

На правах рукописи

Семкина

Алевтина Сергеевна

Векторные магнитные наночастицы оксида железа, загруженные
доксорубицином, в диагностике и терапии экспериментальных опухолей

Специальность: 03.01.04 – Биохимия

Автореферат на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Российский Национальный Исследовательский Медицинский Университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Чехонин Владимир Павлович

Официальные оппоненты:

Ипатова Ольга Михайловна - доктор биологических наук, профессор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича»

Клячко Наталья Львовна - доктор химических наук, профессор Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Защита состоится « » _____ 2017 г. в ____ часов на заседании Диссертационного совета Д 208.072.14 на базе ФГБОУ ВО РНИМУ имени Н.И.Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, Островитянова, д.1

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте <http://rsmu.ru> ФГБОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, г. Москва, ул.Островитянова, д.1

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Кягова Алла Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

Возглавляя список опасных для здоровья проблем у женщин, рак молочной железы продолжает оставаться серьезной угрозой для жизни. Согласно недавним исследованиям предполагается, что к 2020 году данное заболевание будет диагностировано у 1,7 млн пациенток. Это на 26% превышает текущий уровень зарегистрированных случаев (Wagdy M. Eldehna et al. 2017). Ввиду такого неблагоприятного прогноза остается актуальной проблема поиска новых методов терапии рака молочной железы или усовершенствования уже существующих подходов. Чаще всего лечение проводят путем хирургического удаления опухоли и проведения последующих курсов радиотерапии и/или медикаментозной терапии (применение химиопрепаратов, моноклональных антител, гормоноблокирующая терапия). В некоторых случаях, когда хирургическую операцию сложно осуществить, или размер опухоли еще не настолько велик, может иметь место дооперационное проведение химиотерапии.

Существует обширный спектр противоопухолевых препаратов, предназначенных для терапии рака молочной железы, однако, все они обладают серьезным общим недостатком: наличием тяжелых побочных эффектов. Специфика действия химиопрепаратов состоит в том, что они нарушают процесс деления активно делящихся и растущих клеток, в том числе и в нормальной, неопухолевой ткани (Kau1 and Meyers 2006). В связи с этим задача повышения специфичности воздействия лекарств на клетки организма приобретает значительную актуальность. Одним из широко используемых подходов является разработка концепции адресной, избирательной доставки терапевтических молекул с помощью различных синтетических наноконтейнеров: липосомы (Allen and Cullis 2013), магнитные наночастицы (McBain, Yiu, and Dobson 2008), полимеры (Vilar, Tulla-Puche, and Albericio 2012) и др. Использование наноконтейнерных систем позволяет корректировать такие параметры как биораспределение химиопрепарата в органах, фармакокинетический профиль, доступность к определенным тканям, токсичность по отношению к здоровым клеткам, эффективность транспорта внутрь опухоли и преодоление резистентности пораженных клеток к лекарству (Roohi et al. 2012), (Peer et al. 2007). Все это становится реальным благодаря широким возможностям подбора

оптимального типа наноконтейнера, его функционализации и модифицирования различными химическими соединениями (Thanh and Green 2010). Одними из наиболее привлекательных наноразмерных носителей являются магнитные наночастицы оксида железа Fe_3O_4 (МНЧ) (Zou et al. 2010), (Ding and Guo 2013), (Yallapu et al. 2010) благодаря целому ряду их уникальных свойств: высокая доступность, низкая токсичность, сравнительно высокая стабильность в водных растворах. Высокоразвитая поверхность МНЧ позволяет легко осуществлять функционализацию наночастиц: вводить флуоресцентные метки, загружать лекарственные препараты, конъюгировать с молекулярными лигандами-векторами (антитела, пептиды, аптамеры и др.) (Lin et al. 2010). Последние могут адресно доставлять наночастицы в опухолевые клетки за счет высокоспецифичного взаимодействия с рецепторами, экспрессия которых повышена в опухолевой ткани (Ulbrich et al. 2016). В качестве такого рецептора может выступать фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), который играет важную роль в процессе развития опухоли и может считаться надежным маркером опухолеобразования (Chekhonin et al. 2013). Дополнительное модифицирование МНЧ за счет использования различных покрытий (синтетические полимеры, неорганические молекулы, биомолекулы и т.д.) может привести к улучшению физико-химических, биологических и других свойств наноконтейнера или к появлению новых. Таким образом, химически модифицированные наночастицы магнетита (Fe_3O_4) являются крайне перспективным кандидатом на роль контейнера-переносчика химиопрепаратов к опухолевой ткани молочной железы.

Уникальной особенностью МНЧ является наличие у них магнитных свойств, благодаря которым суперпарамагнитные наночастицы (наночастицы магнетита размером 10-20 нм (Wahajuddin and Arora 2012)) способны взаимодействовать с внешним магнитным полем и влиять тем самым на процессы релаксации протонов в тканях организма. На этом основано применение МНЧ в качестве контрастных агентов для МРТ различных патологий. Несмотря на то, что чаще для диагностики рака молочной железы используется маммография и ультразвуковое исследование, качественное МРТ-сканирование потенциально может вдвое увеличить вероятность обнаружения заболевания у населения, находящегося в группе высокого риска (Howard and Bland 2012). Поэтому остается актуальной проблема создания новых

эффективных МРТ-контрастных агентов для диагностики рака молочной железы.

Актуальность данной работы определяется потенциалом системы на основе векторных МНЧ, которые могут выступать как в качестве диагностического препарата (МРТ-контрастный агент), так и в качестве терапевтического (в комплексе с лекарством).

Цель работы:

Разработка и изучение подходов к специфической визуализации и терапии экспериментальной аденокарциномы молочной железы на основе препарата векторных суперпарамагнитных наночастиц оксида железа, связанных с доксорубицином.

Задачи:

1. Синтезировать биосовместимые, устойчивые к агрегации наночастицы оксида железа.
2. Провести загрузку полученных наночастиц оксида железа доксорубицином, изучить физико-химические основы его связывания с наночастицами и разработать метод конъюгации магнитных наночастиц с моноклональными антителами к фактору роста эндотелия сосудов.
3. Исследовать взаимодействие наночастиц оксида железа, загруженных доксорубицином, с клетками линии 4T1 в экспериментах *in vitro*, а также изучить иммунохимическую активность и специфичность векторных наночастиц.
4. Оценить возможность визуализации аденокарциномы молочной железы 4T1 у мышей методом МРТ с помощью полученных векторных магнитных наночастиц оксида железа.
5. Оценить эффективность направленной терапии экспериментальной аденокарциномы молочной железы 4T1 у мышей с помощью наночастиц оксида железа, загруженных доксорубицином.

Научная новизна:

Впервые получены высокоселективные препараты МНЧ, обладающие как диагностическими, так и терапевтическими свойствами, что открывает

перспективы объективизации контроля эффективности доставки лекарственного препарата в клетки-мишени, и мониторинга развития опухолевого процесса.

Практическая значимость:

Разработанный метод получения селективных комплексов на основе МНЧ оксида железа, моноклональных анти-VEGF антител и доксорубицина позволяет получать эффективные препараты для химиотерапии и МРТ-диагностики опухоли молочной железы.

Апробация, внедрение, публикации:

Основные положения работы представлены и обсуждены на 15 российских и международных конференциях, в том числе: на IX-XI Международных Пироговских научных медицинских конференциях студентов и молодых ученых (Москва, 2014-2016), VIII Всероссийской конференции с международным участием молодых ученых по химии «Менделеев 2014» (Санкт-Петербург, 2014), Международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни» (Москва, 2014), VIII Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2015), XXI-XXII Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов» (Москва, 2014-2015), VI Международной конференции Nanosop 2014 (Чехия, Брно, 2014), 12-ой международной конференции «Наноструктурированные материалы NANO 2014» (Москва, 2014), на XXII-XXIII Российских Национальных конгрессах «Человек и лекарство» (Москва, 2015-2016), 3-ей Международной школе «Нано 2015. Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах. Безопасность и наномедицина» (Истринский район, 2015), Международной научно-практической школе-конференции «Магнитные наноматериалы в биомедицине: получение, свойства, применение» (Звенигород, 2015), I Международной школе-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века» (Казань, 2015).

