

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

Направление: 03.04.02 Физика
Профиль: Медицинская физика

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ
МАНИПУЛИРОВАНИЕ ФЕРРОМАГНИТНЫМИ
НАНОЧАСТИЦАМИ ВНУТРИ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ
МАГНИТНОГО ПОЛЯ

Студент 2 курса группы 06-919
«15» июня 2021 г.



(Рамазанова И.Ф.)

Научный руководитель
д.ф.-м.н., профессор кафедры мед. физики
«15» июня 2021 г.



(Котов Н.В.)

Научный консультант
к.б.н., ст.н.с. КИББ ФИЦ КазНЦ РАН
«15» июня 2021 г.



(Самигуллин Д.В.)

Заведующий кафедрой медицинской физики
д.х.н., профессор
«15» июня 2021 г.



(Аганов А.В.)

Казань-2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ	7
1.1. МНЧ в клеточных культурах.....	7
1.2. МНЧ в головном мозге.....	18
1.3. Влияние электромагнитной иглы на МНЧ	26
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	31
2.1. Материалы и методы.....	31
2.1.1. Характеристика магнитных наночастиц	31
2.1.2. Получение клеточных культур	32
2.1.3. Получение срезов головного мозга	34
2.1.4. Описание загрузки МНЧ in vivo	34
2.1.5. Приборы для изучения влияния магнитного поля.....	34
2.1.6. Микроскопическая техника.....	37
2.2. Результаты исследований	38
2.2.1. Изучение интернализации МНЧ в срезах головного мозга без магнитного поля.....	38
2.2.2. Изучение интернализации МНЧ в срезах головного мозга при приложении постоянного и переменного магнитного поля.....	39
2.2.3. Изучение загрузки МНЧ in vivo.....	43
2.2.4. Изучение влияния магнитных полей на культуру мотонейронов....	44
ВЫВОДЫ.....	58
ПУБЛИКАЦИИ, КОНФЕРЕНЦИИ И КОНКУРСЫ	59
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	61

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

α -FITC – изотиоцианат флуоресцеина

Со-феррит – кобальтовый феррит

StxB – холерный токсин

DAPI – диамино-2-фенилиндол

DRG – клетка заднекорешкового ганглия цыпленка

F-actin – актиновые филаменты

FITC-PLL – флуоресцеиновый изотиоцианат полилизина

Fluo-4 – кальциевый краситель

GVIA – ω -конотоксин

HPMCAS – сукцината гипромеллозы

HUVE – эндотелиальные клетки, взятые из пупочной вены человека

IgG1 – иммуноглобулины G1

ME – магнитный элемент

PAA – полиакриловая кислота

RAS – малые G-белки

RGC – ганглиозные клетки сетчатки

RgD – аргинин-глицин-аспаргиновая кислота

SPION – наночастицы из суперпарамагнитного оксида железа

TrkB – тропомиозиновый тирозинкиназный рецептор

АСМ – атомная силовая микроскопия

АФК – активная форма кислорода

ВМ – внеклеточный матрикс

ВПК – везикулы, покрытые клатрином

ГМЖ – гипертермия магнитной жидкости

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

КОЭ – клатрин-опосредованный эндоцитоз

МНЧ – магнитные наночастицы

МП – магнитное поле

МСМ – магнитно-силовая микроскопия

МЭ – магнитный элемент

МЭНЧ – магнитоэлектрические наночастицы

НЧЗ – наночастицы золота

ПД – потенциал действия

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

ЦНС – центральная нервная система

ЭИ – электромагнитная игла

ЭЭГ – электроэнцефалография

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс

ЯПК – ямки, покрытые клатрином.

ВВЕДЕНИЕ

Магнитные наночастицы (МНЧ) в последнее время начали активно применяться в биомедицине в качестве магнитных биосенсоров, для адресной доставки лекарств, в тканевой инженерии и магнитно-резонансной томографии [1]. Особый интерес представляет изучение влияния магнитного поля, так как оно способно глубоко проникать в живые ткани и не инвазивно влиять на МНЧ, находящиеся в них. В ранних исследованиях было показано, что постоянное магнитное поле способно вызывать смещение МНЧ, интернализированных в культуре клеток мотонейронов, вызывая тем самым активацию механо-чувствительных кальциевых каналов N-типа и вход ионов кальция [2]. Будущее лечение заболеваний или состояний, основанное на дистанционном манипулировании определенными ионными каналами в определенных органах и тканях, безусловно, находится в пределах возможного. Существуют данные, утверждающие, что благодаря локальному градиенту магнитного поля, создаваемому с помощью электромагнитных игл (ЭИ), возможно манипулирование и управление отдельными микрочастицами [3-4]. На данный момент способность нацеливаться на клеточные структуры и манипулировать ими с такой элегантной точностью уже открыла новые возможности в биомедицинских исследованиях. Лучшее понимание механизмов наведения аксонов может привести к новым методам лечения неврологических заболеваний, таких как повреждение спинного мозга или периферическая невропатия [5]. В связи с этим разработка методов использования МНЧ для создания новых комбинаций диагностических и терапевтических процедур, приводимых в действие магнитными полями, является довольно актуальной темой для формирования концепции инновационной медицины [6].

В центральной нервной системе (ЦНС) млекопитающих поврежденные аксоны не восстанавливаются, что приводит к постоянным функциональным нарушениям, что наблюдается при глаукоме, инсульте и черепно-мозговых травмах [7]. Травмированные аксоны нейронов ЦНС изначально

демонстрируют временное прорастание аксонов, что указывает на наличие некоторой внутренней способности к регенерации. Тем не менее, этот начальный рост часто бывает неудачным в восстановлении функции нейронов, и многие нейроны ЦНС в конечном итоге подвергаются апоптотической гибели клеток. Неспособность нейронов ЦНС регенерировать аксоны обратно к их мишеням объясняется многочисленными факторами, которые подавляют регенерацию аксонов, включая слабую внутреннюю способность роста аксонов, дисфункциональную динамику органелл, потерянную нейротрофическую сигнализацию, ингибирующие молекулы, а также деструктивный воспалительный иммунный ответ ткани. Однако, в недавних работах было показано, что переменное магнитное поле с частотой 50 Гц с применением МНЧ способно влиять на развитие мезенхимных стволовых клеток и на регенерацию аксонов [8-9]. Данные методы предлагают новые подходы к изучению подвижности конусов роста и биологии роста аксонов, расширяя наши знания и, следовательно, нашу способность разрабатывать новые методы лечения, способствующие регенерации аксонов после травмы или заболевания нервной системы. Более прямой и поступательный подход может заключаться в том, чтобы манипулировать ростом аксонов бесконтактным способом, например, применяя магнитное поле к целевым МНЧ с конусом роста. В связи с вышеизложенным, основной задачей настоящего исследования было разработка методических подходов для манипуляций магнитными наночастицами внутри возбудимых и невозбудимых клеток. Согласно поставленной задаче были выдвинуты следующие цели данной работы:

1. Изучение интернализации МНЧ в клеточных культурах, тканях и *in vivo*.
2. Разработка экспериментальных методик для изучения влияния магнитных полей на загруженные наночастицами образцы.
3. Изучение влияния локального градиента магнитного поля, создаваемого электромагнитной иглой, на МНЧ в раковых клетках HeLa.

ГЛАВА 1. ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОПИСАНИЕ

1.1. МНЧ в клеточных культурах

Исследования в области изучения влияния МНЧ на различные клетки уже проводились ранее. К примеру, Д. Добсон [1] теоретически описал влияние наночастиц из Fe_2O_3 или Fe_3O_4 размером с 1 мкм покрытого аргинин-глицин-аспаргиновой кислотой (rgD) на мембрану клетки (рисунок 1).

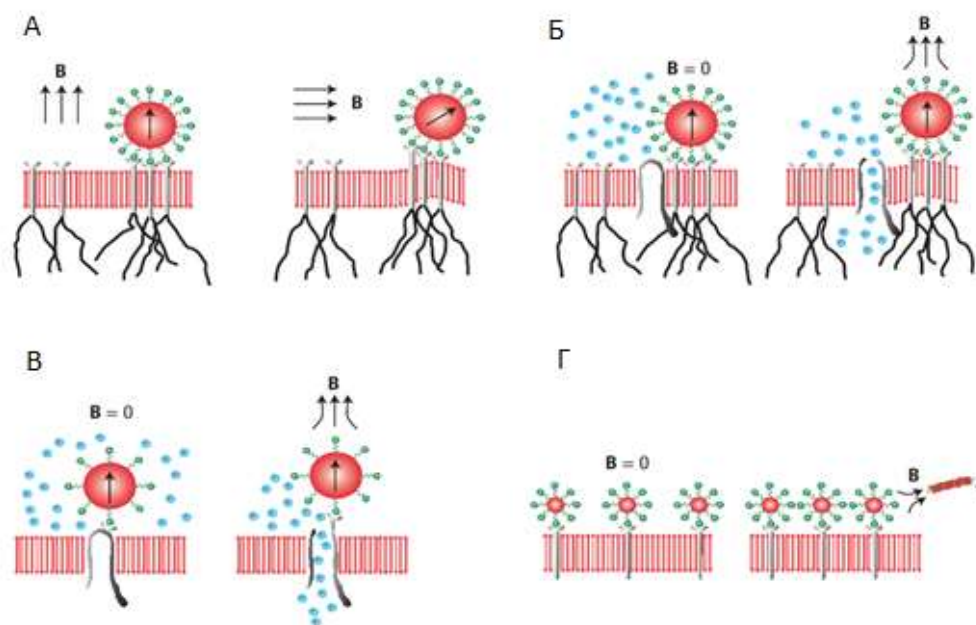


Рисунок 1 – А – Наночастица прикрепляется к рецептору интегрина, Б – Наночастица оттягивает мембрану так, что это открывает соседний механочувствительный ионный канал, В – Наночастица прикрепляется через антитело к каналу, Г – При воздействии магнитного поля через иглу происходит кластеризация рецепторов интегрина, это может привести к запуску внутриклеточной передачи сигналов [1]

Использование МНЧ также позволило создать так называемый «переключатель» [10], с помощью которого можно управлять жизнью и смертью эндотелиальных клеток, взятых из пупочной вены человека (HUVE).

Влияние на клетки осуществлялось при помощи мультиплексированного градиентного концентратора магнитного поля, изготовленного методом фемтосекундного лазерного травления кремниевой пластины.

Таким образом, добавление микрочастиц, покрытых rgD, позволяет управлять жизнеспособностью HUVЕ, т.к. клетки, которые находятся вне жесткого субстрата, покрытого VM, погибают (рисунок 2).

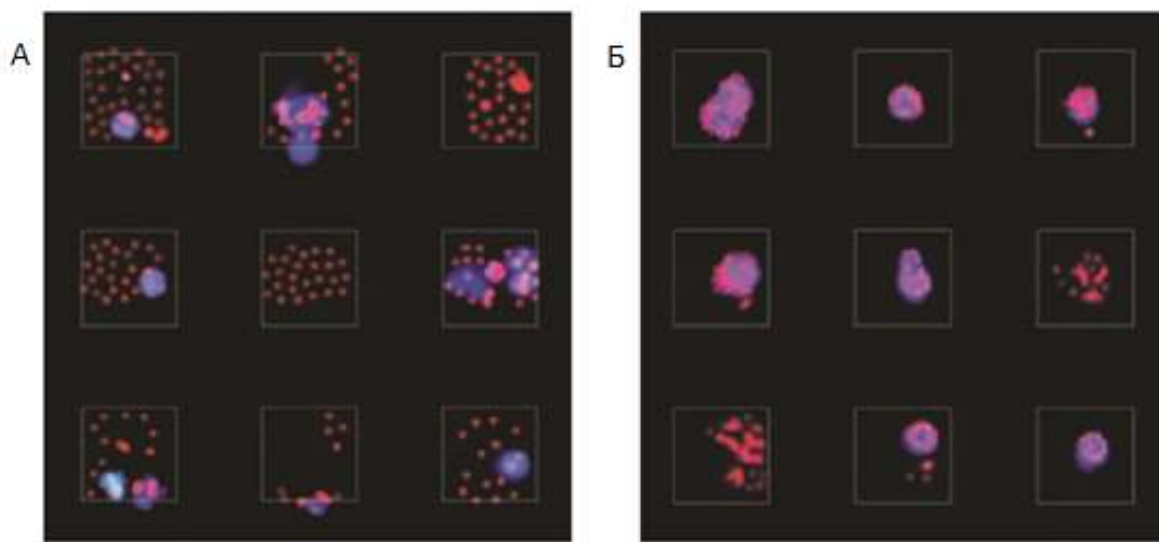


Рисунок 2 – Флуоресцентные изображения, показывающие адгезию клеток на магнитной решетке. HUVЕ окрашены в пурпурный цвет. Покрытые rgD магнитные микрочастицы (диаметром 4,5 мкм), которые связывают клетки, имеют красный цвет. А – Микрочастицы высеваются на намагничиваемые квадраты (белые квадраты), и клетки прилипают к микрочастицам. Б – Клетки с микрочастицами, находящимися уже в них [10]

В. Пита-Томас исследовал удлинение филоподий конуса роста аксона ганглиозных клеток сетчатки (RGC), которые были культивированы на сетках из золота и никеля, в нейронах с помощью мембраносвязанных МНЧ [7, 11]. Наночастицы были из суперпарамагнитного оксида железа (SPION) диаметром 40 нм и 10 нм. В качестве способа загрузки наночастиц использовали экспрессию GM1-ганглиозида и α Thy-1, холерный токсин

(CтxВ) на мембранах RGC, функционализируя МНЧ фрагментами, которые специфически связывают эти молекулы.

На клетки влияли при помощи установки с электромагнитом. Конец электромагнита поместили под углом 45°.

Эксперименты, проведенные со SPIONами диаметром 10 нм, ничем не отличались от результатов экспериментов, проведенных со SPIONами диаметром 40 нм. Наиболее близкие к электромагниту филоподии удлиняются сильнее, что объясняется более сильным магнитным полем и, следовательно, большей силой, приложенной на более коротких расстояниях от кончика электромагнита. Средняя скорость удлинения филоподий во время экспериментов с CтxВ SPION составляла 10 ± 5 мкм/мин.

SPIONы, покрытые антителом против TrkВ, могут связываться с TrkВ на клеточной мембране, чтобы облегчить клеточное поглощение и сформировать эндосомы. Эндосомы могут перемещаться в двух направлениях в зарождающихся нейритах RGC. Электромагнит может остановить ретроградный транспорт эндосом TrkВ и остановить рост нейритов.

Удлинение филоподальной мембраны магнитным натяжением полимеризует актиновые филаменты и транспортирует их в вытянутую область филоподий. Однако во время удлинения филоподии появляются силы втягивания, которые противодействуют удлинению (рисунок 3).

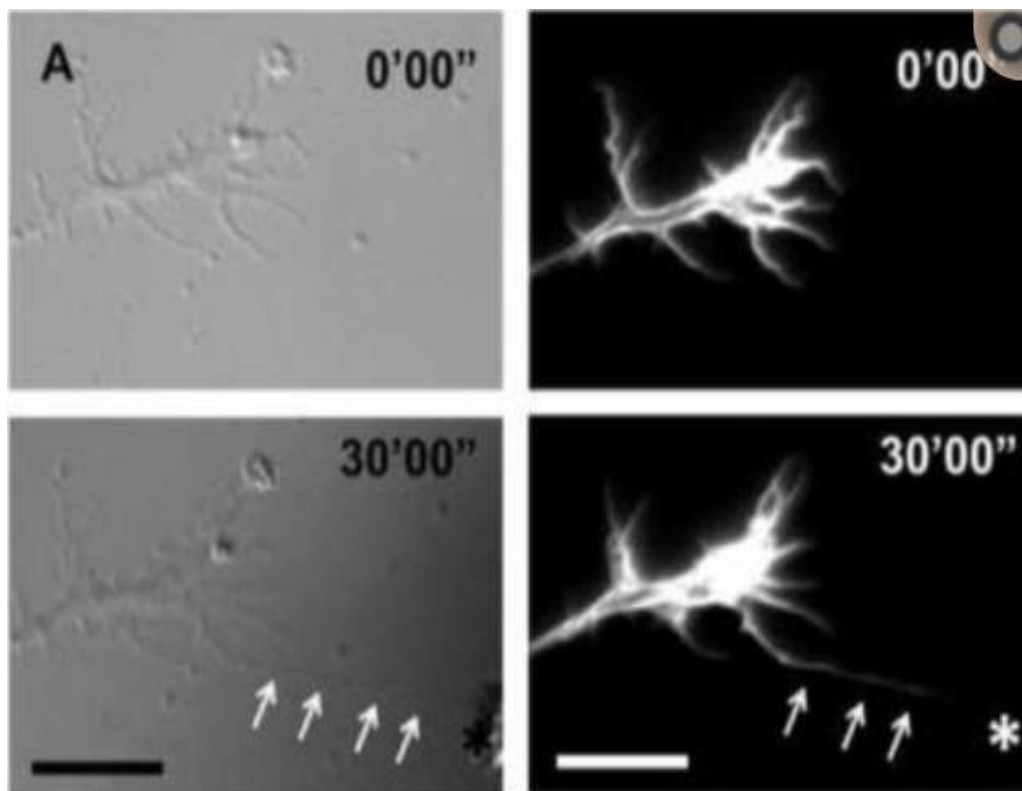


Рисунок 3 – Филоподии обработанные Thy1-SPION через 30 минут прикрепляются к кончику магнита, покрытого PDL и ламинином (звездочка), магнит сам отключается, чтобы избежать артефактов движения, видимых при включенном магните. Экспрессия пептида RFP-LifeAct в RGC позволила визуализировать филаменты F-actin внутри удлиненной филоподии (белые стрелки), масштаб 10 мкм [7]

При помощи установки, которая была использована в предыдущей работе В. Пита-Томасом, Дж. Фасс в 2003 году провел эксперименты с микрочастицами диаметром 4,5 мкм, покрытых иммуноглобулином IgG1 [12]. В качестве клеток использовались нейроны, взятые из головного мозга эмбрионов E7 цыплят.

Существуют исследования, утверждающие что наночастицы стимулируют внутриклеточные запасы кальция [13]. Это изменяет мембранный потенциал, активирует гены, связанные с образованием кости и хряща в остеобластах, хондроцитах и мезенхимальных стволовых клетках и инициирует минерализацию костного матрикса *in vitro* (рисунок 4). Благодаря

наночастицам появилась новая методология изготовления тканевых трубчатых конструкций с применением магнитного поля [14].

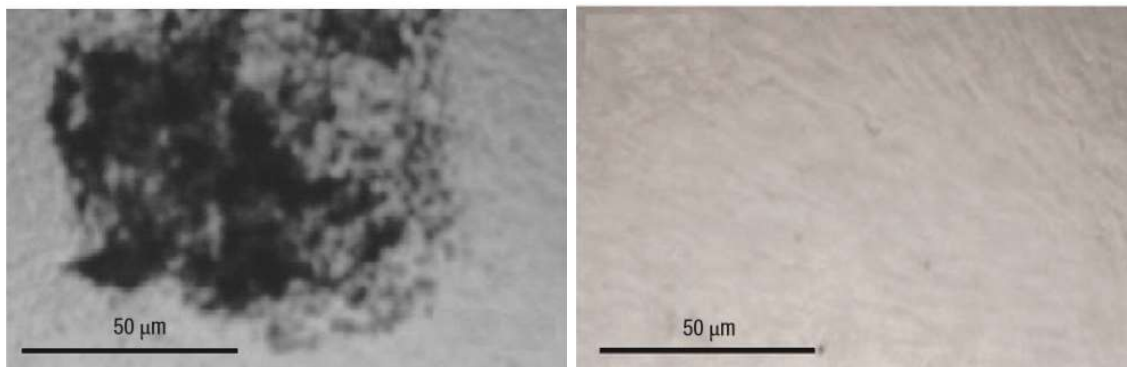


Рисунок 4 – Слева – пятна von Kossa, полученные с помощью световой микроскопии, показывающие минерализацию костного матрикса в остеобластах человека в ответ на наномангнитную активацию, справа – контроль, не показывающий минерализацию [13]

А. Баусч провел исследования в области измерения вязкоупругих параметров адгезивных клеточных поверхностей методом микрореометрии с использованием магнитных микрочастиц [15] и магнитного пинцета [16], которые также использовались в других исследованиях [17-18].

Микрочастица помещалась на мембрану образца и оттягивалась при приложении магнитного поля.

Управлять направлением движения роста отростков нейрона помогают также микротехнологии (рисунок 5) без использования МНЧ, описанные в статье [5].

