривенном введении НЧ оксида марганца (НЧ MnO) показал, что используемые наночастицы [105] практически не преодолевали ГЭБ в здоровых тканях мозга и накапливались в основном в очагах невропатологий, в частности, в клетках глиобластомы человека U-87MG, ортотопического ксенотрансплантата в головном мозге иммунодефицитных мышей линии SCID [31].

## *1.2 Онколитическая активность металлов и их оксидов in vitro и in vivo*

### 1.2.1 Цитотоксичность наночастиц металлов и их оксидов на молекулярном и клеточном уровне

**Оксиды железа.** Опухолевые клетки могут быть уничтожены длинноволновым излучением, таким как ближнее инфракрасное или колебательные магнитные поля, которые могут поглощаться и стимулировать выработку активных форм кислорода (АФК), образующихся под действием гипертермированных наночастиц оксида железа. Преимущество данного подхода обусловлено тем, что наночастицы могут быть доставлены к местоположению опухоли за счет ковалентно связанных тканеспецифичных молекулярных детерминант или, в случае магнитных наночастиц, за счет внешнего применения локальных магнитных полей. Следовательно, такие наночастицы могут использоваться для избирательного уничтожения опухолевых клеток путем преобразования энергии излучения в тепло или получения АФК. Это позволяет уменьшить повреждение здоровых тканей, что является одним из основных побочных эффектов противоопухолевой терапии.

Использование магниточувствительных комплексов наночастиц оксида железа с противоопухолевым препаратом доксорубицином увеличивает его терапевтический эффект по сравнению с традиционной доксорубициновой терапией. Этот эффект, вероятно, связан с тем, что внешнее магнитное поле может провоцировать переход электронов с одного энергетического уровня на другой в наноконплексах. Действие лекарственного средства основано на активации гидроксильных радикалов, которые разрушают митохондрии, липиды, белки, ДНК и другие структуры в опухолевых клетках, что приводит к апоптозу и некрозу. Совместное действие постоянного магнитного поля, умеренной радиочастотной гипертермии (ниже 40°C) и магниточувствительного наноконплекса оксида железа и парамагнитного

доксорубицина усиливает противоопухолевое и антиметастатическое действие по сравнению с обычным диамагнитным доксорубицином.

Сферические наночастицы оксида железа были одобрены в Европейском союзе в качестве лекарственного препарата для магнитной противоопухолевой гипертермии в головном мозге [92, 83] и при раке предстательной железы [43] в сочетании с радио- и химиотерапией. [64] Противоопухолевая гипертермическая терапия заключается в применении температуры выше 40°C [5]. Как только магнитные оксиды железа доставлялись в опухоль, они эффективно поглощали энергию из внешнего источника (например, ближнее ИК-излучение или магнитные поля), превращая ее в тепло.

Намагниченность суперпарамагнитных наночастиц оксида железа исчезает, как только прекращается действие магнитного поля [36]. Это очень важно, поскольку намагничивание индуцирует агрегацию наночастиц - явление, которое приемлемо во время терапии, но очень опасное для пациента после, когда крупные агрегаты будут препятствовать выведению наночастиц и могут создать серьезную угрозу здоровью. По этой причине для применения гипертермии *in vivo*, размеры наночастиц оксидов железа не должны превышать 30-40 нм во избежание образования ферромагнитных наночастиц. Таким образом, увеличение размера наночастиц приводит к увеличению намагниченности и повышению эффективности их применения, но только до момента превышения критических размеров, после которых они становятся ферромагнитными (преодолевают так называемый суперпарамагнитный предел).

В последнее время наночастицы оксидов железа изучались как радиосенсибилизирующие агенты при использовании рентгеновских источников. Исследования *in vitro* показали, что использование суперпарамагнитных наночастиц оксидов железа, покрытых цитратом и малатом, повышало чувствительность опухолевых клеток к рентгеновскому излучению и требует дальнейшего изучения механизмов, происходящих после выработки АФК.

**Диоксид титана.** Принцип фотодинамической терапии заключается в том, что фотосенсибилизатор, состоящий из гидрофобной органической молекулы, возбуждается электромагнитным излучением в диапазоне видимого или ультрафиолетового света для генерации цитотоксических АФК и индукции апоптоза. В самых ранних случаях фотодинамической терапии использовали полимерные и неорганические наночастицы в качестве пассивных носителей для улучшения растворимости гидрофобных молекул фотосенсибилизатора и платформ для их доставки к месту локализации опухоли [9]. Альтернативный подход заключается в использовании неорганических наночастиц, таких как

наночастицы оксида титана ( $\text{TiO}_2$ ) [110, 89, 82] в качестве самостоятельных фотосенсибилизирующих агентов.

Показано, что фотокаталитические наночастицы диоксида титана могут уничтожать опухолевые клетки. Однако применение ультрафиолетового излучения ограничивает использование такой терапии у людей. Одной из стратегий обхода этих ограничений является поверхностная функционализация наночастиц. Эксперименты показали, что жизнеспособность клеток зависит от концентрации наночастиц, типа клеток и химических свойств поверхности. В частности, группы  $-\text{NH}_2$  и  $-\text{OH}$  продемонстрировали значительно более высокую токсичность, чем  $-\text{COOH}$ . Эти результаты показывают, что, по-видимому, и другие наночастицы с модифицированной поверхностью могут быть использованы для противоопухолевой терапии. Наночастицы  $\text{TiO}_2$  могут в течение длительного времени сохраняться в организме, они нетоксичны и стабильны без светового излучения. Основной проблемой фотодинамической терапии является прямое освещение ткани ультрафиолетовым излучением или видимым светом. Однако, УФ и видимый свет имеют ограниченную проникающую способность в ткани, и это является существенной проблемой, если опухоль расположена глубоко под покровами тела [17].

***Наночастицы оксида церия.*** Наночастицы оксида церия представляют собой новый и очень интересный материал для лучевой терапии, обладающий способностью избирательно индуцировать гибель облученных опухолевых клеток, защищая при этом окружающую ткань от радиационно-индуцированного повреждения и окислительного стресса. Уникальность этих наночастиц заключается одновременно в их радиозащитном и радиосенсибилизирующем действии. Высказывалось предположение, что эта особенность связана с их каталазоподобной активностью, которая возникает в кислых средах ( $\text{pH}=4,3$ ): в присутствии супероксида, создаваемого ионизирующим излучением, данная активность приводит к накоплению перекиси водорода, увеличивая радиационные повреждения [100]. Гипотеза основана на том, что раковые клетки имеют более кислую среду. Еще один возможный механизм дифференциальной токсичности также включает их супероксиддисмутазоподобную активность. Исследования показывают, что фермент супероксиддисмутаза действует как радиочувствительный агент, повреждая ДНК и задерживая G2/M переход, тем самым способствуя накоплению клеток в G2 фазе и более полной репарации ДНК. Таким образом, наночастицы оксида церия могут действовать как радиочувствительные агенты посредством запуска механизмов ответа на повреждения ДНК. Исследования ксенографта *in vivo* на иммунодефицитных мышах показали снижение массы и объема опухоли после обработки наночастицами оксида церия. Этот эффект можно считать характерным для окислительно - восстановительных частиц, которые обладают избирательными прооксидантными и антиоксидантными свойствами.

**Наночастицы оксида цинка.** Применение наночастиц ZnO показало, что они наиболее эффективны против раковых клеток T89G и наименее токсичны для здоровых клеток человека НЕК. Эти наночастицы ведут себя как генотоксические препараты, так как они вызывают образование микроядер в клетках. Также было замечено апоптоз - коррелированное продуцирование АФК в клетках меланомы под действием различных доз ZnO [95]. Наночастицы оксида цинка показали активность в низкой концентрации против клеток HepG2 (рак печени) и MCF-7 (рак молочной железы): МТТ-тест показал дозозависимое снижение жизнеспособности. При концентрации 25 мкг/мл, жизнеспособность клеток HepG2 составила менее 10%.

**Наночастицы оксида меди.** Различные исследования сообщают о получении наночастиц оксида меди из экстрактов различных растений, таких как *Ficus religiosa* [78] и *Acalypha indica* [84]. Эти наночастицы продемонстрировали цитотоксическое действие на клетки рака легкого человека (A549) и клетки рака молочной железы (MCF-7). Было продемонстрировано, что механизм цитотоксичности заключается в индукции апоптоза с усилением генерации АФК. Биотехнологический синтез этих наночастиц был предложен в качестве надежного, простого, нетоксичного и экологически чистого метода. Исследования *in vitro* показали, что наночастицы оксида меди избирательно индуцируют апоптоз опухолевых клеток. Исследования *in vivo* показали, что эти наночастицы значительно замедляли рост меланомы B16-F10 и увеличили выживаемость мышей с этой опухолью. Для исследования выведения наночастиц, их вводили мышам через хвостовую вену в дозе 2 мг/кг, а через семь дней были удалены и исследованы основные органы. Результаты показали, что наночастицы оксида меди быстро удаляются из органов, а также проявляют малую системную токсичность. Кроме того, авторы исследования отмечают, что эти наночастицы таргетно действуют на митохондрии клеток HeLa *in vitro*, что приводит к высвобождению цитохрома С и активации каспазы-3 и каспазы-9. Таким образом, было выяснено, что наночастицы оксида меди могут индуцировать апоптоз клеток опухолей по митохондриальному пути [99].

**Диоксид кремния.** В отличие от наночастиц оксидов металлов с противоопухолевой активностью, двуокись кремния проявила себя как хороший носитель для различных противоопухолевых препаратов, таких как гемцитабин и паклитаксел в исследованиях на модели опухоли поджелудочной железы у мышей. Мезопористые наночастицы оксида кремния контролируемой формы и размера могут нести фармацевтические агенты и предотвращать тем самым их преждевременное высвобождение и разрушение до достижения цели. Химиотерапевтические агенты могут быть загружены на мезопористые наночастицы, что избавляет от необходимости использовать растворители, которые часто являются токсичными



для здоровых тканей. Исследование не выявило токсичности наночастиц после их введения мышам [59]. Впоследствии авторы заявили о разработке, синтезе и биологической оценке поверхностно-модифицированных наночастиц оксида кремния для доставки камптотецина. После воздействия этих наночастиц к концу эксперимента у мышей практически исчезли опухоли [74].

### 1.2.2 Токсичность соединений марганца

Марганец является важным нутриентом, участвующим в биохимических реакциях в составе некоторых ферментов, включая Mn - зависимую супероксиддисмутазу, играет важную роль в метаболизме железа и требуется для поддержания нормальной работы мозга. В противоположность своим физиологическим функциям, повышенные уровни марганца могут привести к токсическим неврологическим эффектам, предположительно вызванным механизмами окислительного стресса. Эти нейротоксические эффекты вызывают серию симптомов, таких как адинамия/хроническая усталость, повышенное слюноотделение, головные боли, нарушения сна, мышечные боли, гипертония и раздражительность, в конце концов, приводящую к марганец - индуцированной Паркинсоноподобной болезни, называемой манганизмом. Эта болезнь впервые была описана в 1837 Джеймсом Купером, который наблюдал параплегию, в основном, нижних конечностей, у пяти шотландцев, работавших на измельчении руды  $MnO_2$ . С тех пор было проведено множество исследований, описывающих симптомы интоксикации людей, эффекты на грызунах и клеточных моделях. Очень хорошее обобщение этих исследований нейропатологических эффектов воздействия Mn было опубликовано Ашнером и др. [3], оно описывает механизмы транспорта Mn, воздействие на нейротрансмиттерную систему и на его вклад в дисфункцию митохондрий и разобщение энергетического метаболизма клетки.

В соответствии с существующими знаниями, участки мозга, в которых в основном накапливается марганец при манганизме – это бледный шар и черная субстанция, причем последний вовлечен также в Паркинсонизм. Mn в основном нацелен на дофаминергические и ГАМКергические пути, что приводит к дефициту когнитивных функций, двигательным нарушениям, таким как брадикинезия, ригидность, тремор, нарушение походки, постуральная неустойчивость, дистония и/или атаксия. Тем не менее, точный механизм поглощения марганца мозгом еще не выяснен. В настоящее время считается, что марганец может проходить гематоэнцефалический барьер в виде нескольких соединений и с разными степенями окисления [44]. В отличие от болезни Паркинсона, при манганизме тремор менее выражен и более частый, но с меньшей амплитудой и пациенты не проявляют устойчивого ответа на снижение уровня

дофамина. МРТ показывает сильные изменения в стриопалидарной системе и черной субстанции с обеих сторон.

В глобальном масштабе, сценарии воздействия марганца за последний век сменились от острых, высококонцентрированных воздействий, вызывающих манганизм, до хронического низкоконцентрированного воздействия марганца. С одной стороны, эти изменения могут быть связаны с улучшением условий труда рабочих связанных с марганцем производств. С другой стороны, существует повышенное хроническое воздействие марганца на людей, живущих вблизи промышленных районов. Помимо накопления в мозге, марганец-индуцированная нейротоксичность связывают с окислительным стрессом в занятых участках мозга. Mn является кофактором нескольких важных ферментов, включенных в поддержание окислительного баланса, например, супероксиддисмутазы или ацетилхолинэстеразы. Исследование клеток нейробластомы, обработанных  $MnCl_2$  (200 и 800 мкМ) выявили значительное снижение удельной активности Mn-супероксиддисмутазы, Cu/Zn супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы. Интересно, что одновременное воздействие на эти клетки силимарином значительно увеличило их активность, что может быть связано со способностью силимарина снижать токсичность марганца [65].

### 1.2.3 Имеющиеся данные о цитотоксичности наночастиц оксидов марганца в отношении опухолевых клеток человека *in vitro* и *in vivo*, тераностика

В последнее время стали появляться наносистемы, предназначенные не только для терапевтических целей, но и для диагностики заболеваний [102, 114]. Кроме традиционного использования для доставки лекарств такие «наноинструменты» можно применять в медицинской диагностике, основываясь на методах визуализации при флуоресценции [50, 114] или магнитно-резонансной томографии (МРТ) [67, 113], а также в фототермических методах лечения онкологических заболеваний [94, 114].

В отличие от нанолекарств первого и второго поколения, которые могут выполнять только одну функцию, многофункциональные нанолекарства ожидаемо раньше будут приняты к клиническому использованию. Многофункциональные препараты способны доставлять одновременно несколько лекарств для комбинированной терапии, осуществлять доставку сразу в несколько очагов болезни или одновременно помогать в диагностике и терапии. Одновременная доставка нескольких лекарств, таких как доксорубин и паклитаксел вместе с ДНК или РНК могут стать эффективной противораковой стратегией. Например, многофункциональные полимерные наноносители, загруженные доксорубином и ДНК,

показали более выраженное подавление опухоли, чем доставка отдельно доксорубицина или ДНК как *in vitro*, так и *in vivo*. В другом исследовании, биоразлагаемые полимеры, загруженные одновременно доксорубицином и паклитакселом, были более эффективны, чем отдельные препараты. Также, многофункциональные покрытые ПЭГ липосомы могут одновременно доставлять в опухоли ингибитор Р-гикопотеина териквидар и паклитаксел для преодоления множественной лекарственной устойчивости в опухолях.

Улучшенные многофункциональные нанолечекаства были получены путем комбинирования таргетной доставки и стимул - зависимой системы. Например, многофункциональные полимерные мицеллы были использованы для загрузки лекарств в гидрофобную часть и использования гидрофильного фрагмента для прикрепления таргетирующего лиганда (лиганды фолатного рецептора в данном случае) для улучшенного захвата клетками. К тому же, высвобождение лекарств было модифицировано рН-зависимым в условиях *in vivo* линкером. Были созданы даже более сложные многофункциональные системы путем комбинирования множественного таргетинга и нескольких химиотерапевтических препаратов.