Апробация работы была проведена на совместном заседании кафедры медицинских нанобиотехнологий медико-биологического факультета и отдела медицинских нанобиотехнологий медико-биологического факультета ФГБОУ ВО «РНИМУ имени Н.И. Пирогова» Минздрава РФ. Результаты исследования

внедрены в научно-практическую работу НИТУ «МИСиС» и ФГБУ «ФМИЦПН им. В.П. Сербского».

Публикации:

По материалам диссертации опубликовано 22 работы, из них 2 статьи в ведущих российских рецензируемых журналах, 1 статья в зарубежном журнале, 19 тезисов в материалах российских и международных конференций и симпозиумов.

Объем и структура диссертации:

Диссертация изложена на 129 машинописных страницах; состоит из введения, трех глав, выводов и библиографического указателя, содержащего 149 ссылок. В основных главах работы приведены данные обзора литературы, характеристика объекта, методов исследования, а также используемого материала, результаты собственных исследований и их обсуждение. Диссертация иллюстрирована 27 рисунками и 3 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Синтез МНЧ оксида железа термическим разложением ацетилацетоната железа(III) в бензиловом спирте

Синтез МНЧ путем термического разложения ацетилацетоната железа (III) проводили согласно протоколу (Miles et al. 2010) со следующими модификациями: синтез проводился в атмосфере аргона, нагревание реакционной смеси до 100°C проводилось в течение 1ч, после чего ее доводили до кипения со скоростью нагрева 20°C/ч и оставляли при этой температуре на 40ч. К 20 мг полученных МНЧ добавляли 5 мл дистиллированной воды и доводили pH до 11. Затем полученную дисперсию обрабатывали ультразвуком (10 мин) и добавляли к ней 40 мг БСА, растворенного в 5 мл дистиллированной воды. Полученную смесь инкубировали 4 ч при $T_{комн}$, затем диализовали (25 кДа) напротив дистиллированной воды. К 20 мл полученного раствора добавляли 250 мкл 1М NaOH, а затем 230 мкл 25%го водного раствора глутарового альдегида. Полученную смесь инкубировали при перемешивании 15 мин, а затем добавляли 250 мкл 3М глицина с pH 9,2. К полученному раствору

добавляли 332 мкл раствора боргидрида натрия в PBS с концентрацией 10 мг/мл. Затем инкубировали 60 мин.

К раствору МНЧ-БСА ($C(\text{Fe}^{3+}) = 0,95$ мг/мл, $m(\text{Fe}^{3+}) = 5$ мг) добавляли 265 мкл раствора NHS в PBS и 430 мкл раствора EDC в PBS ($C = 10$ мг/мл). Реакционную смесь инкубировали 10 мин при $T_{\text{комн}}$, затем добавляли 470 мкл водного раствора $\text{HCl} \cdot \text{NH}_2\text{-PEG-OH}$ ($C = 10$ мг/мл) и инкубировали 1 ч при $T_{\text{комн}}$.

Исследование процесса загрузки Докс на МНЧ-БСА-ПЭГ

Раствор МНЧ-БСА-ПЭГ ($C = 100$ мкг/мл, $V = 1$ мл) помещали в кювету для измерений гидродинамического диаметра методом динамического светорассеяния (ДСР), после чего добавляли 50 мкл раствора Докс ($C = 100$ мкг/мл). Реакционная смесь инкубировалась 5 мин, после чего проводили измерение размера образовавшихся комплексов МНЧ-БСА@Докс-ПЭГ. Затем вновь добавляли 50 мкл раствора Докс и повторяли процедуру измерений до тех пор, пока общий объем раствора не составил 2 мл. Загрузку вычисляли по следующей формуле:

$$LC = \frac{m(\text{Докс})}{m(\text{Докс}) + m(\text{МНЧ} - \text{БСА} - \text{ПЭГ})} * 100\%$$

Конфокальная микроскопия

С целью анализа интернализации препаратов клетки экспериментальной аденокарциномы молочной железы 4Т1 высаживали в чашки Петри со стеклянным дном диаметром 35 мм до достижения конfluenceности монослоя 50-70% ($2 \cdot 10^4$ клеток на чашку). Клетки культивировались при температуре 37°C, во влажной атмосфере с 5% CO_2 , на среде RPMI-1640 (Life Technologies, США) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, глутамина и антибиотиков. При пассаже клеток использовался 0,25% раствор Трипсин-ЭДТА (Life Technologies, США). При достижении 50% плотности клеточного монослоя к клеткам вносили рабочий раствор мембранного красителя CellMask™ Deep Red plasma membrane stain C10046 (Life Technologies, США), инкубировали 10 мин при температуре 37°C, после чего клетки аккуратно отмывали и вносили флуоресцентно меченые препараты наночастиц в концентрации 250 мкг/мл в пересчете на содержание ионов Fe^{3+} и инкубировали на протяжении 30 мин при температуре 37°C. Затем клетки аккуратно отмывали. Микроскопическое сканирование производилось с помощью конфокального лазерного

сканирующего микроскопа Nikon A1R MP+ (Япония) с объективом Plan Apo 20x/0,75 Dic N. Использовались лазеры с эмиссией 488, 561 и 641 нм; регистрация производилась в диапазонах 500-550, 570-620 и 663-738 нм, соответственно. Обработка полученных изображений производилась с помощью программного обеспечения NIS-Elements (Nikon).

Получение МНЧ-БСА-ПЭГ, конъюгированных с антителами к VEGF (МНЧ-БСА-ПЭГ-VEGF) и неспецифическими иммуноглобулинами (МНЧ-БСА-ПЭГ-IgG)

Активацию карбоксильных групп на поверхности МНЧ-БСА-ПЭГ карбодиимидным способом проводили 15 мин, после чего добавляли антитела (mAb VEGF или IgG). Инкубировали 1 ч при $T_{\text{комн}}$, и затем 12 ч при $+4^{\circ}\text{C}$.

Иммуноцитохимический анализ антител к VEGF и векторных МНЧ

Фиксированная культура клеток 4T1, выращенная на высокоадгезивном полистироле или на покровных стеклах до 50-100% конфлюентности монослоя, обрабатывалась 4% раствором параформальдегида в PBS ($\text{pH} = 7,4$) в течение 30 мин при $T_{\text{комн}}$, после чего четырехкратно отмывалась. В качестве рабочего буфера использовался PBS, содержащий 0,2% Tween-20 и 0,2% Triton X-100 (PBSTT). Чтобы заблокировать неспецифические сайты связывания на мембране клеток перед последующей процедурой, их инкубировали с 10% раствором сыворотки крови козы. После этого препараты инкубировали с фиксированной культурой 4T1 2 ч при 37°C . Затем промывали PBSTT, добавляли флуоресцентно меченые вторичные антитела (Goat anti-mouse-IgG-Alexa 488) в разведении 1:500 в PBSTT и инкубировали в течение часа при 37°C . После этого клетки отмывали от несвязавшихся вторичных антител (3 раза, PBSTT) и инкубировали с красителем DAPI в течение 5 мин (разведение 1:500). На следующем этапе клетки отмывали от красителя и монтировали на предметное стекло с использованием 50% раствора глицерина. Анализ проводили на конфокальном микроскопе A1R MP+ (Nikon, Япония).

Проточная цитофлуориметрия МНЧ-БСА-ПЭГ, МНЧ-БСА-ПЭГ-IgG, МНЧ-БСА-ПЭГ-VEGF

К живым клеткам аденокарциномы молочной железы 4T1 добавляли флуоресцентно меченые образцы МНЧ-БСА-ПЭГ, МНЧ-БСА-ПЭГ-IgG, МНЧ-БСА-ПЭГ-VEGF ($\text{C}(\text{Fe}^{3+}) = 2,7, 6,4$ и $5,4$ мкг/мл соответственно для достижения

одинаковой интенсивности флуоресценции всех образцов). Препараты инкубировали с клетками в течении 1 ч при 37°C, после чего клетки дважды промывали буфером PBS, добавляли раствор 0,1М трипсина – 0,1М версена и инкубировали 5 мин. Затем клетки фиксировали 1% раствором параформальдегида и переносили в пробирки. Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Miltenyi Biotec GmbH (Германия). Процентное содержание позитивных по флуоресценции клеток определяли с помощью программного обеспечения MACSQuantify (Miltenyi Biotec GmbH, Германия), после чего проводили нормирование образцов по исходным концентрациям.