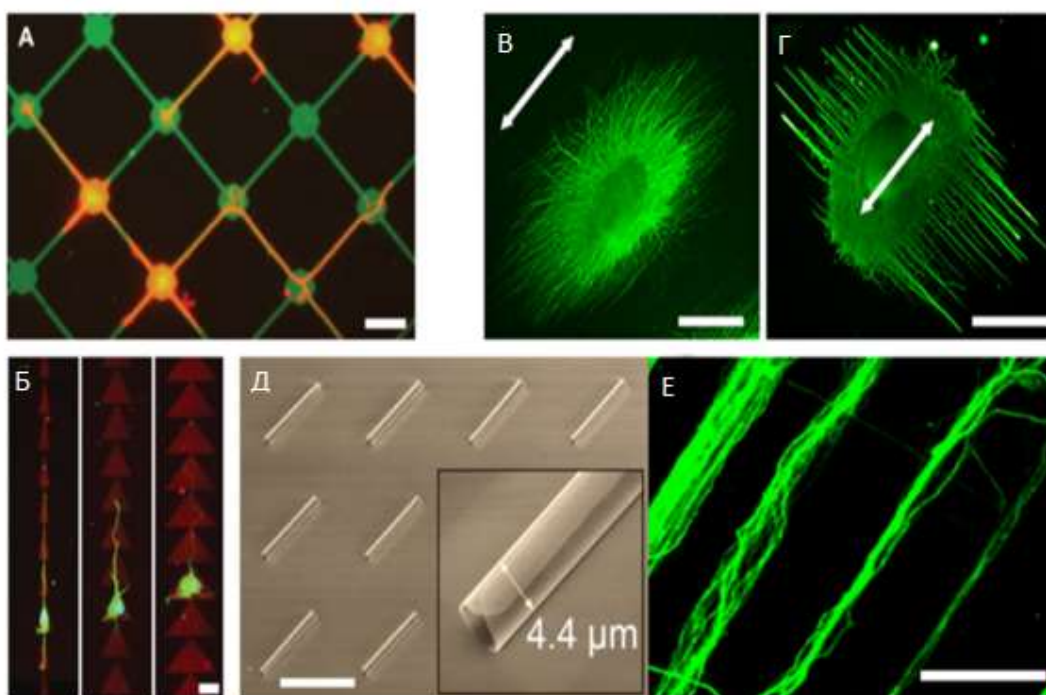


Рисунок 5 – А – Нейроны гиппокампа крысы (красный цвет) прилипают к полоскам из конъюгированного с флуоресцеином изотиоцианатом полилизина (FITC-PLL; зеленый цвет). Б – Нейроны гиппокампа крысы (зеленый цвет), выращенные на полилизине (красный цвет) на монослое полиэтиленгликоля. В, Г – Клетка заднекорешкового ганглия цыпленка (DRG; нейрофиламенты окрашены зеленым), культивируемые на электроспиновых полинановолокнах с различными субстратами. Д – Сканирующая электронная микрофотография матрицы свернутых микротрубок нитрида кремния и Е выровненных пучков аксонов коры головного мозга мыши (зеленый цвет). (20 мкм (А, В), 1 мм (С), 50 мкм (D)).

Нейриты могут не только проецироваться вдоль нановолокон, но и направляться на рост вдоль направления, перпендикулярного выровненным нановолокнам, в зависимости от следующих параметров: (i) плотность нановолокон, (ii) белок, нанесенный на поверхности нановолокон, и (iii) поверхностные свойства подложки, на которой были нанесены нановолокна

[5]

При приложении магнитного поля можно добиться изменения направления движения отростков нейронов против полилизинного субстрата [19].

По теоретической модели Ю. Головина [20] силы, генерируемые типичными МНЧ диаметром $\sim 20\text{--}30$ нм при индукции магнитного поля $\sim 0,1$ Тл, могут достигать $100\text{--}200$ пН и потенциально могут влиять на самые разнообразные биологические процессы и структуры. Также эффект воздействия частицы может зависеть от ее формы.

А. Тау в 2016 году изучил МНЧ, покрытые крахмалом и хитозаном [21], для культивирования клеток использовался магнитный чип.

Анализ с помощью проточной цитометрии показал, что нейроны коры головного мозга поглощают меньше покрытых крахмалом МНЧ, чем покрытых хитозаном МНЧ. Однако одним из ограничений проточной цитометрии является невозможность дифференцировать частицы, которые интернализированы или связаны с мембранами. Азид натрия (5 мг/мл) добавляли для ингибирования эндоцитоза. Результаты проточной цитометрии показали, что покрытые хитозаном МНЧ были интернализированы в нейронах коры головного мозга посредством эндоцитоза, но покрытые крахмалом МНЧ были связаны с мембраной. Флуоресцентные изображения подтвердили, что покрытые крахмалом МНЧ были в основном связаны с мембранами нейритов, в то время как покрытые хитозаном МНЧ были интернализированы.

Далее был проведен эксперимент с добавлением магнитных элементов (МЭ) и ω -конотоксина GVIA, ингибирующего кальциевые каналы, что не приводило к индукции кальция в потоке даже в присутствии магнитного поля (МП). Удаление токсина не восстанавливало влияние МП. Основываясь на этих наблюдениях, вероятно, что МП стимулировало механо-чувствительные кальциевые каналы N-типа. В исследовании использовался неодимовый магнит.

Ю. Лоджк и др. [22] в своем исследовании проанализировали клеточные реакции на НЧ магнитного феррита кобальта, покрытые полиакриловой кислотой (РАА), трех типов клеток: яичнике китайского хомячка (СНО), клеточной линии меланомы мыши (В16) и первичных миобластах человека (МУО). Они сравнили путь интернализации, внутриклеточное перемещение и внутриклеточную локализацию своих НЧ с помощью флуоресцентной и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ), а также количественно оценили поглощение НЧ и проанализировали динамику поглощения. Они определили жизнеспособность клеток после 24- или 96-часового воздействия возрастающих концентраций НЧ и количественно оценили образование активных форм кислорода (АФК) после 24- и 48-часового воздействия. Было показано, что НЧ легко проникают и накапливаются в клетках в больших количествах, используя те же два пути эндоцитоза; в основном за счет макропиноцитоза и частично за счет клатрин-опосредованного эндоцитоза (КОЭ). Типы клеток различались по скорости захвата, динамике внутриклеточного транспорта и способности захвата, а также по их ответу на более высокие концентрации интернализованных НЧ. Наблюдаемые различия в клеточных ответах подчеркивают важность оценки взаимодействий «НЧ-клетка» на нескольких разных типах клеток для лучшего прогнозирования возможных токсических эффектов на разные типы клеток и тканей *in vivo*.

Для определения эндоцитарного пути, который выбранные типы клеток используют для интернализации НЧ, клетки инкубировали с НЧ в течение 1 часа и зафиксировали для ПЭМ. Во всех трех типах клеток обнаружено, что НЧ связаны с плазматической мембраной и различными мембранными нарушениями. Нарушения имели типичную морфологию двух эндоцитарных путей; мембранные изгибы, характерные для макропиноцитоза (рисунок 6А-В), поглощающие НЧ и окружающую жидкость внеклеточной среды, и небольшие ямки, покрытые клатрином (ЯПК) на клеточной мембране (рисунок 6Г-Е), обычно используемые для специфического рецептор-опосредованного эндоцитоза. Более того, НЧ были обнаружены в везикулах,

покрытых клатрином (ВПК), подтверждая КОЭ как путь интернализации для НЧ (рисунок 6Ж-И). НЧ, скорее всего, интернализируются не избирательно, а как нечто дополнительное во время регулярного эндоцитоза. В клетках МУО мы также наблюдали многочисленные кавеолы, инвагинации мембран в форме безоболочечных колб, что указывает на активный путь эндоцитоза, опосредованного кавеолами, но не было обнаружено НЧ внутри кавеол даже после 48 часов инкубации с НЧ (рисунок 7). Таким образом, дополнительные пути интернализации НЧ вероятны, но отмечены не были.

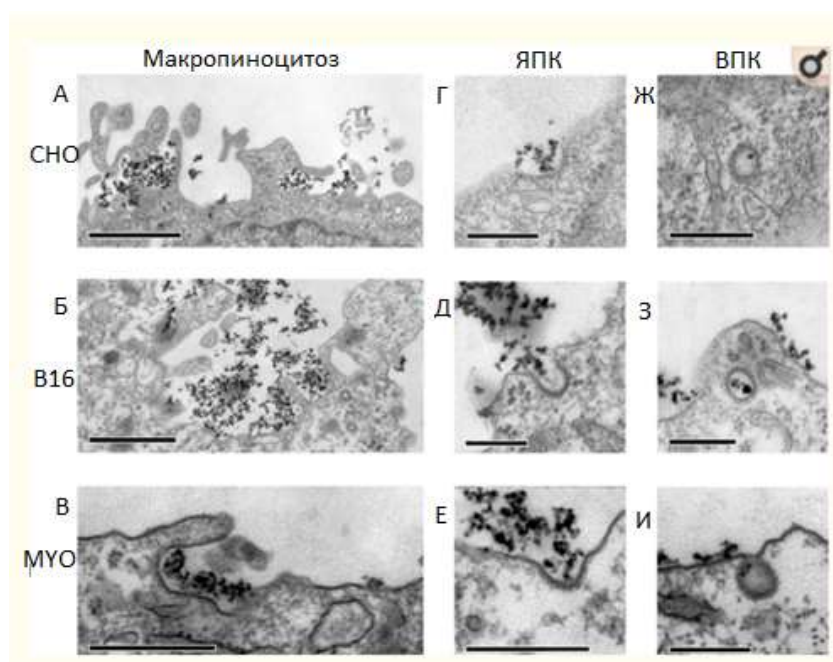


Рисунок 6 – Пути интернализации покрытых РАА Со-ферритных НЧ наблюдались с помощью ПЭМ в трех типах клеток: клетках СНО (А, Г, Ж), клетках В16 (Б, Д, З) и клетках МУО (В, Е, И). Примечания: для всех трех типов клеток наблюдались два пути эндоцитоза, а именно макропиноцитоз (А-В) и клатрин-зависимый эндоцитоз, для которых наблюдались ЯПК (Г-Е) и ВПК (Ж-И). Масштаб: 1 мкм на панелях (А и В), 500 нм в (С) и 250 нм в (Д-И). Сокращения: В16 – линия клеток меланомы мыши; СНО – линия клеток яичника китайского хомячка; Со-феррит – феррит кобальта; МУО – первичные миобласты человека; НЧ – наночастица; ЯПК – ямки, покрытые клатрином; РАА – полиакриловая кислота; ПЭМ – просвечивающий электронный микроскоп [22]

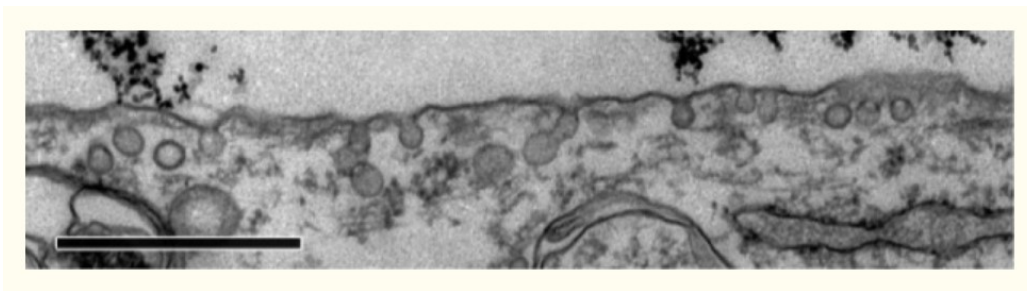


Рисунок 7 – Кавеолы в клетках МУО после 48 часов инкубации с наночастицами Со-феррита, покрытыми РАА, наблюдаемыми с помощью ПЭМ. Примечания: НЧ в кавеолах не обнаружено. Масштабная линия соответствует 1 мкм [22]

Также, как утверждают авторы, наблюдались различия в скорости поглощения и емкости поглощения НЧ клетками. Все три клеточные линии показали зависящую от времени интернализацию НЧ, которая варьировалась по скорости поглощения; на основании наклона кривых поглощения в течение первых 12 часов, когда интернализация линейно увеличивалась для всех трех клеточных линий, клетки МУО и СНО показали сходные скорости поглощения, тогда как для линии клеток В16 наблюдалась гораздо более низкая скорость поглощения. Интересно, что только клетки СНО достигли плато между 12 и 24 часами, в то время как клетки МУО и В16 показали линейное увеличение внутриклеточной концентрации НЧ до 48 часов. В случае клеток В16 это может быть связано с более низкой скоростью поглощения, достигающей плато только через 48 часов. С другой стороны, клетки МУО могут иметь более высокую нагрузочную способность из-за их значительно большего объема (радиусы клеток: $23,38 \pm 5,67$ мкм) по сравнению с клетками СНО (радиусы клеток: $12,01 \pm 2,63$ мкм) и В16 (радиусы клеток: $15,84 \pm 2,79$ мкм) и гораздо более низкую скорость деления. Было показано, что при делении клеток интернализированные НЧ случайным образом распределяются среди дочерних клеток, снижая внутриклеточную концентрацию НЧ в отдельной клетке наполовину до того, как интернализация

продолжится. Следовательно, клеточным линиям с более высокой скоростью деления требуется больше времени для достижения той же внутриклеточной концентрации на клетку по сравнению с медленно делящимися клетками, такими как МҮО, которые могут накапливать большее количество НЧ на клетку, прежде чем они делятся. Поскольку на основании микрофотографий ПЭМ, большая часть интернализации НЧ происходит через макропиноцитоз, насыщение поглощения также может происходить из-за ограниченной способности клетки к эндоцитозу.

Исследование также показывает важность оценки взаимодействий «НЧ-клетка» на нескольких различных типах клеток. Бессмертные и особенно опухолевые клеточные линии, которые наиболее часто используются для исследования цитотоксических эффектов, могут обладать несколькими специфическими свойствами, такими как измененный метаболизм или сигнальные пути, что может сделать их менее предрасположенными к определенным типам цитотоксичности НЧ. В данном случае, только первичные клетки показали отрицательный ответ (снижение жизнеспособности клеток на 20%) на высокую внутриклеточную нагрузку НЧ. Хотя авторы утверждают, что клетки *in vivo* никогда не будут подвергаться воздействию таких высоких концентраций НЧ, которые они использовали в своих экспериментах *in vitro*.

В заключение, в этом исследовании авторы сравнили клеточные ответы на магнитные НЧ, покрытые РАА, для трех различных типов клеток. Было показано, что представленные НЧ легко проникают и накапливаются в клетках в больших количествах с использованием тех же двух путей эндоцитоза; макропиноцитоз и КОЭ. Типы клеток различались по скорости захвата, динамике внутриклеточного перемещения и способности захвата. Клетки МҮО показали самую высокую скорость интернализации, а также интернализировали наибольшее количество НЧ, что, скорее всего, было причиной наблюдаемого падения жизнеспособности клеток через 96 часов, но не через 24 часа. После инкубации НЧ не наблюдалось значительного

увеличения продукции АФК. Наблюдаемые различия в клеточных ответах подчеркивают важность оценки взаимодействий «НЧ-клетка» на нескольких разных типах клеток для лучшего прогнозирования возможных токсических эффектов на разные типы клеток и тканей *in vivo*. Кроме того, высокая внутриклеточная нагрузка, наблюдаемая для магнитных НЧ с покрытием из РАА, делает эти НЧ подходящими для нескольких биотехнологических и биомедицинских применений, включая мечение стволовых или опухолевых клеток.

1.2. МНЧ в головном мозге

С. Кизроев для своих исследований использовал не традиционные МНЧ, а магнитоэлектрические наночастицы (МЭНЧ, MENP) [23].

В своих экспериментах *in vivo* они вводили относительно небольшую дозу наночастиц в кровотоки внутривенно путем инъекции примерно 100 мкг МЭНЧ в хвост мыши. Затем они втягивали наночастицы в мозг через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) посредством приложения градиента магнитного поля примерно 3000 Э/см. Они подтвердили, что в результате значительно увеличилась концентрация наночастиц в головном мозге с помощью атомной и магнитно-силовой микроскопии (АСМ и МСМ). Стимуляция с беспроводным управлением была продемонстрирована путем измерения сигналов электроэнцефалографии (ЭЭГ) от имплантатов ЭЭГ в корреляции с приложенным переменным магнитным полем силой 100 Э и частотой в диапазоне до 100 Гц. Концепция стимуляции с беспроводным управлением на основе МЭНЧ показана на рисунке 8.



Рисунок 8 – Иллюстрация проведенного эксперимента [23]

Авторы утверждают, что для улучшения контроля и максимальной эффективности беспроводной стимуляции на основе МЭНЧ имеет смысл располагать наночастицы на поверхности нейрональной мембраны, прямо там, где начинаются потенциалы действия (ПД). Типичное значение мембранного потенциала в состоянии покоя составляет примерно -70 мВ. Увеличение мембранного потенциала примерно на $+15$ мВ вызывает срабатывание ПД. Точное значение электрического поля, необходимое для достижения этого порога, зависит от типа нейрона и от конкретного места на поверхности мембраны. МЭНЧ на мембране должны иметь возможность локально генерировать электрическое поле, достаточно сильное, чтобы преодолеть потенциальный порог для возбуждения ПД. Генерации такого поля через мембрану было бы достаточно, чтобы вызвать срабатывание ПД одной наночастицей. Более того, при коллективном действии и под воздействием периодических сигналов, соответствующих периодическим ритмам мозговых волн, МЭНЧы могут легко обеспечивать высокоэффективную стимуляцию.

И последнее, но не менее важное: следует отметить, что МЭНЧ после лечения могут быть удалены из мозга таким же способом, как они были

введены (то есть, путем применения градиентов магнитного поля). Во время процесса удаления направления градиента следует менять на противоположные, чтобы наночастицы возвращались в кровоток. В то же время, наночастицы могут выводиться из мозга естественным путем. Действительно, на животных моделях было показано, что наночастицы выводятся из организма в течение 2-месячного периода в зависимости от их размера. Наконец, вполне вероятно, что в будущем будет разработан какой-то тип биоразлагаемых МЭНЧ, возможно, на основе углеродных наноструктур.

Чтобы лекарство высвобождалось на целевом участке, сила конъюгации между лекарством и наночастицами часто сохраняется относительно слабой. В результате большая часть лекарства преждевременно высвобождается из наночастиц в плазме или интерстициальном пространстве, а не в намеченном месте-мишени. Напротив, с помощью МЭНЧ сила конъюгации, определяемая электрическими полями между лекарством и наночастицами, может контролироваться без проводов с помощью приложения постоянного и переменного магнитных полей. Они показали, что из-за МЭ-эффекта приложение переменного магнитного поля эквивалентно стряхиванию лекарства с наночастиц. Следовательно, сила конъюгации между лекарственным средством и наночастицами может быть достаточно сильной, чтобы гарантировать, что лекарство не высвободится до того, как наночастицы достигнут целевого участка. Только после того, как наночастицы с лекарством протянутся через ГЭБ и достигнут целевого участка в мозге, можно применить переменное магнитное поле, чтобы вызвать желаемое высокоэффективное высвобождение.

После того, как нагруженные наночастицы были доставлены в раковые клетки, для высвобождения лекарственного средства по требованию применялось относительно слабое переменное магнитное поле силой 30 Э при частоте 100 Гц (рисунок 9).

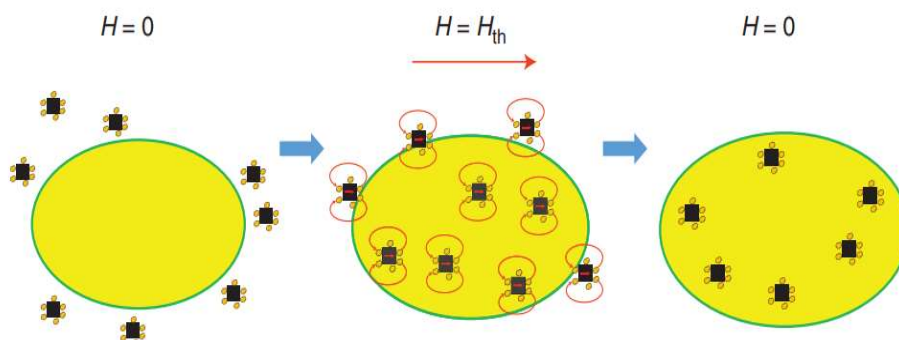


Рисунок 9 – Иллюстрация этапов для доставки лекарств конкретно в раковые клетки. (1) МЭНЧ, загруженные лекарственными средствами, вводятся в интересующее клеточное пространство; (2) прикладывают постоянное магнитное поле выше порогового значения для конкретной линии раковых клеток, чтобы вызвать процесс наноэлектропорации; и (3) магнитное поле отключается, наночастицы с лекарством оказываются внутри раковых клеток [23]

Примечательно, что из-за фундаментального характера подхода МЭНЧ могут использоваться для внутриклеточной доставки любых биомолекул, включая нуклеиновые кислоты для обеспечения возможности генной инженерии или определенных противоопухолевых пептидов для лечения глиобластом.

