

На правах рукописи

Зайковская Мария Владимировна

**ВЛИЯНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-НАНОСОМАЛЬНЫХ
ГИБРИДНЫХ КОМПОЗИЦИЙ
С БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫМИ СУБСТАНЦИЯМИ
НА ФАГОЦИТИРУЮЩИЕ КЛЕТКИ IN VITRO**

03.00.25 – гистология, цитология, клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Томск – 2008

Работа выполнена в Государственном учреждении Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН (г. Новосибирск)

Научный руководитель:

доктор биологических наук

Архипов Сергей Алексеевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,
профессор

Ильинских Николай Николаевич

кандидат медицинских наук

Солонский Анатолий Владимирович

Ведущая организация: Государственное учреждение НИИ клинической и экспериментальной лимфологии СО РАМН.

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2008 г.
в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.096.03 при
Государственном образовательном учреждении высшего
профессионального образования «Сибирский государственный
медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и
социальному развитию» по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, 2

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке
ГОУ ВПО Сибирский государственный медицинский университет Росздрава

Автореферат разослан « ____ » _____ 2008 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



А.В. Герасимов

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Тема работы посвящена актуальной проблеме – разработке и изучению новых молекулярно-наносомальных гибридных композиций в качестве эффективных средств направленной доставки биологически активных веществ и лекарственных средств, обладающих высокой собственной биологической активностью. В настоящее время к одному из перспективных направлений разработки и создания новых лекарственных форм относят синтез композиций адресного действия с заданными фармакокинетическими свойствами и гармоничным содержанием в них субстанций, не только не оказывающих побочных действий, но и обладающих биоактивными свойствами, повышающими их эффективность (Шкурупий В.А. и др. 2000, 2007; Dutt M., Khuller et al., 2001; Fenske D.B. et al., 2008). Такие терапевтические лекарственные системы направленной доставки лекарственных веществ к клетке или органу как наноразмерные носители являются перспективным лечебным средством нового поколения (Матвиенко П.В., 2004; Кузякова Л.М., 2005; Nie S. et al., 2006). Конструирование эффективных лекарственных средств предполагает необходимость не только разработки, но и изучения наноразмерных композиционных материалов, гибридных наноразмерных композиций, обладающих высокой биосовместимостью, биотропностью, заданной биологической активностью, а также средств и способов их доставки, контроля адресности и регистрации производимых биологических эффектов.

Цель исследования. Изучить биологические эффекты молекулярно-наносомальных гибридных композиций с различными физико-химическими свойствами, содержащих биологически активные субстанции, на фагоцитирующие клетки *in vitro*.

Задачи исследования.

1. Изучить влияние окисленных декстранов с молекулярной массой 35 кДа и 60 кДа (декстраналя-35 и декстраналя-60) и их конъюгатов с гидразидом изоникотиновой кислоты (декстразида-35 и декстразида-60) на показатели жизнеспособности перитонеальных клеток, показатели адгезивной активности перитонеальных макрофагов и плотность клеточного монослоя перитонеальных клеток для оценки свойств их биосовместимости.

2. Исследовать влияние молекулярно-наносомальных гибридных композиций на изменение показателей жизнеспособности перитонеальных клеток, показателей адгезивной активности перитонеальных макрофагов и плотности клеточного монослоя перитонеальных клеток в зависимости от вариантов физико-химических параметров молекулярно-наносомальных гибридных композиций, определяемых размерами нанолипосом (в диапазоне 150-800 нм) и молекулярной массой входящих в их состав окисленных декстранов (35 кДа и 60 кДа) и их конъюгатов с гидразидом изоникотиновой кислоты, для оценки свойств их биосовместимости.

3. Изучить влияние физико-химических параметров молекулярно-наносомальных гибридных композиций, задаваемых размерами нанолипосом (в диапазоне размеров 150-800 нм) и молекулярной массой входящих в их

состав окисленных декстранов (35 кДа и 60 кДа), а также их конъюгатов с гидразидом изоникотиновой кислоты, на изменение показателей фагоцитозной активности макрофагов для оценки свойств их биотропности по доле макрофагов, фагоцитирующих нанолипосомальные композиции, и интегрального показателя количества нанолипосомальных композиций, поглощаемых отдельными макрофагами.

4. Исследовать адгезивную способность молекулярно-наносомальных гибридных композиций с размером нанолипосом 200-450 нм, содержащими окисленные декстраны с молекулярной массой 35 кДа и 60 кДа, конъюгированные с гидразидом изоникотиновой кислоты, в отношении перитонеальных макрофагов для оценки биотропных свойств композиций.

5. Изучить влияние молекулярно-наносомальных гибридных композиций с размером 200-450 нм, содержащими окисленные декстраны с молекулярной массой 35 кДа и 60 кДа, конъюгированными с гидразидом изоникотиновой кислоты, на показатели фагосомно-лизосомного слияния в отношении тестируемого корпускулярного агента (гранул зимозана) для оценки биостимулирующих свойств композиций.