Тераностические препараты - это новый подвид многофункциональных нанолечекаств. Тераностика подразумевает одновременно диагностику и лечение в одной наноструктуре. Тераностические агенты позволяют визуализировать накопление нанолечекаств в целевой области, увидеть биораспределение, подсчитать количество высвобожденного препарата и оценить терапевтическую эффективность. Один из самых важных аспектов тераностики - это способность предсказывать ответ отдельного пациента на лечение, таким образом, прокладывая путь к персонализированной медицине. Она также предлагает способ работы с гетерогенностью опухоли, не только показывая наличие таргетного сайта, но и точное местоположение опухоли в теле. Инновационные концепты и стратегии тераностики еще не были в полной мере оценены в рамках клинических испытаний.

Контрастные агенты играют решающую роль в высокоточной магнитно-резонансной томографии (МРТ). В настоящее время имеются данные об использовании в качестве контрастных агентов на основе гадолиния, суперпарамагнитных наночастиц оксида железа и марганца, которые имеют хорошую биосовместимость и высокую контрастность, в результате чего считаются идеальными для МРТ. Кроме того, наночастицы оксида марганца, такие как  $MnO$ ,  $MnO_2$ ,  $Mn_3O_4$  и  $MnO_x$  привлекли внимание исследователей как контрастные агенты с коротким временем циркуляции коллоидных наночастиц с контролируемым размером.

Контрастные агенты на основе Mn можно разделить на две основные категории: композиты  $Mn^{2+}$  и наночастицы оксида марганца. К сожалению, комплексы  $Mn^{2+}$  имеют

короткое время нахождения в кровеносной системе [18], в то время как высокие дозы  $Mn^{2+}$  могут накапливаться в мозге, вызывая отравление марганцем, которое проявляется в изменениях в активности центральной нервной системы, что приводит к когнитивным, психическим расстройствам и нарушениям координации движений [22, 88, 29]. Следовательно, хелатированный  $Mn^{2+}$  не является идеальным кандидатом в качестве контрастного агента для МРТ. Однако, наночастицы оксида марганца, появившиеся в последние годы, продемонстрировали незначительную токсичность [69] и хорошие контрастные эффекты [70]. Удивительно, но эти наночастицы могут реагировать на микроокружение опухоли, pH,  $H_2O_2$  или глутатион и усиливать терапевтические эффекты лечения. В последние годы были изучены химические и магнитно-резонансные характеристики чувствительных контрастных агентов на основе марганца [25].

### ***Наночастицы на основе MnO в диагностике и терапии опухолей***

Ион  $Mn^{2+}$  является ключевым фактором, обеспечивающим использование MnO как контрастных агентов, поскольку пять неспаренных электронов на его 3d-орбитали могут создавать большой магнитный момент [40]. Модификация поверхности является распространенным методом увеличения скорости релаксации наночастиц MnO, например, добавление полимеров, [54] покрытие диоксидом кремния [42], модификация фосфолипидами [40]. Кроме того, исследователи пробовали интегрировать наночастицы MnO с другими модельными контрастными агентами или нанотераностическими агентами для получения более полной информации при клинических исследованиях.

### ***MnO как контрастные агенты в магнитно-резонансной томографии***

Наночастицы MnO могут удерживаться ретикулоэндотелиальной системой и впоследствии концентрироваться в печени и селезенке, что приводит к вызываемым  $Mn^{2+}$  токсическим эффектам. Чтобы снизить токсичность MnO *in vivo*, Шевалье и его коллеги прикрепили к его поверхности покрытые ПЭГ бис-фосфонатные дендримеры, что значительно повысило стабильность в растворе, показатели релаксации и скорость выведения [11]. Покрытие из полиэтиленгликоля (ПЭГ) может значительно улучшать биосовместимость и физиологическую стабильность наночастиц, а также позволяет прикреплять специфические полипептиды и другие аптамеры для улучшения таргетности наночастиц. Кроме того, было показано, что магнитные наноматериалы соединяются с мезопористым кремнием, благородными металлами, материалами на основе углерода и флуорофорами для более эффективного функционирования. Chen с коллегами улучшили растворимость MnO в воде с помощью перезетирифицированной олеиновой кислоты с силаном N-(триметоксисилилпропил)-

этилендиаминтриуксусной кислоты (ТТЕТ) [10]. Ну с коллегами нанесли поливинилпирролидон на наночастицы MnO<sub>2</sub>, используя послойную электростатическую сборку. Такие наночастицы проходят гематоэнцефалический барьер и могут потенциально использоваться для МРТ и других целей в неврологии [41].

### ***MnO как контрастный агент в визуализирующей терапии опухолей***

Наномедицина способна значительно увеличить дозу и точность адресной доставки лекарств для снижения токсических эффектов, что позволяет эффективнее лечить опухоли не инвазивным путем. MnO<sub>2</sub> обладает рядом уникальных преимуществ для применения в лечении опухолей. Диспергируемые в воде нанокристаллы оксида марганца могут вызывать аутофагию, не зависящую от активации P53 [60]. Это усиление аутофагии помогает нанокристаллам оксида марганца совместно с другими химиотерапевтическими агентами повышать разрушаемость опухолей. Триметилфосфоний с наночастицами MnO<sub>2</sub> способен нацеливаться на митохондрии и эффективно поглощаться клетками HeLa [101]. Эта конструкция очень специфична по отношению к митохондриям, вызывает сильный цитотоксический эффект и гибель опухолевых клеток в течение четырех часов.

В плане комбинированной химиотерапии Howell с коллегами синтезировали многофункциональные липидные наночастицы путем инкапсулирования MnO<sub>2</sub> в мицеллах со смешанными катионами [38]. Исследования *in vitro* показали, что такие наноструктуры, загруженные доксорубицином или плазмидной ДНК, эффективно поглощаются карциномой легких Льюиса. После интраназального введения эти структуры преимущественно концентрировались в легком, МРТ и высвобождение ДНК и доксорубицина могло производиться одновременно.

Для фотодинамической терапии метастатических опухолей использовались углеродные нанотрубки, покрытые MnO<sub>2</sub>. Для исследования терапевтического эффекта было проведено выращивание клеток A549 (рак легкого человека) под воздействием данных наночастиц при лазерном облучении 3 Вт/см<sup>2</sup>. В результате почти все клетки были убиты. Модель метастазов клеток линии A549 была использована в исследованиях *in vivo*. Температура поверхности лимфатических узлов увеличилась с 25,28 °С до 55,64 °С в течение 5 минут под воздействием лазерного излучения, в то время как окружающие ткани значительно не изменили температуру [98]. Аналогично, Xiang с коллегами инкапсулировали MnO<sub>2</sub> в углеродные наносферы для использования наночастиц в МРТ и фототермической терапии. Для усиления эффективности фототерапии, Чжоу с коллегами синтезировали нацеленный на митохондрии многофункциональный нанофотосенсибилизатор, используя IR808 в качестве лиганда,

нацеливающего структуру на опухоль. Под воздействием лазерного излучения IR808 превращает кислород в высокотоксичные ионы с выделением большого количества тепла. Опухоли мышей MCF-7, обработанных этими наноструктурами, полностью регрессировали при воздействии инфракрасным светом с длиной волны 808 нм [6].

### ***Наночастицы на основе $Mn_3O_4$ в диагностике и терапии опухолей***

Разработка наночастиц  $Mn_3O_4$  как контрастных агентов привлекла большое внимание исследователей. В этих наночастицах Mn обладает смешанной валентностью +2 и +3.

Инкапсуляция гидрофобных наночастиц с помощью полимеров в настоящее время является наиболее распространенной стратегией модификации.

Yang с коллегами синтезировали монодисперсные наночастицы оксида марганца с покрытием из диоксида кремния путем пиролиза при высокой температуре. ПЭГ был связан с наночастицами  $Mn_3O_4 + SiO_2$ , покрытыми, через присоединенные аминогруппы, нацеливающим лигандом FA (глюкокортикоид флуоцинолона ацетонид). Такие наноструктуры демонстрировали хорошую стабильность в среде RPMI с 10% FBS. Также они способны контрастировать на МРТ клетки HeLa со сверхэкспрессией рецепторов FA в моделях опухолей на животных. Wang с сотрудниками синтезировали некоагулирующие наночастицы оксида марганца, используя сольватермический метод в присутствии цитрата тринатрия, после чего модифицировали его поверхность с помощью ПЭГ и L-цистеина [97]. Такие наночастицы имели высокую контрастность на МРТ, диспергируемость в водном растворе, коллоидную стабильность и хорошую биосовместимость. Что более важно, модификация L-цистеином позволила продлить время нахождения наночастиц в кровеносной системе (время полувыведения составило 28,4 часа) по сравнению с теми, которые не имели такой модификации (18,5 ч), а также уменьшила вероятность поглощения макрофагами.

PEI (полиэфириимид) - другой тип полимера, который обычно используется для модификации поверхности. Например, Luo с соавторами сообщили, что покрытые PEI наночастицы  $Mn_3O_4$ , конъюгированные с изотиоцианат флуоресцеином, ПЭГилированным FA и монометиловым эфиром ПЭГ использовались в качестве контрастных агентов для МРТ *in vivo* [62]. Кроме того, эти авторы полагают, что наночастицы  $Mn_3O_4$ , покрытые PEI, могут быть модифицированы и другими биомолекулами для применения в мультимодальной биомедицинской визуализации.

В настоящее время стратегии модификации ПЭГ и PEI являются относительно изученными. Тем не менее, модификация ПЭГ создает толстую гидрофобную углеводородную

оболочку, которая может препятствовать обмену протонами и магнитными ионами, что приводит к относительно низкой скорости релаксации. Альтернативная стратегия заключается в использовании небольших молекул, таких как цитрат натрия вместо олеиновой кислоты или олеиламина для покрытия поверхности гидрофобных частиц. Однако при нагревании, необходимом для реакции, может произойти окисление  $Mn^{2+}$  до  $Mn^{3+}$ . Поскольку ионы  $Mn^{3+}$  имеют как более низкие неспаренные электроны, так и значительно более короткое время релаксации электронов, чем у ионов  $Mn^{2+}$ , они не достаточны для достижения эффективного обмена протонов воды и увеличения скорости релаксации наночастиц оксида марганца.

### ***Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub> в качестве контрастных агентов для МРТ в визуализации и терапии опухолей***

Фотодинамическая терапия - эффективная клиническая терапия, при которой опухолевые клетки повреждаются активными формами кислорода, которые вырабатываются нетоксичными фотосенсибилизаторами под действием светового излучения с определенной длиной волны. Фотодинамическая терапия с визуализацией может обеспечить более точное определение локализации опухоли и уменьшить побочные эффекты для нормальных тканей. С этой целью был создан гибридный агент PDT с двойной визуализацией, состоящий из  $Mn_3O_4$  и графеновых квантовых точек, связанных с полиэтилендиамином (PDA) и тиоламином [68]. Несколько исследований стабильности этой системы показали, что связь между  $Mn_3O_4$  и графеновыми квантовыми точками сохраняет стабильность в темноте, но лазерное облучение может привести к генерации эффективных флуоресцентных излучений и активных форм кислорода, что убивает раковые клетки и приводит к регрессии опухоли. Также эти наночастицы демонстрируют хорошие оптические и контрастные возможности в МРТ. Ding с коллегами разработали многофункциональный нанотераностический агент  $Mn_3O_4$ +PDA+ПЭГ с конъюгированным доксорубицином, который будет участвовать в синергетической химио - фототермической терапии под контролем МРТ [18].

### ***Наночастицы на основе MnO<sub>2</sub> в диагностике и терапии опухолей***

Хорошо известно, что рост и метаболизм опухолевых клеток не регулируется так, как это происходит в нормальных клетках, что приводит к тому, что микроокружение опухолей довольно сильно отличается от обычных тканей. В клетках злокачественных опухолей происходит чрезмерная выработка  $H_2O_2$  и его накопление в микроокружении. В то же время, активный гликолиз во время онкогенеза приводит к выработке большого количества молочной кислоты, что понижает pH микроокружения опухолей [104]. Кроме того, сообщалось, что количество глутатиона в опухолевых тканях почти в пять раз выше, чем в нормальных тканях, и что глутатион играет ключевую роль в защите клеток от таких веществ, как  $H_2O_2$ , супероксид,

гидроксильный радикал и другие активные формы кислорода [58]. Гипоксия, которая является характерной чертой солидных опухолей, часто связана с инвазией, метастазированием опухоли и ее устойчивости к традиционным методам лечения [21]. Это означает, что высокие уровни глутатиона и гипоксия опухолевых клеток повышают устойчивость к химиотерапии, лучевой и фотодинамической терапии. Как сообщалось, диоксид марганца обладает способностью реагировать с глутатионом при восстановлении  $Mn^{4+}$  до  $Mn^{2+}$ . При расходовании внутриклеточного глутатиона, продуцируемый  $Mn^{2+}$  может не только усиливать контрастность при МРТ, но и подвергаться реакции Фентона с перекисью водорода с образованием гидроксильных радикалов, наиболее вредных активных форм кислорода [58]. Таким образом, в последние годы получили распространение исследования наночастиц диоксида марганца в связи с их контрастными свойствами и способностью реагировать на микроокружение опухоли как нанотераностический агент.

### ***MnO<sub>2</sub> в качестве контрастных агентов для МРТ в визуализирующей терапии опухолей***

Song с коллегами сообщили о нагрузке доксорубицином наночастиц  $MnO_2$ , модифицированных гиалуроновой кислотой и маннаном для таргетной визуализации опухолевых клеток молочной железы в эксперименте на мышах и усиления действия химиотерапии [86]. Высокая степень накопления связанных с опухолью макрофагов в гипоксических областях солидной опухоли, а также высокая реактивность наночастиц  $MnO_2$  по отношению к пероксиду водорода приводит к активной генерации  $O_2$  и изменению pH для снижения опухолевой гипоксии. Кроме того, гиалуроновая кислота не только служит мишенью, но также может перепрограммировать противовоспалительные опухоль - ассоциированные макрофаги в провоспалительные противоопухолевые макрофаги для дополнительной регуляции хеморезистентности. В то же время, ионы  $Mn^{2+}$ , высвобождаемые при реакции наночастиц с пероксидом водорода, значительно улучшают контрастирование опухоли в МРТ.

В последнее время были предприняты попытки разработать терапевтические стратегии лечения онкологических заболеваний за счет выработки АФК, в частности, хемодинамическая терапия, в которой используются реакции Фентона [111]. К сожалению, чрезмерная выработка глутатиона в опухолевых клетках приводит к удалению гидроксил - ионов, что значительно снижает эффективность такой терапии. Lin с коллегами сообщили о самоусиливающемся хемодинамическом наноматериале на основе  $MnO_2$ , который истощает глутатион [96]. Эти авторы синтезировали наночастицы мезопористого диоксида кремния, покрытые камптотецином и  $MnO_2$  для синергического хемодинамического лечения новообразований под контролем МРТ. Как только опухолевые клетки захватывают эти наноструктуры, оболочка из



диоксида марганца реагирует с глутатионом, ионы марганца восстанавливаются до  $Mn^{2+}$ . При расходовании глутатиона в физиологических условиях, богатых  $HCO_3^-$ , получившиеся ионы марганца не только усиливают МРТ-контрастность, но и подвергаются реакции Фентона с  $H_2O_2$  с образованием  $OH^\cdot$ , и таким образом усиливают эффект хемодинамической терапии.

### ***Наночастицы $MnO_2$ для расширенной фотодинамической терапии и МРТ***

Гипоксическая среда опухолей наряду со способностью сверх экспрессированного глутатиона поглощать АФК и коротковолновое лазерное излучение является препятствием для клинического применения фотодинамической терапии [90, 32]. Исходя из ранее указанных свойств  $MnO_2$ , позволяющих ему усиливать МРТ контраст и связывать глутатион, были синтезированы аптамер-конъюгированные, загруженные доксорубицином и хлорином еб наноструктуры из  $MnO_2$  и мезопористого диоксида кремния, легированные двухфотонным красителем для глутатион - чувствительной флуоресцентной/МРТ - бимодальной клеточной визуализации, а также таргетной химио - и фотодинамической терапии.