Согласно принципу взаимности, если МЭНЧ можно использовать для «записи» информации (или стимулирования локально), то те же наночастицы должны иметь возможность «считывать» (или записывать) информацию из-за локальной клеточной или нейронной активности. Применительно только к мозгу, важность способности регистрировать нейронную активность с субнейронным пространственным разрешением при достаточно высоком временном разрешении с целью мониторинга мозга в режиме реального времени трудно переоценить. Такая возможность не только произвела бы революцию в большой области диагностики нейродегенеративных заболеваний, но также проложила бы путь к фундаментальному пониманию и обратному проектированию мозга.

Временное разрешение изображения МНЧ ограничено ферромагнитным резонансом наночастиц, который, в свою очередь, определяется магнитной анизотропией и может находиться в наносекундном диапазоне. В качестве иллюстрации на рисунке 10 показаны численно смоделированные изображения, полученные с помощью традиционных МНЧ и эквивалентных МЭНЧ в трех последовательных временных точках из одной и той же области мозга в эквивалентных условиях. В результате эффекта МЭ, МЭНЧ могут обнаруживать некоторый зависящий от времени процесс, которые не могут быть обнаружены МНЧ. Например, этот процесс может быть результатом какой-то динамики нейровоспаления, которая будет характерна для прогрессирования заболевания.

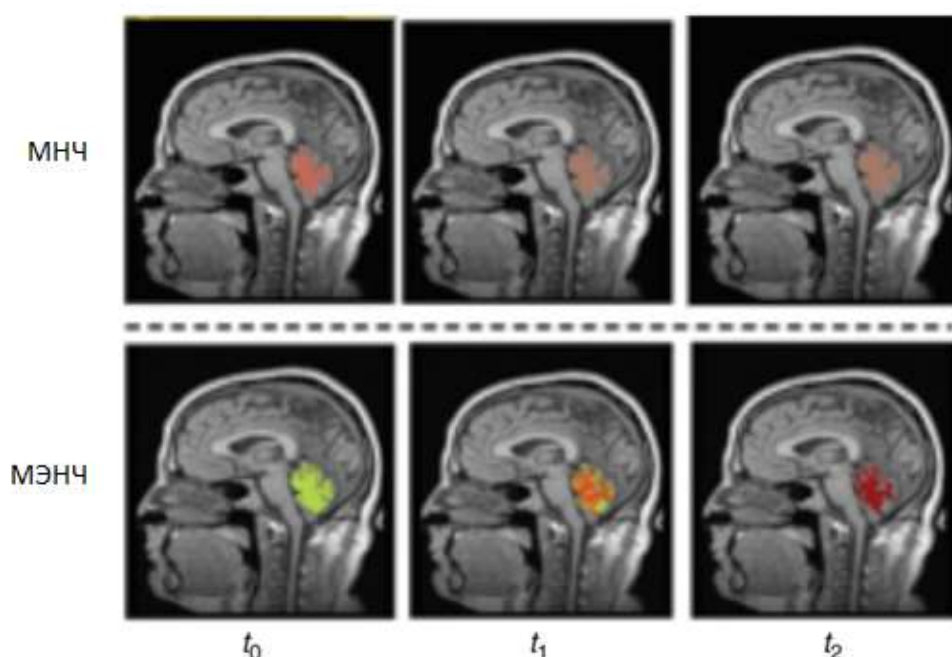


Рисунок 10 – Имитация изображений магнитных частиц, полученных с использованием традиционных МНЧ (верхний ряд) и эквивалентных МЭНЧ в трех последовательных временных точках, t_0 , t_1 и t_2 , соответственно.

Расчет был выполнен доктором Ракешем Гудуру из Флориды [23]

МЭНЧ можно использовать для ранней диагностики и/или быстрого скрининга заболеваний. Например, исследование *in vitro* с использованием МНЧ вместе со спектроскопией ядерного магнитного резонанса (ЯМР) для

диагностики рака. Исследование показало не только то, что раковые клетки имеют совершенно разные спектры ЯМР по сравнению с их нормальными аналогами, но также и то, что разные линии раковых клеток можно отличить друг от друга по их характерным спектрам ЯМР. Они сравнили несколько линий клеток рака груди, рака яичников и опухоли мозга.

По словам авторов, в будущем появившиеся в результате потенциальные применения технобиологии не только произведут революцию в медицине, но и приведут к скачкообразному развитию науки и технологий.

МНЧ использовались для роста нейритов [24] в головном мозге. Х. Сонборн с коллегами функционализировали МНЧ белками, регулирующими активность RAS, для создания сигнальных инструментов для подавления нервной системы, вызванных ростом электромагнитных сил.

В работе С. Данте изучалась роль поверхностного заряда НЧ в определении их нейрональных взаимодействий и электрических реакций [25]. Они обнаружили, что отрицательно заряженные НЧ, вводимые в низкой концентрации (10 нМ), взаимодействуют с мембраной нейрона и синаптической щелью, тогда как положительно и нейтрально заряженные НЧ никогда не локализуются на нейронах. Этот эффект не зависит от формы и материала. Присутствие отрицательно заряженных НЧ на мембранах нейронных клеток влияет на возбудимость нейронов, вызывая увеличение амплитуды и частоты спонтанных постсинаптических токов на уровне отдельных клеток и увеличение как пиковой активности, так и синхронного возбуждения на уровне нейронной сети. Отрицательно заряженные НЧ связываются исключительно с возбудимыми нейрональными клетками, а не с невозбудимыми глиальными клетками. Это специфическое взаимодействие также было подтверждено манипулированием электрофизиологической активностью нейрональных клеток. В самом деле, взаимодействие отрицательно заряженных НЧ с нейронами либо стимулируется, либо затрудняется фармакологическим подавлением или усилением активности нейронов с тетродотоксином или бикикуллином, соответственно. Это

исследование демонстрирует, что отрицательно заряженные НЧ модулируют возбудимость нейронов, раскрывая потенциальное использование НЧ для контроля активности нейронов.

А. Спинели в своей работе обнаружил повышение возбудимости нейронов, а также усиление активности мозга мыши вследствие влияния НЧ из золота [26]. Благодаря своим инертным свойствам наночастицы золота (НЧЗ) привлекли значительное внимание; их биологическое применение недавно расширилось и теперь включает наномедицину и нейробиологию. Со своей командой они внутриклеточно наносили НЧЗ на нейроны CA1 гиппокампа из головного мозга мыши. Внутриклеточное применение НЧЗ увеличивало как количество ПД, так и входное сопротивление. Благодаря наличию НЧЗ внутри клеток порог и продолжительность ПД после гиперполяризации были уменьшены. Следовательно, внутриклеточные НЧЗ изменяют внутренние свойства нейронов в сторону повышения их возбудимости и могут оказывать вредное воздействие на нейроны при патологических состояниях, таких как судороги. Эти результаты дают значительное направление на применение НЧЗ в ЦНС.

Особый интерес представляют коллоидные суспензии магнитных наночастиц, особенно для биоизображений, а в последнее время и для гипертермии магнитной жидкости (ГМЖ). ГМЖ обещает быть перспективной альтернативой в лечении раковых опухолей [27-29]. Лечение состоит из локального введения МНЧ в жидкой суспензии в участок опухоли и воздействия на участок магнитным полем, где наночастицы рассеивают энергию в форме тепла, вызывая локальное повышение температуры и гибель опухолевых клеток. Если частицы изготовлены из проводящего материала, то последующее воздействие мощного высокочастотного электромагнитного поля вызывает сильный нагрев частиц, что разрушает содержащие их клетки.

Следует отметить, что нагрев нежелательных клеток/тканей – так называемая гипертермия – и раньше использовался в клинической практике, в том числе, в онкологии, но именно с появлением наноматериалов этот метод

терапии стал выглядеть очень перспективным. Главной проблемой клинического применения оказалась неизбирательность проникновения наночастиц в опухоль, их неравномерное или неполное проникновение и сложность стандартизации самой процедуры. Для избирательной доставки частиц в опухоль недостаточно просто ввести их в кровоток, нужно либо вводить их прямо в опухоль, либо снабжать антителами, которые адресно направят их. И то, и другое улучшение обладает своими недостатками и прибавляет сложности процедуре.

В то же время наночастицы используются для достижения эффективного контраста для биологических и клеточных изображений, фототермических терапевтических применений [30-31], диагностики внутри пораженного заболеванием мозга или лучевой терапии [26].

Оптогенетика – исследование работы нервных клеток, основанное на внедрении в их мембрану специальных каналов – опсинов, реагирующих на возбуждение светом. Эта методика является перспективной для лечения неврологических расстройств. Однако следует отметить, что видимый свет не может проникнуть глубоко внутрь мозговой ткани. Для устранения данной проблемы используют специальные наночастицы, которые поглощают проникающий в ткани ближний инфракрасный свет и излучают видимый свет, зависящий от длины волны. Следовательно, они могут служить в качестве оптогенетических исполнительных механизмов инфракрасного света для стимуляции нейронов головного мозга, находящихся в более глубоких слоях, что в дальнейшем способствует восстановлению памяти. Благодаря данной технологии появляется возможность проведения менее инвазивных манипуляций с возможностью дистанционной терапии [32].

Также проводились исследования в области изучения влияния магнитного поля на нейронные клетки, взятые из головного мозга крыс [19], в частности на удлинение нейритов при помощи электромагнита, с использованием МНЧ *in vitro* [12]. Было выявлено, что влияние магнитного поля посредством МНЧ увеличивает приток кальция в нейронах коры

головного мозга без заметной цитотоксичности. Стимулированные нейроны показали в среднем 20%-ный прирост интенсивности кальциевой флуоресценции и увеличение численности кальциевых спайков. Эти эффекты наблюдались в областях с высокими градиентами магнитного поля. Более того, блокада кальциевых каналов N-типа ингибировала стимулирующий эффект магнитного поля, что указывает на роль механо-чувствительных ионных каналов в управлении кальциевым потоком [21].

1.3. Влияние электромагнитной иглы на МНЧ

Ранее уже упоминалось о возможном воздействии электромагнитных игл на НЧ, находящихся в клетках [7, 11]. З. Ценев и Дж. Сеон в своих статьях описали способ управления суперпарамагнитными НЧ вне клеток с помощью электромагнитной иглы [3-4]. Устройство манипуляции представляет собой электромагнитную иглу, катушку, намотанную на электрохимически заостренную проволоку из нержавеющей стали хирургического класса с радиусом кончика 2 мкм. Игла прикреплена к роботизированному нанопозиционеру и установлена внутри инвертированного микроскопа. Манипуляции производились с микрочастицами (средний диаметр $6,85 \pm 0,50$ мкм), сделанными из ацетата сукцината гипромеллозы (HPMCAS), инкапсулирующего наночастицы оксида железа-III ($Fe_3O_4 @HPMCAS$). Микрочастицы погружают в деионизированную воду, находящуюся на поверхности микроскопического предметного стекла. Манипуляции начинаются с того, что робот-позиционер подносит иглу к целевой частице. Подавая тщательно запрограммированный ток на катушку, в непосредственной близости от кончика иглы создается сильно локализованное магнитное поле, которое притягивает микрочастицу к ней. Как только частица поднята, она транспортируется в желаемое место. Когда частица сталкивается с подложкой, игла отрывается, и частица остается на подложке из-за более высокой адгезии частицы к подложке.

Магнитная сила, действующая на отдельную частицу в поле с индукцией B , может быть выражена как (1):

$$F_m = \frac{\pi}{6} d_p^3 \rho_p M_p B \frac{dB}{d\delta} \quad (1)$$

где d_p – диаметр частицы, а ρ_p – плотность частицы, M_p – массовая намагниченность для партии образцов, δ – расстояние от одной микрочастицы до иглы.

Расчетная магнитная сила, действующая на одну микрочастицу на заданном расстоянии на основе проведенного численного моделирования и аналитической оценки, представлена на рисунке 11. Для силы тока 25 мА расчетное усилие составляет до 700 пН на самом острие иглы. Сила быстро падает до более низкого пико-ньютонского диапазона после того, как расстояние от иглы до частицы становится больше 10 мкм.

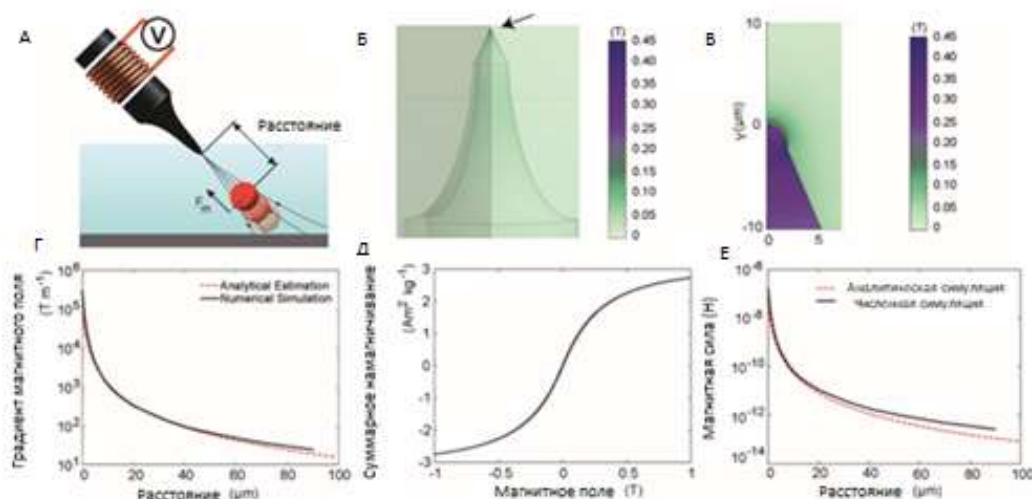


Рисунок 11 – А) Иллюстрация компонентов, участвующих в притяжении микрочастицы иглой. Б) Трехмерное изображение насыщения магнитного поля на самом острие иглы, обозначено черной стрелкой. В) Крупный план 2D-распределения магнитного поля вблизи кончика. Г) Экстраполированный градиент магнитного поля иглы для катушки, сила тока 25 мА. Расстояние измеряется от кончика иглы. Д) Массовая намагниченность суперпарамагнитных микрочастиц, измеренная с использованием магнитометра с вибрирующим образцом при разрешении 1 мТл. Е) Расчетная зависимость силы от расстояния между острием иглы и одной частицей [3]

Они наблюдали пороговое магнитное притяжение (сила тока катушки 18 мА, приводящая к расчетной силе 250 пН) для хорошего перемещения: ниже порогового значения максимальная скорость перемещения составляла 65 мкм/с; выше порогового значения наблюдалась хорошее перемещение при максимально возможной скорости позиционирования иглы, то есть 1,5 мм/с.

Изготовление кончика электромагнитной иглы: проволока из нержавеющей стали толщиной 1 мм (AISI 420) была химически протравлена в 10%-ном растворе HCl с водой. Проволока была зажата между двумя изготовленными на заказ алюминиевыми пластинами, прикрепленными к источнику постоянного тока M-122.2DD. Сигналы напряжения генерировались АЦП/ЦАП преобразователем. Сначала сигнал был дважды усилен разработанным в компании усилителем напряжения с последующим усилением тока. Ток в цепи контролировался шунтирующим резистором, подключенным к преобразователю. Процесс травления продемонстрирован на рисунке 12.

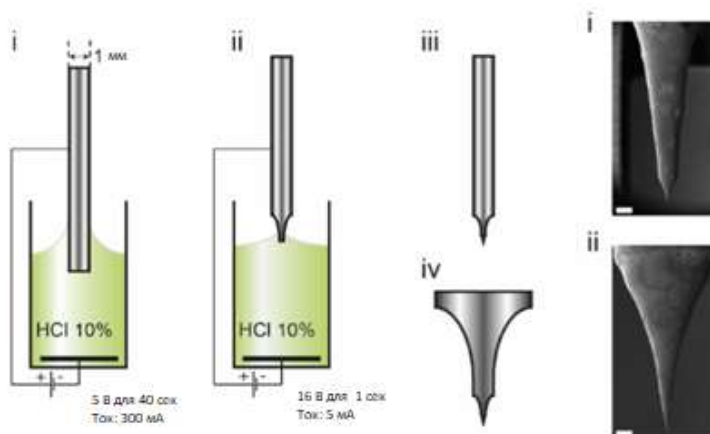


Рисунок 12 – а) На первом этапе проволоку погружали в 10% раствор HCl-вода на 3 мм при приложенном напряжении 5 В до тех пор, пока не было зарегистрировано падение тока на 300 мА. На втором этапе протравленный кончик повторно вводили на 0,4 мм в тот же раствор при приложенном напряжении 16 В, пока ток не упал до 5 мА. Наконiec, кончик был удален из раствора для травления и очищен в изопропанолe, а затем в деионизированной воде. б) Радиус иглы составлял ≈ 2 мкм [3]

Устройство показано на рисунке 13.

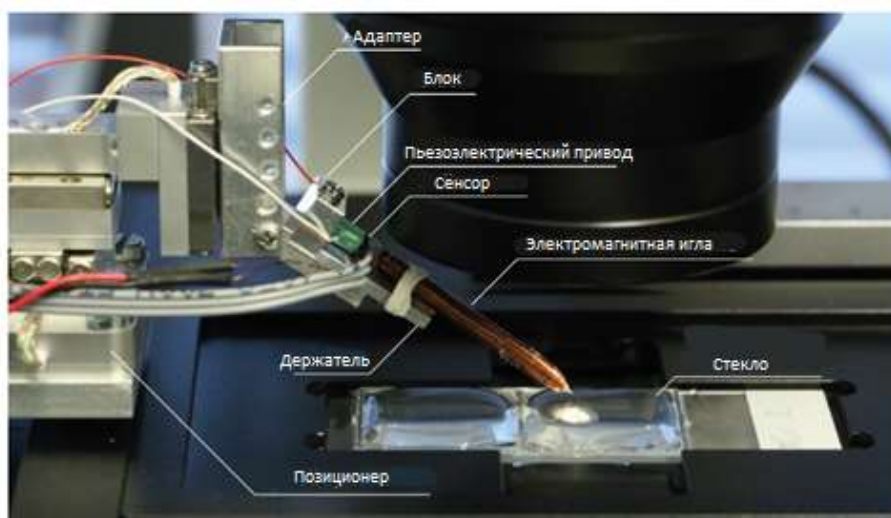


Рисунок 13 – Фотография манипуляционного устройства с электромагнитной иглой [3]

Катушка содержит 8-10 слоев медного провода (AWG 34), в общей сложности более 1000 витков катушки, что дает общее сопротивление 10 Ом. Для перемещения роботизированного позиционера, управления магнитным полем катушки и вибрации иглы было написано специальное программное обеспечение.

Селективное и независимое манипулирование микрочастицами важно для широкого спектра применений. По сравнению с другими физическими принципами, магнитное поле является перспективным благодаря своей способности проникать в большинство материалов и воздействовать только на магнитные объекты. Однако в большинстве бесконтактных систем магнитных манипуляций все частицы в рабочем пространстве перемещаются одновременно. В статьях З. Ценева и Дж. Сеона рассказывается об автоматической бесконтактной магнитной манипуляции с одним источником, которая может избирательно извлекать отдельные магнитные частицы из совокупности подобных частиц, а затем независимо управлять извлеченными частицами. Они используют электромагнитную иглу для создания сильно локализованного магнитного поля для достижения локальной адресации.

Движение отдельных частиц контролируется путем регулировки положения электромагнитной иглы с помощью визуального управления. Возможности предлагаемого способа были продемонстрированы в четырех случаях: селективное извлечение одной частицы из популяции, отделение двух магнитных частиц с начальным расстоянием между собой 10,6 мкм, независимое манипулирование четырьмя частицами и целенаправленная доставка двух частиц на две отдельные клетки.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Материалы и методы

2.1.1. Характеристика магнитных наночастиц

В рамках нашей работы мы использовали МНЧ [2], покрытые оболочкой из диоксида кремния с использованием флуоресцентных комплексов рутения, модифицированные аминогруппами для их лучшей интернализации в клетки (рисунок 14).