Визуализация аденокарциномы молочной железы 4T1 у мышей с помощью векторных и невекторных МНЧ

Подкожную опухоль моделировали на мышах Balb/C с помощью внутримышечной имплантации клеток аденокарциномы молочной железы 4T1, которые были трансфицированы геном люциферазы светлячка (4T1-Luc). Препараты МНЧ-БСА-ПЭГ, МНЧ-БСА-ПЭГ-VEGF и МНЧ-БСА-ПЭГ-IgG вводились внутривенно в объеме 100 мкл на 9й день после имплантации. Доза препарата составляла 10 мг Fe³⁺/кг. Перед введением препарата, а также спустя 5 мин и 24 ч после введения проводилось МРТ-сканирование на магнитно-резонансном томографе ClinScan 7T (Bruker Biospin, США) в T2* взвешенном режиме SWI со следующими параметрами: TE/TR =19/50 мс, толщина среза 0,5 мм, FOV = 30мм, разрешение 256/176.

Исследование противоопухолевой активности векторных и невекторных МНЧ, загруженных Докс

В эксперименте использовались самки мышей Balb/C, массой 19±2 г, которым в третью пару молочных желез вводились клетки 4T1-Luc для моделирования ортотопической аденокарциномы молочной железы. Наличие и развитие опухоли регистрировались в ходе сканирования животных на приборе прижизненной визуализации IVIS Spectrum CT (Perkin Elmer, США) в режиме анализа биолюминесценции. Было сформировано 5 групп, по 6 животных в каждой группе. Первая группа получала в качестве лечения препарат Докс, вторая – МНЧ-БСА@Докс-ПЭГ, третья – МНЧ-БСА@Докс-ПЭГ-VEGF, четвертая – МНЧ-БСА@Докс-ПЭГ-IgG, пятая – физиологический раствор. Введение препаратов осуществлялось внутривенно на 7,14,17 и 21е сутки после

имплантации опухоли. Доза препаратов - 2 мг/кг по Докс. Параметры выживаемости определяли по методу Каплана-Майера с использованием компьютерной программы GraphPrism.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез МНЧ-БСА-ПЭГ и их характеристика

Для получения МНЧ оксида железа был выбран метод термического разложения органического прекурсора: ацетилацетоната железа (III). Для стабилизации МНЧ в растворе проводилось их покрытие молекулами БСА. Нам удалось выделить 2 типа наночастиц: МНЧ-БСА I и МНЧ-БСА II, для которых были определены такие характеристики как гидродинамический диаметр (85 ± 10 и 36 ± 4 нм соответственно), содержание белковой оболочки (28 ± 3 и $50 \pm 3\%$), дзета-потенциал поверхности (-24 ± 2 и -35 ± 3 мВ). Исследования морфологии показали, что наночастицы образуют агломераты, которые представляют собой несколько частиц оксида железа, окруженных белковой оболочкой (Рис. 1). Распределение атомов Fe, C, N, O подтверждает состав наночастиц и их структуру, характеризующуюся наличием ядра и окружающей его органической оболочки (структура "ядро-оболочка").

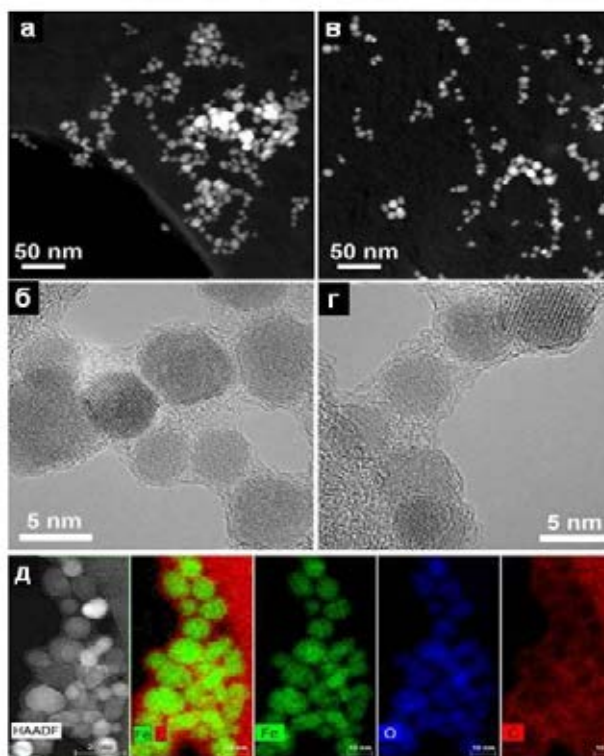


Рисунок 1. а,б и в,г – ПЭМ-микрофотографии наночастиц МНЧ-БСА I и МНЧ-БСА II соответственно; д – карты элементного состава агломератов, полученные методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии.

Для того чтобы оценить возможность применения полученных наночастиц в качестве контрастных МРТ-агентов были определены значения T2 релаксивности. Данный параметр показывает, насколько снижается характерное время спин-спиновой релаксации протонов окружающей среды при введении в нее контрастного агента в заданной концентрации. Для МНЧ-БСА I T2 релаксивность оказалась равна $271 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$, для МНЧ-БСА II – $161 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$. По сравнению с коммерческим контрастным агентом Feridex (значение T2 релаксивности - $148 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$), который используется для визуализации клеток печени, полученные наночастицы имеют большее значение T2 релаксивности, а значит, способны эффективно визуализировать опухолевую ткань.

Была установлена низкая коллоидная стабильность водного раствора наночастиц МНЧ-БСА I и их склонность к образованию агрегатов (Рис. 2), поэтому для дальнейших экспериментов использовались МНЧ-БСА II.

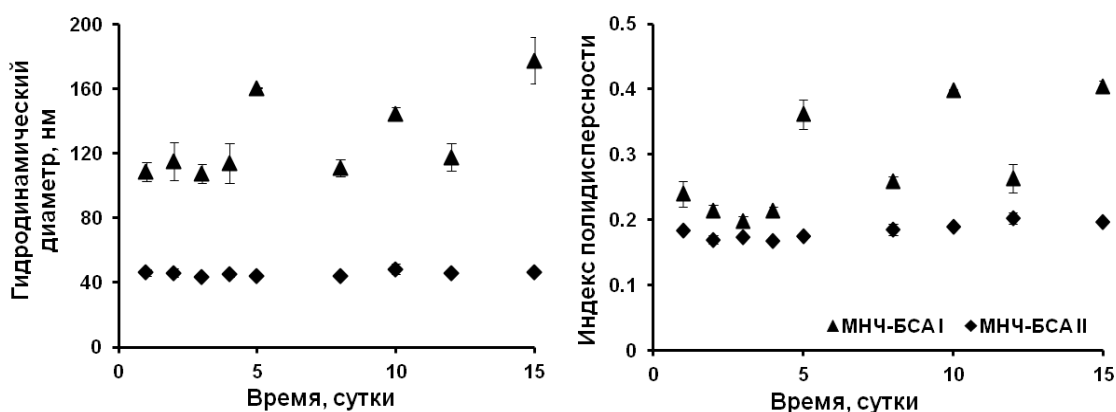


Рисунок 2. Исследование стабильности МНЧ-БСА I и МНЧ-БСА II в течение 15 суток.

На следующем этапе МНЧ-БСА покрывали оболочкой из ПЭГ для обеспечения биосовместимости наноконтейнера. Успешную конъюгацию полимерных молекул подтвердили данные ДСР и ТГА: по сравнению с исходными наночастицами наблюдалось увеличение гидродинамического диаметра ($41 \pm 4 \text{ нм}$) и дзета-потенциала МНЧ-БСА-ПЭГ ($-30 \pm 3 \text{ мВ}$), а также увеличение массовой доли органической оболочки в составе наночастиц ($58 \pm 5\%$). Значение T2 релаксивности составило $-151 \pm 3 \text{ mM}^{-1}\text{s}^{-1}$.