### ***Наночастицы на основе $MnO_x$ в диагностике и терапии опухолей***

Степень окисления оксида марганца можно определить с использованием классических методов материаловедения, таких как рентгеновская дифракция, рентгеновская фотоэлектронная микроскопия и другие. Однако, при достижении материалом наноразмера, определение этой характеристики становится чрезвычайно сложным. Поэтому некоторые исследователи описывают наноструктуры просто как  $MnO_x$ , чтобы избежать неточностей [25].

Гао с коллегами поместили технеций-99 на поверхность наночастиц, покрытых  $MnO_x$  на основе мезопористого кремния для интеграции методов визуализации SPECT и МРТ для улучшения чувствительности и пространственного разрешения [24]. МРТ является самой быстрорастущей технологией молекулярной визуализации благодаря своей не инвазивной природе, высокому пространственному разрешению, неионизирующему излучению, возможности визуализации мягких тканей и т.д. Благодаря хорошей биосовместимости, относительно высокому уровню намагниченности и быстрому обмену протонов в воде, наночастицы оксида марганца (в отличие от гадолиния) приняты к разработке как контрастные агенты и изучаются как клинические агенты для диагностики онкологических заболеваний.

Несмотря на перспективность использования таких наноплатформ, их исследования находятся еще на ранних лабораторных стадиях. Подобно другим наноструктурам, малый размер наноматериалов дает им отличные химические и физические свойства, но их нанотоксичность все еще остается не вполне ясной. Относительно наночастиц оксида марганца,

вопрос, ослабляет ли их кристаллическая структура нейротоксичность самого марганца или нет, требует дальнейшего изучения. Что еще более важно, функциональность наноструктур достигается за счет увеличения их сложности. Сложные структуры, необходимые для достижения универсальности, создают серьезные технические проблемы при конструировании и получении, такие как стабильность в растворе, управляемость экспериментальных процессов и воспроизводимость. Эти проблемы увеличивают сложность очистки получаемых наноструктур, а монодисперсность конечного продукта оставляет вопрос хранения и срока годности [6]. Нанодисперсные частицы оксида марганца (MnO) в силу высокой реакционной способности широко используются в качестве активной субстанции при производстве сорбентов и катализаторов, используемых в технологиях утилизации жидких отходов.

Наночастицы оксида марганца ввиду своих небольших размеров и высокой проникающей способности могут преодолевать гематоэнцефалический барьер и вызывать морфофункциональные нарушения различных отделов центральной нервной системы при различных путях поступления в организм даже в небольших концентрациях [79]. Оценка риска воздействия наночастиц оксида марганца в основном сосредоточена на ингаляции как наиболее вероятном пути поступления в организм. По данным работ ряда авторов [77], можно предположить, что в определенных условиях наночастицы оксида марганца могут оказывать неблагоприятное, в том числе токсическое, воздействие на организм при ингаляционном поступлении. Для них характерна активная каталитическая генерация реакционно-способных активных форм кислорода (АФК), которая выявлена в альвеолярных эпителиальных клетках человека после 24-часовой экспозиции [23], при этом увеличивается уровень внеклеточной и внутриклеточной окисленной формы глутатиона на 30 и 80 % соответственно [77].

При интраназальном введении наночастиц оксида марганца (IV) в дозе 2,63 мг/кг массы тела в течение 6 недель у крыс наблюдается появление нейротоксичности по увеличению относительного рефрактерного периода хвостового нерва. При интратрахеальном введении изучаемого соединения в аналогичной дозе в течение 6 недель зафиксировано значительное снижение массы тела, удлинение абсолютного рефрактерного периода хвостового нерва, уменьшение подвижности животных [79]. Нейротоксичность наночастиц оксида марганца (IV) при интратрахеальном введении в дозах 2,63 и 5,26 мг/кг также проявляется в увеличении латентного периода возникновения коркового потенциала (суммарного ответа больших популяций нейронов коры на приходящий к ним синхронный поток импульсов, возникающий под воздействием афферентного раздражителя) в визуальной, слуховой и первой соматосенсорной области. Данный эффект может быть обусловлен нарушением

функций мембран нейронов в результате перекисного окисления мембранных липидов, сопровождающегося нарушением гомеостаза кальция [16]. Установлено, что после 24 часов воздействия наночастиц оксида марганца на альвеолярные эпителиальные клетки в культуре уровень внеклеточной и внутриклеточной формы восстановленного глутатиона увеличивается на 30 и 80 % соответственно. Концентрация окисленного глутатиона возрастает после 24 часов воздействия наночастиц оксида марганца, что может быть связано с активацией синтеза  $\gamma$ -глутамилцистеинсинтетазы и повышением активности транспортной системы аминокислот цистина и глутамата, которые являются субстратами для синтеза восстановленной формы глутатиона [23].

Проведенные ранее исследования показали, что при однократном введении через зонд водной суспензии нанодисперсного оксида марганца с размером частиц 15–29 нм среднесмертельная доза (LD50) для мышей BALB/C составляет  $2340,0 \pm 602,6$  мг/кг массы тела, для крыс линии Wistar –  $2577,0 \pm 669,6$  мг/кг [117].

Водная суспензия нанодисперсного MnO при ежедневном внутрижелудочном введении через зонд крысам линии Wistar в дозах 260, 50, 10 мг/кг массы тела/сут в течение 90 дней вызывает активацию перекисного окисления липидов (по повышению уровня гидроперекисей липидов и МДА в сыворотке крови), снижение активности антиоксидантной системы (по снижению концентрации антиоксидантов и Cu/Zn супероксиддисмутазы в сыворотке крови), повреждение мембран астроцитов и нейронов и нарушение соотношения нейромедиаторов (по повышению концентрации глутамата и снижению ГАМК в сыворотке крови), полнокровие сосудов, субарахноидальное кровоизлияние, отёк головного мозга с расширением периваскулярных и перицеллюлярных пространств, очаги демиелинизации нервных волокон, очаговые дистрофические изменения эндотелия сосудов. В дозе 5 мг/кг массы тела/сут водная суспензия нанодисперсного MnO установленных эффектов не вызывает [118].

## **Глава 2 Материалы и методы**

### *2.1 Материалы и реактивы*

DMEM/F-12 (1:1), порошок (с добавлением L-глутамина, 15 мМ HEPES и пиридоксина) для приготовления жидкой культуральной среды (Invitrogen, США);

DMSO (диметилсульфоксид) (Amresco, США);

DPBS (дульбекко ФСБ) (раствор 10x) (Invitrogen, США);

гентамицина раствор (Invitrogen, США);  
изопропанол (лаборатория Медиген, Россия);  
канамицина порошок (Биохимик, Россия);  
трипсин (250x) сухой (Invitrogen, США), для приготовления 0,25 % раствора;  
ципрофлоксацин 2мг/мл 100 мл (Курган Синтез, Россия);  
МТТ (тиазолил синий тетразолий бромид), не менее 98 %;  
Раствор  $MnCl_2$  0,5M (Sigma);  
Взвесь наночастиц  $MnO$  0,4M (Институт Катализа СО РАН);  
Цисплатин 5мг/мл, 100мл (Фармахеми Б.В., Нидерланды);  
Клеточные культуры (U-87, SW620, фибробласты эмбриона человека) 4 день после посева при концентрации  $5 \times 10^4$  кл./мл, флаконы 25 см<sup>2</sup>;  
Градуированные пипетки 1 мл, 5 мл, 10 мл, 25 мл;  
Микропипетки разных объемов;  
Этанол 70% в распыляющей бутылке;  
Без ворсовые салфетки или тампоны для протирки;  
Ручка-маркер с нерастворимыми этанолом чернилами;  
Записная книжка, ручка, протоколы и т. д.

### 2.1.1 Наночастицы оксидов и другие соединения марганца

**Наночастицы оксида марганца (II).** Препарат представляет собой 0,5M коллоидный раствор наночастиц оксида марганца (II) производства Института Катализа СО РАН. Хранился при комнатной температуре в течение всего эксперимента (около 2х месяцев). В качестве лекарственного средства препарат ранее не использовался. По литературным данным, применялся в экспериментальной биологии как контрастное вещество для МРТ на животных.

В исследовании использовалась только надосадочная жидкость, содержащая фракцию целевых наночастиц. Требуемое разведение достигалось добавлением необходимого количества дистиллированной воды.

**Характеристика микроструктуры НЧ  $MnO$  методом просвечивающей ЭМ высокого разрешения.** Характеристики наночастиц, такие как размер и форма, имеют решающее значение для определения их функциональной роли в опухолевых клетках. В связи с этим синтезированные НЧ  $MnO$  были исследованы с использованием просвечивающей ЭМ для определения их размера, формы и морфологии. На рисунке 1 приведены электронно-микроскопические (ЭМ) изображения исходных НЧ  $MnO$  (II), сорбированных на поверхность

графита. Как видно на рисунке, наночастицы  $MnO$  имели диаметр 10–50 нм (рисунок 1а) и кристаллическую структуру сферообразной формы (рисунок 1б), сформировавшуюся, вероятно, в процессе подготовки образцов.

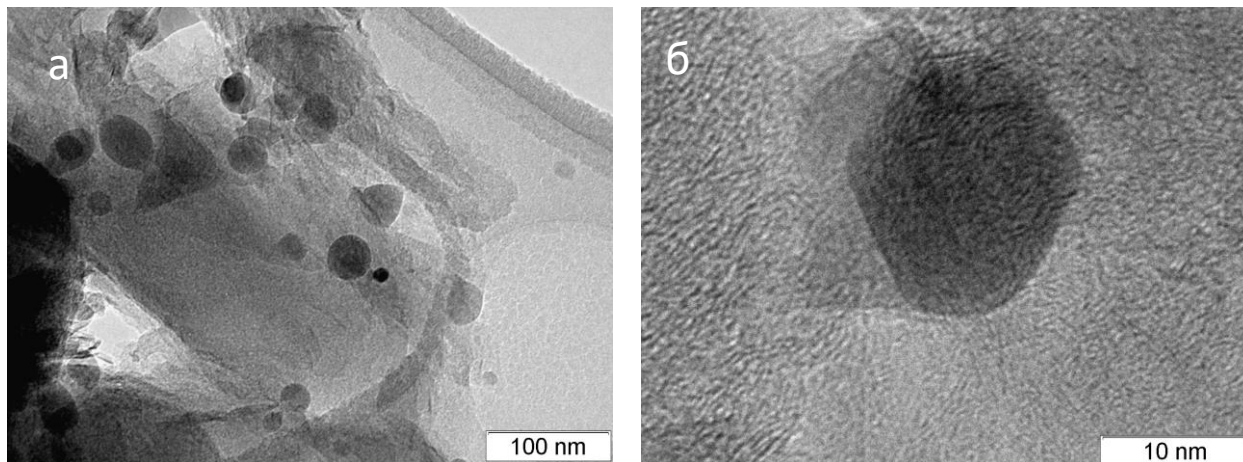


Рисунок 1. Электронно-микроскопические изображения НЧ оксида марганца на поверхности графита.

Анализ спектра малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) суспензии НЧ  $MnO$  показал, что наибольшее число частиц имели диаметр порядка 8-10 нм ( $8 \pm 3$  нм) (рис. 2). Второй максимум в распределении НЧ наблюдался в районе 30 нм, что соответствует агрегированным частицам, в которых одна частица диаметром около 10 нм окружена, по-видимому, слоем таких же частиц, что соответствует данным электронной микроскопии (рис. 1).

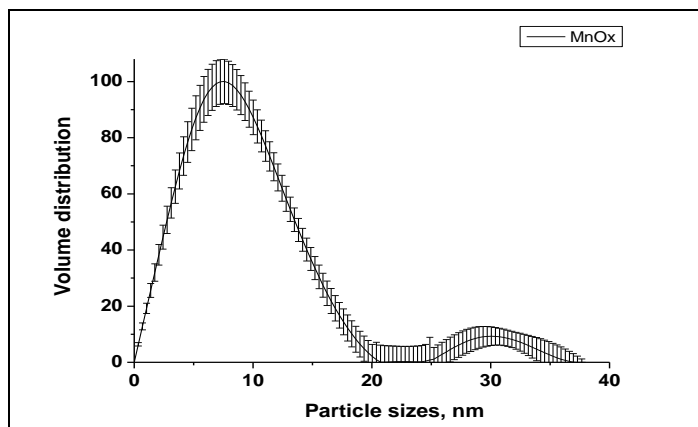


Рисунок 2. Определение методом МУРР распределения по размерам наночастиц  $MnO$  в суспензии

## 2.2 Культуры клеток

### 2.2.1 Характеристика культур клеток и паспортные данные

Культура клеток глиобластомы человека U-87 (ATCC® HTB-14™) была взята у европеоидного мужчины из опухоли, удаленной оперативным путем и охарактеризована Понтеном в 1975. Недавние исследования показали, что клеточная линия имеет высокую абберрантность: U-87 - гиподиплоидная линия с модальным числом хромосом 44. Мутационный анализ выявил 512 мутировавших генов. Во многих исследовательских работах данная клеточная линия используется для тестирования цитогенетической активности противоопухолевых агентов, включая наночастицы и экстракты растений. Инвазивный потенциал U-87 выше в сравнении с другими клеточными линиями мультиформных глиобластом, например, U-118 [91].

Культура клеток колоректальной аденокарциномы SW620 (ATCC® CCL-227™) была взята у 51-летнего мужчины из метастаза в лимфатическом узле в 1976 году. Колоректальная карцинома представляет собой третий наиболее часто диагностируемый рак у мужчин и второй у женщин, причем больше половины случаев заболеваемости имеет место в развитых регионах [115].

Культура фибробластов эмбриона человека получена из криобанка SPF-вивария ИЦиГ СО РАН.

### 2.2.2 Культивирование или пассирование клеток

Когда клеточная линия подвергается субкультивированию, то происходит повторный рост клеток до точки, в которой культура становится готовой к последующему субкультивированию. Обычно этот процесс можно выразить в виде стандартного графика [123]. Lag-период наступает после посева, вслед за ним идет период экспоненциального роста, называемый log-фазой. Когда плотность клеток (клеток/см<sup>2</sup> субстрата) достигает такого уровня, что весь доступный субстрат оказывается занятым, или когда концентрация клеток (клеток/мл среды) превышает возможности среды, рост прекращается или значительно снижается. Затем следует либо заменить среду, либо культуру следует разделить. Для адгерентных клеточных линий деление культуры, или субкультивирование, обычно включает в себя удаление истощенной питательной среды и диссоциацию клеток монослоя при помощи трипсина. Прикрепление клеток друг к другу и к субстрату опосредовано гликопротеинами клеточной поверхности и Ca<sup>2+</sup>. Другие протеины, а также протеогликаны, выделенные из клеток и из сыворотки, связываются с

клеточной поверхностью и с субстратом, усиливая клеточную адгезию. Субкультивирование обычно требует хелатирования  $Ca^{2+}$  и деградации внеклеточного матрикса, а также, возможно, внеклеточных доменов некоторых молекул клеточной адгезии [123].

Как только культура иницирована, независимо от того, является она первичной или субкультурой, периодически заменялась среда с последующим субкультивированием, если клетки делятся. Состояние среды исследовалось невооруженным глазом, состояние монослоя клеток - с помощью инвертированного микроскопа. При обнаружении, например, падения pH, старая среда заменялась новой.

### 2.2.3 Подсчёт клеток на автосчётчике

Подсчёт клеток на автосчётчике Countess производится согласно инструкции производителя. При субкультивировании клеток каплю суспензии отбирают для подсчета, помещая ее на плашку. Рядом добавляют две капли по 10 мкл красителя трипанового синего. Затем из капли суспензии 10 мкл среды с клетками переносят в краситель и пипетируют 7-10 раз. Окрашенные клетки помещают в лунку камеры для подсчета, которую вставляют в разъем автосчетчика до щелчка. Изображение оптимизируют путем увеличения выбранной области кнопкой «zoom» и поворачивая фокусирующий винт. Живые клетки должны иметь яркий центр и темные края, мертвые - синее окрашивание без яркого центра.