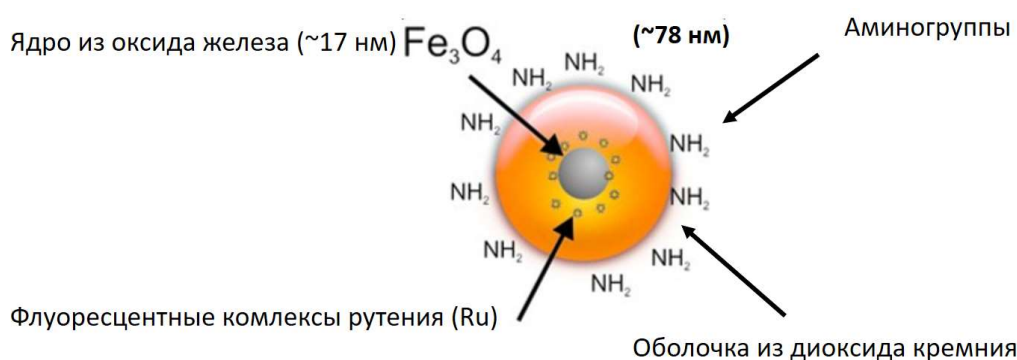


Рисунок 14 – Суперпарамагнитные наночастицы [2]

Для приготовления МНЧ первым этапом является высокотемпературное разложение предшественника олеата железа в присутствии олеиновой кислоты в качестве стабилизатора с целью получения сферических наночастиц оксида железа, покрытых суперпарамагнитным олеатом, с хорошей монодисперсностью (17 ± 1 нм). Покрытие МНЧ диоксидом кремния было объединено с легированием молекул красителя в одnoreакторном синтезе в рамках хорошо известной технологии обратной микроэмульсии вода-в-масле. Железо, покрытое диоксидом кремния – оксидные наночастицы, легированные комплексами рутения и их аминированные родственные соединения, также демонстрируют суперпарамагнетизм при комнатной температуре. Измерения М-Н наночастиц оксида железа, покрытых диоксидом кремния, легированных комплексами рутения и их аминированных родственных соединений, также показывают, что они являются

суперпарамагнитными. Величина намагниченности насыщения (M_s) наночастиц оксида железа, покрытых олеатом, составила около $42 \text{ Am}^2/\text{кг}$, тогда как значение M_s оксидов железа, покрытых диоксидом кремния, легированных комплексами рутения и их аминированные соединения составляют примерно 4,5 и $2 \text{ Am}^2/\text{кг}$ соответственно. Наблюдаемое уменьшение значения M_s при переходе от олеата с покрытием к оксидам железа, покрытых диоксидом кремния, согласуется с результатами, полученными ранее Надимом и др., которые объяснили это явление влиянием диоксида кремния на размер кристаллитов магнитного сердечника, что приводит к изменению магнитных свойств. В дальнейшем МНЧ покрываются аминогруппами, которые обеспечивают нейтральный заряд частиц.

2.1.2. Получение клеточных культур

2.1.2.1. Мотонейроны

В работе были использованы новорожденные крысята (P1) 3 шт. Получение культуры мотонейронов [33] (рисунок 15) проводилось по стандартному протоколу, описанному в работе [34].

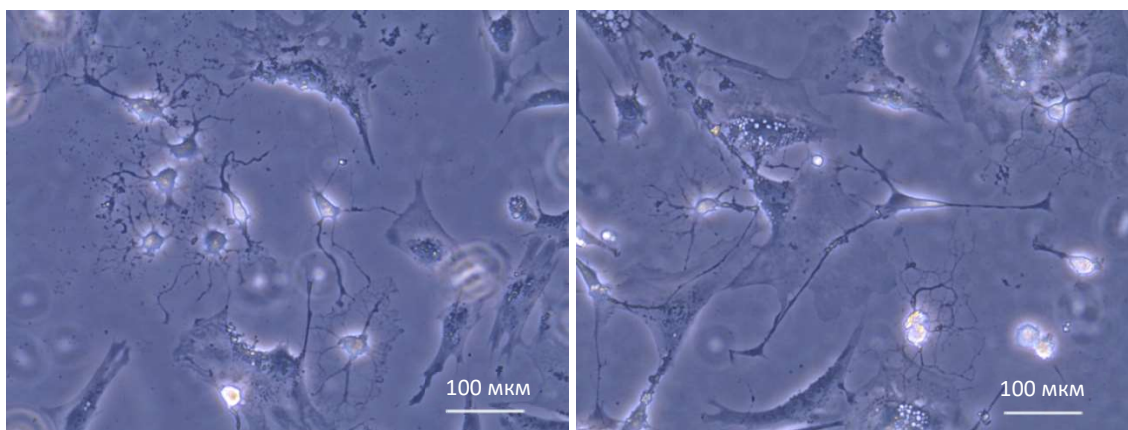


Рисунок 15 – Мотонейроны на следующий день после посева в среде DMEM

Мотонейроны загружались МНЧ в соотношении 8 мкл на 1.5 мл среды на 5 сутки после посева клеток в среде DMEM. Клетки инкубировали с наночастицами в течение 24 часов. Затем клетки были промыты раствором DPBS и залиты средой DMEM (рисунок 16).

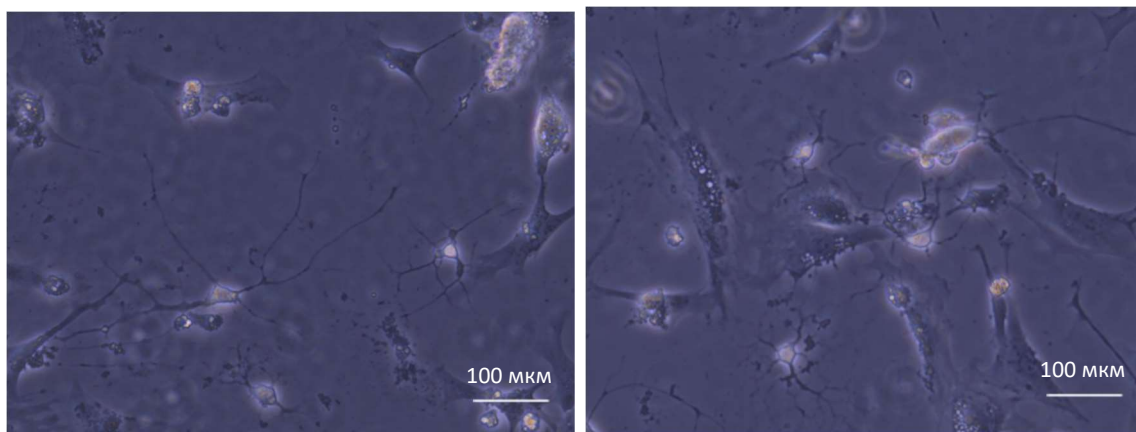


Рисунок 16 – Мотонейроны, загруженные МНЧ в среде DMEM на 5 сутки после посева

При визуальном наблюдении не было отмечено токсического воздействия наночастиц на мотонейроны: количество и морфология мотонейронов не различалась в контрольном и опытном вариантах.

2.1.2.2. Раковые клетки Hela

Клетки Hela получали из коллекции клеточных культур института цитологии РАН. Посадка осуществлялась путем внесения необходимого количества суспензии клеток на обработанное поли-L-лизином покровное стекло (24x24 мм), помещенное в лунку культурального планшета. После отстаивания клеток (10-15 мин) вносился необходимый объем питательной среды DMEM. Планшеты помещали в термостат (температура 37°C, 5% CO₂). Загрузку клеток МНЧ (20 мкг/мл) осуществляли на третьи сутки после посева в течение 24 часов. НЧ добавляли непосредственно к среде культивирования. Конечная концентрация НЧ составляла 20 мкг/мл. Анализ интернализации НЧ в мотонейроны проводили с помощью конфокального лазерного микроскопа Leica SP5 TCS (рисунок 17).

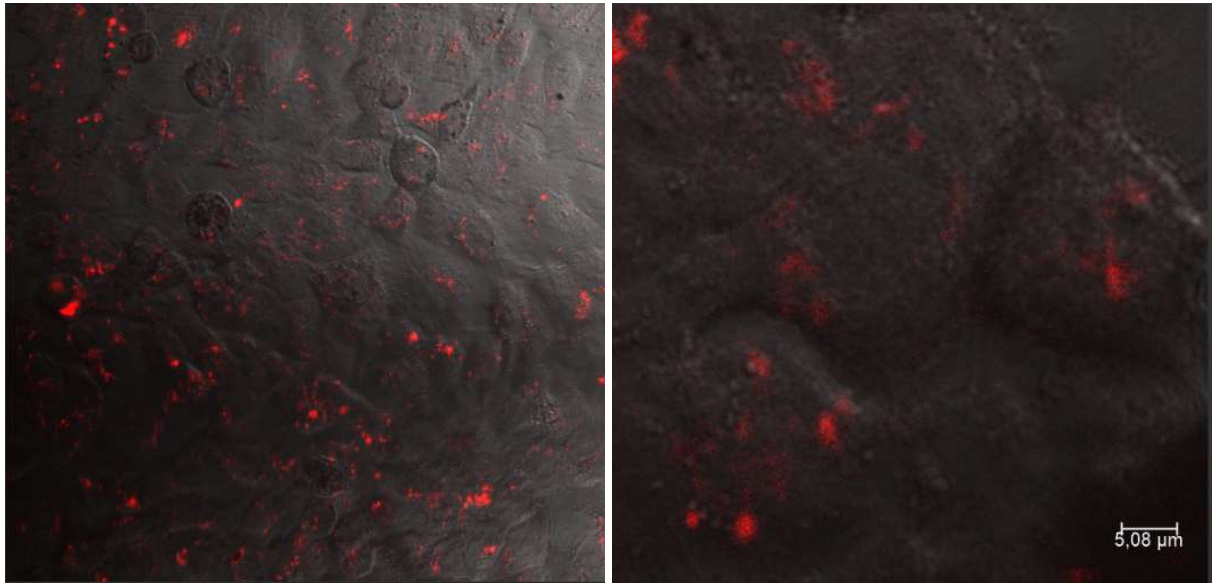


Рисунок 17 – Раковые клетки HeLa с загруженными в них наночастицами

2.1.3. Получение срезов головного мозга

В работе были использованы срезы коры головного мозга новорожденных крысят (P1), а также мышат возрастом 1-3 месяца, полученные по методике, описанной в [35].

2.1.4. Описание загрузки МНЧ in vivo

Для данного эксперимента была взята мышь массой 23.6 г, возрастом 3 месяца. С помощью шприца внутривенно было загружено 100 мкл жидкости с ферромагнитными наночастицами, которые предварительно разбили при помощи ультразвука. Инкубация наночастицами проводилась в течение 1 часа.

2.1.5. Приборы для изучения влияния магнитного поля

Стимуляция постоянным магнитным полем осуществлялась с помощью неодимового магнита с $R = 1$ см.

Для создания переменного МП в экспериментах использовался магнитный стимулятор (рисунок 18) [36]. Технические характеристики

стимулятора: наличие переменного магнитного поля частотой 50 Гц и амплитудного значения магнитной индукции 0.03 Тл.

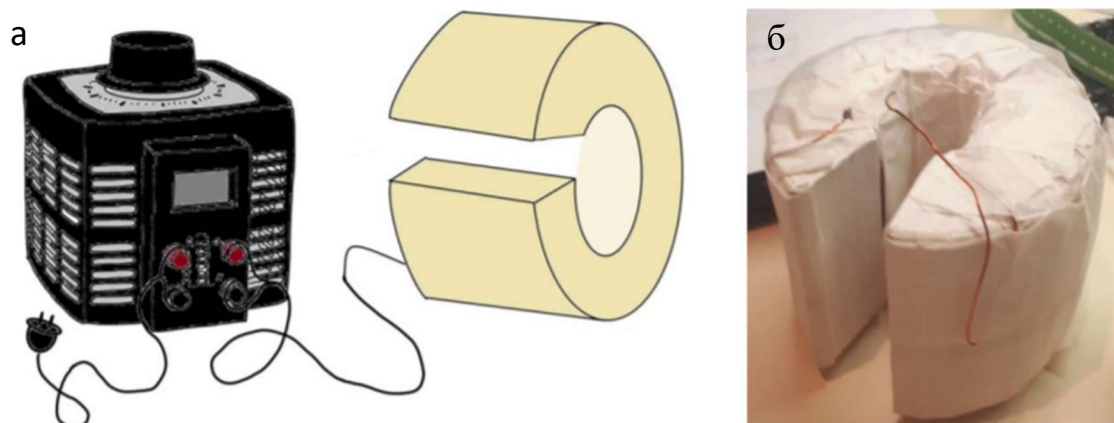


Рисунок 18 – Конструкция магнитного стимулятора. а – блок управления и блок электромагнита б – фотография блока электромагнита [36]

Для стимуляции переменным МП была изготовлена электромагнитная игла. В качестве ЭИ использовался стержень из нержавеющей стали диаметром 4 мм. С помощью электролиза в 10%-ном растворе HCl (рисунок 19) кончик стержня был уменьшен (протравлен) согласно методу, описанному в работах [3-4], до 40 мкм в диаметре (рисунок 20). Для генерации магнитного поля иглу поместили в корпус из PLA (полилактид), напечатанный на 3D принтере Anet A61 (для моделирования использовалась программа Fusion360) (рисунок 21), с намотанным на него медным обмоточным проводом диаметром 0.2 мм (3300 витков).



Рисунок 19 – Вид установки для травления стального провода с помощью 10%-ной соляной кислоты

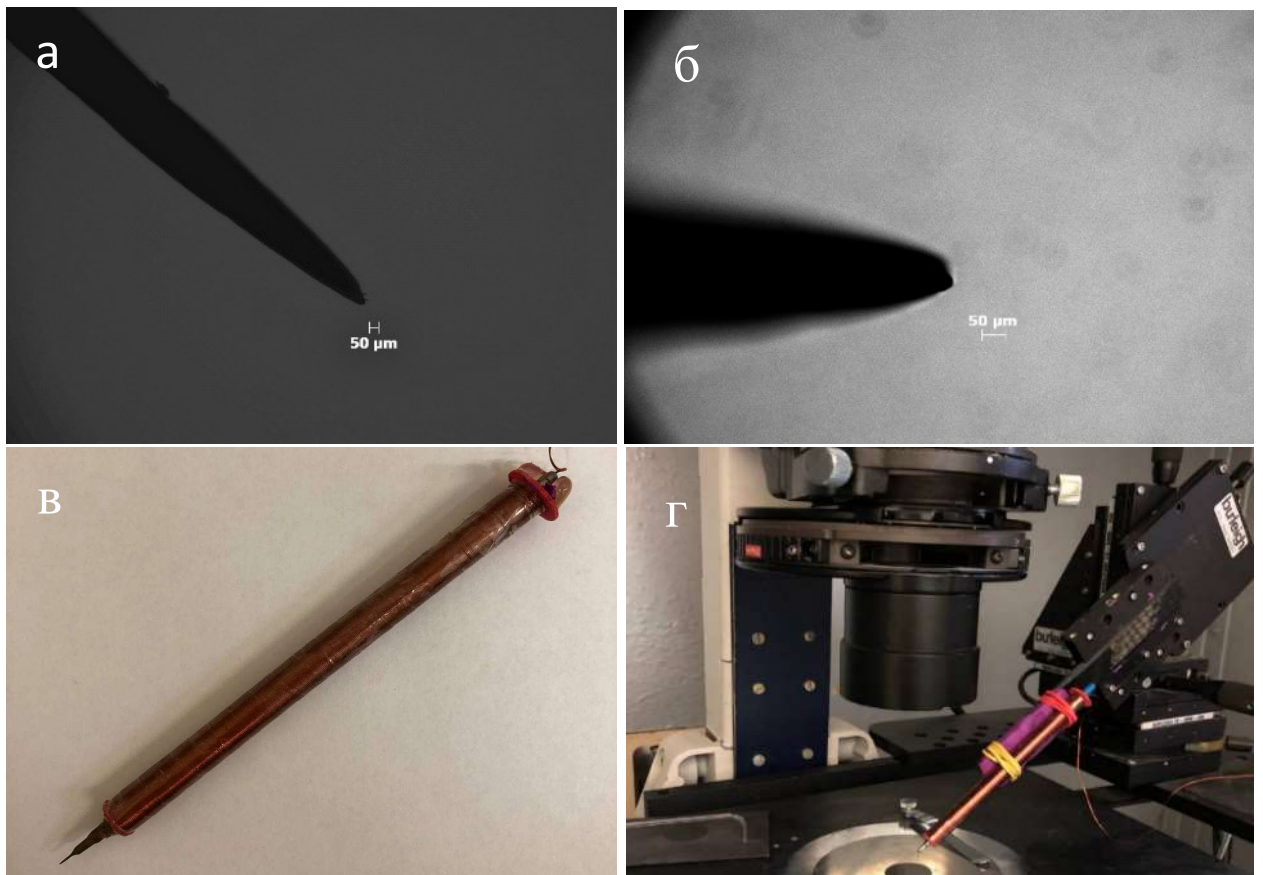


Рисунок 20 – Вид кончика иглы после травления (а, б), ЭИ в корпусе (в), вид установки с ЭИ (г)

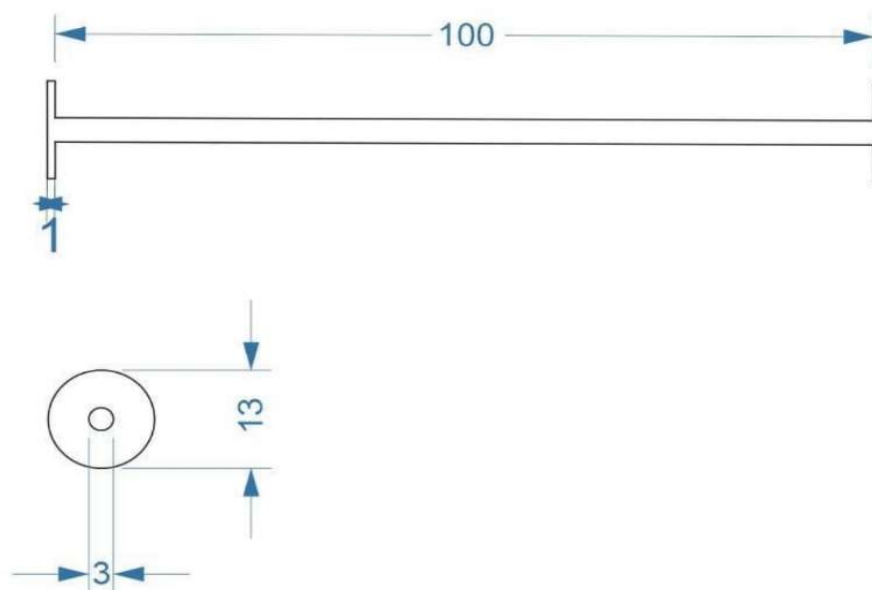
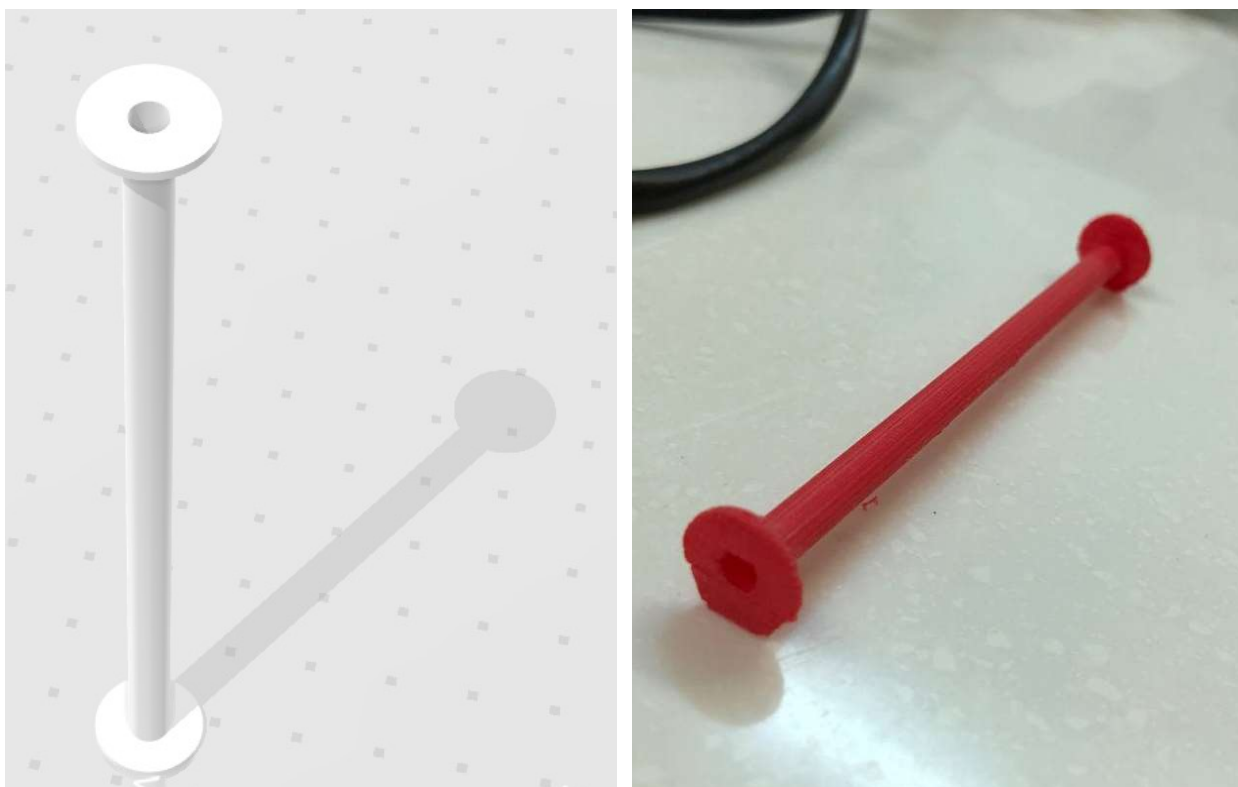


Рисунок 21 – Модель корпуса (слева), напечатанный корпус из PLA (справа), модель (снизу): длина – 100 мм, радиус внутреннего отверстия – 1.5 мм, толщина – 0.5 мм, диаметр боковой окружности – 13 мм, ее толщина – 1 мм

2.1.6. Микроскопическая техника

Для моделирования зависимости притягивающей силы ЭИ от расстояния между кончиком иглы и МНЧ использовался микроскоп Nikon Inverted

Microscope Eclipse TE300 с использованием ртутной лампы. Принцип работы флуоресцентного микроскопа описан в [37].