Было установлено, что при высоких значениях концентрации наночастиц МНЧ-БСА-ПЭГ оказывают существенно меньшее токсическое действие на живые клетки (HF – человеческие фибробласты) в отличие от МНЧ-БСА I и МНЧ-БСА II (Рис. 3).

Модификация МНЧ-БСА II молекулами ПЭГ привела к уменьшению генерации активных форм кислорода, обеспечив тем самым безопасность МНЧ-БСА-ПЭГ по отношению к мышинным эмбриональным фибробластам. Однако в случае исследований на линии клеток почечного эпителия человека такого эффекта не наблюдалось, что может быть связано с различием клеточного метаболизма двух анализируемых культур.

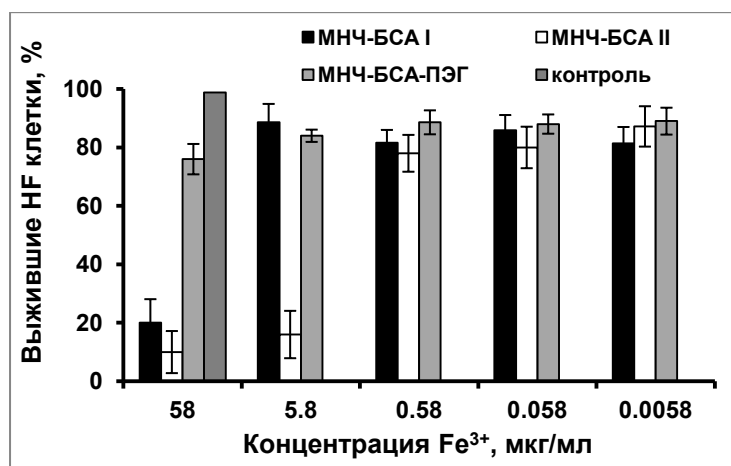


Рисунок 3. Анализ цитотоксического эффекта МНЧ-БСА I, МНЧ-БСА II, МНЧ-БСА-ПЭГ. Время инкубации с клетками – 48ч. HF – человеческие фибробласты

Для характеристики магнитных свойств наночастиц были получены кривые намагниченности с использованием весов Фарадея. Отсутствие остаточной намагниченности на кривой гистерезиса у всех образцов свидетельствует о наличии у них суперпарамагнитных свойств (Рис. 4).

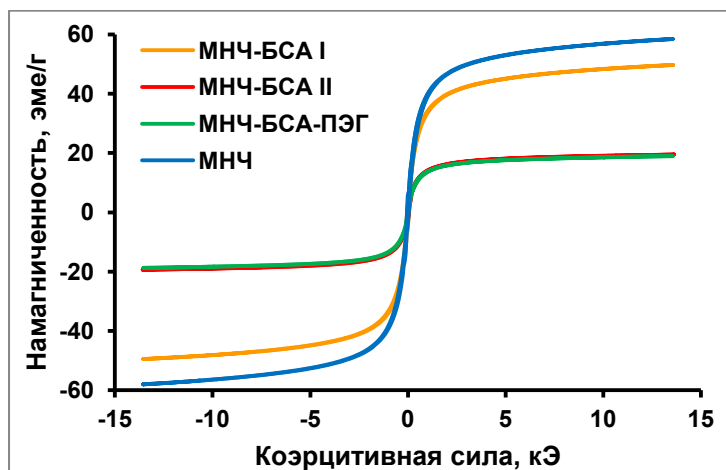


Рисунок 4. Кривая намагниченности МНЧ, полученных термическим разложением ацетилацетоната железа (III), МНЧ-БСА (I), МНЧ-БСА (II), МНЧ-БСА-ПЭГ.

По крутому начальному наклону кривой можно сделать вывод о высоком значении магнитной восприимчивости материала. Намагниченность насыщения синтезированных наночастиц оксида железа составила: МНЧ Fe₃O₄ - 59±3, МНЧ-БСА I - 50±3, МНЧ-БСА II - 20±1, МНЧ-БСА-ПЭГ - 19±1 эме/г, что позволяет говорить о возможности их взаимодействия с внешним магнитным

полям при проведении МРТ-сканирования. Значения намагниченности хорошо согласуются с различным процентным содержанием железа в наночастицах, т.к. внешнее белково-полимерное покрытие не обладает магнитными свойствами, а значит и не может влиять на характер кривой намагниченности.

Изучение процесса загрузки МНЧ-БСА-ПЭГ лекарством доксорубицин

Для исследования процесса связывания Докс с МНЧ-БСА-ПЭГ раствор наночастиц титровали раствором лекарства той же концентрации и анализировали размер и дзета-потенциал суспензии методом ДСР. При соотношении Докс к ионам Fe^{3+} более чем 1:5 по массе (значение загрузки – 8 масс.%) наблюдалось увеличение размера наночастиц и индекса полидисперсности, что может свидетельствовать о постепенной дестабилизации коллоидной системы (Рис. 5). Таким образом, была установлена оптимальная величина загрузки Докс, которая составила 8 масс.%, и была использована для дальнейших экспериментов.

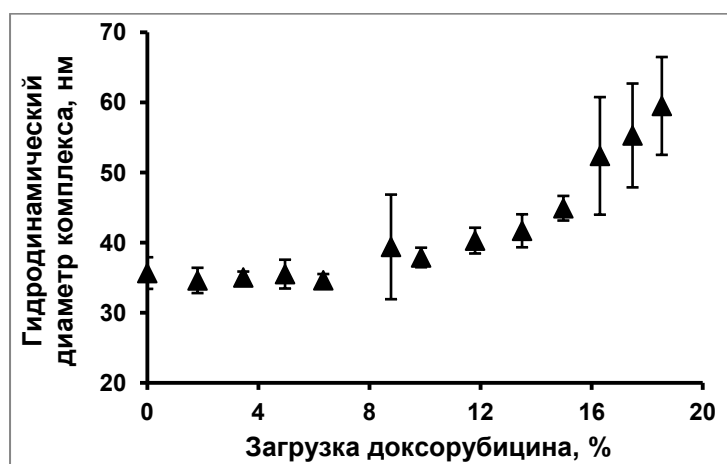


Рисунок 5. Зависимость гидродинамического диаметра комплекса МНЧ-БСА@Докс-ПЭГ от величины загрузки Докс.

Иммобилизация Докс на МНЧ-БСА-ПЭГ приводила к изменению заряда поверхности наночастиц, о чем свидетельствовали результаты измерения: значение дзета-потенциала увеличивалось по абсолютной величине по мере увеличения загрузки Докс. В отсутствие лекарства для МНЧ-БСА-ПЭГ оно составляло -30 ± 3 мВ, для комплекса МНЧ-БСА@Докс-ПЭГ при загрузке 8 масс.% увеличивалось до -25 ± 1 мВ. При дальнейшем увеличении количества Докс в составе комплекса (20 масс.%) дзета-потенциал становился значительно выше по сравнению с незагруженными наночастицами и достигал -11 ± 1 мВ. Помимо этого количество связанного с наночастицами Докс изменялось в зависимости от значения ионной силы раствора. Иными словами, нам удалось

показать движущую роль электростатического взаимодействия при загрузке лекарственного препарата Докс на МНЧ-БСА-ПЭГ.

Чтобы подтвердить эффективность полученных электростатических комплексов МНЧ-БСА@Докс-ПЭГ для доставки лекарственного препарата, было проанализировано его высвобождение под действием внешнего стимула, в роли которого выступало значение рН среды. Согласно полученным данным (Рис. 6), при значении рН=7,4 за 24 ч количество высвободившегося Докс не превышало 25% по массе от исходного содержания лекарства в составе комплекса. В кислых условиях процесс происходил более интенсивно: при рН=6,5 и рН=5,5 значения высвобождения составляли 55 и 75% соответственно. Известно, что в некоторых солидных опухолях в результате процессов гипоксии и последующего ацидоза кислотность окружения пораженной ткани оказывается завышенной (Gillies, Robey, and Gatenby 2008). Таким образом, есть все основания полагать, что комплекс МНЧ-БСА@Докс-ПЭГ, достигший опухоли, сможет обеспечить более интенсивное высвобождение Докс в этой области по сравнению со здоровой тканью.

