

МАГНИТНЫЕ НАНОДИСКИ, АДРЕСНО РАЗРУШАЮЩИЕ КЛЕТКИ ГЛИОБЛАСТОМЫ В ПЕРЕМЕННОМ НЕГРЕЮЩЕМ МАГНИТНОМ ПОЛЕ

© 2024 г. В. Д. Федотовская^{1,3}, С. С. Замай¹, М. В. Зотова¹, А. Н. Масюгин⁴, Ф. В. Зеленов⁴,
Н. А. Лузан³, Т. Н. Замай^{1,3}, А. А. Кошманова³, Д. А. Кириченко³, Е. Д. Николаева^{1,3},
О. С. Коловская^{1,3}, И. А. Щугорева^{1,3}, Г. С. Замай^{1,3}, В. Н. Заблуда^{2,3}, А. А. Борус^{2,3},
А. С. Букатин^{5,8}, И. Н. Лапин⁶, В. А. Светличный⁶, Е. В. Морозов⁷, К. А. Лукьяненко^{1,3},
Ф. Г. Зограф^{1,3}, Ф. Н. Томилин^{1,2}, А. Э. Соколов^{1,2}, А. А. Народов³,
Р. Г. Галеев⁴, А. С. Кичкайло^{1,3,*}

¹Федеральный исследовательский центр “Красноярский научный центр Сибирского отделения
Российской академии наук”, Красноярск, Россия

²Институт физики им. Л. В. Киренского СО РАН, Красноярск, Россия

³Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В. Ф. Войно-Ясенецкого,
Красноярск, Россия

⁴АО “НПП Радиосвязь”, Красноярск, Россия

⁵Санкт-Петербургский национальный исследовательский академический университет им. Ж.И. Алфёрова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

⁶Томский государственный университет, Томск, Россия

⁷Институт химии и химической технологии СО РАН, Красноярск, Россия

⁸Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: annazamatay@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.12.2023 г.

После доработки 27.12.2023 г.

Принята к публикации 29.12.2023 г.

Рассматривается необходимость разработки хирургического инструмента, который максимально эффективно и малоинвазивно может удалить злокачественную опухоль, различить и уничтожить только опухолевые клетки, не повреждая нормальные клетки окружающих опухоль здоровых тканей. Для достижения этой цели предлагается использовать нанодиски с особыми магнитными, электронными и оптическими свойствами. Нанодиски, модифицированные распознающими лигандами – аптамерами, способны связываться с опухолевыми клетками и разрушать их под воздействием слабого негреющего переменного магнитного поля. Это позволяет достичь эффективного уничтожения опухоли, минимизируя воздействие на окружающую здоровую ткань.

DOI: 10.56304/S1992722323601064

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания – одна из главных причин смертности трудоспособного населения [1]. Проблема основных методов терапии, таких как хирургия и лучевая терапия, заключается в их высокой инвазивности, так как они повреждают здоровые ткани, окружающие опухоль. Это особенно опасно при лечении глиальных опухолей головного мозга. Другая проблема – невозможность полного удаления всех опухолевых клеток, так как они могут остаться незаметными и способствовать образованию новых опухолей [2]. Для максимально радикального удаления опухоли с минимальным повреждением здоровых

тканей необходим инструмент, который может находить и удалять только опухолевые клетки, не повреждая здоровые. Создание такого инструмента возможно с помощью нанотехнологий и наноматериалов с уникальными свойствами – электронными, оптическими и магнитными [3]. Магнитные диски, называемые наноскальпелями, могут стать перспективным хирургическим инструментом для разрушения опухолевых клеток [4]. Эти диски имеют узнавающий лиганд, способный связываться с опухолевыми клетками и разрушать их под влиянием переменного магнитного поля (МП). Наноразмерный инструмент для удаления опухоли состоит из двух компонентов.