Лазерный конфокальный сканирующий микроскоп является измерительным прибором, с помощью которого возможно исследовать самые различные структуры и процессы в живых клетках [38].

Измерения, связанные с изучением перемещения МНЧ внутри раковых клеток HeLa, а также интернализацией МНЧ в срезах головного мозга проводились с помощью конфокального лазерного микроскопа Leica SP5 TCS с использованием аргонового лазера с длиной волны 488 нм. Для детектирования флуоресценции кальциевого красителя Fluo3 использовали диапазон 500-550 нм. Наночастицы визуализировали путем детектирования флуоресценции в диапазоне 600-640 нм. Использовался режим конфокального микроскопа XYZt. Инструменты ортогонального сечения Leica SP5 TCS использовались для определения положения максимальной интенсивности флуоресценции. Чтобы определить изменения в локализации МНЧ, мы проанализировали положение максимальной флуоресценции от одиночной наночастицы и ее движение вдоль оси z до и после приложения магнитного поля.

2.2. Результаты исследований

2.2.1. Изучение интернализации МНЧ в срезах головного мозга без магнитного поля

Было подготовлено три среза коры головного мозга новорожденного крысенка, которые поместили в специальный питательный аэрируемый раствор. МНЧ добавили в соотношении 7 мкл частиц на один срез, всего 21 мкл наночастиц в растворе. Раствор со срезами нагрели до температуры 37 °С, инкубацию проводили в течение часа. Обнаружилось, что из-за образовавшегося после срезания мертвого слоя клеток на поверхности срезов, МНЧ загрузились лишь в небольшом количестве в некоторые живые нейроны более внутреннего слоя. Большая часть частиц прилипала к внешнему

мертвому слою. В связи с этим требовалось изучение влияния постоянного и переменного магнитного полей на загрузку МНЧ в нейроны.

2.2.2. Изучение интернализации МНЧ в срезах головного мозга при приложении постоянного и переменного магнитного поля

Наночастицы разбавляем в ультразвуке примерно 6 минут. Добавляем наночастицы в соотношении 8 мкл на 1.5 мл среды (в одну чашку Петри с 3 мл раствора добавляем 16 мкл наночастиц) со срезами. Одну чашку помещаем в магнитный стимулятор, создающий переменное магнитное поле, на час. Под одной чашкой Петри кладем неодимовый магнит с постоянным магнитным полем на час, наночастицы капаем над срезами (рисунок 22).



Рисунок 22 – Срезы с МНЧ над неодимовым магнитом

Одну чашку Петри загружаем наночастицами в течение часа без приложения магнитного поля в качестве контроля. Результаты в дальнейшем фиксируем на конфокальном микроскопе. Визуализация срезов представлена на рисунок 23.

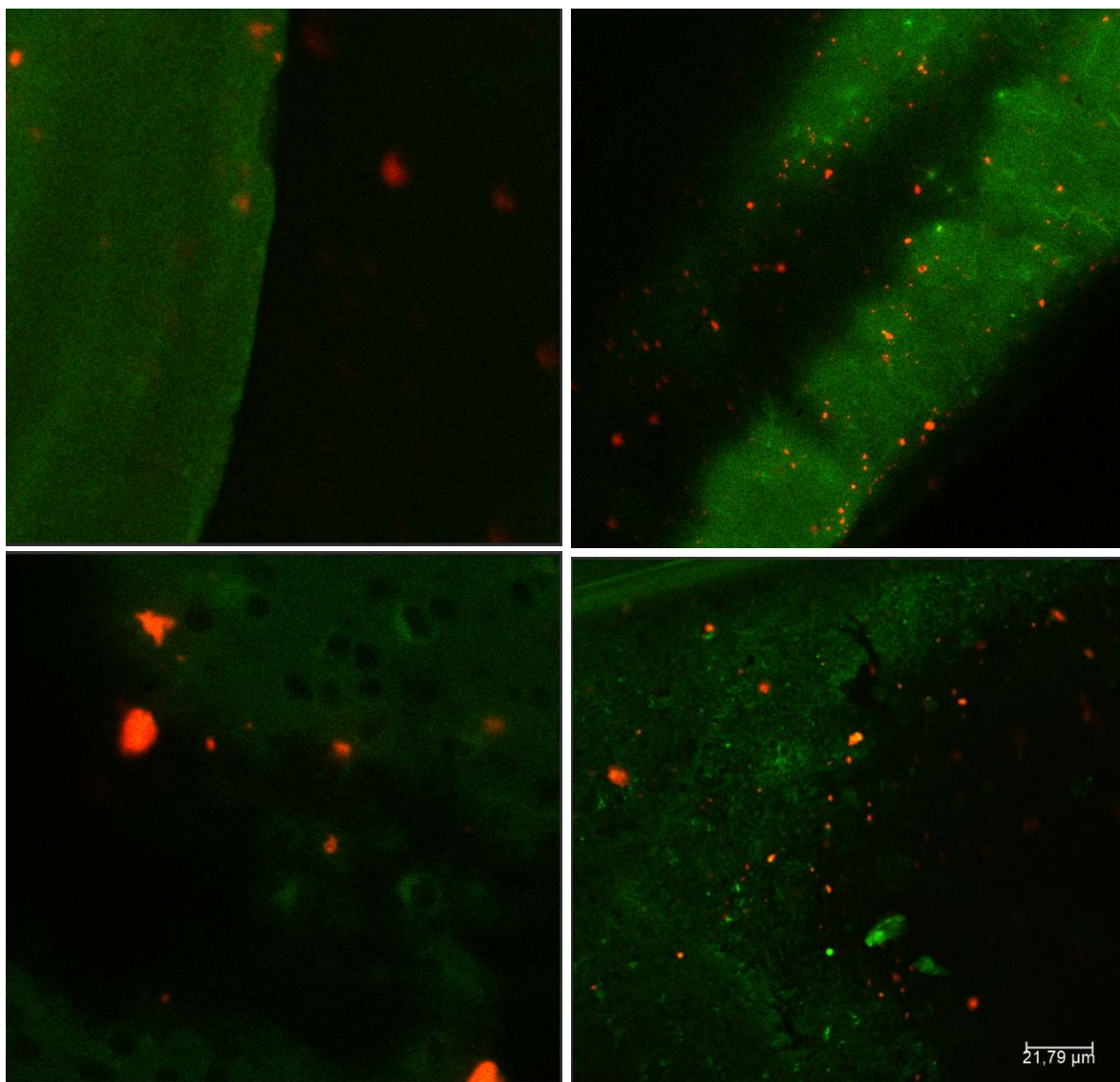


Рисунок 23 – Срезы головного мозга с МНЧ спустя час после начала загрузки (используется кальциевый краситель Fluo-3)

Исследуем полученные образцы при отсутствии МП (рисунок 24), при наличии постоянного МП (рисунок 25) и переменного МП (рисунок 26) на конфокальном микроскопе.

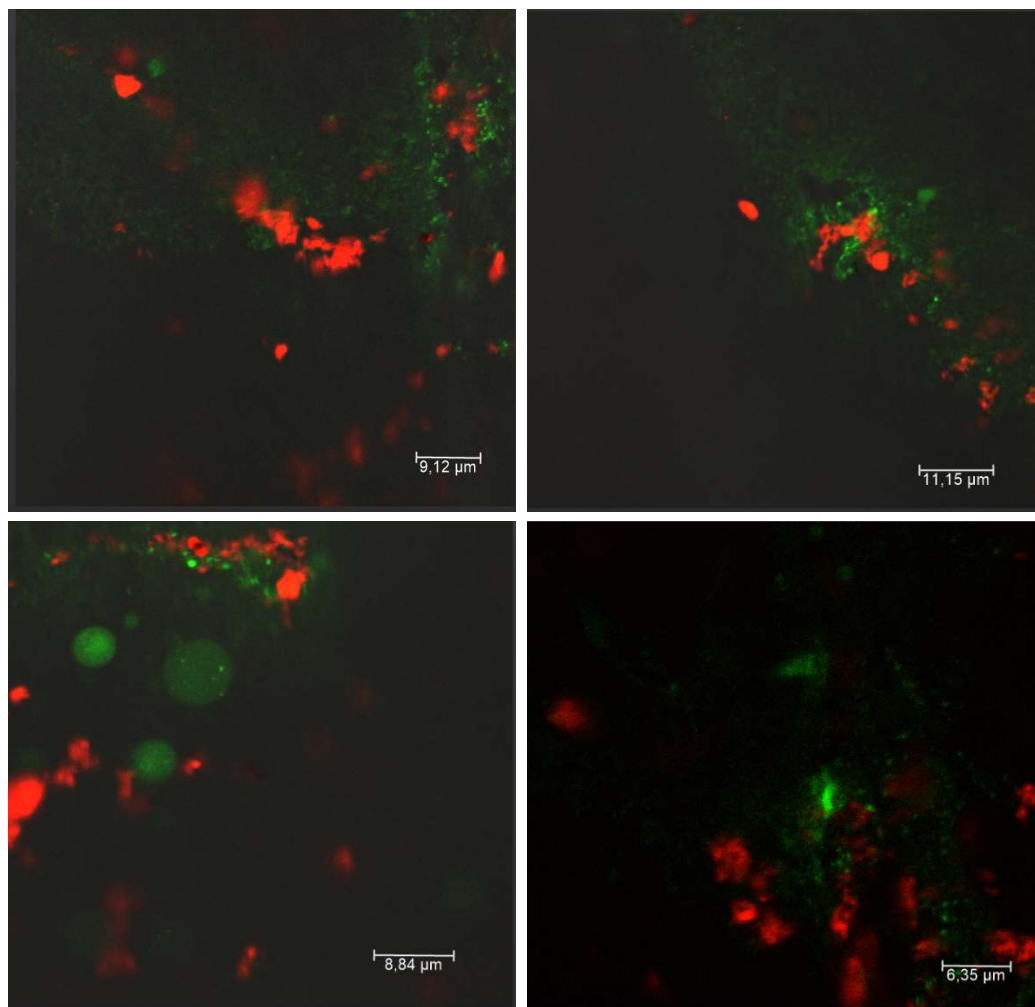


Рисунок 24 – Срезы головного мозга с МНЧ спустя час после начала загрузки при отсутствии магнитного поля

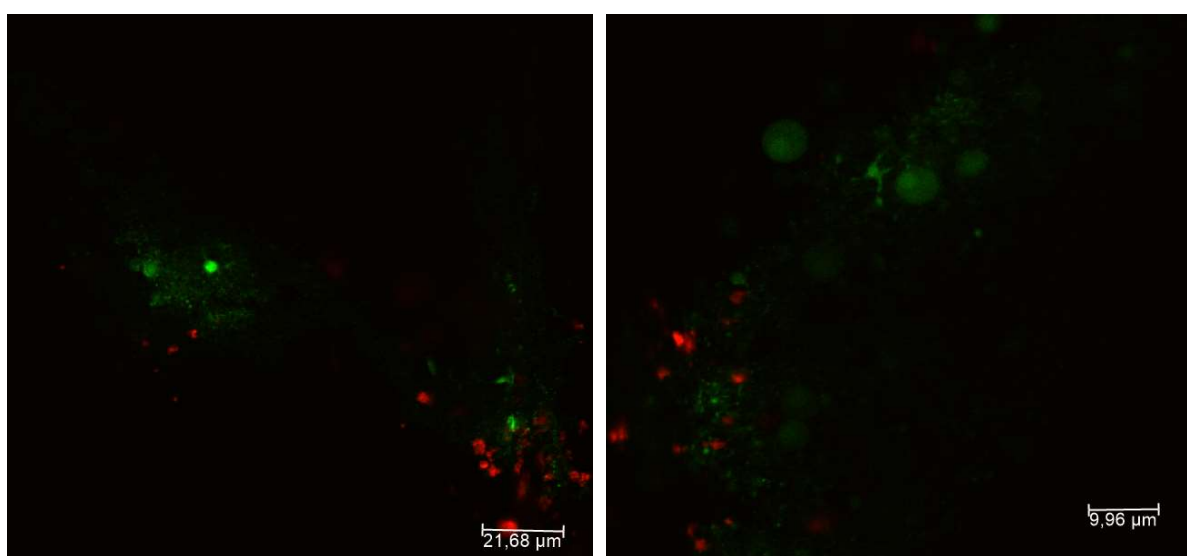


Рисунок 25 – Срезы головного мозга с МНЧ спустя час после начала загрузки при приложении постоянного магнитного поля

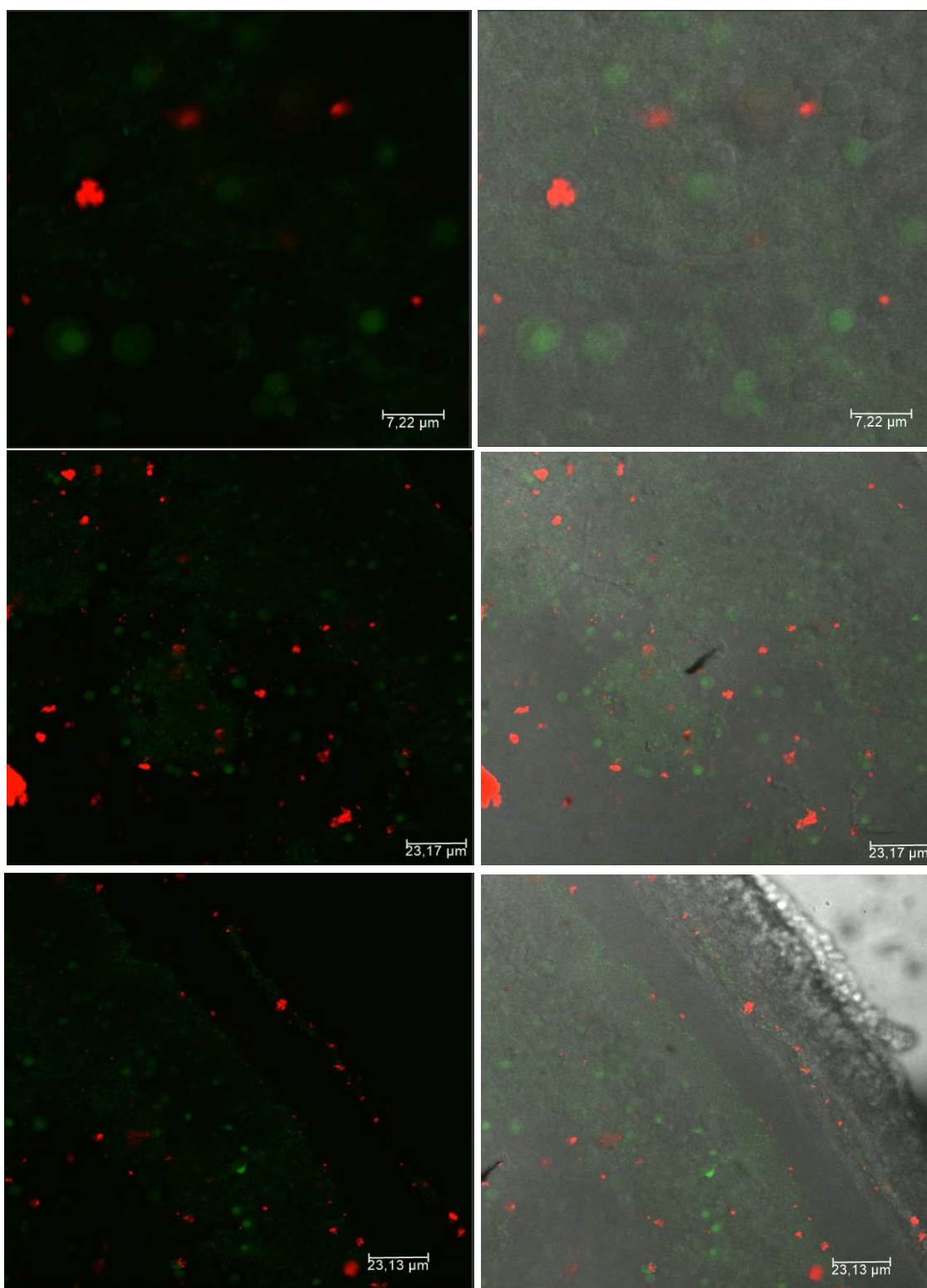


Рисунок 26 – Срезы головного мозга с МНЧ спустя час после начала загрузки при приложении переменного магнитного поля (справа при наличии проходящего света)

Из полученных результатов следует, что МНЧ в клетки не интернализируются ни при влиянии переменного, ни при влиянии постоянного МП. Следовательно, переменное и постоянное магнитное поле не оказывают влияния на загрузку нейронных клеток наночастицами.

2.2.3. Изучение загрузки МНЧ *in vivo*

Интернализация МНЧ проводилась по методике, описанной в п. 1.4. Наночастицы были обнаружены во всех срезах, в том числе и в сосудах головного мозга (рисунок 27). Результаты анализа загрузки частицами срезов представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Загрузка срезов МНЧ

Номер среза	Число частиц в сосуде (при обнаружении)	В самом срезе
1	22	10
2	5	5
3	-	3
4	-	6
5	-	7
6	-	25
7	-	14
8	-	8
9	-	9
10	3	15
11	-	10
Среднее	-	11,2

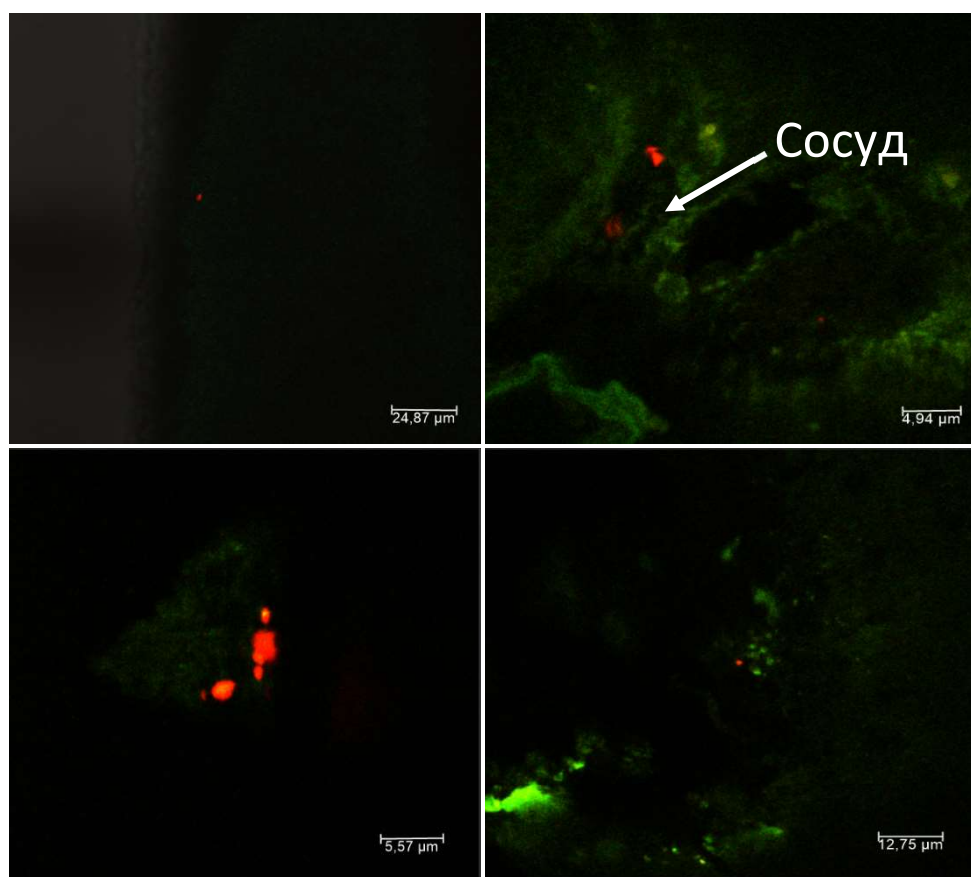


Рисунок 27 – Слева – срезы головного мозга с МНЧ спустя один час после инъекции 200 мкл частиц через хвостик, верхняя правая картинка – частицы в сосуде. В среднем было обнаружено 11 частиц на срез

Частицы при их внутривенной загрузке попадают в головной мозг. В среднем было обнаружено 11 частиц на срез, максимум – 25, минимум – 3. Их локализацию в клетках, изменение концентрации наночастиц в головном мозге при увеличении концентрации загрузки и при приложении магнитного поля предстоит изучить в дальнейшем.