В результате подсчета прибор показывает общее число клеток, количество живых и мертвых клеток и их процентное содержание.

### 2.2.4 Постановка МТТ-теста (микротитрационный анализ на основе тетразолевого красителя)

**Принцип действия.** Клетки в экспоненциальной стадии роста подвергаются действию препарата, предположительно обладающего цитотоксичностью и выращиваются под действием препарата в течение времени, достаточного для повреждения. Число оставшихся живых клеток косвенно определяется по окраске, по уменьшению МТТ-окрашивания. МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид) под действием ферментов митохондрий живых клеток превращается в синий формазановый продукт. Количество образовавшегося МТТ-формазана определяется спектрофотометрически, если МТТ-формазан растворен в подходящем растворителе (DMSO-диметилсульфоксид или пропанол-2).

**Схема.** Монослойная культура подвергается действию трипсина для открепления клеток от подложки. После того, как клетки перейдут в состояние суспензии, добавляют удобное для

подсчета количество ростовой среды. Проводят подсчет клеток с помощью камеры Горяева или на автоматическом счетчике, окрашивая погибшие клетки трипановым синим. В каждую лунку микротитрационного планшета, кроме первого столбца, добавляют по 10-20 тыс. клеток. Затем клетки инкубируются в течение суток для прикрепления и адаптации к среде. Добавляют препараты, оставив два или три столбика лунок без препаратов для в качестве контрольной группы, и титруют, перенося равное количество среды из лунки в лунку от верхних к нижним для получения градиента концентраций препаратов. Планшет оставляют в инкубаторе на срок, достаточный для повреждения клеток исследуемыми препаратами. Затем среду из лунок заменяют на бессывороточную среду, содержащую МТТ. Образование осадка занимает в среднем 4 часа, затем среду заменяют на растворитель, стараясь не задеть осадка. Растворение занимает 5 минут, после чего планшет можно подвергать спектрофотометрическому анализу. С помощью планшетного ридера измеряют оптическую плотность каждой лунки при длине волны 490 либо 595 нм, что соответствует синей области спектра. Значение концентрации, вызывающее 50% ингибирование роста популяции клеток определяют на основе дозозависимых кривых [112].

### *2.3 Модели и методы исследований in vivo*

#### 2.3.1 Характеристика мышей линии SCID

Центр коллективного пользования научным оборудованием «SPF-виварий» Института цитологии и генетики СО РАН является площадкой для проведения большого числа исследований на животных SPF-статуса. Животные, выращенные в условиях отсутствия инфекционных заболеваний, обладают высокими показателями здоровья, что позволяет получать более надежные результаты биомедицинских исследований.

Мыши линии SCID (several combined immunodeficiency) завезены в Центр генетических ресурсов лабораторных животных ИциГ СО РАН из Charles River Laboratories в 2012 году. Отличительной особенностью является тяжелый иммунодефицит в результате мутации в генах RAG, ответственных за перегруппировку генов иммуноглобулинов и Т-клеточного рецептора. Животные практически лишены Т- и В-лимфоцитов и могут жить только в безмикробных условиях. В результате этого, не отторгают ксенографты клеток человека и могут быть использованы для исследований онкологических заболеваний.

Животные содержались в «чистой» зоне ЦКП «SPF-виварий» ИциГ СО РАН однополыми группами по 5 особей в индивидуально вентилируемых клетках системы OptiMice (Animal care systems) в контролируемых условиях (при комнатной температуре 22-25°C, относительной



влажности 30-60% и световом режиме свет/темнота 14/10 ч с рассветом в 01:00). Корм Ssniff (Германия) и деионизированную воду, обогащенную минеральной смесью «Северянка» (Санкт-Петербург), животным предоставляли *ad libitum*.

### 2.3.2 Инокуляция клеток животным и наблюдение за ростом опухоли

Все манипуляции проводили в соответствии с международными правилами работы с животными (European Communities Council Directive 86/609 EEC).

Перед инъекцией клетки опухоли снимали с подложки раствором трипсин/версен и после 5 мин центрифугирования при 1000 об/мин осадок тщательно перемешивали в среде без сыворотки, доводя до концентрации  $10^8$  клеток в 1 мл. Для получения солидной опухоли мышам в лопаточную область подкожно вводили по 10 млн клеток в 100 мкл среды DMEM/F12 без сыворотки. На протяжении периода наблюдения, 3 раза в неделю обследовали животных с помощью пальпации места инокуляции клеток. При появлении характерных уплотнений штангенциркулем измеряли в мм длину и ширину. Объём опухоли ( $V$ ) вычисляли по формуле [13], где  $V = (a \times b^2) \times 0,52$ ,  $a$  – наибольший диаметр опухоли,  $b$  – наименьший диаметр опухоли. В ходе эксперимента данные объёма использовали для расчёта процента торможения роста опухоли (ТРО) и индекс прироста опухоли (ИПО). Расчёты производили по формулам: ТРО, % =  $(V_{\text{контроля}} - V_{\text{опыта}}) / V_{\text{контроля}} \times 100$ ; ИПО =  $V_i / V_0$ , где  $i$  — сутки эксперимента,  $V_0$  – объём опухоли в день начала введения препаратов.

## Глава 3 Практическая часть. Определение цитотоксичности наночастиц MnO in vitro и in vivo против клеток опухолей человека

### 3.1 Определение избирательного действия наночастиц MnO in vitro против клеток линии SW620

На культурах SW620 и фибробластах эмбриона человека была проведена серия МТТ-тестов для выявления токсических эффектов наночастиц оксида марганца и раствора хлорида марганца для изучения избирательности воздействия наночастиц и выяснения вклада ионов марганца ( $Mn^{2+}$ ) в токсический эффект. Контрольным препаратом служил цисплатин (Фармахеми Б.В., Нидерланды), разведённый в соответствии со схемой эксперимента. В литературных данных  $CC_{50}$  – цитотоксическая концентрация, убивающая 50% клеток, цисплатина оценивается в 0,75-1,05 мкг/мл (0,6-3,5 мкмоль/л) [34].

Таблица 1

Определение цитотоксичности наночастиц MnO в МТТ-тесте в отношении опухолевых клеток человека **SW620** и нормальных клеток ФЭЧ

| Культура клеток               | CC <sub>50</sub> препаратов, мг/мл |           |                   |
|-------------------------------|------------------------------------|-----------|-------------------|
|                               | MnO                                | цисплатин | MnCl <sub>2</sub> |
| SW620                         | 0,003                              | 0,0005    | 0,03              |
| Фибробласты эмбриона человека | 0,06                               | 0,0004    | вне диапазона*    |

\*-во всех исследованных концентрациях MnCl<sub>2</sub> (от 0,126 мг/мл до 0,06 мкг/мл) не проявил цитотоксического действия

С целью определения перспективности использования соединений при разработке препаратов для химиотерапии опухолей, как правило, определяют индекс селективности (ИС) или индекс избирательной цитотоксичности – отношение CC<sub>50</sub> исследуемого соединения для клеток нормального фенотипа к CC<sub>50</sub> для клеток опухолевого происхождения [87]. Индекс селективности наночастиц MnO по отношению к клеткам аденокарциномы кишечника SW620 составляет 20. Для клеток глиобластомы U87, это значение, полученное в предыдущих исследованиях, составляет 29 [31].

Таблица 2

Индекс селективности наночастиц MnO в МТТ-тесте в отношении опухолевых клеток человека **U-87, SW620** и нормальных клеток ФЭЧ

|       | Индекс селективности |           |
|-------|----------------------|-----------|
|       | MnO                  | цисплатин |
| SW620 | 20                   | 0,8       |
| U-87  | 29*                  | 1,3       |

\*-показатель взят из литературных данных [27]

### 3.2 Определение местной токсичности препарата НЧ MnO у мышей SCID

#### 3.2.1 Токсические эффекты различных концентраций НЧ MnO при подкожном введении

Мыши были распределены на 6 групп, по 5 самцов в каждой. Животным из первых трех групп вводили взвесь наночастиц в разведениях 1/10, 1/20 и 1/30 (концентрации 2,8; 1,4 и 0,9 мг/мл). Животным из трех других групп вводили раствор хлорида марганца  $MnCl_2$  в тех же разведениях (концентрации 25; 12,5 и 8,3 мг/мл) для выявления вклада марганца в токсический эффект. Вещества вводились подкожно один раз в два дня на протяжении месяца объемом по 100 мкл на животное.

Состояние мышей регистрировали, начиная с первого дня эксперимента, путем измерения массы и последующих замеров площади ранок и очагов некроза, проявляющихся в результате токсического действия, оценки двигательной активности и поведения. Срок наблюдения составлял 26 дней. Животные, имеющие выраженные признаки токсичности – сгорбленность, снижение двигательной активности, обширные поражения кожи и тканей и снижение массы тела более чем на 20%, подвергались эвтаназии в соответствии с принципами биоэтики.

Данные по проведению эксперимента по определению токсичности препаратов при подкожном введении представлены в таблице 3.

Таблица 3.

Схема оценки эффектов различных концентраций НЧ MnO при подкожном введении

| Препарат | Количество животных | Концентрация, мг/мл | Доза препарата, мкг/кг |
|----------|---------------------|---------------------|------------------------|
| MnO      | 5                   | 2,8                 | 13                     |
| MnO      | 5                   | 1,4                 | 7                      |
| MnO      | 5                   | 0,9                 | 4                      |
| $MnCl_2$ | 5                   | 25                  | 114                    |
| $MnCl_2$ | 5                   | 12,5                | 58                     |
| $MnCl_2$ | 5                   | 8,3                 | 38                     |

В данном эксперименте было проведено сравнение токсического действия наночастиц MnO и раствора  $MnCl_2$  при регулярном введении мышам линии SCID. Результаты эксперимента приведены на рисунке 3.

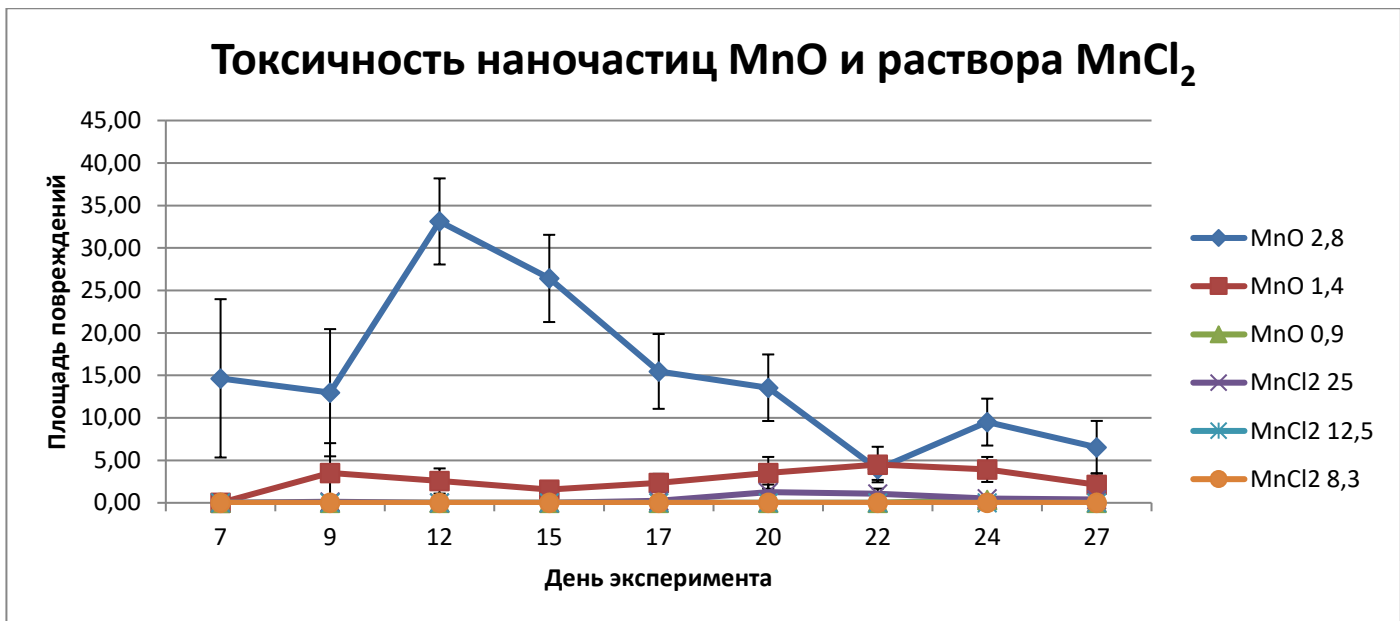


Рисунок 3. Определение токсичности НЧ MnO и раствора MnCl<sub>2</sub> при подкожном введении

Минимальная токсическая концентрация рассматривалась как минимальное разведение препарата, при котором проявляется токсическое действие. Из графика видно, что наночастицы оксида марганца оказывают больший токсический эффект в меньших дозах, чем раствор хлорида марганца. Минимальная токсическая доза наночастиц составляет 7 мкг/кг. Токсическая доза в используемых концентрациях (максимальная 114 мкг/кг) не была обнаружена.

Изменения массы животных в ходе эксперимента были незначительными, данные представлены на рисунке 4.

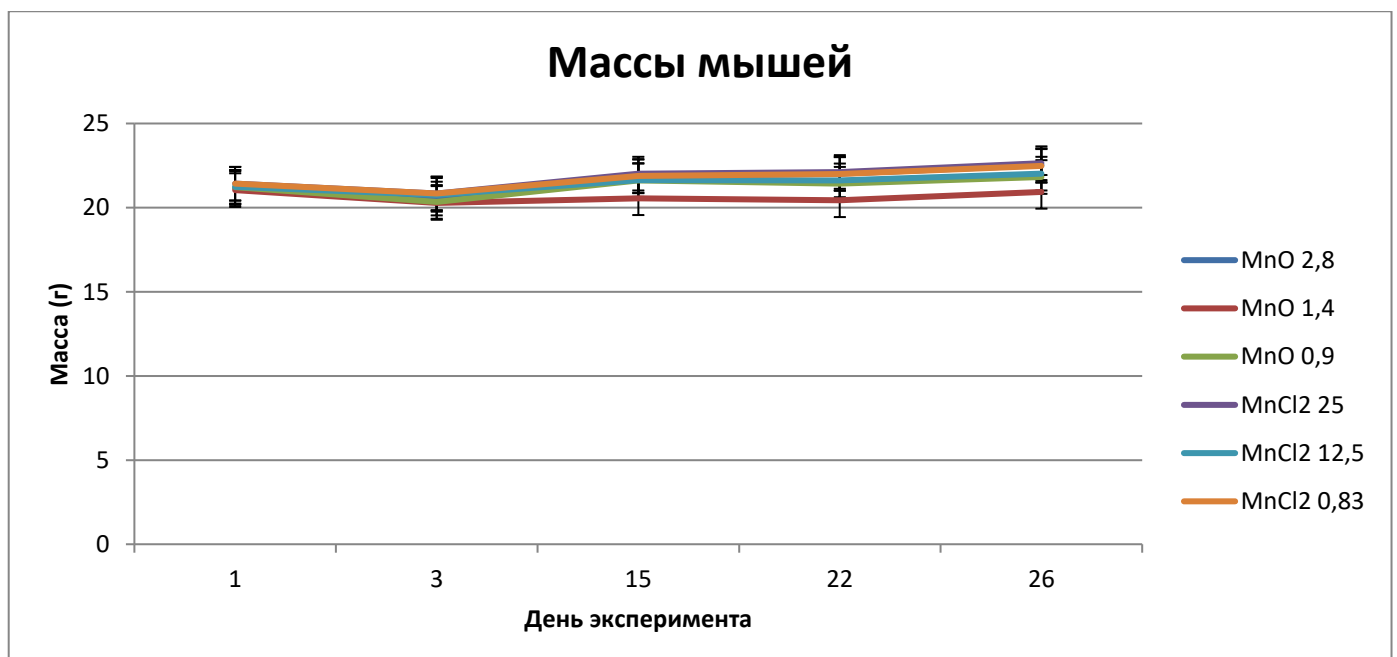


Рисунок 4. Изменение массы животных в ходе эксперимента по определению токсичности НЧ MnO и раствора MnCl<sub>2</sub> при подкожном введении

### 3.2.2 Токсические эффекты НЧ MnO при внутривенном и внутрибрюшинном введении

Было сформировано 4 группы животных, по 5 самцов мышей в каждой. На основе данных прошлого эксперимента было принято решение вводить наночастицы MnO в концентрации 1,4 мг/мл (доза 7 мкг/кг), раствор MnCl<sub>2</sub> в концентрации 12,5 мг/мл (доза 58 мкг/кг). Первой группе вводили взвесь наночастиц MnO внутрибрюшинной, второй - в ретроорбитальный синус. Третьей и четвертой группе - раствор MnCl<sub>2</sub> теми же способами. Все введения (в ретроорбитальный синус и внутрибрюшинные) осуществлялись однократно в объеме 100 мкл.