Первый – наноскальпель – наносит повреждения на опухолевую клетку, вызывая ее гибель [5], второй – распознающий элемент – взаимодействует с опухолевой клеткой, обеспечивая контакт наноскальпеля с ней. Необходимость применения магнитных дисков для разрушения опухолевых клеток объясняется тем, что эффективность использования суперпарамагнитных наночастиц для этой цели достигла своего предела. Размеры суперпарамагнитных частиц ограничивают величину их магнитного отклика, который необходим для биомедицинских применений [6]. Однако, когда размеры превышают суперпарамагнитный предел, частицы начинают скапливаться. В отличие от этого эффективность наноскальпелей, наоборот, увеличивается с увеличением магнитного момента частицы. Специальным образом изготовленные [4, 6] магнитные микро- и нанодиски, в частности трехслойные Au/Ni/Au [4], обладают высоким насыщением намагниченности и отсутствием остаточной намагниченности, что позволяет удаленно управлять частицами с помощью МП, избегая проблемы скапливания дисков [7]. В результате эти диски становятся идеальными магнитомеханическими инструментами для разрушения раковых клеток. Аптамеры идеально справляются с ролью молекул адресного транспорта для доставки наночастиц и нанодисков в опухоль, а также могут обеспечить их фиксацию на клеточной мемbrane.

Глиальные опухоли головного мозга человека отличаются злокачественностью, приводящей к высокой смертности [1]. Большая инвазия опухолевых клеток в окружающие ткани делает невозможным полное удаление опухоли, а традиционные методы малоэффективны для ее лечения [1]. В настоящей работе оценивается эффективность трехслойных магнитных нанодисков с квазидипольной структурой (Au/Ni/Au), модифицированных аптамером Gli-233 [8] под воздействием переменного МП, для разрушения глиальной опухоли мозга человека, трансплантированной в мозг иммуносупрессированных мышей.

Дальнейшее исследование и использование магнитных нанодисков с узнающими лигандами предоставят новые возможности для разработки инструментов для максимально выборочного разрушения клеток злокачественных опухолей, открывая путь к малоинвазивным методам резекции и лечения рака.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Получение магнитных нанодисков и их функционализация с помощью аптамеров. Диски Au/Ni/Au были получены методом оптической литографии и электронно-лучевого напыления на подложки из монокристаллического Si диаметром 100 мм. Для этапа фотолитографии использовали негативный

резист ФН-16У-4, который перед нанесением был разбавлен AZ EBR Solver до толщины ~200 нм. Далее проводили стандартные операции подготовки фоторезиста согласно технологической карте для данного вида фотополимера:

- нанесение методом центрифугирования при скорости вращения центрифуги 3000 об./мин;
- высушивание полученного слоя при температуре 110°C;
- экспонирование через заранее подготовленный шаблон, негативный фотополимер подвергался дополнительной процедуре температурной обработки;
- проявка сформированных структур.

В результате проведенных операций формировалась геометрия из фоторезиста в виде столбиков высотой 220 нм и диаметром ~1000 нм (площадь 2500 мм^2). После процесса оптической литографии проводилось осаждение металлических слоев Au и Ni методом электронно-лучевого напыления на установке EBS.

Функционализацию нанодисков тиолированными ДНК-аптамерами Gli-233, способными к *in vivo*-связыванию [8], и олигонуклеотидами, неспецифичными для глиальных клеток, проводили согласно процедуре, описанной в [6]. Инкубировали с 1 мкМ восстановленных в ТСЕР-буфере тиолированных олигонуклеотидов в течение 24 ч при 6°C на шейкере для стабилизации дисков и предотвращения их конъюгации.

Исследования на клеточной модели в микрофлюидном чипе. Микрофлюидные чипы были изготовлены из полидиметилсилоксана (ПДМС) с применением резиста SU-8 (“мягкая литография”) согласно методике [9] в Санкт-Петербургском национально-исследовательском академическом университете им. Ж.И. Алфёрова РАН. В целом процесс состоял из трех этапов: изготовление фотошаблона; изготовление мастер-формы из фоторезиста, нанесенного на кремниевую пластину; изготовление микрофлюидных чипов. Изготовление фотошаблона осуществлялось на установке лазерной литографии DWL 66FS (Heidelberg Instruments Mikrotechnik GmbH, Германия) с характерным разрешением ~1 мкм.