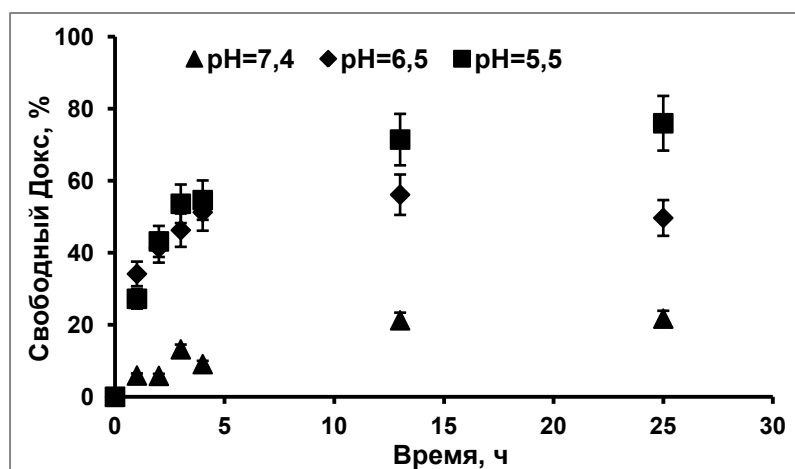


Рисунок 6. График высвобождения Докс из комплекса МНЧ-БСА@Докс-ПЭГ при различных значениях рН среды (7,4; 6,5; 5,5).

Сравнение цитотоксической активности МНЧ-БСА-ПЭГ, комплекса МНЧ-БСА@Докс-ПЭГ и доксорубицина

Для характеристики терапевтических свойств комплекса МНЧ-БСА@Докс-ПЭГ исследовали его воздействие на живые клетки 4Т1 в ходе MTS-теста. Цитотоксичность комплекса оказалась сравнимой с токсичностью свободного Докс в диапазоне концентраций от 0,08 до 20 мкг/мл (Рис. 7). Также было установлено отсутствие токсического воздействия МНЧ-БСА-ПЭГ в диапазоне концентраций от 0,32 до 80 мкг Fe^{3+} /мл. Образование комплекса не

оказывает негативного влияния на терапевтическую активность Докс, что делает МНЧ-БСА@Докс-ПЭГ перспективным противоопухолевым агентом.

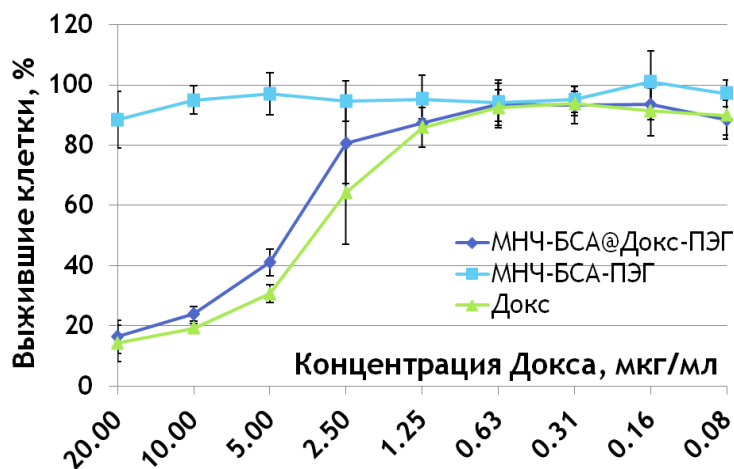


Рисунок 7. Цитотоксическая активность Докс, МНЧ-БСА-ПЭГ и МНЧ-БСА@Докс-ПЭГ. Концентрация свободных МНЧ-БСА-ПЭГ соответствовала концентрации МНЧ-БСА-ПЭГ в комплексе.

Получение МНЧ, конъюгированных с моноклональными антителами к VEGF (МНЧ-БСА-ПЭГ-VEGF) и их характеристика

Конъюгация mAb VEGF с МНЧ-БСА-ПЭГ проводилась методом карбодиимидной активации карбоксильных групп, входящих в состав белковой оболочки наночастиц. Иммунохимические свойства полученных векторных наночастиц определяли методом иммуноферментного анализа. Было доказано специфичное взаимодействие МНЧ-БСА-ПЭГ-VEGF с антигеном VEGF и отсутствие такого взаимодействия в случае МНЧ-БСА-ПЭГ-IgG, а также в случае немодифицированных наночастиц МНЧ-БСА-ПЭГ. Иммуноцитохимический анализ показал значительное накопление МНЧ-БСА-ПЭГ-VEGF в фиксированных VEGF-положительных клетках 4Т1 по сравнению с контролем МНЧ-БСА-ПЭГ-IgG (Рис. 8), что указывает на селективное связывание векторных наночастиц с антигеном, презентированным в клетках.

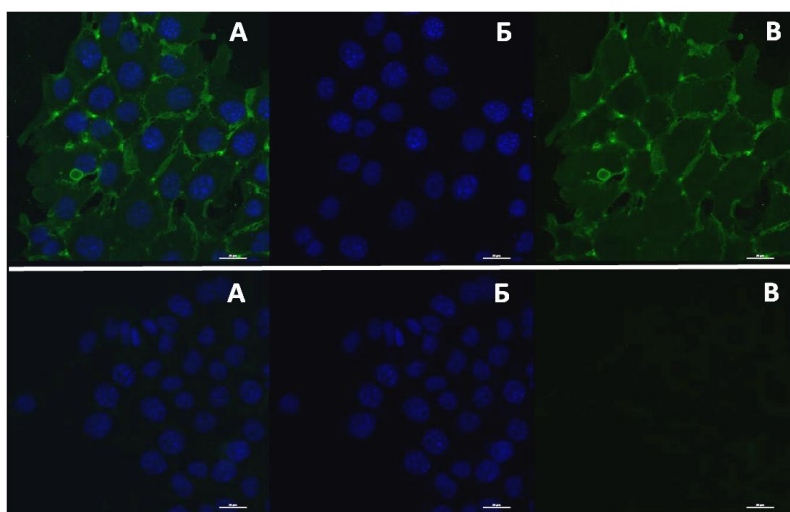


Рисунок 8. Флуоресцентные фотографии фиксированных клеток 4Т1 после взаимодействия с МНЧ-БСА-ПЭГ-VEGF (верхняя панель) и МНЧ-БСА-ПЭГ-IgG (нижняя панель).

А - совмещенное изображение, Б - флуоресценция DAPI, В - флуоресценция иммуноглобулинов козы, специфичных к иммуноглобулинам мыши.

Чтобы количественно оценить уровень захвата векторных МНЧ клетками 4Т1 был использован методом проточной цитофлуориметрии (Рис. 9). Из представленного графика можно сделать вывод о том, что МНЧ-БСА-ПЭГ-VEGF накапливались клетками в 3,4 раза более активно, чем не векторные наночастицы (МНЧ-БСА-ПЭГ) в той же концентрации после 1 ч инкубации препаратов с клетками. Для МНЧ-БСА-ПЭГ-IgG процентное содержание наночастиц в клетках оказалось еще ниже: в 7,4 раза меньше по сравнению с векторными МНЧ. Таким образом, селективное связывание МНЧ-БСА-ПЭГ-VEGF с опухолевыми клетками было продемонстрировано и в ходе количественного анализа накопления МНЧ.