Состояние мышей регистрировали начиная с первого дня эксперимента путем измерения массы и последующих замеров площади ранок и очагов некроза, проявляющихся в результате токсического действия, оценки двигательной активности и поведения.

Данные по проведению эксперимента 2 по определению токсичности препаратов при введении в ретроорбитальный синус и внутрибрюшинно представлены в таблице 4.

Таблица 4. Схема постановки эксперимента по определению токсических эффектов НЧ MnO при внутривенном и внутрибрюшинном введении

| Препарат          | Путь введения            | Количество животных | Концентрация, г/л | Доза препарата, мкг/кг |
|-------------------|--------------------------|---------------------|-------------------|------------------------|
| MnO               | внутрибрюшинно           | 5                   | 1,4               | 7                      |
| MnO               | в ретроорбитальный синус | 5                   | 1,4               | 7                      |
| MnCl <sub>2</sub> | внутрибрюшинно           | 5                   | 12,5              | 58                     |
| MnCl <sub>2</sub> | в ретроорбитальный синус | 5                   | 12,5              | 58                     |

Оба исследуемых препарата были однократно введены в разведении 1/20, наночастицы MnO в концентрации 1,4 мг/мл (доза 7 мкг/кг), раствор MnCl<sub>2</sub> в концентрации 12,5 мг/мл (доза 58 мкг/кг) внутрибрюшинно и в ретроорбитальный синус четырем группам мышей. Токсические эффекты не проявились.

### 3.3 Определение онколитической активности НЧ MnO *in vivo* на мышах SCID с ксенографтами U87MG

Предыдущие исследования показали, что наночастицы оксида марганца избирательно лизируют *in vitro* клетки U-87MG и U251MG глиобластомы человека, которая была сравнима и даже несколько превышала таковую, описанную ранее для НЧ ZnO к лимфобластоидным клеткам [30]. Кроме того, было показано, что инкубация клеток U-87MG с НЧ MnO усиливает цитотоксический эффект облучения против этих опухолевых клеток [37].

Первоначально, введение препаратов животным начинали с 17 дня после введения опухолевых клеток, когда средние размеры объёмов опухолей в контрольной и опытной группах составляли около 300 мм<sup>3</sup>. Было обнаружено, что у животных из экспериментальной группы (n=5, самцы) вводимые наночастицы (24 мкг/мышь; 0,92 мг/кг) проявляли выраженный противоопухолевый эффект (рис. 5). Рост опухоли у самцов из этой группы значительно замедлялся и уже на 4 сутки после начала введения НЧ средний объем опухоли был достоверно меньше, чем у животных из контрольной группы (n=4). Процент торможения роста опухоли (ТРО) в день закрытия эксперимента на 38 сутки (21 сутки с первого введения НЧ) составил 61,1%.

Таким образом, в экспериментах *in vivo* рост опухоли был заметно ингибирован еженедельным введением 24 мкг/мышь НЧ MnO.

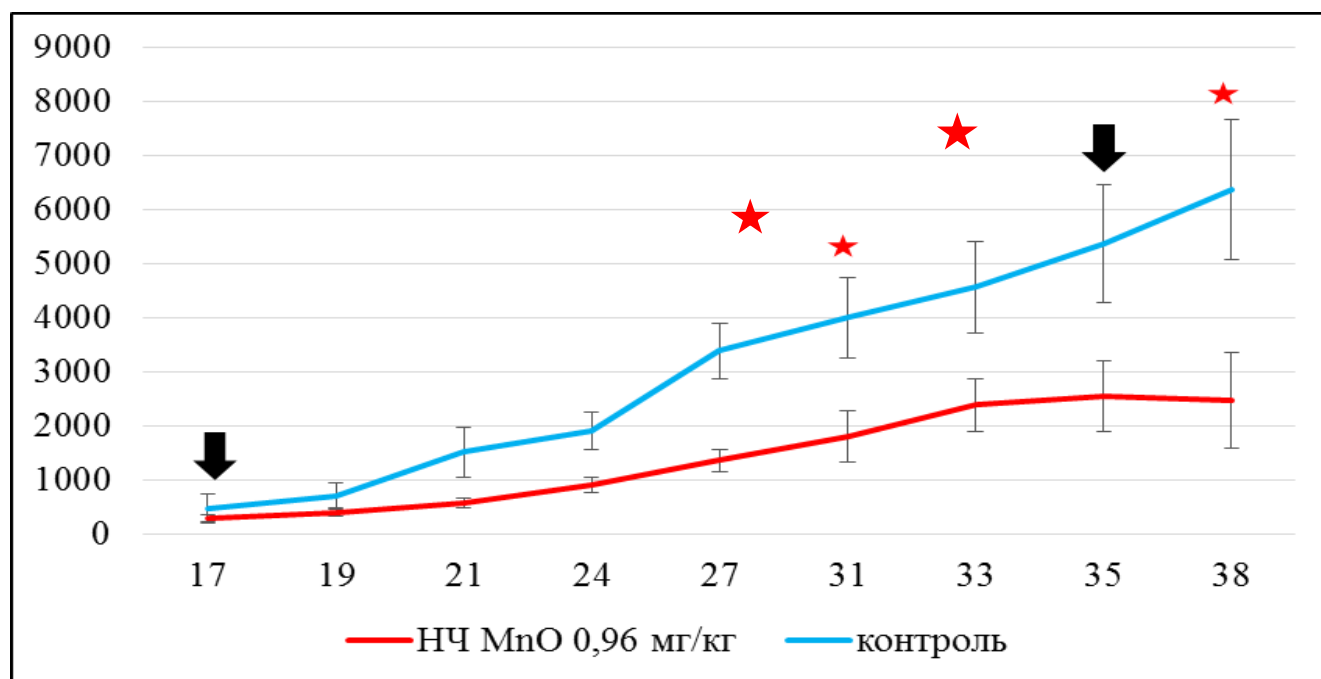


Рисунок 5 Определение эффектов НЧ MnO в разведении 120 мкг/мл в среде DMEM/F12 (в пересчёте на Mn) на рост ксенографтов U87MG у мышей SCID. Животным вводили по 24 мкг (0,96 мг/кг) Mn в одно животное один раз в день, три раза в неделю. По оси абсцисс представлены сутки от инокуляции опухолевых клеток, по оси ординат – средние объёмы ксенографтов в мм<sup>3</sup>. Стрелками обозначены день первого (17) и последнего (35) подкожного введения животным НЧ; \* - различия достоверны по t-критерию Стьюдента,  $p < 0.05$ , столбики представляют  $\pm SE$ .

Сравнительная оценка индекса прироста опухоли (ИПО) в контрольной и опытной группах выявила (рис. 6), что в период с 17 по 38 день средняя величина опухоли в опытной группе увеличилась в 8,01 раза, а в контрольной в 21,60 раза. Следовательно, ксенографты в контрольной группе росли в  $\approx 2,7$  раза быстрее, чем ксенографты у животных, которым подкожно вводили НЧ MnO.

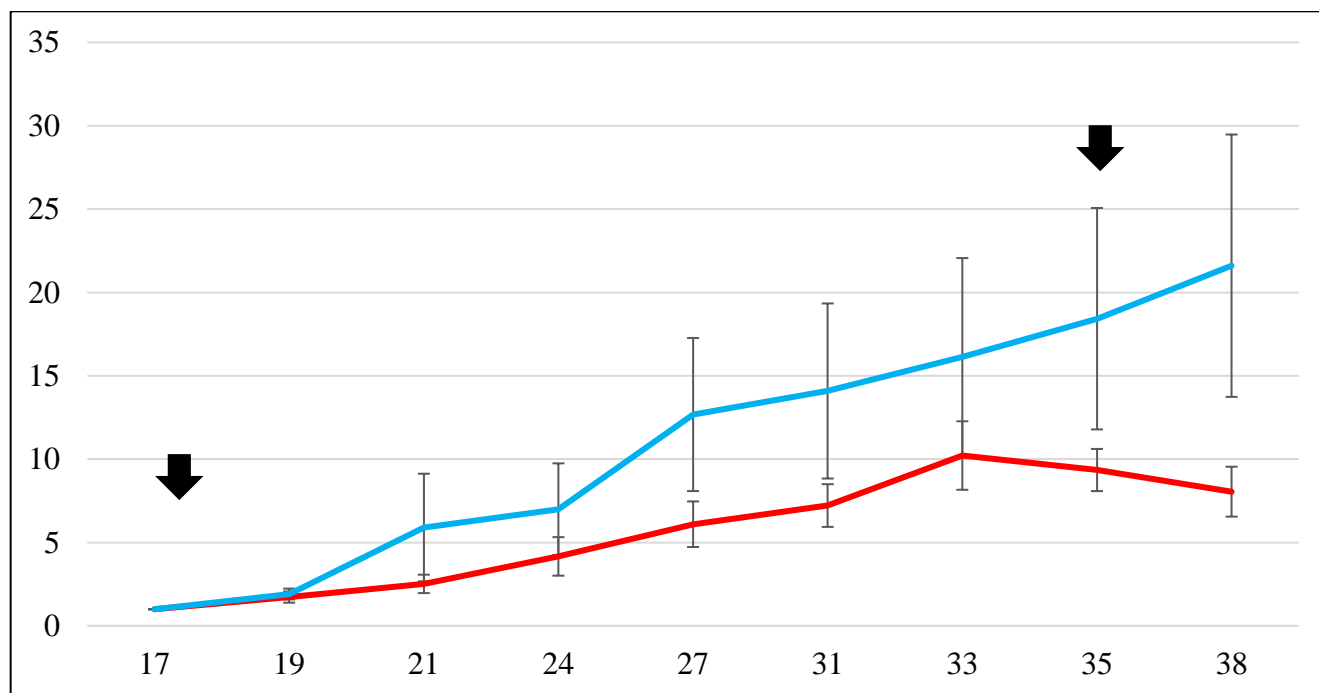


Рисунок 6. Определение индекса прироста ксенографтов у мышей SCID U-87MG при введении НЧ MnO. По оси абсцисс представлены сутки от инокуляции опухолевых клеток, по оси ординат – индекс прироста опухоли (ИПО). Стрелками обозначены день первого (17) и последнего (35) подкожного введения животным НЧ. Красная линия – группа НЧ MnO. Синяя линия – контрольная группа; столбики  $\pm SE$

При подкожном введении мышам двукратной дозы НЧ MnO (48 мкг/мышь) в месте расположения ксенографта U-87MG были обнаружены более выраженные эффекты торможения роста опухоли (рис. 7). Мышам опытных групп вводили подкожно НЧ MnO в дозе 1,92 мг/кг (2,4 мкг/мл) три дня в неделю в течение 3 недель.

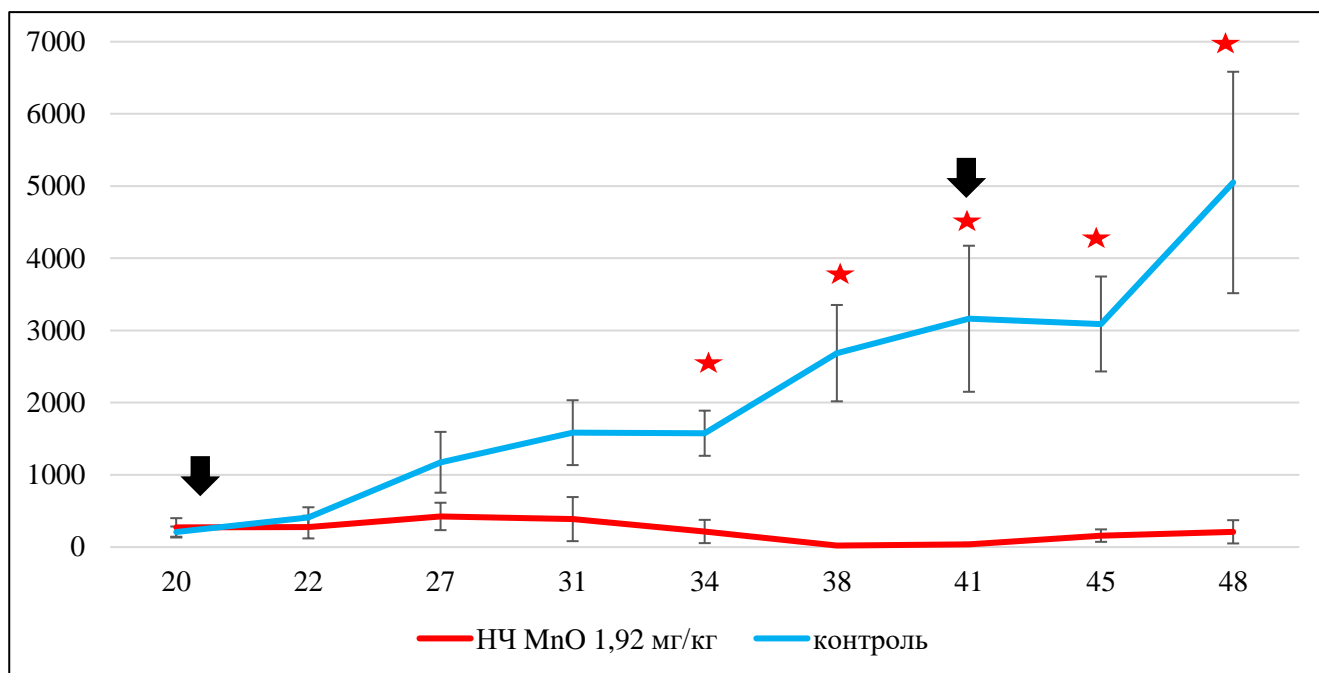


Рисунок 7. Определение эффектов НЧ MnO при разведении в воде для инъекций (фирма Renewal, Россия) на рост ксенографтов U-87MG у мышей SCID. Животным вводили по 2,4 мкг/мл Mn в одно животное один раз в день, три раза в неделю с 20 до 41 дня. По оси абсцисс представлены сутки от инокуляции опухолевых клеток, по оси ординат – средние объёмы ксенографтов в мм<sup>3</sup>. Стрелками обозначены день первого (20) и последнего (41) подкожного введения животным НЧ; \* - различия достоверны по t-критерию Стьюдента,  $p < 0.05$ , столбики представляют  $\pm SE$

Сравнительная оценка индекса прироста опухоли (рис. 8) в контрольной и экспериментальной группах позволила заключить, что опухоли контрольной группы за весь период до 48 суток росли значительно быстрее, чем опухоли в группе, получавшей НЧ MnO. Так в период инокуляции наночастиц с 20 по 41 день средние объёмы опухолей в группе лечения уменьшились в 13 раз, а в контрольной увеличились в 16,44 раза (тест Манна-Уитни:  $Z=2.16$ ,  $n=4=5$ ,  $p<0.05$ ). Наблюдение за животными из группы лечения продолжалось до 76 суток от инокуляции клеток. На 52 сутки в этой группе был отмечен взрывообразный рост ксенографтов, когда ИПО составлял 12.18, в отличие от ИПО = 0.43 на 48 сутки. В период с 48 по 76 день наблюдения средние объёмы опухолей в опытной группе лечения увеличились в 16,09 раза. Несмотря на это, на день закрытия эксперимента (76 сутки) объёмы опухолей в



опытной группе были сравнимы с объёмами опухолей в контрольной группе на 31 сутки ( $V_{\text{ср}}=1585 \text{ мм}^3$ ) (рис 8).