Для формирования микроструктур на поверхности кремниевой подложки использовали резисты SU-8 2025 и SU-8 2075 (MicroChem Corp., США), позволяющие получить пленки толщиной 10–250 мкм на центрифуге Delta 6 RC (SUSS MicroTec, Германия). После нанесения резиста осуществляли его удаление с края образца механическим способом и отжиг при температуре 95°C в течение 7–60 мин в зависимости от толщины слоя. Для повышения силы адгезии SU-8 к кремниевой подложке последнюю предварительно обрабатывали в 50%-ном растворе плавиковой кис-

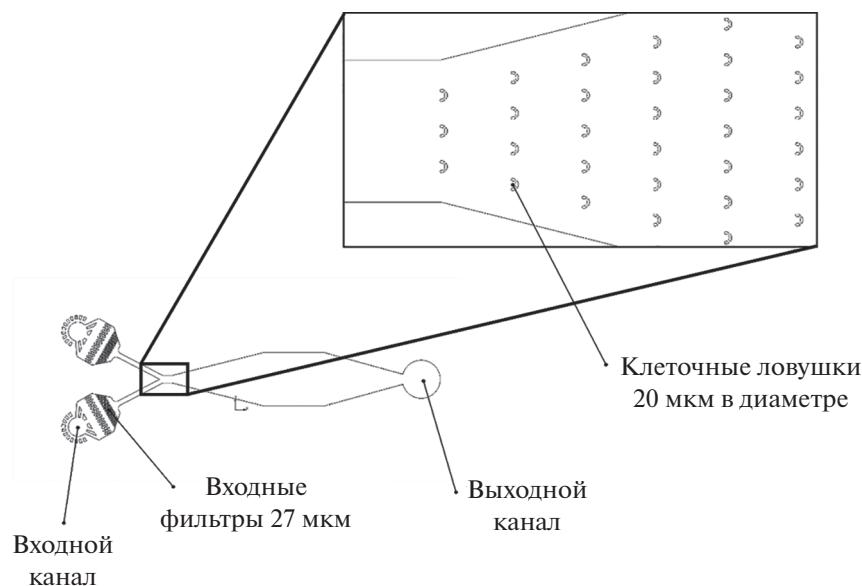


Рис. 1. Схема каналов микрофлюидного чипа с клеточными ловушками.

лоты в течение 40 с. Для отливки ПДМС-реплик микрофлюидных чипов по изготовленным мастер-формам использовали набор *Sylgard 184* (Dow Corning, США), состоящий из основы и отвердителя, смешиваемых в пропорции 10 : 1. После дегазации и заливки смеси в форму проводилось ее отверждение при температуре 65°С в течение 4 ч. По окончании процесса отверждения ПДМС-реплики микрофлюидных чипов отделяли от формы и проделывали в них отверстия с помощью пробойника. После этого осуществляли обработку поверхности реплики и защитной стеклянной пластины в виде покровного стекла в кислородной плазменной установке V15-G (PINK GmbH Thermosysteme) и последующее их соединение.

Схема каналов микрофлюидного чипа с клеточными ловушками представлена на рис. 1.

Магнитомеханическая терапия в микрофлюидных чипах. Для масштабных экспериментов по поиску оптимальных условий магнитомеханической терапии в качестве модельных клеток использовали асцитные клетки карциномы Эрлиха в микрофлюидных чипах. Для заполнения использовали шприцы объемом 1 мл. Ввод пробы проводили с помощью шприцевого насоса AL-1000HP (WPI, Англия). Для терапии использовали магнитные диски, конъюгированные с аптером к асцитным клеткам карциномы Эрлиха As-42. Чип помещали в катушку с переменным МП частотой 50 Гц и напряженностью 100 мТл на 10 мин. Измерения проводили на конфокальном микроскопе LSM 780 NLO (Carl Zeiss, Германия), фотографии клеток были сделаны с помощью камеры AxioCam MRc 5 (Carl Zeiss, Германия).

Общая схема микрофлюидного чипа с клеточными ловушками показана на рис. 1. Чип имеет два входных и один выходной канал. Каждый из входных каналов оснащен системой фильтрации. В центральной камере чипа располагаются клеточные ловушки диаметром 20 мкм для фиксации клеток.