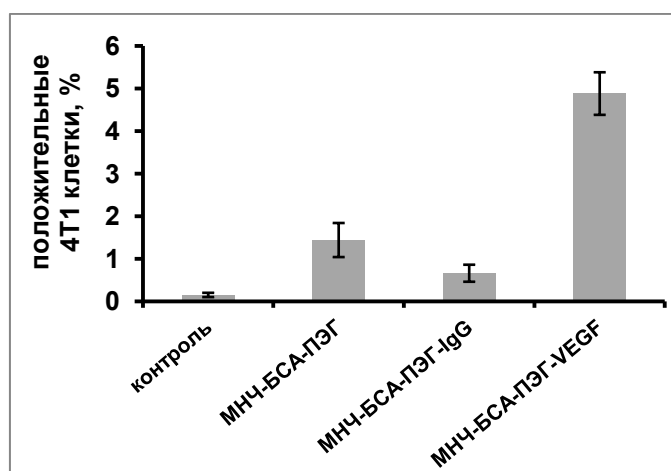


Рисунок 9. Результаты проточной цитофлуориметрии образцов МНЧ-БСА-ПЭГ, МНЧ-БСА-ПЭГ-IgG и МНЧ-БСА-ПЭГ-VEGF на живых клетках аденокарциномы молочной железы 4Т1 мыши.

Анализ интернализации МНЧ-БСА@Докс-ПЭГ-VEGF в клетки аденокарциномы молочной железы 4Т1 мыши

Результаты конфокальной микроскопии (Рис. 10) показали, что спустя 30 мин после инкубации клеток аденокарциномы молочной железы 4Т1 с МНЧ-БСА@Докс-ПЭГ-VEGF весь Докс обнаруживался в ядрах клеток. В свою очередь МНЧ-БСА-ПЭГ-VEGF оставались в цитоплазме или на мембране клеток, о чем свидетельствовала частичная колокализация флуоресцентного сигнала наноконтейнера (зеленый) и мембранного красителя (красный). В случае МНЧ, модифицированных неспецифическими антителами IgG, интенсивность захвата Докс клетками оказалась значительно ниже, а флуоресцентный сигнал от наноконтейнера практически невозможно было зарегистрировать.

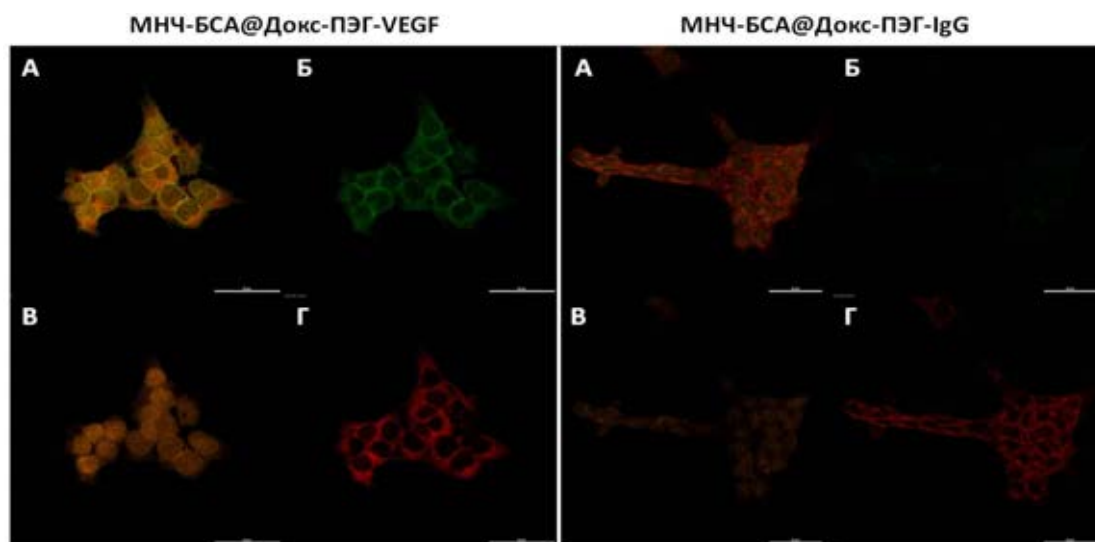


Рисунок 10. Конфокальная микроскопия МНЧ-БСА@Докс-ПЭГ-VEGF и МНЧ-БСА@Докс-ПЭГ-IgG на живых клетках 4T1. А – обобщенное изображение, Б – флуоресценция наноконтейнеров, В – флуоресценция Докс, Г – флуоресценция мембранного красителя.

Согласно полученным результатам векторные МНЧ действительно способны адресно доставить Докс за счет наличия моноклональных антител к VEGF, которые способствуют более эффективному взаимодействию наноконтейнера с опухолевыми клетками аденокарциномы 4T1. Неспецифические антитела с такой задачей справиться не могут, а незначительное накопление препарата в ядрах клеток объясняется, скорее всего, интернализацией слабосвязанного с поверхностью наночастиц Докса.

Исследование проницаемости опухоли молочной железы 4T1 мыши для МНЧ-БСА-ПЭГ, МНЧ-БСА-ПЭГ-VEGF и МНЧ-БСА-ПЭГ-IgG

Для оценки проницаемости опухоли при внутривенном введении векторных и неvectorных МНЧ нами было решено использовать метод МРТ: оценивать уровень накопления в опухоли путём получения T2* взвешенных изображений, наиболее чувствительных к присутствию наночастиц в ткани.

Анализ МРТ-снимков, полученных спустя 24 ч, показал, что МНЧ-БСА-ПЭГ, МНЧ-БСА-ПЭГ-IgG и МНЧ-БСА-ПЭГ-VEGF накапливаются в периферических сосудах аденокарциномы и тем самым обеспечивают эффективную визуализацию внешних контуров опухоли (Рис. 11). Зачастую при хирургическом удалении пораженной ткани злокачественные клетки, находящиеся на периферии, остаются в организме и впоследствии приводят к рецидиву. Выявление границ опухоли с помощью МНЧ позволяет увеличить точность и эффективность различных методов терапии, не только

хирургического. Спустя 24 ч после введения можно было наблюдать значительное накопление МНЧ-БСА-ПЭГ-VEGF в теле опухоли, которое не наблюдалось для других препаратов. Через 5 мин после внутривенного введения МНЧ экспериментальным животным более эффективно накапливались в теле опухоли также МНЧ-БСА-ПЭГ-VEGF, предоставляя информацию о ее морфологии. По-видимому, благодаря специфическому взаимодействию векторных наночастиц с антигеном VEGF в клетках аденокарциномы МНЧ-БСА-ПЭГ-VEGF быстрее накапливаются и дольше удерживаются в опухолевой ткани. Чего нельзя сказать про наночастицы МНЧ-БСА-ПЭГ-IgG, которые спустя 5 мин после введения практически не обнаруживались внутри опухоли.

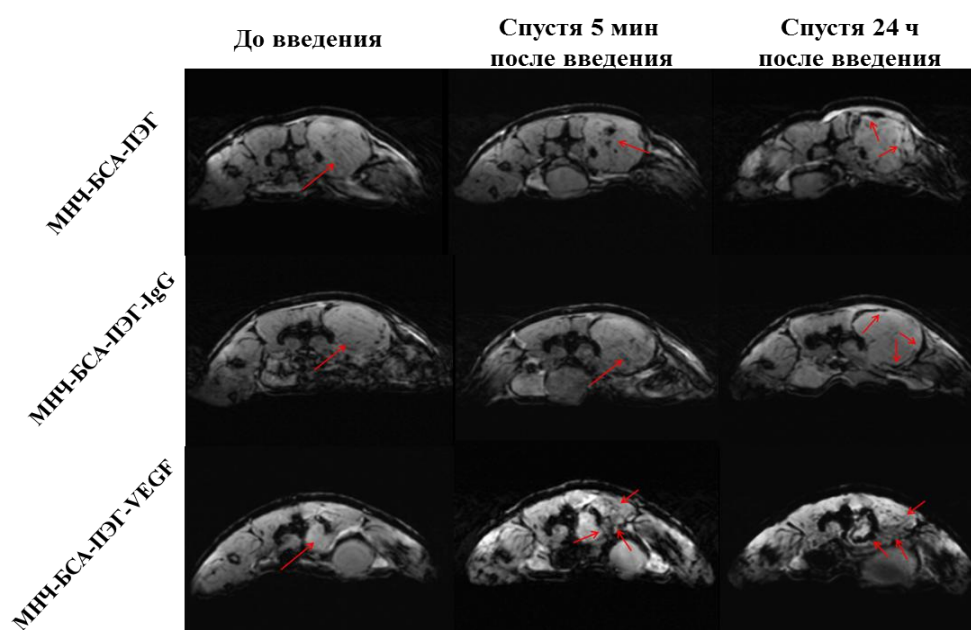


Рисунок 11. T2* взвешенные изображения аденокарциномы молочной железы мыши 4T1 до и после (5 мин, 24 ч) внутривенного введения магнитных наночастиц.