В связи с малой интернализацией МНЧ в срезы головного мозга было принято решение продолжить изучение загрузки и воздействия МП на клеточных культурах.

2.2.4. Изучение влияния магнитных полей на культуру мотонейронов

2.2.4.1. Изучение влияния постоянного МП

Неодимовый магнит помещали в культуральный планшет между лунками со стеклами, в которых выращивали мотонейроны, через сутки после добавления наночастиц (уже после отмывки).

Анализ показал, что присутствие магнита не оказывает существенного влияния на рост отростков мотонейронов. Отростки располагаются хаотично и не имеют общего направления роста. Также не было отмечено влияние магнита на морфологию и количество клеток.

На третьи сутки после начала воздействия магнитного поля были взяты образцы для анализа локализации магнитных наночастиц в мотонейронах. Было установлено, что наночастицы накапливаются преимущественно в соме мотонейронов (рисунок 28).

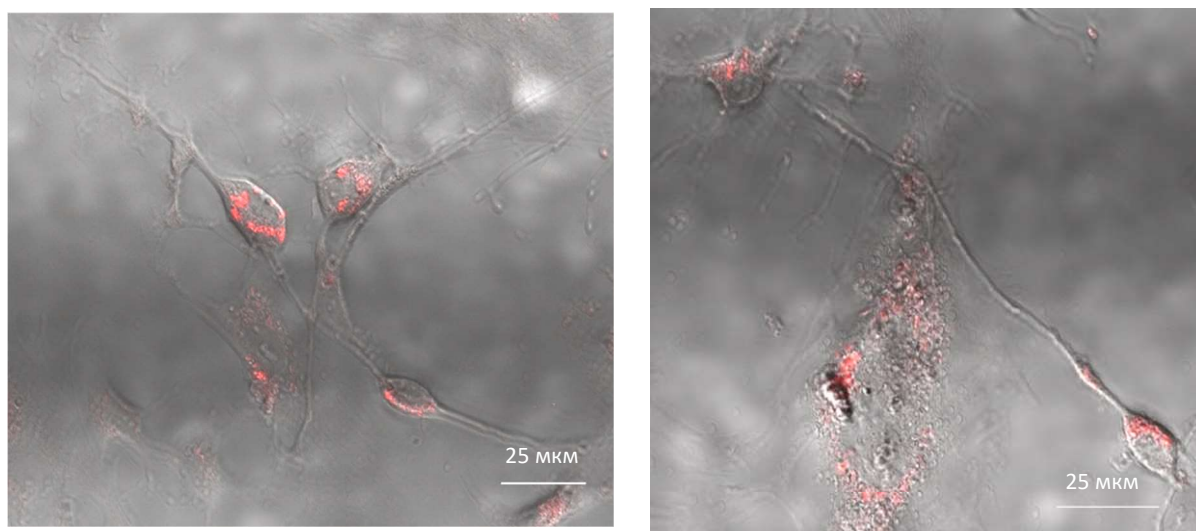


Рисунок 28 – Локализация магнитных наночастиц в мотонейронах через 48 часов инкубации в присутствии магнита, длина линии 100 мкм

Было предположено, что МНЧ не смогли оказаться в отростках мотонейронов по причине того, что они уже были окончательно сформированы на 5 сутки.

2.2.4.2. Изучение влияния переменного МП

Магнитное поле не инвазивно и может глубоко проникать в живые ткани. В недавних работах было показано, что переменное магнитное поле с частотой 50 Гц с применением магнитных наночастиц способно влиять на развитие мезенхимных стволовых клеток и на регенерацию аксонов [8-9]. В рамках данной работы мы исследовали влияние переменного магнитного поля на интернализацию НЧ в мотонейроны. Культуры первичных мотонейронов получали из спинного мозга новорожденных крысят Вистар (P3-P4). Загрузку клеток НЧ осуществляли на третьи сутки после посева. НЧ добавляли непосредственно к среде культивирования. Конечная концентрация НЧ составляла 20 мкг/мл. Анализ интернализации НЧ в мотонейроны проводили с помощью конфокального лазерного микроскопа Leica SP5 TCS (рисунок 29).

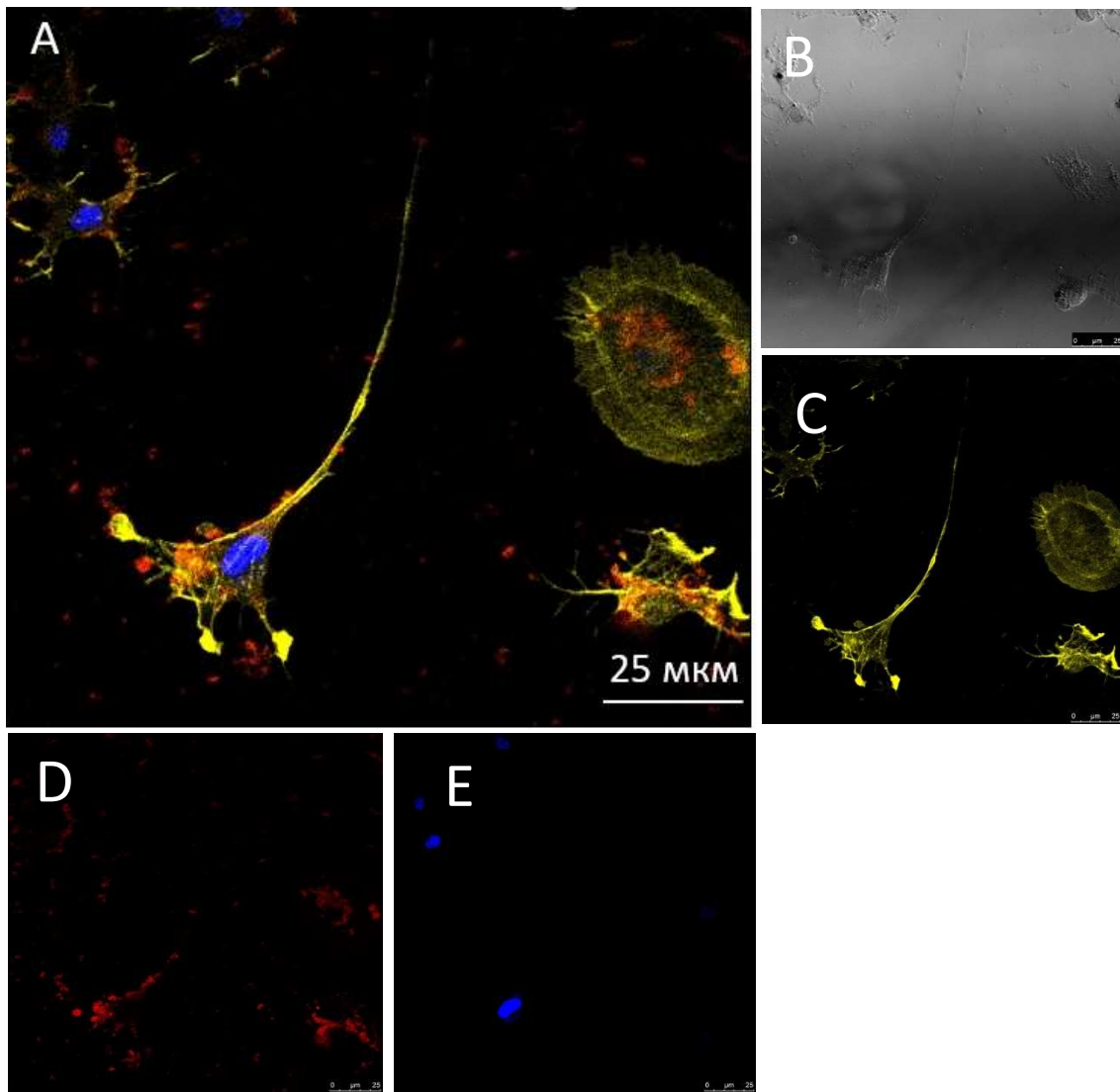


Рисунок 29 – Изображения первых образцов мотонейронов (влияние магнитного стимулятора осуществлялось в течение 30 минут), полученные на конфокальном микроскопе. А – общее изображение; В – при проходящем свете; С – цитоскелет клеток, окрашенный TRITC-фаллоидином; D – наночастицы; E – ядра клеток, окрашенные DAPI

После добавления НЧ образцы поместили в магнитный стимулятор и производили инкубацию в течение 30 минут.

В качестве контроля служили клетки, загруженные НЧ, но не подвергнутые воздействию магнитного поля. Образцы клеток были зафиксированы в 4% параформальдегиде и затем окрашены флуоресцентными красителями DAPI и TRITC-фаллоидином (рисунок 30).

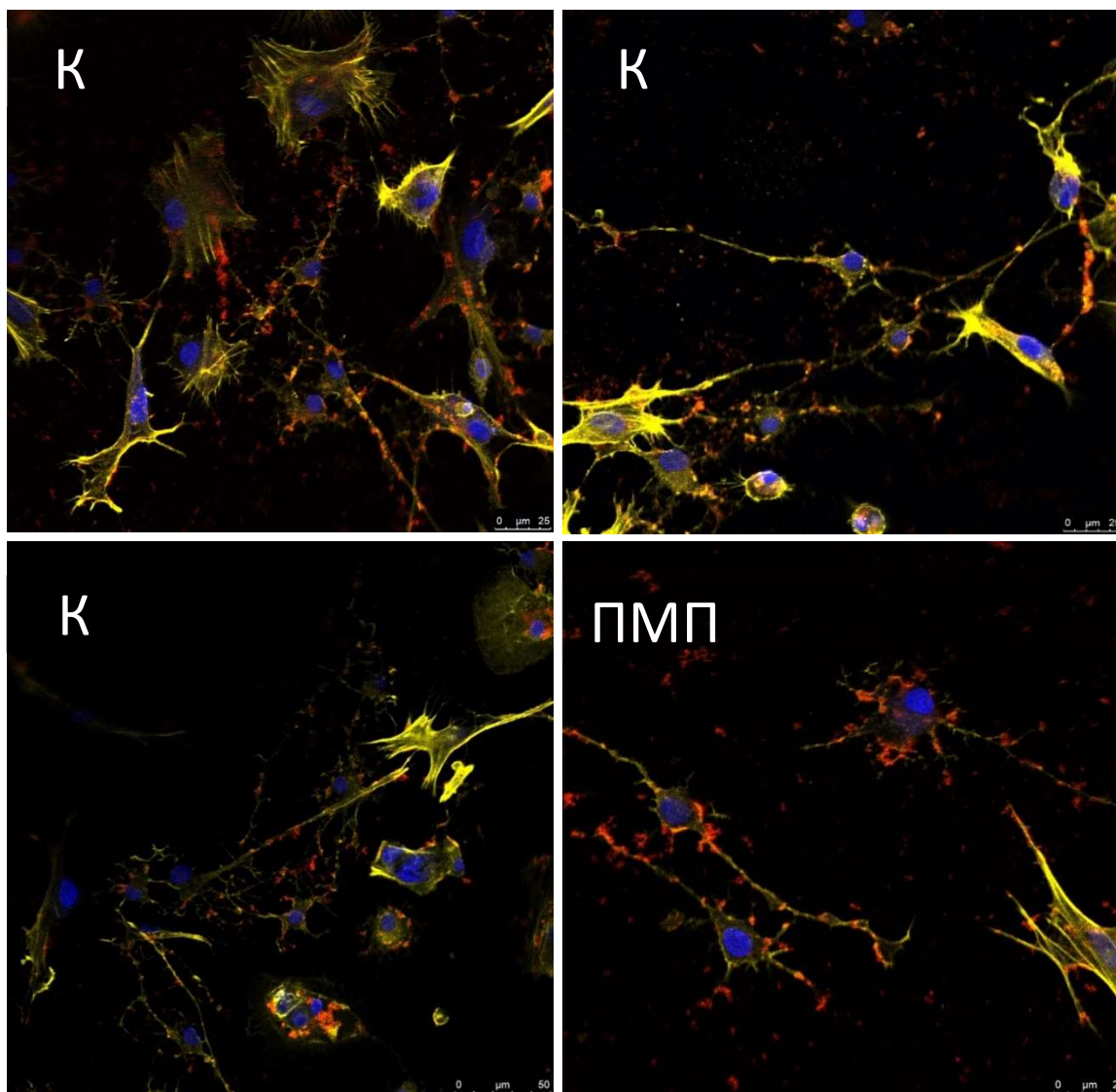


Рисунок 30 – Локализация НЧ в мотонейронах. К – контрольные образцы, ПМП – образцы после воздействия переменного магнитного поля. Клетки были окрашены флуоресцентными красителями для выявления ядер (синий) и цитоскелета (желтый)

Ранее было показано, что НЧ способны эффективно интернализироваться в культивируемые мотонейроны в отсутствие магнитного поля [2]. При приложении переменного магнитного поля в течение 30 мин после внесения НЧ в среду культивирования клеток процент загруженных клеток не отличался от контроля и составлял 100% (таблица 2).

Таблица 2 – Загрузка мотонейронов МНЧ

Изображение	Число загруженных частицами клеток	Общее число клеток	Процент загруженных частицами клеток
К	133	133	100%
ПМП	67	67	100%
Всего	200	200	100%

Процент загруженных наночастицами клеток составил 100% и в контрольном варианте без влияния переменного магнитного поля, и в случае с переменным магнитным полем. Таким образом, было установлено, что кратковременное приложение переменного магнитного поля не оказывает влияния на процесс интернализации мотонейронов НЧ, а также не влияет на их морфологию и количество. МНЧ в ядрах клеток обнаружены не были.

2.2.4.3. Изучение влияния ЭИ на перемещение МНЧ в культуре Hela

В данной работе исследуется влияние локального градиента магнитного поля, создаваемого ЭИ, на МНЧ в раковых клетках Hela, описан способ управления интенсивностью этого поля, произведена оценка притягивающей силы ЭИ, также описана конструкция ЭИ, изучены основные характеристики.

В ходе данного исследования было обнаружено перемещение МНЧ под действием магнитного поля, генерируемого ЭИ. Также была отмечена прямая зависимость между подаваемым напряжением и величиной смещения МНЧ в раковых клетках Hela: при увеличении напряжения от 1 до 6 В увеличивалась величина самого смещения с 1.01 ± 0.19 до 2.03 ± 0.29 мкм соответственно. Для характеристики магнитных свойств ЭИ у фрагмента использованной стали массой $176.1 \text{ мг} \pm 0.5 \text{ мг}$ была измерена зависимость намагниченности от величины приложенного магнитного поля в интервале $\pm 1 \text{ Т}$ или $\pm 10 \text{ кЭ}$ при

комнатной температуре 300 К (рисунок 31). Из зависимости следует, что образец ферромагнитный, насыщение происходит при величине внешнего поля 1 Т, магнитный момент насыщения = 207.26 ему/г. Величина коэрцитивной силы находится в диапазоне $0 \text{ Э} < H_c < 50 \text{ Э}$.

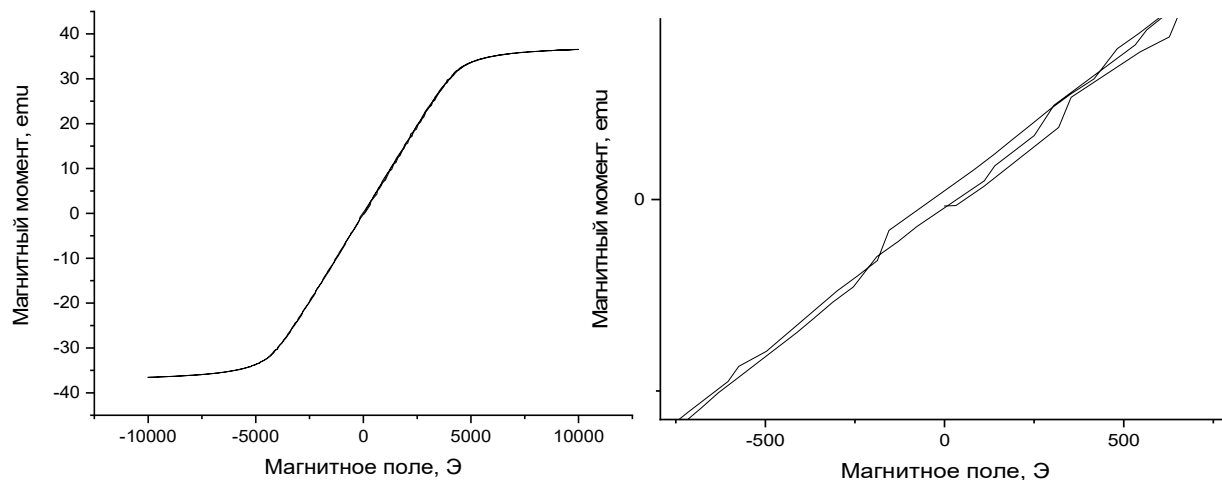


Рисунок 31 – Петля гистерезиса образца ЭИ (слева), увеличенный масштаб (справа)

Игла подключалась к источнику постоянного тока Б5-44А. Индукцию магнитного поля у кончика ЭИ оценивали при помощи сконструированного прибора на основе датчика Холла, остаточную намагниченность снимали путем приложения переменного магнитного поля (таблица 3).

Таблица 3 – Параметры ЭИ

Напряжение, В	Сила тока, мА	Индукция магнитного поля иглы, мТл	Величина смещения, мкм	Величина средней силы (на расстоянии 20 мкм), пН
1	29	3.3	1.01 ± 0.19	8,7
2	59	6	1.13 ± 0.21	34,8
3	86	7.4	1.23 ± 0.15	80,2
4	116	8.1	1.41 ± 0.19	112,6
5	144	9.5	1.63 ± 0.24	163,8
6	169	10.7	2.03 ± 0.29	280,7

Перемещение МНЧ в раковых клетках Hela оценивали по смещению пика интенсивности флуоресценции от МНЧ, анализ проводили с помощью конфокального лазерного микроскопа Leica SP5 TCS.

Зависимости притягивающей силы иглы от расстояния ранее исследовали З. Ценев, Х. Занг и В. Пита-Томас в своих работах [3-4, 7].

Для изучения зависимости притягивающей силы от расстояния для наших частиц мы поместили иглу в воду с МНЧ, с помощью источника постоянного тока Б5-44А подавали напряжения в диапазоне 1-6 В. Было записано видео притяжения МНЧ при различных напряжениях, которое в дальнейшем было разбито на кадры. Частота кадров $\text{fps} = 3.7463$ 1/сек, время между кадрами $t = 1/f = 0.26693$ сек. Масштаб: 30 пикселей соответствуют 50 мкм, следовательно, 1 пиксель = 1,67 мкм. Определяем размеры частиц. Покадрово фиксируем положения частиц, результаты заносим в таблицу. Находим скорость v для каждой частицы по формуле $v = \Delta x / \Delta t$. Движение частицы может быть смоделировано по закону (2):

$$m\ddot{x} = F_{\text{стокс}} + F_{\text{иг}} \quad (2)$$

Решая дифференциальное уравнение, при условии, что $F_{\text{иг}}$ меняется намного медленнее, чем время $\tau = m / (6\pi r \mu)$, за которое частица набирает постоянную скорость (τ – время «подстраивания» частицы под внешнее поле), то можно считать ускорение $a = 0$ на бесконечно малом участке, которое по времени длится намного больше, чем τ . Следовательно, $-F_{\text{стокс}} = F_{\text{иг}}$.