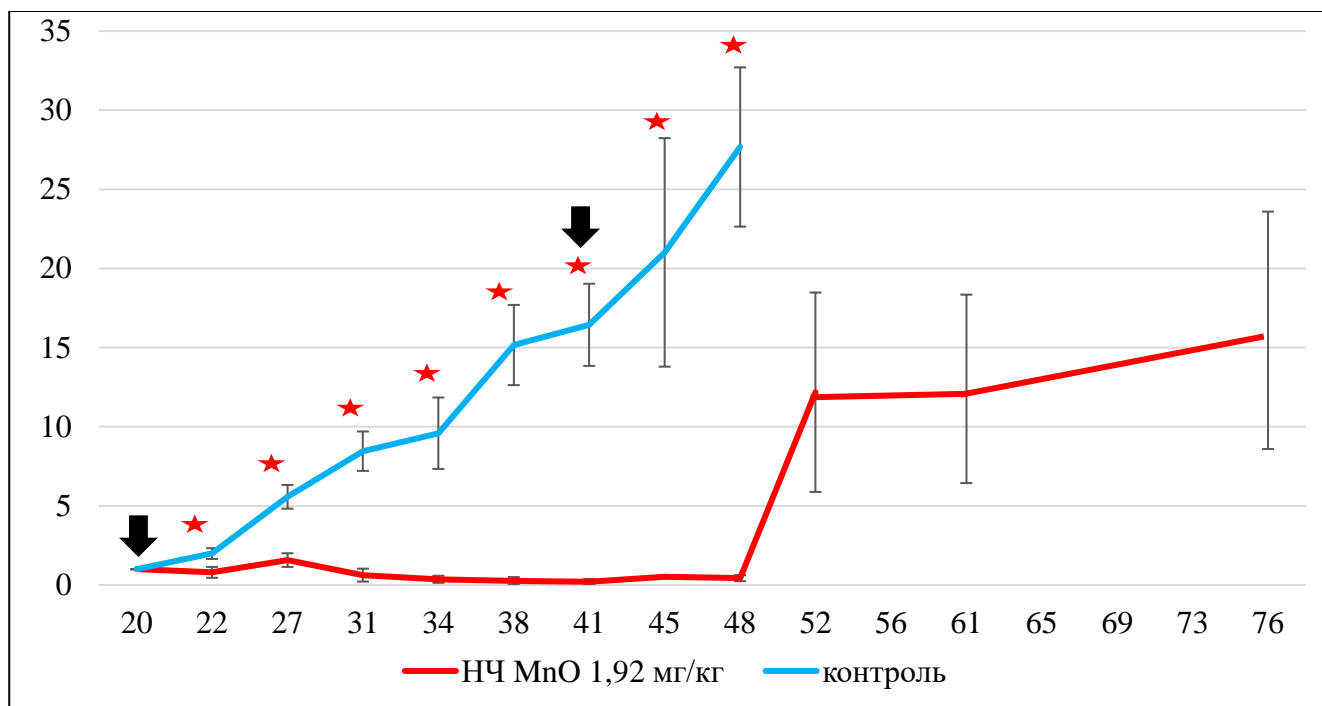


Рисунок 8. Определение индекса прироста ксенографтов у мышей SCID U-87MG при введении НЧ MnO (1,92 мг/кг Mn). По оси абсцисс представлены сутки от инокуляции опухолевых клеток, по оси ординат – индекс прироста опухоли (ИПО). Стрелками обозначены день первого (20) и последнего (41) подкожного введения животным НЧ. Красная линия – группа НЧ MnO. Синяя линия – контрольная группа; \* - различия достоверны по тесту Манна-Уитни,  $p < 0.05$ , столбики представляют  $\pm SE$ .

Необходимо отметить, в данном эксперименте наночастицы MnO при подкожном введении в указанных дозах провоцировали появление мелких очагов некроза на коже животных на месте опухоли. После прекращения введения наночастиц эти очаги постепенно заживали. Однако характер, темп и период их заживления был индивидуальным для каждой мыши.

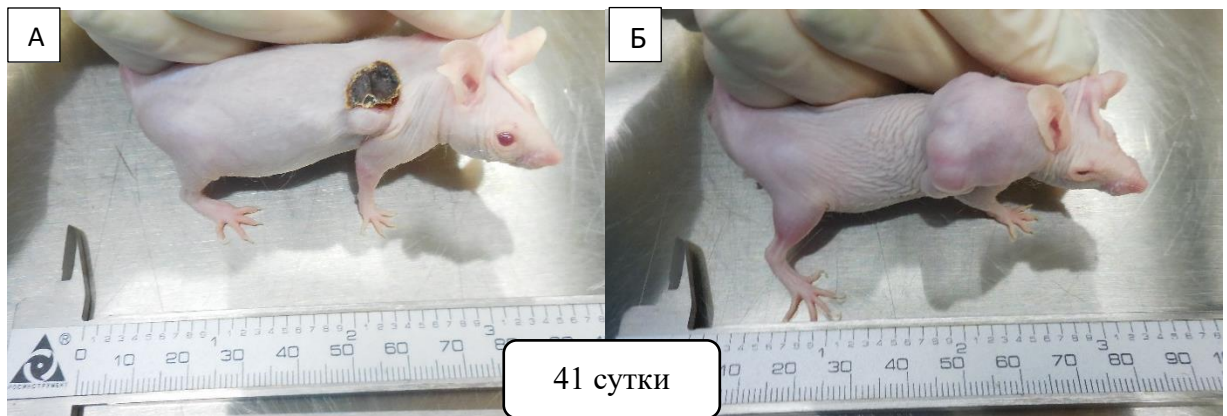
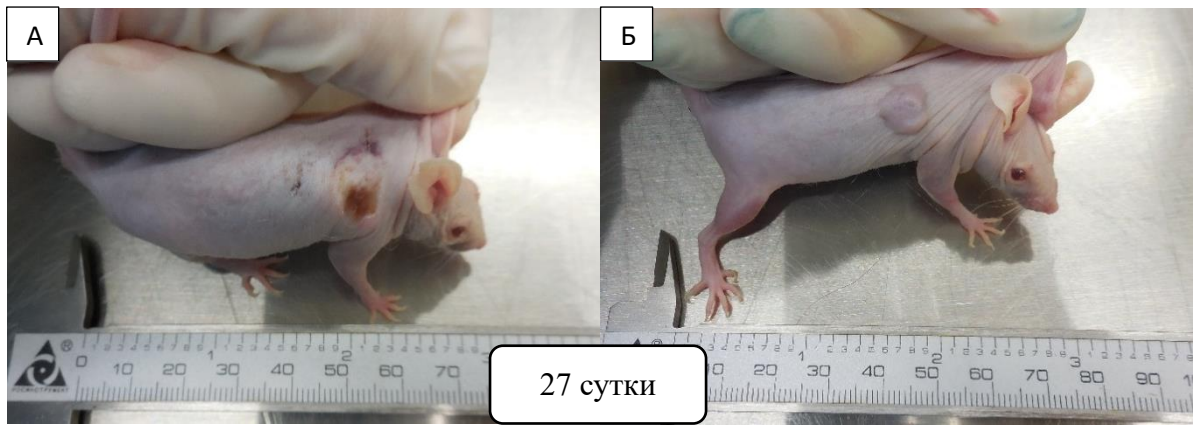


Рисунок 9. Патологические эффекты НЧ MnO в дозе 1,92 мг/кг на ксенографты U87MG на 27, 41, 62 и 76 сутки от инокуляции клеток; А – животное №7 из опытной группы, Б – животное №9 из контрольной группы.

### 3.4 Определение онколитической активности НЧ MnO *in vivo*, на мышах SCID с ксенографтами SW-620

На моделях ксенографтов SW620 были применены НЧ MnO (II) разведённые (вода для инъекций, Renewal) до концентрации марганца 40 и 120 мкг/мл. Оба варианта оказали онколитический эффект на опухоли SW620: объёмы ксенографтов в опытных группах были достоверно меньше, чем объёмы ксенографтов в контрольной группе. Так, ксенографты мышей, получавших в качестве терапии наночастицы в разведении 40 мкг/мл (Рисунок 10) демонстрировали торможение в росте опухолей по сравнению с контрольной группой, а также большую продолжительность жизни – для контрольной группы срок наблюдения составил 32 дня, а для группы, пролеченной НЧ MnO 41 день. На 32 сутки эксперимента средний объём опухолей у животных, пролеченных НЧ MnO, был в 2 раза меньше среднего объёма опухолей контрольных животных (рисунок 10).

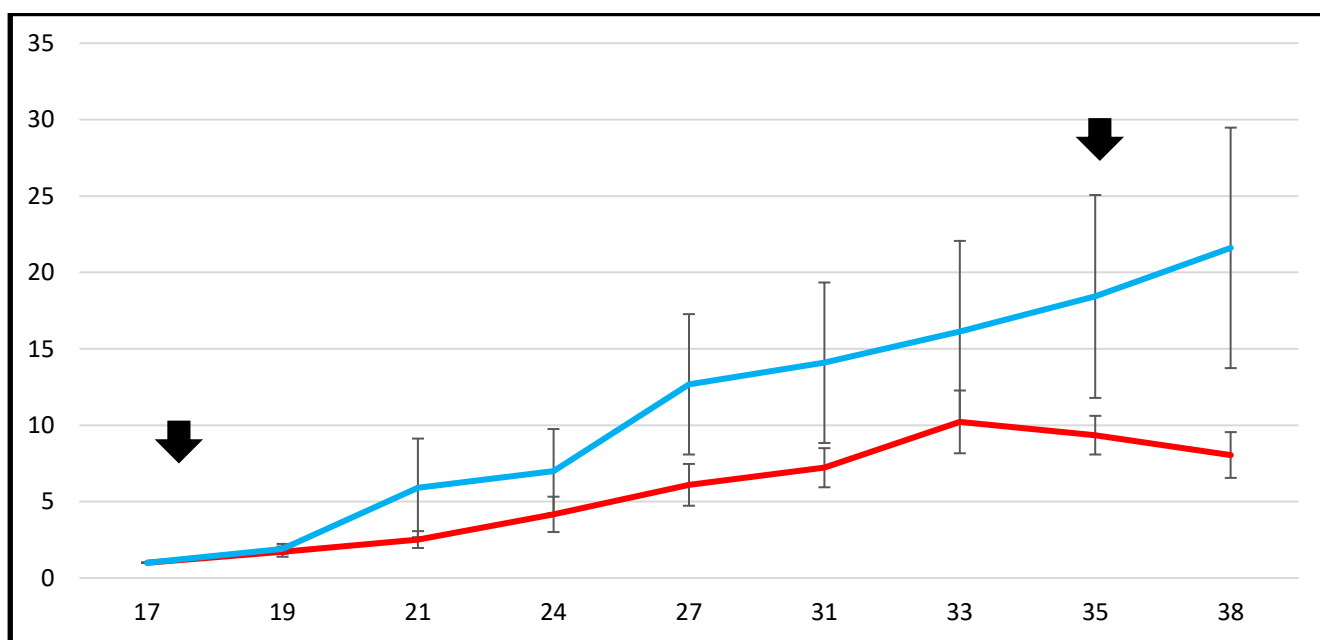


Рисунок 10. Определение эффектов НЧ MnO в концентрации 40 мкг/мл на рост ксенографтов SW 620 у мышей SCID. Опытной группе вводили по приблизительно 8 мкг (0,32 мг/кг) Mn в одно животное один раз в день, три раза в неделю в период от 10 до 37 (41) дня; – различия достоверны, столбики ошибок  $\pm$  SD.

Для усиления эффектов наночастиц на ксенографты SW 620 у мышей SCID было использовано разведение наночастиц MnO 120 мкг/мл, чтобы увеличить лечебную дозу наночастиц до 0,96 мг/кг (рисунок 11).

В этой группе зафиксировано устойчивое снижение роста ксенографтов: на 32 сутки от введения клеток после 8 инъекций наночастиц оксида марганца средний объём опухолей

контрольных животных превышает средний объём опухолей животных, получавших наночастицы почти в 4 раза. Процент торможения роста опухоли (ТРО) на 32 день закрытия эксперимента составил 69,8%. До окончания периода наблюдения (51 сутки) объёмы ксенографтов увеличились только на 13% (рисунок 11).

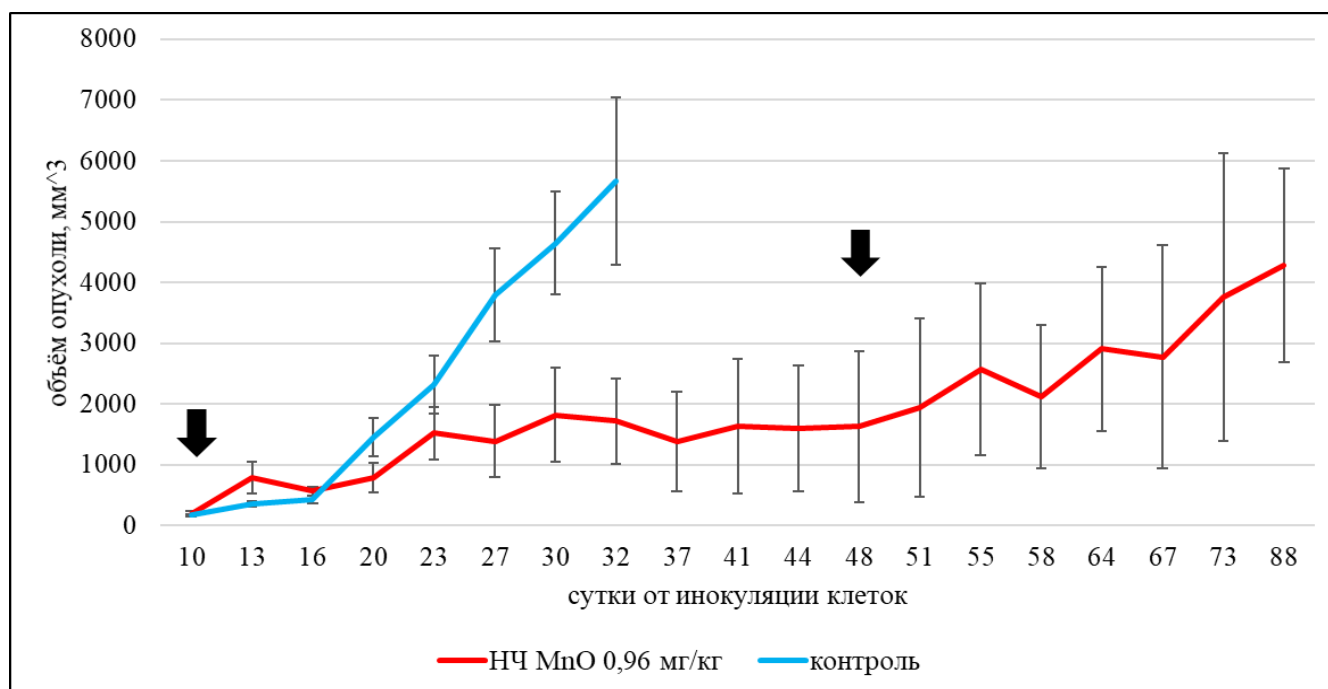


Рисунок 11. Определение эффектов НЧ MnO в концентрации 120 мкг/мл на рост ксенографтов SW 620 у мышей SCID. По данным спектроскопии группе лечения вводили по приблизительно 24 мкг (0,96 мг/кг) Mn в одно животное один раз в день, три раза в неделю; \* - различия относительно контрольной группы достоверны по тесту Манна-Уитни,  $p < 0.05$ , данные представлены как среднее  $\pm$  ошибка среднего.