Разработка лабораторной установки для управления магнитными нанодисками. Лабораторная научно-исследовательская установка для поиска оптимальных режимов адресной деструкции клеток-мишеней в низкочастотных магнитных полях, осуществляемого на экспериментальных клеточных моделях глиальных опухолей, была разработана специально для этого эксперимента (рис. 2). Катушка состоит из колец Гельмгольца со средним диаметром 6 см и подключена к генератору переменного тока с системой управления. Катушка может генерировать МП с максимальной индукцией 150 Э. Установка позволяет изменять форму переменного МП (прямоугольная или синусовая), частоту, напряженность и скважность переменного МП прямоугольной формы. В катушках может создаваться МП с максимальной индукцией 200 Э. Катушки подключены к генератору переменного тока. Каждая катушка подключена кциальному каналу генератора. Раздельные каналы генератора позволяют формировать как однородное, так и неоднородное МП. Генератор выполнен на микроконтроллере AtMega328P и подключается к компьютеру через USB-контроллер с функцией виртуального COM-порта. (CP210x usb to uart bridge). Генератор имеет встроенный блок питания 12 В 5 А от сети переменного тока 220 В и вентилятор для охлаждения. Созда-

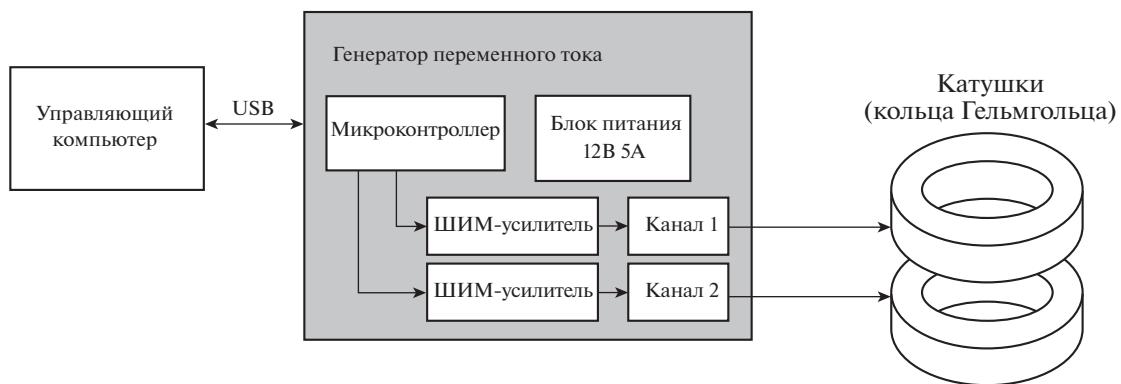


Рис. 2. Установка для управления магнитными нанодисками.

ние соответствующей формы и амплитуды тока обеспечивается широтно-импульсной модуляцией. Генератор позволяет выдавать сигналы синусоидальной и прямоугольной формы. Для сигнала задаются следующие параметры: freq – частота от 0.1 до 1000 Гц, amp – амплитуда от 0.1 до 100, dFi – разность фаз двух катушек в градусах, 0 – фазы совпадают, 180 – сигналы находятся в противофазе.

Исследования *in vivo*. Для формирования иммуносупрессии животным внутрибрюшинно вводили циклоспорин в концентрации 20 мг/кг и циклофосфамид в концентрации 60 мг/кг пятикратно с интервалом 48 ч. Перед введением оба препарата разводили физиологическим раствором до нужной концентрации, ежедневно животные получали кетоконазол перорально в дозе 20 мг/кг. После пятого введения препаратов в этот же день проводили ортоптическую транспланацию глиальных культур мышам. На следующий день после проведения ксенотрансплантации животным однократно вводили только циклоспорин. На период иммуносупрессии во избежание грибковых инфекций в поилку добавляли противогрибковый препарат – “Кетоконазол” в конечной концентрации 25 мг/л.

Исследование проведено в строгом соответствии с рекомендациями Руководства по уходу и использованию лабораторных животных Национального института здравоохранения. Протокол одобрен локальным комитетом по этике экспериментов на животных Красноярского государственного медицинского университета № 3 16 декабря 2022 г. Все операции проводили под наркозом, были приложены все усилия, чтобы минимизировать страдания животных.

Объектами исследования служили лабораторные мыши-самцы массой 20–25 г линии ICR с иммуносупрессией. Формирование модели глиобластомы человека осуществляли путем внутричерепной инъекции опухолевых клеток глиобластомы, полученных от больного глиобластомой.

Рост глиальной опухоли контролировали с помощью ЯМР-томографии. Противоопухолевую терапию проводили с помощью Au/Ni/Au-нанодисков, модифицированных аптамером Gli-233.