Рассчитываем силу иглы для каждой частицы по формуле $F_{\text{иг}} = 6\pi * \mu * r * v$, где μ – вязкость жидкости, в которой находятся частицы, r – радиус частицы. Были построены графики зависимости силы от расстояния для частиц при напряжениях 1-6 В (μ у воды был принят за 10^{-3} Па·с или 10^{-3} кг/м·с). Далее была произведена аппроксимация полученных графиков по формуле (3), описанной в работе [3-4]:

$$F_m = \frac{2\pi}{3} d_p^3 \rho_p M_p \frac{\beta M_n^2}{(4\beta\delta + 1)^3} \quad (3)$$

где F_m – сила, действующая на частицу со стороны иглы, d_p – диаметр частицы, ρ – плотность частицы, M_p – намагниченность частицы, β – коэффициент, связанный с формой полюса, δ – расстояние от кончика иглы до частицы, M_n – намагниченность иглы.

Данное уравнение было переписано в виде (4):

$$F = \frac{\sigma d^3 \beta}{(4\beta\delta + 1)^3}, \quad (4)$$

где σ – некий параметр, пропорциональный намагниченности частицы, иглы, плотности частицы, плотности потока магнитного поля, создаваемого иглы (предположительно, зависит относительно ориентации иглы и частицы).

Пример графика зависимости притягивающей силы ЭИ от расстояния при напряжении 2В представлен на рисунке 32.

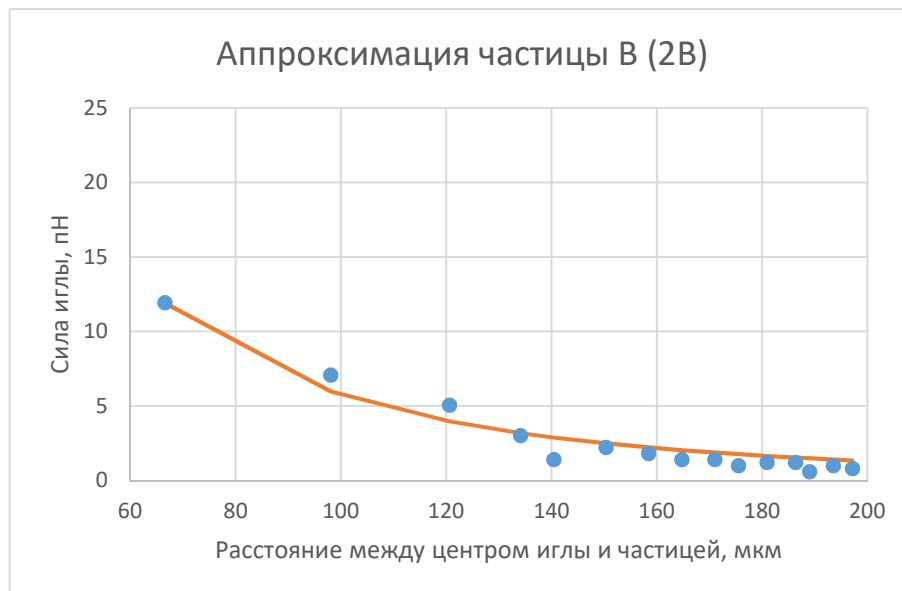


Рисунок 32 – График зависимости притягивающей силы ЭИ от расстояния для 2В

В результате получили графики зависимости силы притяжения иглы от расстояния между центром иглы и частицей при различных напряжениях в диапазоне 1- 6 В (рисунок 33).

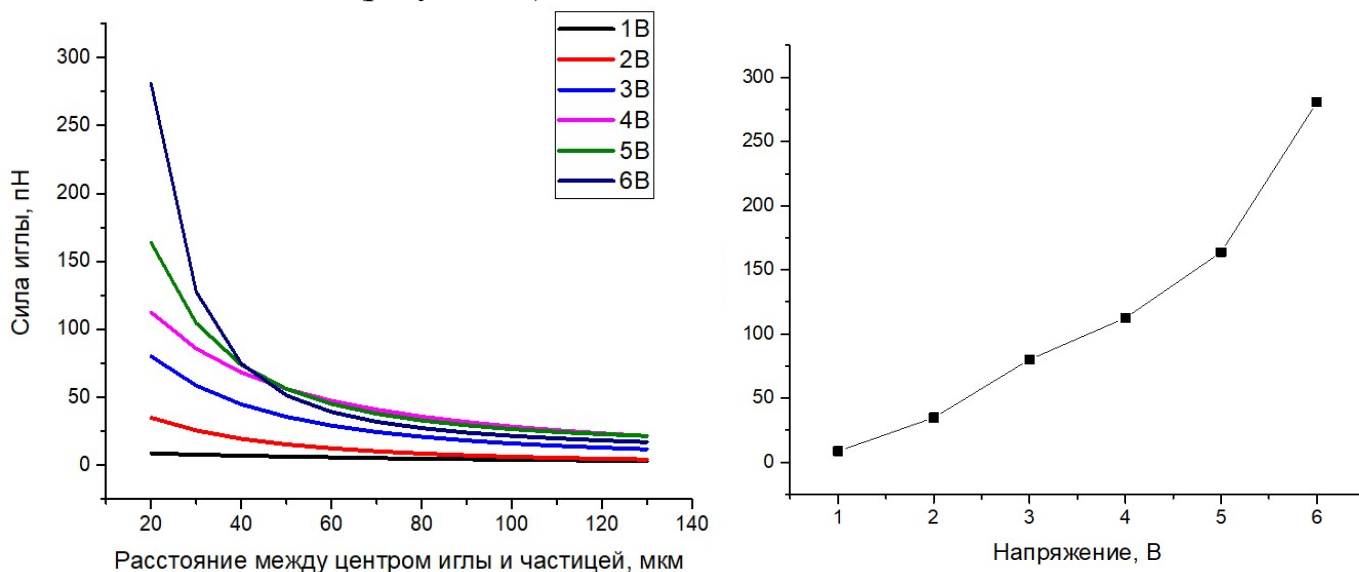


Рисунок 33 – Графики зависимости силы электромагнитной иглы от расстояния между центром иглы и частицей при различных напряжениях (слева), график зависимости силы электромагнитной иглы (на расстоянии 20 мкм) от напряжения (справа)

Из зависимостей следует, что при увеличении напряжения от 1 до 6 В увеличивается величина притягивающей силы от 8,7 до 280,7 пН (на расстоянии 20 мкм) соответственно (таблица 3). Величина притягивающей силы ЭИ увеличивается также при уменьшении расстояния между ЭИ и частицей.

Чтобы определить изменения в локализации МНЧ, мы проанализировали положение максимальной флуоресценции от одиночной наночастицы и ее движение вдоль оси z до и после приложения магнитного поля. (рисунок 34). При нулевом поле в течение 2 минут смещение интенсивности не наблюдалось. При влиянии магнитного поля в течение 3 минут наблюдалось смещение пиков интенсивности флуоресценции порядка ~ 1-2 мкм (рисунок 35), причем при увеличении подаваемого напряжения, т.е. при увеличении

индукции магнитного поля ЭИ, увеличивалась величина смещения МНЧ в раковых клетках HeLa (рисунок 36).

Результаты измерений занесены в таблицу 1. Графики зависимости смещения МНЧ под действием магнитного поля ЭИ от подаваемого напряжения (б), чартбоксы смещений представлены на рисунок 37.

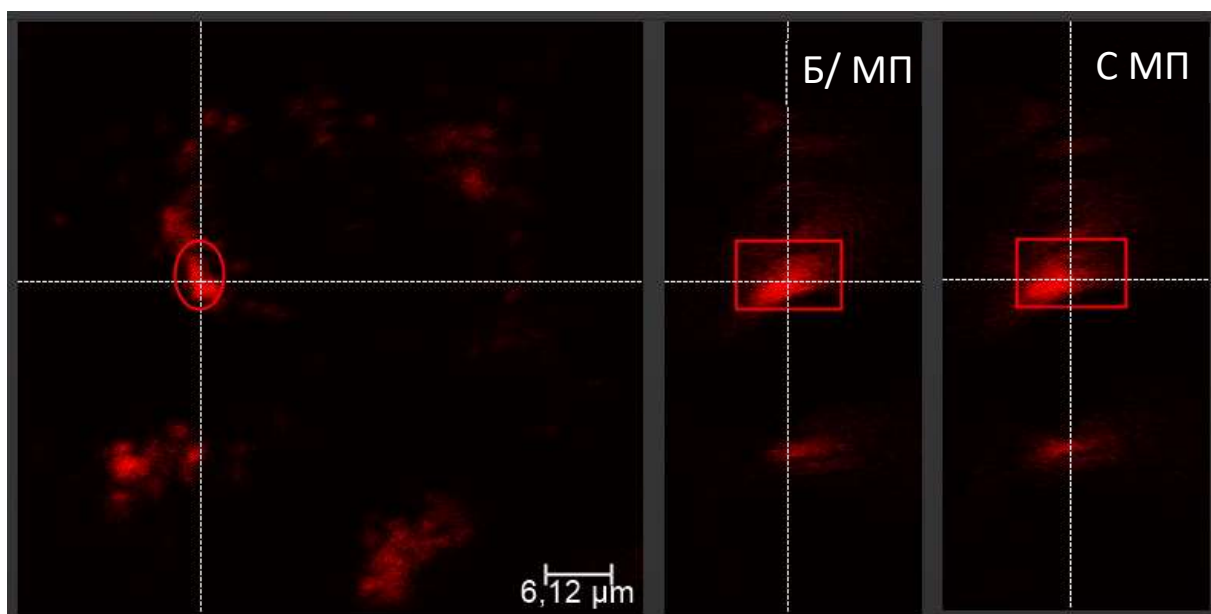


Рисунок 34 – Смещение частицы. Б/ МП – без влияния магнитного поля ЭИ в течение 2 минут, С МП – при влиянии магнитного поля в течение 3 минут

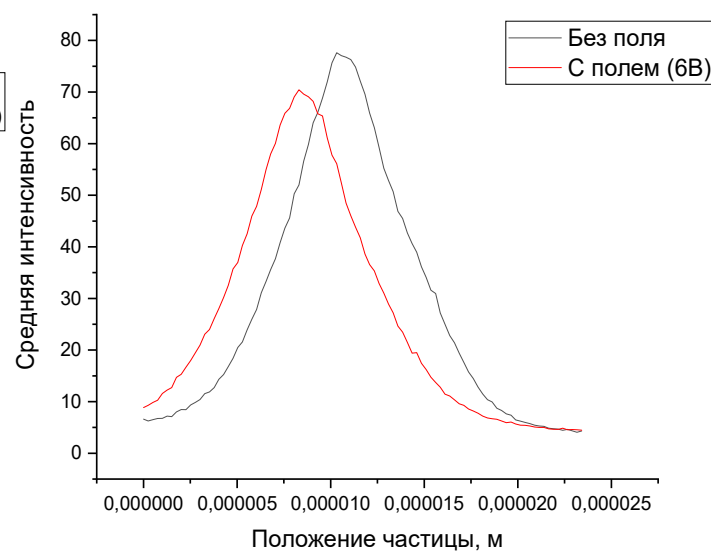
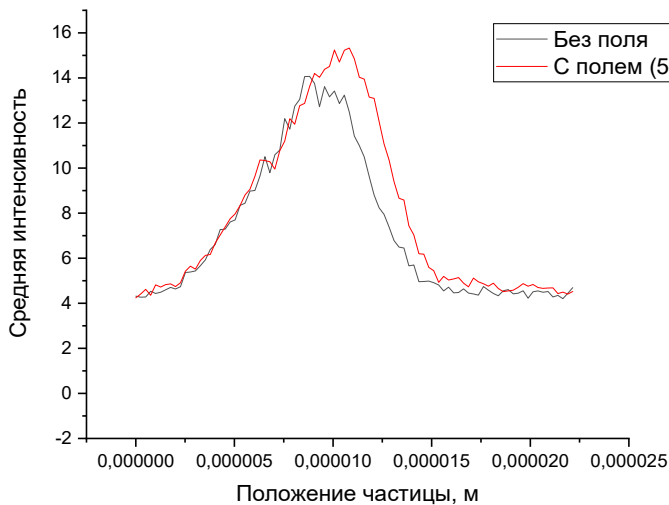
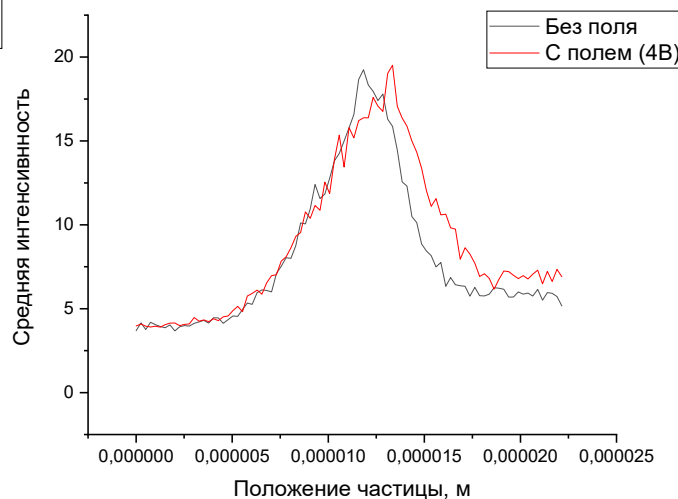
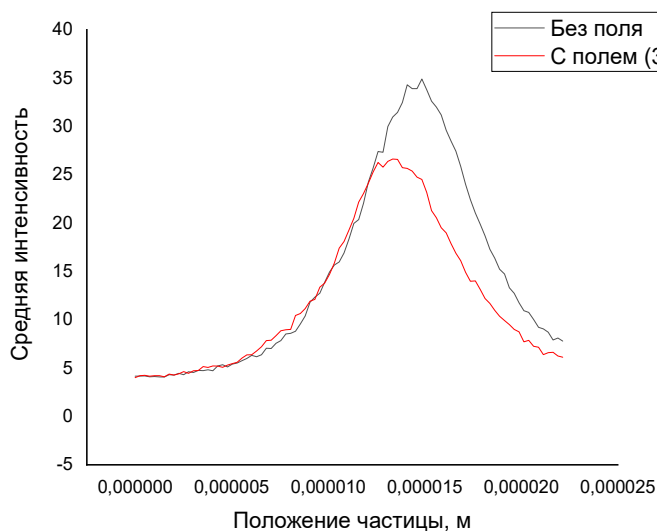
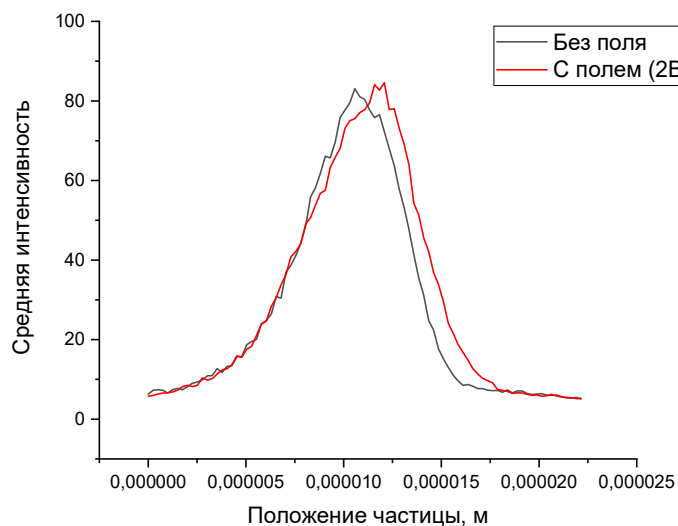
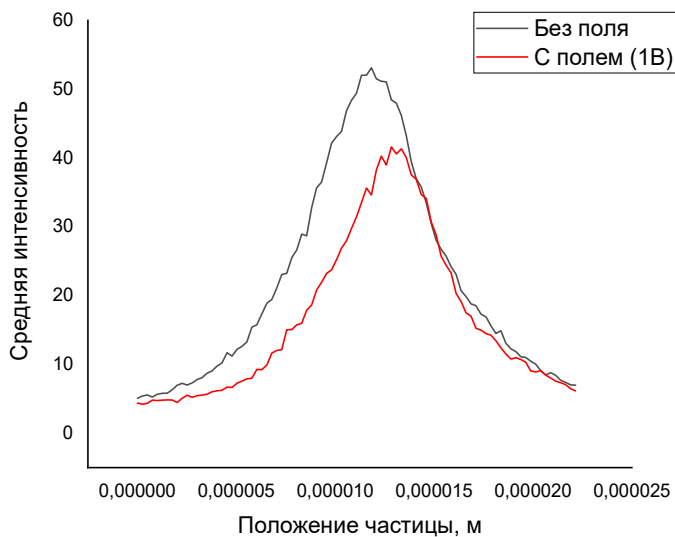


Рисунок 35 – Пики интенсивности флуоресценции наночастиц до и после приложения магнитного поля при различных напряжениях от 1В до 6В

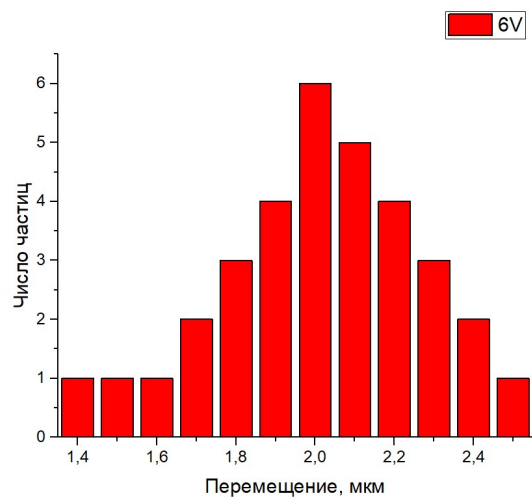
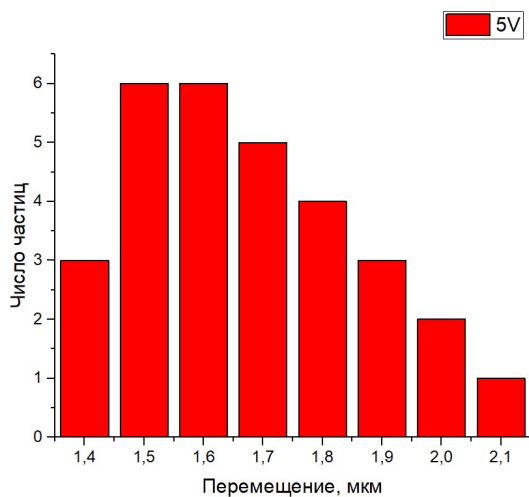
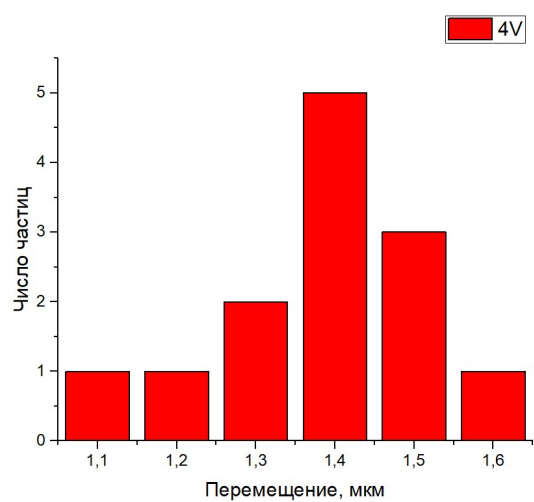
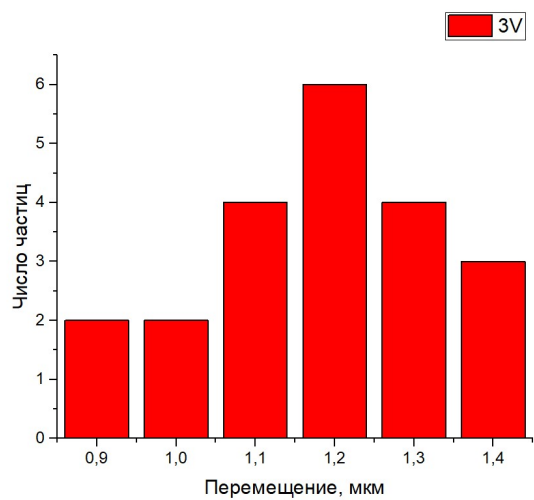
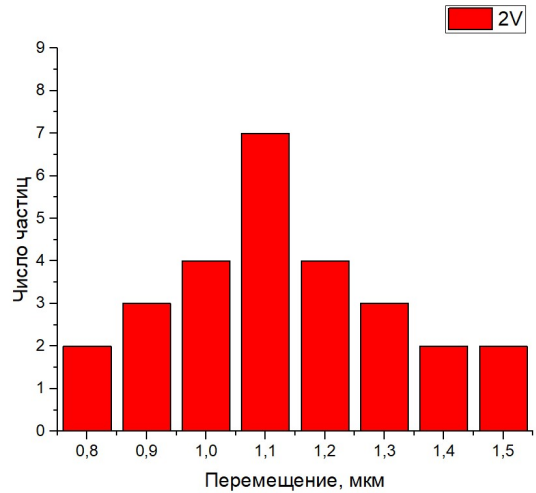
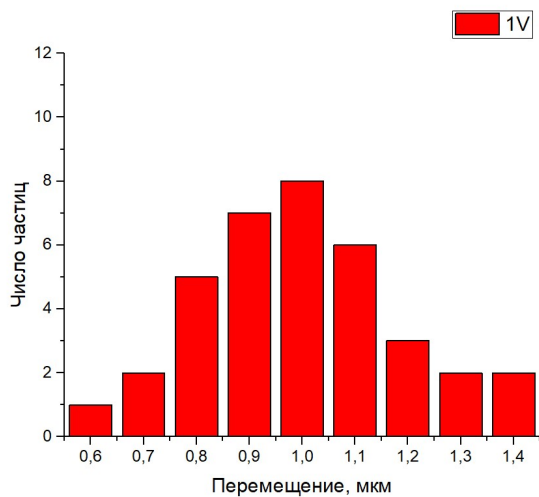