Сравнительная оценка индекса прироста опухоли в контрольной и опытной группах позволяет заключить, что в период с 10 по 32 день наблюдения средняя величина опухоли в опытной группе увеличилась в 7 раз, а в контрольной в 32 раза. То есть опухоль контрольной группы росла в  $\approx 3,2$  раза быстрее, чем опухоли в группе, получавшей НЧ MnO.

Вводимые наночастицы проявили выраженный онколитический эффект, с достоверными отличиями в объёмах опухолей опытных и контрольных групп (рисунок 1) начиная с 21 дня. Средние объёмы опухолей опытной группы (+НЧ MnO) были значительно меньше по сравнению с опухолями у контрольных мышей. Индекс торможения роста опухоли (ИТРО) в день закрытия эксперимента составил 43,0 %.

#### Обсуждение результатов

Вещества, приведенные в состояние наночастиц, начинают проявлять новые свойства, в том числе и фармакологические. Помимо их состава, структуры и дозы, необходимо учитывать также их высокую реакционную способность, размеры и форму. В области онкологии интересующими исследователей свойствами наночастиц становятся такие свойства, как высокая токсичность и избирательность накопления в опухолях за счет EPR-эффекта (эффекта усиленного проникновения и удержания).

Полученные нами данные показывают, что наночастицы MnO показывают более высокую токсичность, чем раствор MnCl<sub>2</sub> пропорциональную дозе вводимого препарата. Вероятнее всего, токсичность может быть связана с появлением в клетках активных форм кислорода, последующим окислительным стрессом и реакциями спонтанного перекисного окисления липидов, что, в конечном итоге, приводит к разрушению клеток (апоптозу и некрозу). [30]

На способность НЧ проникать внутрь клетки значительное влияние может оказывать их размер. В недавней работе было показано, что частицы размером 100–200 нм демонстрируют в 4 раза более высокую скорость поглощения клетками опухоли по сравнению с частицами размером более 300 нм или менее 50 нм [12]. Вместе с тем, хотя более мелкие наночастицы хуже используют эффект усиленного проникновения и удержания (EPR) [55], который признан «золотым стандартом» в разработке новых противораковых средств, они обычно проявляют большую токсичность, связанную с их большим отношением площади поверхности/объему.

Полученные нами данные в модели *in vivo* впервые показывают, что НЧ MnO проявляют онколитический эффект пропорциональный дозе введения. Высокая онколитическая активность НЧ MnO для опухолевых клеток ксенографтов U-87MG, по-видимому, не связана с наличием ионов Mn<sup>2+</sup>, что подтверждают данные спектроскопии по отсутствию ионов в составе препарата НЧ. Эти результаты согласуются с нашими предыдущими результатами, согласно которым НЧ MnO в наномолярных концентрациях избирательно индуцировали гибель опухолевых клеток глиобластом [121] *in vitro*.

В настоящее время наша работа с НЧ MnO находится, по-нашему мнению, на начальной стадии исследования. Одним из основных преимуществ рассмотрения НЧ MnO для применения против опухолевых клеток является выявленная у этих наночастиц избирательная цитотоксичность в отношении клеток глиобластом *in vitro* [121] и подтвержденная *in vivo* в данной работе. Предполагается, что их селективность в отношении раковых клеток может быть еще более улучшена за счет инженерного проектирования с нацеливанием на белки-маркеры или молекулы опухолевых клеток, чтобы минимизировать вредное воздействие на нормальные клетки организма, сохраняя и усиливая при этом их свойство уничтожения опухолевых клеток.

## Заключение

Избирательное воздействие наночастиц MnO изучено по отношению к двум культурам опухолевых клеток (SW620 аденокарциномы кишечника человека и U87 глиобластомы человека), что открывает перспективы для их изучения в качестве кандидатных препаратов для тестирования на животных с ксенографтами опухолей человека.

Таким образом, в ходе экспериментов были выяснены минимальные токсические дозы наночастиц оксида марганца (7 мкг/кг) и отсутствие таковой для раствора хлорида марганца в используемых концентрациях (максимальная 114 мкг/кг) для дальнейших исследований их воздействия на ксенографты опухолей человека и выяснения избирательности их эффекта по отношению к опухолевым тканям при минимальном токсическом воздействии на здоровые ткани. Кроме того, при смене пути введения на внутрибрюшинный и в ретроорбитальный синус, было обнаружено, что токсические эффекты наночастиц MnO и раствора MnCl<sub>2</sub> в дозах, токсичных при подкожном введении, не проявлялись.

Также была выявлена избирательная токсичность наночастиц MnO по отношению к опухолевым клеткам SW-620 *in vitro* и противоопухолевая активность к ксенографтам двух опухолей человека – мультиформной глиобластомы U-87MG и колоректальной аденокарциномы SW-620.

## Выводы

1. Наночастицы MnO могут проявлять *in vitro* избирательную цитотоксическую активность по отношению к опухолевым клеткам человека. Для культуры клеток SW620  $CC_{50}$  составил 0,003 мг/мл, для фибробластов эмбриона человека  $CC_{50}=0,06$  мг/мл. Индекс селективности 20.
2. Выяснены токсические эффекты изучаемых наночастиц MnO при подкожном введении. Минимальная токсическая доза наночастиц – 7 мкг/кг. Раствор MnCl<sub>2</sub> в исследованных концентрациях (38 мкг/кг-114 мкг/кг) токсические эффекты не проявлял.
3. Наночастицы MnO способны замедлять рост ксенографтов глиобластомы U-87MG и колоректальной аденокарциномы человека SW-620 у мышей линии SCID. Доза 0,96 мг/кг снижает темп роста ксенографта глиобластомы человека U87MG в 2,7 раза. Доза 1,96 мг/кг провоцирует регрессию ксенографта. Доза 0,32 мг/кг наночастиц в 2 раза замедляет скорость роста ксенографта аденокарциномы кишечника человека SW620. Доза 0,96 мг/кг замедляет рост ксенографтов в 3,2 раза.

## Список цитированной литературы

1. Adams M.L., Lavasanifar A., Kwon G.S. Amphiphilic block copolymers for drug delivery // *J. Pharm. Sci.* - 2003. – N. 92 – P. 1343-1355.
2. Allen T.M. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy // *Nat. Rev. Cancer* - 2002. – N. 2. - P. 750-763.
3. Aschner M., Erikson K.M., Hernandez E.H. et al. Manganese and its role in Parkinson's disease: from transport to neuropathology // *Neuromol. Med.* - 2009. – N. 11(4). – P. 252–266.
4. Bartzokis G. et al. Brain ferritin iron may influence age- and gender-related risks of neurodegeneration // *Neurobiol. Aging* – 2007. – N. 28. - P. 414-423.
5. Bhattacharyya S., Kudgus R.A., Bhattacharya R. et al. Inorganic nanoparticles in cancer therapy // *Pharm Res.* – 2011. N. 28. – P. 237–259.
6. Cai X., Zhu Q., Zeng Y. et al. Manganese oxide nanoparticles as MRI contrast agents in tumor multimodal imaging and therapy // *Int. J. of Nanomedicine* – 2019 – N. 14 – P. 8321-8344.
7. Caputo, F., de Nicola, M., Ghibelli L. Pharmacological potential of bioactive engineered nanomaterials // *Biochemical Pharmacology.* - 2014. – N 92. - P.112–130.
8. Carmeliet P., Jain R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases // *Nature* - 2000. – N. 407. – P. 249-250
9. Chatterjee D.K., Fong L.S., Zhang Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2008. – N. 60. – P. 1627–1637.
10. Chen N., Shao C., Qu Y., et al. Folic acid-conjugated MnO nanoparticles as a T1 contrast agent for magnetic resonance imaging of tiny brain gliomas // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2014. – N. 6(22) – P. 19850–19857.
11. Chevallier P., Walter A., Garofalo A., et al. Tailored biological retention and efficient clearance of pegylated ultra-small MnO nanoparticles as positive MRI contrast agents for molecular imaging // *J. Mater. Chem. B.* – 2014. – N. 2(13). – P. 1779–1790.
12. Cho K., Wang X., Nie S., et al. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer // *Clin. Cancer. Res.* – 2008. – N. 14 – P. 1310–1316.
13. Connor J.R., Boeshore K.L. et al. Isoforms of ferritin have a specific cellular distribution in the brain. *J. Neurosci. Res.* -1994. - N 37. - P. 461-465.
14. Connor J.R., Pavlick G., Karli D. et al. A histochemical study of iron-positive cells in the developing rat brain // *J. Comp. Neurol.* – 1995. – N. 355. – P. 111-123.
15. Connor J.R., Snyder B.S., Arosio P. et al. A quantitative analysis of isoferritins in selected regions of aged, parkinsonian, and Alzheimer's diseased brains // *J. Neurochem* – 1995. – N. 76. – P, 1766-1773.

16. Crittenden P.L, Filipov N.M. Manganese-induced potentiation of in vitro proinflammatory cytokine production by activated microglial cells is associated with persistent activation of p38 MAPK // *Toxicology in Vitro*. - 2008. - Vol. 22. P. 18–27.
17. Cui S., Yin D., Chen Y. et al. In vivo targeted deep-tissue photodynamic therapy based on near-infrared light triggered upconversion nanoconstruct // *ACS Nano* – 2013. –N. 7. – P. 676–688.
18. Ding X., Liu J.H., et al. Polydopamine coated manganese oxide nanoparticles with ultrahigh relaxivity as nanotheranostic agents for magnetic resonance imaging guided synergetic chemo-/ photothermal therapy // *Chem. Sci.* – 2016. – N. 7 (11) – P. 6695–6700.
19. Douglas T. et al. Synthesis and structure of an iron(III) sulfide-ferritin bioinorganic nanocomposite // *Science* – 1995. – N. 269. – P. 54-57.
20. Duncan R., Gaspar R. Nanomedicine(s) under the microscope // *Mol. Pharm.* - 2011. - N8. P. 2101–2141.
21. Evans S.M., Koch C.J. Prognostic significance of tumor oxygenation in humans // *Cancer Lett.* – 2003. – N. 195(1) –P. 1–16.
22. Fitsanakis V.A., Zhang N., Avison M.J. et al. The use of magnetic resonance imaging (MRI) in the study of manganese neurotoxicity // *Neurotoxicology*. – 2006. – N. 27(5). –P. 798–806.
23. Frick R., Meller-Edenborn B., Schlicker A. et al. Comparison of manganese oxide nanoparticles and manganese sulfate with regard to oxidative stress, uptake and apoptosis in alveolar epithelial cells // *Toxicol Lett.* - 2011. - Vol. 205. - P. 163–172.
24. Gao H., Liu X., Tang W., et al. (99) Tc-conjugated manganese-based mesoporous silica nanoparticles for SPECT, pH-responsive MRI and anti-cancer drug delivery // *Nanoscale*. – 2016. – N. 8(47). – P. 19573–19580.
25. Garcia-Hevia L., Banobre-Lopez M., Gallo J. Recent progress on manganese-based nanostructures as responsive MRI contrast agents // *Chem-Eur. J.*- 2019. – N. 25(2). – P. 431–441.
26. Goodman L. Alzheimer's disease – a clinicopathologic analysis of 23 cases with a theory on pathogenesis // *J. Nerv. Ment. Dis.* – 1953. – N. 118. – P. 97-130.
27. Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters // *Nat. Rev. Cancer* - 2002. – N. 2. - P. 48-58.
28. Gould R.M., Freund C.M., Palmer F. et al. Messenger RNAs located in myelin sheath assembly sites // *J. Neurochem.* – 2000. – N. 75. – P. 1834-1844.
29. Guilarte T.R. Manganese neurotoxicity: new perspectives from behavioral, neuroimaging, and neuropathological studies in humans and non-human primates // *Front Aging Neurosci.* – 2013. - N. 5 – P. 23.
30. Hanley C., Layne J., Punnoose A. et al. Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles // *Nanotechnology*. - 2008. - N 29.



31. Hao Y., Wang L., Zhang B. et al. Multifunctional nanosheets based on folic acid modified manganese oxide for tumor-targeting theranostic application // *Nanotechnology*. - 2016. – N. 27 (2).
32. Hao Y., Zhang B., Zheng C., et al. Multifunctional nanoplatform for enhanced photodynamic cancer therapy and magnetic resonance imaging // *Colloids and Surf. B. Biointerfaces*. – 2017. – N. 151. – P. 384–393.
33. Harris J.M., Martin N.E., Modi M. Pegylation: a novel process for modifying pharmacokinetics // *Clin. Pharmacokinet*. - 2001. – N. 40 P. 539-551.
34. Harvey I. Pass et al. Inhibition of the colony-stimulating-factor-1 receptor affects the resistance of lung cancer cells to cisplatin // *Oncotarget*. - 2016 - Vol. 7. – N. 35.
35. Hellgren B. Sourander P. The non-haemin iron in the cerebral cortex in Alzheimer's disease // *J. Neurochem*. – 1958. – N. 3. – P. 41-51.
36. Hilger I., Kaiser W.A. Iron oxide-based nanostructures for MRI and magnetic hyperthermia // *Nanomedicine* – 2012. - N. 7. – P. 1443–1459.
37. Horning K.J., Caito S.W., Tipps K.G., et al. Manganese Is Essential for Neuronal // *Health. Annu. Rev. Nutr.* – 2015. –N. 35. – P. 71–108.
38. Howell M., Mallela J., Wang C., et al. Manganese-loaded lipid-micellar theranostics for simultaneous drug and gene delivery to lungs // *J. Control. Release*. – 2013. – N. 167(2). – P. 210–218.
39. Hsu B.Y.W., Kirby G., Tan A. et al. Relaxivity and toxicological properties of manganese oxide nanoparticles for MRI applications // *RSC Adv*. – 2016. – N. 6(51). – P. 45462–45474.
40. Hsu B.Y.W., Wang M., Zhang Y., et al. Silica-F127 nanohybrid-encapsulated manganese oxide nanoparticles for optimized T-1 magnetic resonance relaxivity // *Nanoscale*. – 2014. – N. 6(1). – P. 293–299.
41. Hu X., Ji Y., Wang M., et al. Water-soluble and biocompatible MnO@PVP nanoparticles for MR imaging in vitro and in vivo // *J. Biomed. Nanotechnol*. – 2013. – N. 9(6). – P. 976–984.
42. Huang H.T., Yue T., Xu K. et al. Fabrication and evaluation of tumor-targeted positive MRI contrast agent based on ultrasmall MnO nanoparticles // *Colloid Surf*. – 2015. – N. 131. – P. 148–154.
43. Johannsen M., Thiesen B., Wust P. et al. Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer // *Int. J. Hyperthermia* – 2010. N. 26. –P. 790–795.
44. Josephs K.A., Ahlskog J.E., Klos K.J. et al. Neurologic manifestations in welders with pallidal MRI T1 hyperintensity // *Neurology* - 2005. – N. 64(12).- P. 2033–2039.
45. Karim R., Palazzo C., Evrard B. et al. Nanocarriers for the treatment of glioblastoma multiforme: Current state-of-the-art. // *Journal of controlled release*. - 2016. - N 227. - P. 23-37.
46. Ke Y., Qian Z. Iron misregulation in the brain: a primary cause of neurodegenerative disorders // *Lancet Neurol*. – 2003. – N. 2 P. 246-253.