Подбор оптимальных параметров МП для микрохирургии магнитными нанодисками проводили на асцитных клетках карциномы Эрлиха *in vitro*. Эффективность магнитомеханической терапии оценивали на культурах клеток асцитной карциномы Эрлиха *in vitro* при следующих частотах переменного МП: 1, 5, 10, 20 и 50 Гц (интенсивность МП – 100 Э).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Эксперимент по оценке количества мертвых клеток в клеточных ловушках проводили после магнитомеханической терапии с магнитными наночастицами и аптамерами в зависимости от времени после обработки. Для этого использовали магнитные нанодиски и аптамер As-42 на асцитных клетках карциномы Эрлиха в качестве модельных. Данные записывали с помощью цифровой камеры AxioCam HRc High Resolution (Carl Zeiss, Германия) на конфокальном микроскопе LSM 780 (Carl Zeiss, Германия). Микрофлюидный чип с клеточными ловушками заполняли клетками, инкубированными с комплексом нанодисков с As-42. В буферную среду PBS, в которой находились клетки, добавляли красители мембранныго потенциала клеток DiBAC4 (зеленый) и краситель мертвых клеток Propidium iodide (красный). Чип с клетками был помещен в измерительную камеру конфокального микроскопа. Поверх чипа установлена катушка, в которой генерировалось переменное МП частотой 50 Гц и напряженностью 10 мТл. Мембранный потенциал снижался в переменном МП, и клетки погибли (рис. 3), о чем свидетельствует ядро, окрашенное пропидиумом иодидом. На основании выполненных экспериментов были выбраны оптимальные характеристики переменного МП:

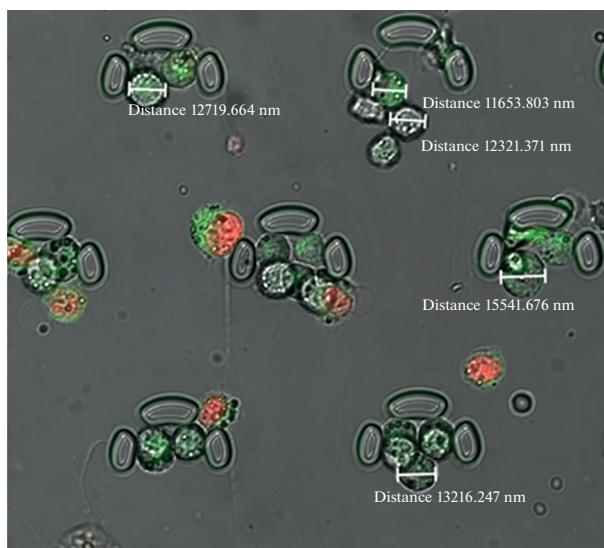


Рис. 3. Клетки погибают через 7 мин после окончания воздействия слабого переменного магнитного поля.

частота – 10 Гц, напряженность – 150 Э, форма поля – синус.

Исследования *in vivo*. Для успешного проведения ортоптической трансплантации глиобластомы животным проводили лекарственную иммуносупрессию. В качестве иммунодепрессантов выбрали комбинацию следующих препаратов: циклоспорина, селективно действующего на Т-лимфоциты, и цитостатического препарата циклофосфамида.

Как известно, в терапевтических концентрациях цитостатики способны угнетать иммунный ответ. Оценка иммунного статуса мышей перед ксено-трансплантацией глиобластомы в их головной мозг показала, что иммунорегуляторный индекс (CD3, CD4/CD3, CD8) животных перед трансплантацией опухоли существенно снижался – с 7.4 ± 2.6 до 1.7 ± 0.6 .

Развитие и лечение глиальных опухолей у мышей контролировали с помощью визуализации методом ЯМР-томографии. Исследования показали, что в течение 14 дней опухоль увеличилась до значительных размеров (рис. 4). Глиальная опухоль после четырех сеансов магнитомеханической терапии с использованием “умного” наноскальпеля в переменном МП (10 Гц, 150 Э) постепенно уменьшалась (рис. 4, А1–А3), в то время как глиальные опухоли у мышей, которых лечили нанодисками, модифицированными неспецифическими аптамерами, продолжали увеличиваться (рис. 4, Б1–Б3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Важнейшей биомедицинской задачей является разработка “умного” наноскальпеля, состоящего из нанохирургического инструмента и опухолераспознающих молекул, способных избирательно разрушать *in vivo* только опухолевые клетки. Функцию нанохирургических инструментов могут выполнять нанодиски с магнитной анизотропией и очень высокой чувствительностью