Оценка эффективности терапии аденокарциномы 4T1 мыши с помощью комплекса векторных МНЧ с доксорубицином

Для оценки эффективности полученных наноконструктов с Доксом в терапии аденокарциномы молочной железы 4T1 были проведены эксперименты *in vivo* на мышах с экспериментальной опухолью. Для лечения использовали 4 препарата: Докс, МНЧ-БСА@Докс-ПЭГ, МНЧ-БСА@Докс-ПЭГ-VEGF и МНЧ-БСА@Докс-ПЭГ-IgG. Анализ выживаемости (Рис. 12) показал, что для экспериментальных животных, получавших в качестве терапевтического агента МНЧ-БСА@Докс-ПЭГ-VEGF, медиана выживаемости составила $39 \pm 3,8$ дней. При проведении терапии с помощью МНЧ-БСА@Докс-ПЭГ значение медианы

оказалось равным $21,5 \pm 4,9$, МНЧ-БСА@Докс-ПЭГ-IgG – $24,5 \pm 3,8$, а при использовании Докс – $26 \pm 2,6$ дней. Для контрольной группы животных, получавших вместо лекарственного препарата физиологический раствор, медиана выживаемости составила $25,5 \pm 1,9$ дня. Проведенный статистический анализ показал, что значение медианы выживаемости животных, получавших в качестве лекарственного препарата МНЧ-БСА@Докс-ПЭГ-VEGF, достоверно превышает значение медианы для группы препарата Докс на 50% ($p=0,01$), для группы препарата МНЧ-БСА@Докс-ПЭГ на 80% ($p=0,03$) и для группы препарата МНЧ-БСА@Докс-ПЭГ-IgG на 59% ($p=0,01$). Разработанный препарат на основе векторных МНЧ с Докс оказался более активным, что, скорее всего, объясняется наличием в его составе векторных молекул – mAb VEGF, за счет которых транспорт лекарственного препарата в опухолевые клетки оказался более эффективным.

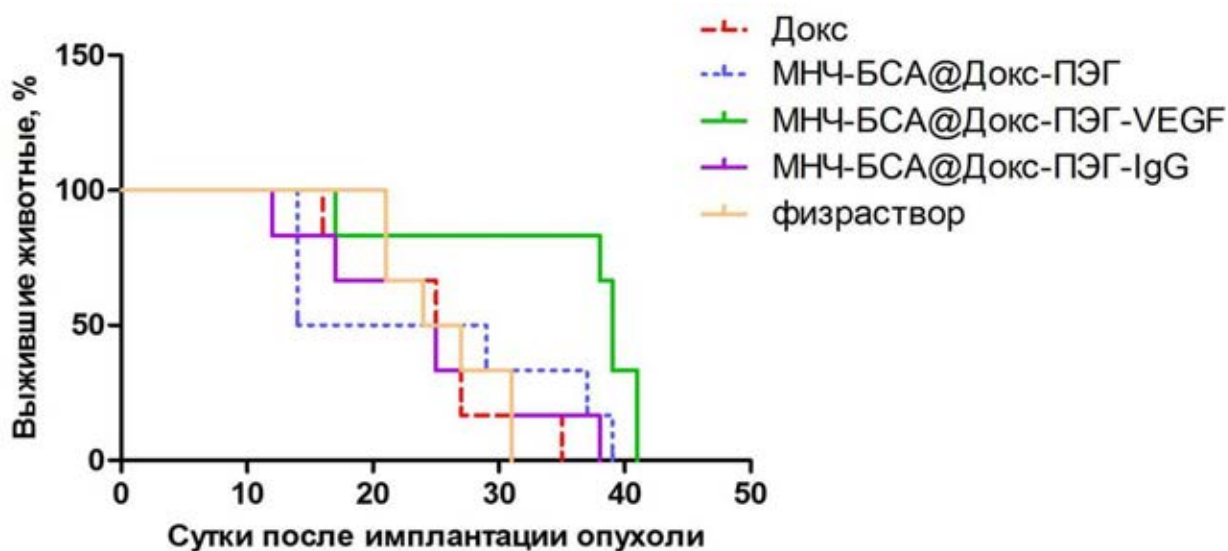


Рисунок 12. График выживаемости животных Каплана-Майера в условиях терапии аденокарциномы молочной железы 4Т1 с помощью комплексов МНЧ с доксорубицином.

Таким образом, нам удалось разработать метод получения стабильных, биосовместимых векторных магнитных наночастиц оксида железа, покрытых оболочкой из БСА и ПЭГ, которые являются уникальной бифункциональной платформой. Полученные наночастицы можно успешно использовать в МРТ-диагностике опухоли молочной железы. Осуществив загрузку химиопрепарата на наночастицы, также становится возможным получить терапевтический препарат, применение которого позволит увеличить медиану выживаемости онкологических больных.

ВЫВОДЫ:

1. Стабилизация магнитных наночастиц Fe_3O_4 молекулами БСА и ПЭГ позволяет получать наночастицы, стабильные в водном растворе при физиологических условиях, обладающие низкой гено- и цитотоксичностью, а также не вызывающие значительной генерации АФК в живых клетках.
2. Процесс загрузки противоопухолевого препарата доxorубина происходит за счет образования межмолекулярных электростатических связей, в результате чего высвобождение препарата из комплекса носит рН-зависимый характер.
3. Комплекс магнитных наночастиц с доxorубином способен проникать в клетки аденокарциномы 4Т1 мыши, обеспечивать транспорт лекарственного препарата в ядро и оказывать цитотоксический эффект по величине не ниже эффекта свободного доxorубина.
4. Внутривенное введение препарата векторных наночастиц оксида железа позволяет визуализировать границы и тело экспериментальной аденокарциномы молочной железы 4Т1 у мышей с помощью МРТ-сканирования спустя 5 мин – 24 ч после введения препарата.
5. Терапия с помощью магнитных наночастиц, загруженных доxorубином и конъюгированных с моноклональными антителами к VEGF, позволила увеличить медиану выживаемости у животных с экспериментальной аденокарциномой молочной железы 4Т1 на 50% по сравнению со свободным лекарственным препаратом ($p=0,01$), на 80% по сравнению с невекторными наночастицами ($p=0,03$) и на 59% по сравнению с наночастицами, конъюгированными с неспецифическими антителами ($p=0,01$).

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ В ЖУРНАЛАХ, РЕКОМЕНДОВАННЫХ ВАК

1. Semkina, A.S. Core-shell-corona doxorubicin-loaded superparamagnetic Fe_3O_4 nanoparticles for cancer theranostics / Semkina A., Abakumov M., Grinenko N., Abakumov A., Skorikov A., Mironova E., Davydova G., Majouga A., Nukolova N., Kabanov A., Chekhonin V. // **Colloids Surf B Biointerfaces**. – 2015. – Volume 136. – P. 1073-1080.
2. Семкина, А.С. Влияние размера магнитных наночастиц на эффективность визуализации глиомы головного мозга у крыс методом МРТ / Семкина А.С., Абакумов М.А., Абакумов А.М., Нуколова Н.В., Чехонин В.П. // **Бюллетень**

экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 161. - № 2 . – С. 256-260.

3. Семкина, А.С. МРТ-визуализация опухолей с использованием магнитных наночастиц оксида железа в качестве контрастного агента / Семкина А.С., Абакумов М.А., Гриненко Н.Ф., Липенгольд А.А., Нуколова Н.В., Чехонин В.П. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. - Т. 162. - № 12. – С. 781-785.