47. Kirschvink J.L., Kobayashi-Kirschvink A., Woodford B.J. Magnetite biomineralization in the human brain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* – 1992. – N. 89. - P. 7683-7687.
48. Koeppen A.H. A brief history of brain iron research // *J. Neurol. Sci.* – 2003. – N. 207. - P. 95-97.
49. Król A., Pomastowski P., Rafińska K. et al. Zinc oxide nanoparticles: synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. // *advantages in colloid interface science.* – 2017. - N 249. - P. 37-52.
50. Kubik T., Bogunia-Kubik K., Sugisaka M. Nanotechnology on duty in medical applications // *Curr. Pharm. Biotechnol.* – 2005. –N. 6. – P. 17-33.
51. Kwangjae C. Wang X., Nie S. et al. Therapeutic Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer // *Clin. Cancer Res.* – 2008 – N. 14(5) – P.. 1310-1316.
52. Larsen A.K., Escargueil A.E. et al. Resistance mechanisms associated with altered intracellular distribution of anticancer agents // *Pharmacol. Ther.* - 2000. – N 85 – P. 217-29.
53. Leamon C.P., Reddy J.A. Folate-targeted chemotherapy // *Adv. Drug Deliv. Rev.* - 2004. – N. 56. – P. 1127-1141.
54. Li J., Wu C., Hou P. et al. One-pot preparation of hydrophilic manganese oxide nanoparticles as T1 nano-contrast agent for molecular magnetic resonance imaging of renal carcinoma in vitro and in vivo // *Biosens Bioelectron.* – 2018. – N. 102 –P. 1–8.
55. Li S.D., Huang L.. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles // *Mol. Pharm.* – 2008. – N. 5. – P. 496–504.
56. Lieu P., Heiskala M., Peterson P.A. et al. The roles of iron in health and disease // *Mol. Aspects Med.* – 2001. – N. 22. –P. 1-87.
57. Limbach, L.K., Li, Y., Grass, R.N., Brunner, T.J. et al. Oxide nanoparticle uptake in human lung fibroblasts: Effects of particle size, agglomeration, and diffusion at low concentrations // *Environ. Sci. Technol.* – 2005. - N 39. – P. 9370–9376
58. Lin L.S., Song J.B., Song L., et al. Simultaneous fenton-like ion delivery and glutathione depletion by MnO<sub>2</sub>-based nanoagent to enhance chemodynamic therapy // *Angew Chem. Int. Edit.* – 2018. – N. 57 (18). – P. 4902–4906.
59. Lu J., Liong M., Li Z. et al. Biocompatibility, biodistribution, and drug-delivery efficiency of mesoporous silica nanoparticles for cancer therapy in animals // *Small* – 2010. –N. 6. – P. 1794–1805.
60. Lu Y., Zhang L., Li J., et al. MnO nanocrystals: a platform for integration of MRI and genuine autophagy induction for chemotherapy // *Adv. Funct. Mater.* – 2013. – N. 23(12). – P. 1534–1546.
61. Lucky S.S., Idris N.M., Li, Z., et al. Coated upconversion nanoparticles for near-infrared light triggered photodynamic therapy // *ACS Nano* – 2015. - N 9. - P. 191–205.

62. Luo Y., Yang J., Li J., et al. Facile synthesis and functionalization of manganese oxide nanoparticles for targeted T1-weighted tumor MR imaging // *Colloids and Surf. B. Biointerfaces.* – 2015. – N. 136. – P. 506–513.
63. Maeda H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting // *Adv. Enzyme Regul.* - 2001. – N. 41 – P. 189-207.
64. Maier-Hauff K., Ulrich F., Nestler D. et al. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme // *J. Neurooncol.* – 2011. – N. 103. – P. 317–324.
65. Michalke B., Fernsebner K. New insights into manganese toxicity and speciation // *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* - 2013. – N. 28(2). - P. 106-116.
66. Moghimi S.M., Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties // *Prog. Lipid. Res.* - 2003. – N. 42 - P. 463-78.
67. Monk D.J., Walt D.R., Optical fiber-based biosensors // *Anal. Bioanal. Chem.* – 2004. –N. 379. – P. 931-945.
68. Nafiujjaman M., Nurunnabi M., Kang S.-H. et al. Ternary graphene quantum dot–polydopamine–MN3O4 nanoparticles for optical imaging guided photodynamic therapy and T1-weighted magnetic resonance imaging // *J. Mater. Chem. B.* – 2015. – N. 3(28). – P. 5815–5823.
69. Pan D., Caruthers S.D., Hu G., et al. Ligand-directed nanobialys as theranostic agent for drug delivery and manganese-based magnetic resonance Imaging of vascular targets // *J. Am. Chem. Soc.* – 2008. – N. 130 (29). – P. 9186–9187.
70. Pan D.P.J., Schmieder A.H., Wickline S.A. et al. Manganese-based MRI contrast agents: past, present, and future // *Tetrahedron.* – 2011. – N. 67(44) – P. 8431–8444.
71. Pankhurst Q.A., Connolly J., et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine // *J. Phys. D: Appl. Phys.* – 2003. –N. 36. – P. 167-181.
72. Pelicano H., Martin D.S., Xu R.H. et al. Glycolysis inhibition for anticancer treatment // *Oncogene* - 2006. – N. 25 – P. 4633-4646.
73. Pešić M., Podolski-Renić A., Stojković S., et al. Anti-cancer effects of cerium oxide nanoparticles and its intracellular redox activity. // *Chem. Biol. Interact.* – 2015. - N 232. - P. 85–93.
74. Pilar V.M., Mitjans M. Antitumor Activities of Metal Oxide Nanoparticles // *Nanomaterials.* - 2015. - N 5(2). - P. 1004-1021.
75. Raliya R., Singh Chadha T., et al. Perspective on nanoparticle technology for biomedical use. // *Current Pharmaceutical Design.* - 2016. - N 22 (17) - P. 2481–2490.

76. Rasmussen J. W., Martinez E., Louka P., et al. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications // *Expert Opinion on Drug Delivery*. - 2010. - N 7 (9). - P.1063–1077.
77. Sakon S., Xue X., Takekawa M. et al. NF- $\kappa$ B inhibits TNF-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death // *EMBO J*. - 2003. - Vol. 22. - N. 15. - P. 3898–3909.
78. Sankar R., Maheswari R., Karthik S. et al. Anticancer activity of *Ficus religiosa* engineered copper oxide nanoparticles // *Mater. Sci. Eng.* – 2014. – N. 44. – P. 234–239.
79. Sarkuzi L., Horvath E., Kynya Z. et al. Subacute intratracheal exposure of rats to manganese nanoparticles: behavioral, electrophysiological, and general toxicological effects // *Inhal Toxicol.* - 2009. - N. 21. P. 83–91.
80. Schladt T. D., Schneider K., Shukoor M. I. et al. Highly soluble multifunctional MnO nanoparticles for simultaneous optical and MRI imaging and cancer treatment using photodynamic therapy // *Journal of materials chemistry*. - 2010. – N. 20. - P. 8297-8304.
81. Schultheiss-Grassi P.P., Wessiken R., Dobson J. TEM observation of biogenic magnetite extracted from the human hippocampus // *Biochem. Biophys. Acta* – 1999. –N. 1426. – P. 212-216.
82. Seo J.W., Chung H., Kim et al. Development of watersoluble single-crystalline TiO<sub>2</sub> nanoparticles for photocatalytic cancer-cell treatment // *Small* – 2007. –N. 3. – P. 850–853.
83. Silva A.C., Oliveira T.R., Mamani J.B. et al. Application of hyperthermia induced by superparamagnetic iron oxide nanoparticles in glioma treatment // *Int. J. Nanomed.* – 2011. N. 6. – P. 591–603.
84. Sivaraj R., Rahman P.K., Rajiv P. et al. Biosynthesis and characterization of *Acalypha indica* mediated copper oxide nanoparticles and evaluation of its antimicrobial and anticancer activity // *Spectrochim. Acta* – 2014. – N. 129. –P. 255–258.
85. Smith L., Kuncic Z., Ostrikov K., et al. Nanoparticles in cancer imaging and therapy // *Journal of Nanomaterials*. - 2012. - N 9. - 7 P.
86. Song M., Liu T., Shi C. et al. Bioconjugated manganese dioxide nanoparticles enhance chemotherapy response by priming tumor-associated macrophages toward M1-like phenotype and attenuating tumor hypoxia // *ACS Nano*. – 2016. – N. 10(1). – P. 633–647.
87. Stupp R., Hegi M.E., Gilbert M.R. et al. Dose-dense temozolomide for newly diagnosed glioblastoma: a randomized phase III clinical trial. // *Oncology*. - 2007 Vol. 25. – N. 26. - P. 4127–4136.
88. Takeda A. Manganese action in brain function // *Brain Res. Rev.* – 2003. –N. 41(1). – P. 79–87.
89. Thevenot P., Cho J., Wavhal, D. et al. Surface chemistry influences cancer killing effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles // *Nanomedicine* – 2008. – N. 4. – P. 226–236.

90. Turan I.S., Yildiz D., Turksoy A. et al. A bifunctional photosensitizer for enhanced fractional photodynamic therapy: singlet oxygen generation in the presence and absence of light // *Angew. Chem. Int. Edit.* – 2016. – N. 55(8). – P. 2875–2878.
91. Urbańska K., Chandi C. M. Advanced views of glioblastoma multiforme U-87 cells for therapy of brain tumor // *IJCBR.* - 2014. - Vol. 1. - N. 1. - P. 59-66.
92. Van Landeghem, F.K., Maier-Hauff, K., et al. Post-mortem studies in glioblastoma patients treated with thermotherapy using magnetic nanoparticles // *Biomaterials* – 2009. – N. 30. – P. 52–57.
93. Vinardell M.P., Mitjans M. Antitumor activities of metal oxide nanoparticles // *Nanomaterials* – 2015. – N 5. – P. 1004-1021.
94. Vo-Dinh T., Cullum B., Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics // *Fresenius J. Anal. Chem.* – 2000. – N. 366. – P. 540-551.
95. Wahab R., Kaushik N.K., Kaushik N. et al. ZnO nanoparticles induces cell death in malignant human T98G gliomas, KB and non-malignant HEK cells // *J. Biomed. Nanotechnol.* – 2013. – N. 9. – P. 1181–1189.
96. Wang D., Lin H., Zhang G., et al. Effective pH-activated theranostic platform for synchronous magnetic resonance imaging diagnosis and chemotherapy // *ACS Appl. Mater Inter.* – 2018. – N. 10(37). – P. 31114–31123.
97. Wang P., Yang J., Zhou B.Q., et al. Antifouling manganese oxide nanoparticles: synthesis, characterization, and applications for enhanced MR imaging of tumors // *ACS Appl. Mater Inter.* – 2017. – N. 9(1). – P. 47–53.
98. Wang S., Zhang Q., Yang P., et al. Manganese oxide-coated carbon nanotubes as dual-modality lymph mapping agents for photothermal therapy of tumor metastasis // *ACS Appl. Mater Interfaces.* – 2016. – N. 8(6). – P. 3736–3743.
99. Wang Y., Yang F., Zhang H.-X. et al. Cuprous oxide nanoparticles inhibit the growth and metastasis of melanoma by targeting mitochondria // *Cell Death Dis.* – 2013. – N. 4.
100. Wason M.S., Colon J., Das S. et al. Sensitization of pancreatic cancer cells to radiation by cerium oxide nanoparticle-induced ROS production // *Nanomedicine* – 2012.
101. Wei J., Yu C., Wang L., et al. Cytotoxicity of mitochondrial-targeting silica-coated manganese oxide nanoparticles // *Sci. China. Chem.* – 2015. –N. 58(10). – P. 1537–1543.
102. Whitesides G.M., Ostuni E., Takayama S. et al. Soft lithography in biology and biochemistry // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* – 2001. – N. 3. – P. 335-373.
103. Wong H.L., Bendayan R., Rauth A.M. et al. A mechanistic study of enhanced doxorubicin uptake and retention in multidrug resistant breast cancer cells using a polymer-lipid hybrid nanoparticle system // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* - 2006. – N. 317. – P. 1372-1381.

104. Xu J., Han W., Yang P., et al. Tumor microenvironment-responsive mesoporous MnO<sub>2</sub>-coated upconversion nanoplatform for self-enhanced tumor theranostics // *Adv. Funct. Mater.* – 2018. –N. 28(36).
105. Yang G., Xu L., Chao Y., et al. Hollow MnO<sub>2</sub> as a tumor-microenvironment-responsive biodegradable nano-platform for combination therapy favoring antitumor immune responses // *Nature Communications.* - 2017. – N. 8(1) - P. 902.
106. Yatvin M.B., Kreutz W., Horwitz B.A. et al. pH-sensitive liposomes: possible clinical implications // *Science* - 1980. - N. 210 - P. 1253-1255.
107. Zavjalov E.L., Razumov I.A., Gerlinskaya L.A., et al. In vivo MRI visualization of growth and morphology in the orthotopic xenotrasplantation U87 glioblastoma mouse SCID model // *Russ. J. Genetics: Appl. Res.* 2016. – N 6(4): P. 448-453.
108. Zecca L. et al. Interaction of neuromelanin and iron in substantia nigra and other areas of human brain // *Neuroscience* – 1996. – N. 73. – P. 407-415.
109. Zecca L., et al. Iron, neuromelanin and ferritin inn substantia nigra of normal subjects at different ages. Consequences for iron storage and neurodegenerative disorders // *J. Neurochem.* – 2001. – N. 76. – P. 1766-1773.
110. Zhang A.P., Sun Y.P. Photocatalytic killing effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on Ls- 174-t human colon carcinoma cells // *World J. Gastroenterol.* – 2004. –N. 10 – P. 3191–3193.
111. Zhang C., Bu W.B., Ni D.L. et al. Synthesis of iron nanometallic glasses and their application in cancer therapy by a localized fenton reaction // *Angew. Chem. Int. Edit.* – 2016. – N. 55(6). – P. 2101–2106.
112. Аникина Л.В. и др. Сравнительное определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ и ресазурина // *Фундаментальные исследования.* - 2014. - № 12-7. - С. 1423-1427.
113. Гареев И.Ф., Бейлерли О.А., Павлов В.Н. и др. Наночастицы: новый подход в диагностике и терапии глиальных опухолей головного мозга // *Creative surgery and oncology* – 2019. - № 1 С. 66-74
114. Гонаслвес К.Е., Хальберштадт К.Р., Лоренсин К.Т. Наноструктуры в биомедицине: пер. с англ. – М. БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. – 519 с.
115. Жунусова М. С. Химиорезистентность раковых стволовых клеток, выделенных из клеточной линии SW620 колоректального рака // *International innovation research.* – 2018. - С. 42-47.
116. Завьялов Е.Л., Разумов И.А., Герлинская Л.А. и др. In vivo МРТ-визуализация динамики развития Глиобластомы U87 в модели ортотопической ксенотрансплантации мышам линии SCID // *Вавиловский журнал генетики и селекции.* - 2015. - Т. 19. - № 4. - С. 460-465.

117. Зайцева Н.В., Землянова М.А., Звездин В.Н. и др. Токсиколого-гигиеническая оценка безопасности нано- и микродисперсного оксида марганца (III, IV) // Вопросы питания. - 2012. - Т. 81. - № 5. - С. 13–19.
118. Зайцева Н.В., Землянова М.А., Звездин В.Н. и др. Эффекты субхронической экспозиции наночастиц оксида марганца на центральную нервную систему, перекисное окисление липидов и ферменты антиоксидантной системы крыс// Анализ риска здоровью. - 2014. - № 4. - С. 66–77.
119. Каприн А. Д., Старинский В. В., Петрова Г. В. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П. А. Герцена, 2018. - 250 с.
120. Мукерджи С. Царь всех болезней. Биография рака: пер. с англ. - М.: АСТ, 2013. - 800 с.
121. Разумов И.А., Завьялов Е.Л., Троицкий С.Ю. и др. Избирательная цитотоксичность наночастиц марганца для клеток глиобластом человека // Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2017. Т. 2 С. 114-118
122. Соухами, Р., Тобайас Дж. Рак и его лечение: пер. с англ. - М.:БИНОМ. Лаборатория знаний, 2017. - 437 с.
123. Фрешни Р. Я. Культура животных клеток: практическое руководство: пер. 5-го англ. изд. - М: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. - 691 с.