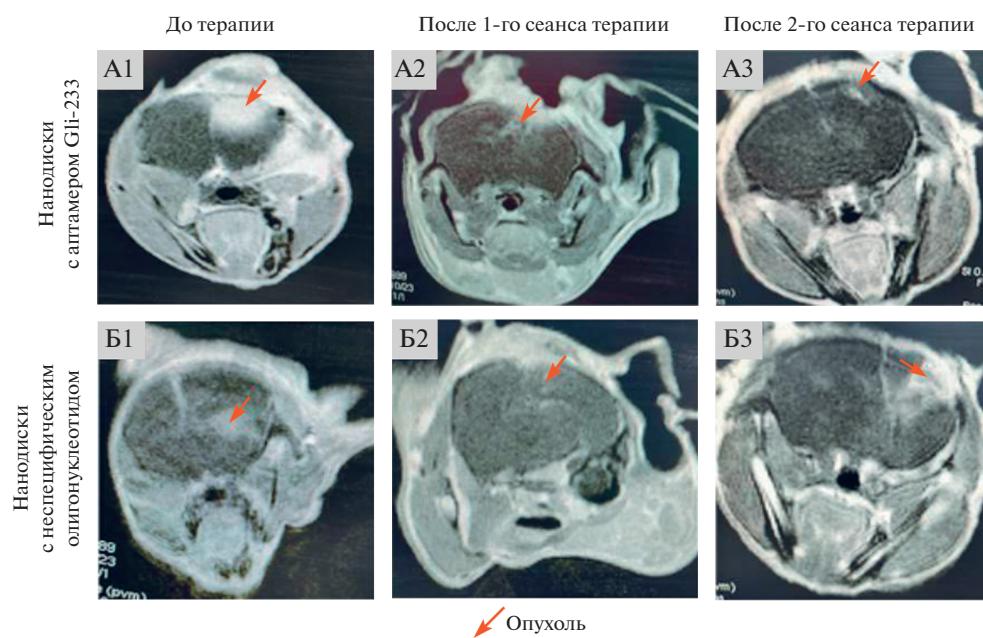


Рис. 4. Эффективность “умного” наноскальпеля в микрохирургии глиальных опухолей: опухоли до лечения (А1, Б1), обработка нанодисками, модифицированными аптамером Gli-233 (А2, А3), обработка нанодисками, модифицированными неспецифическим аптамером (Б2, Б3).

к магнитным воздействиям. Диски приобретают большую намагниченность в слабом внешнем МП, так как без МП имеют нулевую суммарную намагниченность. Нацеливание “наноскальпеля” на опухолевую клетку-мишень достигается за счет функционализации магнитных нанодисков специфичными и аффинными к опухолевым клеткам ДНК-аптамерами, которые используются в качестве биоидентифицирующих молекул [10–12].

Использование в сочетании микрофлюидных, клеточных, биохимических технологий и физико-технических решений позволяет автоматизировать и проводить массовые эксперименты поиска оптимальных условий магнитомеханической деструкции клеток-мишеней в зависимости от концентрации и физических свойств магнитных нанодисков, частоты, геометрии, напряженности и времени действия МП.

Проникновение магнитных дисков в клетку осуществляется путем эндоцитоза с последующей инкапсуляцией в лизосомы [13]. При этом предполагается, что разрыв лизосомальной мембранны под действием переменного МП является причиной гибели клеток [14, 15], в то время как проникновение дисков в клетки без воздействия переменного МП не снижает жизнеспособность опухолевых клеток. Вход дисков в клетку начинается со взаимодействия с белками клеточных мембран, которые являются специфическими мишениями для аптамеров.