МАТЕРИАЛЫ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЕ НА НАУЧНЫХ КОНФЕРЕНЦИЯХ

1. Семкина, А.С. Электростатический комплекс магнитных наночастиц оксида железа с доксорубицином для терапии и диагностики онкологических заболеваний / Семкина А.С., Абакумов М.А., Гриненко Н.Ф., Чехонин В.П., Кабанов А.В. // Вестник РГМУ. Материалы IX Международной (XVIII Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. – 2014. – С. 264-265.
2. Семкина, А.С. Получение комплекса магнитных наночастиц с доксорубицином для терапии и диагностики онкологических заболеваний / Семкина А.С., Абакумов М.А., Гриненко Н.Ф., Власова К.Ю., Чехонин В.П., Кабанов А.В. // VIII Всероссийская конференция с международным участием молодых ученых по химии «Менделеев 2014». Тезисы докладов. – 2014. – С. 88-89.
3. Семкина, А.С. Магнитные наночастицы, загруженные доксорубицином, для диагностики онкологических заболеваний и доставки лекарственных препаратов / Семкина А.С., Абакумов М.А., Гриненко Н.Ф., Чехонин В.П., Кабанов А.В. // Материалы Международной научно-практической конференции «Биотехнология и качество жизни 2014». – 2014. – С. 52.
4. Семкина, А.С. Получение электростатического комплекса магнитных наночастиц оксида железа с противоопухолевым препаратом доксорубицином и определение его физико-химических характеристик / Семкина А.С. // Материалы Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2014». – 2014. – http://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2014/section_30_2748.htm
5. Semkina, A.S. Doxorubicin-loaded Magnetic Nanoparticles for Tumor Therapy and Imaging / Semkina A.S., Abakumov M.A., Kabanov A.V., Chekhonin V.P. // Brno, Czech Republic, 6th International Conference Nanocon 2014. Conference proceedings. – 2014. – P. 136.
6. Semkina, A.S. VEGF targeted protein coated magnetic nanoparticles for brain tumor imaging / Abakumov M.A., Semkina A.S., Abakumova T.O., Nukolova N.V., Kabanov A.V., Chekhonin V.P. // Brno, Czech Republic, 6th International Conference Nanocon 2014. Conference proceedings. – 2014. – P. 135.

7. Semkina, A.S. Protein Coated Magnetic Nanoparticles for Cancer Therapy and Diagnostics / Abakumov M.A., Semkina A.S., Abakumova T.O., Nukolova N.V., Kabanov A.V., Chekhonin V.P. // Abstracts of XII International Conference on Nanostructured Materials. – 2014. – P. 758.
8. Семкина, А.С. Создание наноконпозиции на основе магнитных наночастиц оксида железа и противоопухолевого препарата доксорубицина / Семкина А.С., Абакумов М.А., Гриненко Н.Ф., Нуколова Н.В., Кабанов А.В. // Вестник РГМУ. Материалы X Международной (XIX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. – 2015. – С. 458.
9. Семкина, А.С. Магнитные наночастицы, загруженные доксорубицином, для диагностики и терапии опухолей / Семкина А.С., Абакумов М.А., Гриненко Н.Ф., Габашвили А.Н., Мельников П.А., Нуколова Н.В., Кабанов А.В., Чехонин В.П. // Сборник материалов XXII Российского Национального конгресса «Человек и лекарство». – 2015. – С. 259-260.
10. Семкина, А.С. Магнитные наночастицы оксида железа для терапии и МРТ диагностики онкологических заболеваний / Семкина А. С., Абакумов М. А., Габашвили А. Н., Мельников П. А., Гриненко Н. Ф., Нуколова, Н. В., Кабанов А. В., Чехонин В. П. // Материалы VIII Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». -2015. – С. 44-46.
11. Семкина, А.С. Синтез биосовместимых магнитных наночастиц оксида железа различного размера, и сравнение их эффективности в МРТ-визуализации опухолей / А.С. Скориков, А.С. Семкина, М.А. Абакумов, Н.Ф. Гриненко, Н.В. Нуколова, А.В. Кабанов, В.П. Чехонин // Вестник РГМУ. Материалы X Международной (XIX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. – 2015. – С. 458-459.
12. Семкина, А.С. Синтез магнитных наночастиц оксида железа, загруженных доксорубицином, и изучение их взаимодействия с живыми клетками / Скориков А.С., Семкина А.С., Габашвили А.Н., Мельников П.А. // Материалы XXII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов 2015». – 2015. – https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2015/data/section_32_7119.htm.
13. Семкина, А.С. Исследование воздействия наночастиц оксида железа в различных оболочках и комплекса наночастиц с доксорубицином на рост и образование активных форм кислорода в клетках млекопитающих / Давыдова Г.А., Миронова Е.А., Абакумов М.А., Семкина А.С. // Материалы XXII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов 2015». – 2015. – https://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2015/data/section_2_6938.htm.

14. Семкина, А.С. Магнитные наночастицы оксида железа для терапии и МРТ-диагностики онкологических заболеваний / Семкина А. С., Абакумов М. А., Габашвили А. Н., Мельников П. А., Гриненко Н.Ф., Нуколова Н. В., Кабанов А. В., Чехонин В. П. // Программа и сборник тезисов Международной конференции «Биокатализ – 2015: Основы и применения». – 2015. – С. 158-159.
15. Семкина, А.С. Перспективный агент для терапии онкологических заболеваний на основе магнитных наночастиц оксида железа, загруженных доксорубицином / Семкина А.С., Абакумов М.А., Скориков А.С., Абакумов А.М., Габашвили А.Н., Мельников П.А., Гриненко Н.Ф., Нуколова Н.В., Кабанов А.В., Чехонин В.П. // Сборник тезисов Международной научно-практической школы-конференции «Магнитные наноматериалы в биомедицине: получение, свойства, применение». – 2015. – С. 40-42.
16. Семкина, А.С. Получение биосовместимых магнитных наночастиц оксида железа для МРТ-визуализации опухолей / Скориков А.С., Абакумов М.А., Семкина А.С. // Сборник тезисов I Международной школы-конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Биомедицина, материалы и технологии XXI века». – 2015. – С. 188.
17. Семкина, А.С. Векторные магнитные наночастицы с доксорубицином для терапии аденокарциномы молочной железы / Семкина А.С., Абакумов М.А., Скориков А.С., Гриненко Н.Ф., Габашвили А.Н., Мельников П.А., Нуколова Н.В., Кабанов А.В., Чехонин В.П. // Сборник материалов XXIII Российского Национального конгресса «Человек и лекарство». – 2016. – С. 202
18. Семкина, А.С. Получение магнитных наночастиц, загруженных доксорубицином, для терапии аденокарциномы молочной железы / Семкина А.С., Абакумов М.А., Гриненко Н.Ф., Скориков А.С., Нуколова Н.В., Чехонин В.П. // Вестник РГМУ. Материалы XI Международной (XX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. – 2016. – С. 345
19. Семкина, А.С. Разработка МРТ контрастного агента на основе магнитных наночастиц оксида железа для диагностики глиом / Скориков А.С., Гриненко Н.Ф., Нуколова Н.В., Кабанов А.В., Чехонин В.П., Семкина А.С., Абакумов М.А. // Вестник РГМУ. Материалы XI Международной (XX Всероссийской) Пироговской научной медицинской конференции студентов и молодых ученых. – 2016. – С. 345-346.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

МНЧ – магнитные наночастицы

МРТ – магнитно-резонансная томография

Докс – доксорубицин

БСА – бычий сывороточный альбумин

ПЭГ – полиэтиленгликоль

ДСР – динамическое светорассеяние

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

ТГА – термогравиметрический анализ

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

PBS – фосфатно-солевой буфер (pH=7,4)

NHS – N-гидроксисукцинимид

EDC – 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодиимид

T2 – время спин-поперечной релаксации протонов

DMEM – среда Игла в модификации Дульбекко

RPMI – культуральная среда roswell park memorial institute

mAb VEGF – моноклональные антитела к фактору роста эндотелия сосудов

DAPI - 4',6-диамидино-2-фенилиндол