Рисунок 36 – Распределение смещения пиков интенсивности флуоресценции наночастиц после приложения магнитного поля при различных напряжениях от 1В до 6В

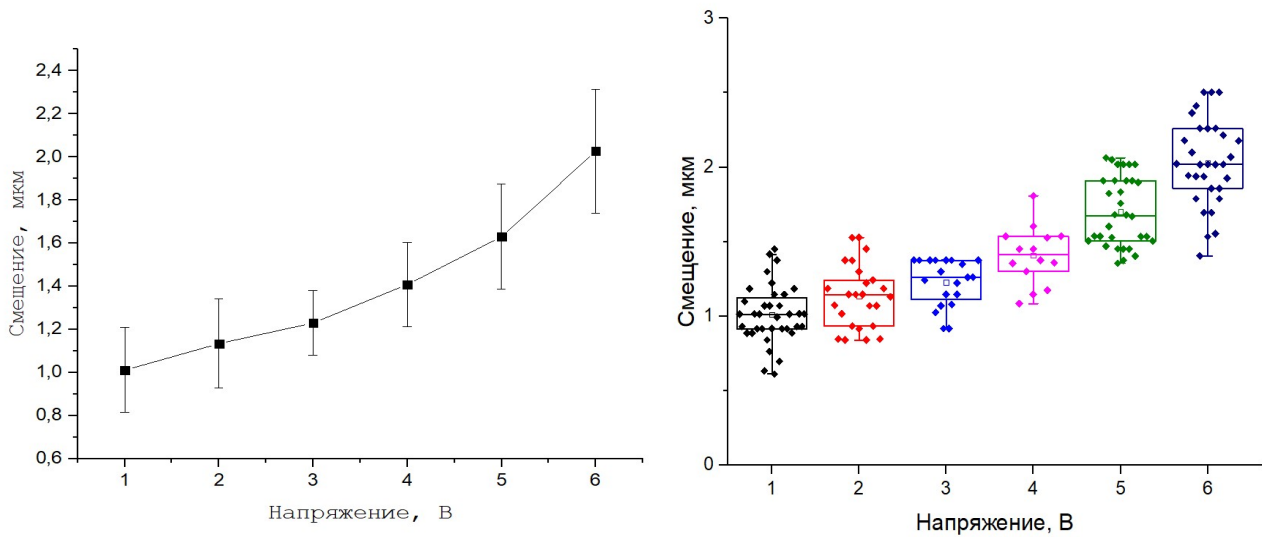


Рисунок 37 – График зависимости смещения МНЧ под действием магнитного поля ЭИ от подаваемого напряжения (слева), чартбоксы смещений (справа)

Наблюдалась прямая зависимость между подаваемым напряжением и смещением пика интенсивности флуоресценции МНЧ: при увеличении напряжения от 1 до 6 В увеличивалось величина самого смещения с 1.01 ± 0.19 до 2.03 ± 0.29 мкм. Таким образом, при помощи ЭИ возможно локальное вариативное воздействие на МНЧ отдельно взятых клеток.

ВЫВОДЫ

В данной работе была изучена интернализация МНЧ в клеточных культурах, тканях и *in vivo*, а также произведена отработка методических подходов для изучения влияния магнитных полей на загруженные наночастицами образцы. В результате проведенного исследования было установлено, что инкубация культуры Hela и культуры мотонейронов с магнитными наночастицами в течение суток приводит к 100% загрузке клеток МНЧ. Загрузка МНЧ в мотонейроны срезов головного мозга мыши была затруднена. Наложение переменного и постоянного магнитных полей не оказывало влияния на загрузку наночастиц в срезы. Было обнаружено, что внутривенное введение магнитных наночастиц в кровотоки экспериментальным животным приводит к их проникновению сквозь гематоэнцефалический барьер в головной мозг.

Ввиду слабой интернализации МНЧ в срезы головного мозга дальнейшее изучение загрузки МНЧ проводилось преимущественно на клеточных культурах.

При приложении переменного магнитного поля в течение 30 минут после внесения МНЧ в среду культивирования клеток мотонейронов процент загруженных клеток не отличается от контроля и составляет 100%. МНЧ в ядрах клеток обнаружены не были. Следовательно, кратковременное приложение переменного магнитного поля не оказывает влияния на процесс интернализации МНЧ в ядра клеток и в сами клетки.

Для манипулирования МНЧ в клетках была изготовлена ЭИ. Охарактеризованы магнитные свойства материала сердечника иглы: магнитный момент насыщения, а также величина коэрцитивной силы. Измерена сила притяжения, создаваемая магнитной иглой при различных напряжениях. В ходе исследования было обнаружено перемещение МНЧ под действием магнитного поля, генерируемого электромагнитной иглой. Средняя величина смещения, а также средняя сила воздействия ЭИ на МНЧ в раковых клетках Hela увеличивалась при увеличении подаваемого напряжения.

ПУБЛИКАЦИИ, КОНФЕРЕНЦИИ И КОНКУРСЫ

В данном разделе указаны все публикации, конференции и конкурсы за период обучения в магистратуре (01.09.19-30.06.21), в которых я принимала участие:

1. Рамазанова И.Ф., Котов Н.В. Сигнальная система, управляющая конусом роста аксонов при воздействии электрическим полем // Актуальные проблемы нейробиологии: Международная конференция "Актуальные проблемы нейробиологии", X Всероссийская школа молодых ученых, посвященная памяти академика РАН Евгения Евгеньевича Никольского, сателлитный симпозиум "От нейрона к мозгу" (Казань, 9-12 сентября 2019г.). Тезисы докладов / под общ. ред.: Э. А. Бухараевой, А. Л. Зефирова. - Казань: Издательство Казанского университета, 2019. - 176 с (с. 128-129).
2. Рамазанова И.Ф., Котов Н.В., Самигуллин Д.В. Разработка методов использования магнитных наночастиц для формирования синаптических контактов *in vitro* // Сборник тезисов итоговой научно-образовательной конференции студентов КФУ. - Казань: Изд-во Казанского университета, 2020 (с. 174).
3. Рамазанова И.Ф., Котов Н.В., Самигуллин Д.В., Сибгатуллина Г.В. Влияние переменного магнитного поля на интернализацию суперпарамагнитных наночастиц в культуре мотонейронов // Сборник статей лучших научных работ студентов КФУ. - Казань: Изд-во Казанского университета, 2020 (с. 66-68).
4. Конкурс на лучшую научную работу К(П)ФУ по естественно-научному направлению, КФУ, 28.05.2020, диплом участника.
5. Международный конкурс научно-исследовательских работ студентов, магистрантов «От науки к практике», АГГПУ им. В.М. Шукшина, 01.12.20-29.12.20, 1 место.
6. Рамазанова И.Ф., Суслов М.А., Сибгатуллина Г.В., Федоренко С.В., Петров К.А., Мустафина А.Р., Самигуллин Д.В. Манипулирование

- ферромагнитными наночастицами внутри клеток с помощью электромагнитной иглы // Самойловские чтения. Современные проблемы нейрофизиологии: сборник статей Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 145-летию кафедры физиологии человека и животных / под общ. ред. Г.Ф. Ситдиковой. – Казань: Издательство казанского университета, 2021. – 160 с (с. 50-51).
7. Конкурс на лучший стендовый доклад во Всероссийской конференции с международным участием «Самойловские чтения. Современные проблемы нейрофизиологии», КФУ, Казань, Россия, 27.02.21., 1 место.
 8. Рамазанова И.Ф., Котов Н.В. Сигнальная система, управляющая конусом роста аксона // Научно-образовательный журнал для студентов и преподавателей «StudNet» №3/2021, DOI: 10.24411/2658-4964-2021-10332.
 9. Рамазанова И.Ф., Котов Н.В., Самигуллин Д.В. Манипулирование ферромагнитными наночастицами внутри клеток с помощью электромагнитной иглы // Сборник тезисов итоговой научно-образовательной конференции студентов КФУ. - Казань: Изд-во Казанского университета, 2021 – в печати.
 10. Рамазанова И.Ф., Суслов М.А., Сибгатуллина Г.В., Батулин Р.Г., Самигуллин Д.В. Электромагнитная игла для манипулирования ферромагнитными наночастицами // Сборник тезисов VIII Молодежной международной научно-технической конференции «Прикладная электродинамика, фотоника и живые системы – 2021», Казань, 8-10 апреля, 2021 (с. 379-382).
 11. Рамазанова И.Ф., Суслов М.А., Сибгатуллина Г.В., Самигуллин Д.В. Манипулирование ферромагнитными наночастицами внутри раковых клеток HeLa с помощью электромагнитной иглы // Ежегодный Саммит молодых ученых и инженеров «Большие вызовы для общества, государства и науки», г. Сочи, 26-30 апреля, 2021, стенд.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dobson, J. Remote control of cellular behaviour with magnetic nanoparticles/ J. Dobson. – Текст : непосредственный // Nature Nanotechnology. – 2008. – Vol. 3. – P. 139-143.
2. Fluorescent magnetic nanoparticles for modulating the level of intracellular Ca²⁺ in motoneurons/ S. Fedorenko, A. Stepanov, G. Sibgatullina [et al.]. – Текст : непосредственный // Nanoscale. – 2019. – Vol. 11. – No. 34. – P. 16103-16113.
3. Manipulating superparamagnetic microparticles with an electromagnetic needle/ Z. Cenev, H. Zhang, V. Sariola [et al.]. – Текст : непосредственный // Advanced Materials Technologies. – 2018. – Vol. 3. – No. 1. – P. 170-177.
4. Seon, J. Automatic Noncontact Extraction and Independent Manipulation of Magnetic Particles Using Electromagnetic Needle/ J. Seon, Z. Cenev, Q. Zhou. – Текст : непосредственный // IEEE/ASME Transactions on Mechatronics. – 2019. – Vol. 25. – No. 2. – P. 931-941.
5. Kilinc, D. Microtechnologies for studying the role of mechanics in axon growth and guidance / D. Kilinc, A. Blasiak, G. Lee. – Текст : непосредственный // Front Cell Neurosci. – 2015. – Vol. 27. – No. 7. – P. 282.
6. Theranostic multimodal potential of magnetic nanoparticles actuated by non-heating low frequency magnetic field in the new-generation nanomedicine / Y. Golovin, N. Klyachko, A. Majouga [et al.]. – Текст : непосредственный // Journal of Nanoparticle Research. – 2017. – Vol. 19. – P. 1-14.
7. Promoting filopodial elongation in neurons by membrane-bound magnetic nanoparticles / W. Pita-Thomas, M. Steketee, S. Moysidis [et al.]. – Текст : непосредственный // Journal of Nanomedicine. – 2015. – Vol. 11. – No. 3. – P. 559-567.
8. Fifty-Hertz Electromagnetic Fields Facilitate the Induction of Rat Bone Mesenchymal Stromal Cells to Differentiate Into Functional Neurons / W.

- Bai, W. Xu, Y. Feng [et al.]. – Текст : непосредственный // *Cytotherapy*. – 2013. – Vol. 15. – No. 8. – P. 961-970.
9. Activation of Schwann Cells in Vitro by Magnetic Nanocomposites via Applied Magnetic Field / Z. Liu, L. Huang, L. Liu [et al.]. – Текст : непосредственный // *Int. J. Nanomedicine*. – 2014. – Vol. 10, – P. 43-61.
 10. Nanostructured magnetizable materials that switch cells between life and death / T. Polte, M. Shen, J. Karavitis [et al.]. – Текст : непосредственный // *Biomaterials*. – 2007. – Vol. 28. – No. 17. – P. 2783-2790.
 11. Ren, T. Regulating growth cone motility and axon growth by manipulating targeted superparamagnetic nanoparticles / T. Ren, J. Goldberg, M. Stekete. – Текст : непосредственный // *In Use of Nanoparticles in Neuroscience*. – 2018. – P. 89-108.
 12. Fass, J. Tensile force-dependent neurite elicitation via anti-beta1 integrin antibody-coated magnetic beads / J. Fass, D. Odde. – Текст : непосредственный // *Biophysical journal*. – 2003. – Vol. 85. – No. 1. – P. 623-636.
 13. Principles and design of a novel magnetic force mechanical conditioning bioreactor for tissue engineering, stem cell conditioning, and dynamic in vitro screening / J. Dobson, S. Cartmell, A. Keramane [et al.]. – Текст : непосредственный // *IEEE transactions on nanobioscience*. – 2006. – Vol. 5. – No. 3. – P. 173-177.
 14. Novel methodology for fabrication of tissue-engineered tubular constructs using magnetite nanoparticles and magnetic force / A. Ito, K. Ino, M. Hayashida [et al.]. – Текст : непосредственный // *Tissue engineering*. – 2005. – Vol. 11. – No. 9-10. – P. 1553-1561.
 15. Local measurements of viscoelastic parameters of adherent cell surfaces by magnetic bead microrheometry / A. Bausch, F. Ziemann, A. Boulbitch [et al.]. – Текст : непосредственный // *Biophysical journal*. – 1998. – Vol. 75. – No. 4. – P. 2038–2049.

16. Bausch, A. Measurement of local viscoelasticity and forces in living cells by magnetic tweezers / A. Bausch, W. Möller, E. Sackmann. – Текст : непосредственный // *Biophysical journal*. – 1999. – Vol. 76. – No. 1. – P. 573-579.
17. Kilinc, D. Advances in magnetic tweezers for single molecule and cell biophysic / D. Kilinc, G. Lee. – Текст : непосредственный // *Integrative biology: quantitative biosciences from nano to macro*. – 2014. – Vol. 6. – No. 1. – P. 27-34.
18. Low piconewton towing of CNS axons against diffusing and surface-bound repellents requires the inhibition of motor protein-associated pathways / D. Kilinc, A. Blasiak, J. O'Mahony [et al.]. – Текст : непосредственный // *Scientific reports*. – 2014. – Vol. 4. – P. 7128.
19. Engineering cortical neuron polarity with nanomagnets on a chip / A. Kunze, P. Tseng, C. Godzich [et al.]. – Текст : непосредственный // *ACS nano*. – 2015. – Vol. 9. – No. 4. – P. 3664-3676.
20. The dynamics of magnetic nanoparticles exposed to non-heating alternating magnetic field in biochemical applications: theoretical study / Y. Golovin, S. Gribanovsky, D. Golovin [et al.]. – Текст : непосредственный // *Journal of Nanoparticle Research*. – 2017. – Vol. 19. – No. 2. – P. 59.
21. Induction of Calcium Influx in Cortical Neural Networks by Nanomagnetic Forces / A. Tay, A. Kunze, C. Murray [et al.]. – Текст : непосредственный // *ACS nano*. – 2016. – Vol. 10. – No. 2. – P. 2331-2341.
22. Cell type-specific response to high intracellular loading of polyacrylic acid-coated magnetic nanoparticles / J. Lojk, V. Bregar, M. Rajh [et al.]. – Текст : непосредственный // *Int J Nanomedicine*. – 2015. – Vol. 10. – P. 1449-62.
23. Khizroev, S. Technobiology's Enabler: The Magnetoelectric Nanoparticle / S. Khizroev. – Текст : непосредственный // *Cold Spring Harb Perspect Med*. – 2019. – Vol. 9. – No. 8.
24. Schöneborn, H. Novel Tools towards Magnetic Guidance of Neurite Growth: (I) Guidance of Magnetic Nanoparticles into Neurite Extensions of Induced

- Human Neurons and In Vitro Functionalization with RAS Regulating Proteins / H. Schöneborn, F. Raudzus, E. Secret. – Текст : непосредственный // J Funct Biomater. – 2019. – Vol. 10. – No. 3.
25. Selective Targeting of Neurons with Inorganic Nanoparticles: Revealing the Crucial Role of Nanoparticle Surface Charge / S. Dante, A. Petrelli, E. Petrini [et al.]. – Текст : непосредственный // ACS Nano. – 2017. – Vol. 11. – No. 7. – P. 6630-6640.
26. Intracisternal delivery of PEG-coated gold nanoparticles results in high brain penetrance and long-lasting stability / A. Spinelli, M. Girelli, D. Arosio [et al.]. – Текст : непосредственный // J Nanobiotechnology. – 2019. – Vol. 17. – No. 1. – P. 49.
27. Latorre, M. Applications of magnetic nanoparticles in medicine: magnetic fluid hyperthermia / M. Latorre, C. Rinaldi. – Текст : непосредственный // Journal of Health Science. – 2009. – Vol. 28. – No. 3. – P. 227-238.
28. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme / K. Maier-Hauff, F. Ulrich, D. Nestler [et al.]. – Текст : непосредственный // Journal of Neuro-Oncology. – 2011. – Vol. 103. – No. 2. – P. 317-324.
29. Dutz, S. Magnetic particle hyperthermia--a promising tumour therapy? / S. Dutz, R. Hergt. – Текст : непосредственный // Nanotechnology. – 2014. – Vol. 25. – No. 45.
30. Calculated absorption and scattering properties of gold nanoparticles of different size, shape, and composition: applications in biological imaging and biomedicine / P. Jain, K. Lee, I. El-Sayed [et al.]. – Текст : непосредственный // The Journal of Physical Chemistry B. – 2006. – Vol. 110. – No. 14. – P. 7238-7248.
31. Neuroimaging of Exosomes Using Gold Nanoparticles / O. Betzer, N. Perets, A. Angel [et al.]. – Текст : непосредственный // ACS Nano. – 2017. – Vol. 11. – No. 11. – P. 10883-10893.

32. Near-infrared Deep Brain Stimulation via Upconversion Nanoparticle-Mediated Optogenetics / S. Chen, A. Weitemier, X. Zeng [et al.]. – Текст : непосредственный // Science. – 2018. – Vol. 359. – No. 6376. – P. 679-684.
33. Редкая патология болезнь двигательного нейрона - приговор или... – Текст : электронный // Яндекс Дзен : [сайт]. – URL: <https://zen.yandex.ru/media/id/595f61ded7d0a69b431e48f9/redkaia-patologiiia-bolezn-dvigatel'nogo-neirona-prigovor-ili-5cd18ef6b539b500b33db3e2> (дата обращения: 1.06.2021).
34. Sibgatullina, G. GABA in developing rat skeletal muscle and motor neurons / G. Sibgatullina, A. Malomouzh. – Текст : непосредственный // Protoplasma. – 2020. – Vol. 257. – No. 3. – P. 1009-1015.
35. Калинцева, Я. Приготовление переживающих срезов мозга крыс : учеб.-метод. пособие / Я. Казанцева. – 2011. – С. 1-36. – Текст : электронный. – URL: <http://www.unn.ru/pages/e-library/methodmaterial/2010/114.pdf> (Дата обращения: 18.05.2020).
36. Магнитный стимулятор для воздействия на ферромагнитные наночастицы в биомедицинских исследованиях / С. Блохин, А. Мухтаров, А. Аникин [и др.]. – Текст : непосредственный // Инженерный вестник Дона. – 2020. – № 5.
37. Wolf, D. Fundamentals of Fluorescence and Fluorescence Microscopy / D. Wolf. – Текст : непосредственный // Methods In Cell Biology. – 2003. – P. 184.
38. Штейн, Г.И. Руководство по конфокальной микроскопии : руководство. / Г.И. Штейн. – СПб : Изд-во ИНЦ РАН, 2007. – 77 с. – Текст : непосредственный.