Следовательно, одной из важнейших задач при разработке “умного” наноскальпеля для микрохирургии злокачественных опухолей является проблема подбора количества нанодисков, достаточного для уничтожения всех опухолевых клеток, поскольку хорошо известно, что опухолевые клетки удваиваются практически каждые 24 ч. Однако существует проблема слишком быстрой элиминации опухоли. Продукты деструкции могут быть токсичными для организма и представлять не меньшую опасность, чем живые опухолевые клетки. Несмотря на то что метод магнитомеханической терапии кажется очень перспективным, все еще существуют ограничения его применения, связанные с удалением мертвых клеток из организма. В случае использования магнитомеханической микрохирургии в качестве дополнительного инструмента во время операции разрушенные клетки и диски можно удалить простым промыванием. Таким образом, полученные результаты показали принципиальную возможность нанодисков нацеливаться и уничтожать отдельные опухолевые клетки.

В дальнейшем планируется усовершенствовать этот метод для его применения при интраоперационном удалении отдельных опухолевых клеток для предотвращения рецидива опухоли при резекции солидных опухолей с последующим

отмыванием дисков и разрушенных клеток. Использование дисков для этой процедуры обусловлено прежде всего тем, что диски не являются биосовместимыми и из-за большого размера их трудно удалить из организма. Использование магнитных дисков интраоперационно – перспективная технология лечения злокачественных новообразований, поскольку развитие современных технологий позволяет получать диски для терапии опухолей в промышленных масштабах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Оценка эффективности противоопухолевой терапии с помощью “умного” наноскальпеля показала, что микрохирургия с использованием трехслойных магнитных нанодисков с квазидипольной структурой (Au/Ni/Au), модифицированных специфичным для глиальных клеток аптамером Gli-233 (“умный” наноскальпель), эффективна для лечения глиальных опухолей головного мозга человека.

Работа выполнена в рамках базового проекта Красноярского научного центра (FWES-2022-0005).

Работа выполнена в ЦКП “Молекулярные и клеточные технологии” КрасГМУ им. В.Ф. Войно-Ясенецкого и Красноярском региональном центре коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН, региональном ЦКП Национального исследовательского Томского государственного университета при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грант № 075-15-2021-693 (№ 13.RFC.21.0012)).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H.E., Jemal A. // CA Cancer J. Clin. 2022. V. 72 (1). P. 7. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>
2. da Fonseca A.C., Amaral R., Garcia C. et al. // Adv. Exp. Med. Biol. 2016. V. 949. P. 245. https://doi.org/10.1007/978-3-319-40764-7_12
3. Cullity B.D. // Introduction to magnetic materials. Addison-Wesley publ, 1972.
4. Kim D.-H., Rozhkova E.A., Ulasov I.V. et al. // Nat. Mater. 2010. V. 9 (2). P. 165. <https://doi.org/10.1038/nmat2631>
5. Zamay T.N., Prokopenko V.S., Zamay S.S. et al. // Nanomaterials. 2021. V. 11 (6). P. 1459. <https://doi.org/10.3390/nano11061459>
6. Zamay T.N., Zamay S., Luzan N. et al. // J. Funct. Biomater. 2023. V. 14 (4). P. 179. <https://doi.org/10.3390/jfb14040179>
7. Koh A.L., Hu W., Wilson R.J. et al. // J. Appl. Phys. 2010. V. 107. № 9. P. 09B522. <https://doi.org/10.1063/1.3358067>

8. *Kichkailo A., Narodov A.A., Komarova M.A. et al.* // Mol. Ther. Nucleic Acids. 2023. V. 32. P. 267. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2023.03.015>
9. *Bukatin A.S., Mukhin I.S., Malyshev E.I. et al.* // Tech. Phys. 2016. V. 61 (10). P. 1566. <https://doi.org/10.1134/S106378421610008X>
10. *Fu Z. Xiang J.* // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 2793. <https://doi.org/10.3390/ijms21082793>
11. *de Franciscis V.* // Biochimie. 2018. V. 145. P. 45. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.09.01412>
12. *Duan T. Xu Z., Sun F. et al.* // Biomed. Pharmacother. 2019. V. 117. P. 109121. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2019.109121>
13. *Goirienna-Goikoetxea M., Munoz D., Orue I. et al.* // Appl. Phys. Rev. 2020. V. 7. P. 011306. <https://doi.org/10.1063/1.5123716>
14. *Saftig P., Klumperman J.* // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2009. V. 10. P. 623. <https://doi.org/10.1038/nrm2745>
15. *Boya P. Kroemer G.* // Oncogene. 2008. V. 27. P. 6434. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.310>