6. Изучить влияние молекулярно-наносомальных гибридных композиций с размером 200-450 нм, содержащими окисленные декстраны с молекулярной массы 35 кДа и 60 кДа, конъюгированными с гидразидом изоникотиновой кислоты, на показатели продукции макрофагами гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и антиапоптотического белка Bcl-2, экспрессии кластера дифференцировки CD25 на мембранах макрофагов, в качестве маркеров активации макрофагов, для оценки их биостимулирующих свойств.

Научная новизна. Впервые проведено комплексное изучение свойств, характеризующих биосовместимость, биотропность и биологическую активность новых молекулярно-наносомальных гибридных композиций липосомальной формы, полученных на основе окисленных декстранов, в зависимости от физико-химических параметров композиций для разработки средств адресной доставки биологически активных веществ и лекарственных средств.

Впервые установлено, что окисленные декстраны с различной молекулярной массой и молекулярно-наносомальные гибридные композиции липосомальной формы, полученные на основе окисленных декстранов и их конъюгатов с гидразидом изоникотиновой кислоты, обладают высокой биосовместимостью в отношении перитонеальных клеток.

Впервые установлено, что биосовместимость, биотропность и биологическая активность, исследуемых молекулярно-наносомальных гибридных композиций зависит от их физико-химических параметров: размеров нанолипосом, молекулярной массы окисленных декстранов и их конъюгатов с гидразидом изоникотиновой кислоты, входящих в состав композиций.

Впервые при комплексном анализе полученных результатов установлено, что к наиболее оптимальной форме молекулярно-наносомальных гибридных композиций (в качестве средства адресной доставки биологически активных

веществ в клетки системы мононуклеарных фагоцитов на примере гидразида изоникотиновой кислоты – противотуберкулезного препарата), следует отнести композиции с размерами нанолипосом 200-450 нм на матрице-носителе - окисленном декстране с молекулярной массой 60 кДа - по параметрам биосовместимости, биотропности и высокой биостимулирующей активности в отношении макрофагов.

Впервые показано, что свойства биосовместимости, биотропности и биостимуляции в отношении макрофагов определяются не только суммой соответствующих свойств компонентов, входящих в состав молекулярно-наносомальных гибридных композиций, а представляют собой новое качество, формирующееся при конструировании нанолипосомальных композиций, зависящее от их физико-химических характеристик, задаваемых размерами нанолипосом и молекулярной массой окисленных декстранов, входящих в их состав.

Обоснована вероятная эффективность применения изучаемых молекулярно-наносомальных гибридных композиций в качестве средств направленной доставки биологически активных веществ.

Научно-практическая значимость работы. Исследование выполнено в рамках гранта Федеральной целевой научно-технической программы "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007 – 2012 годы" в соответствии с государственным контрактом № 02.513.11.3183 от «23» апреля 2007 года «Разработать технологию конструирования молекулярно-наносомальных гибридных биосовместимых композиций для адресной доставки биологически активных веществ в клетки и клеточные системы».

Результаты исследования могут быть использованы при разработке средств направленной доставки биологически активных веществ или лекарственных средств с заданными биологически активными свойствами в клетки и органы-мишени, в частности, для лечения ряда заболеваний, в основе которых лежит гранулематозное воспаление.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Окисленные декстраны с молекулярной массой 35 кДа и 60 кДа (декстраналь-35 и декстраналь-60) обладают высокой биосовместимостью в отношении перитонеальных клеток.
2. Конъюгаты окисленных декстранов с гидразидом изоникотиновой кислоты (декстрозид-35 и декстрозид-60) обладают более низкой биосовместимостью по сравнению с декстраналем-35 и декстраналем-60.
3. Молекулярно-наносомальные гибридные композиции, включающие окисленные декстраны или их конъюгаты с гидразидом изоникотиновой кислоты, обладают высокой биотропностью в отношении клеток системы мононуклеарных фагоцитов. Биотропность молекулярно-наносомальных гибридных композиций возрастает при уменьшении размеров нанолипосом.
4. Молекулярно-наносомальные гибридные композиции с размерами нанолипосом 200-450 нм, включающие окисленные декстраны или их конъюгаты с гидразидом изоникотиновой кислоты, обладают

биостимулирующими свойствами в отношении клеток системы мононуклеарных фагоцитов: стимулируют процесс фагосомно-лизосомного слияния, продукцию гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора GM-CSF и внутриклеточного антиапоптотического белка Bcl-2, повышают экспрессию кластера дифференцировки CD25 на мембранах макрофагов.

5. Молекулярно-наносомальные гибридные композиции с размерами нанолипосом 200-450 нм, содержащие окисленные декстраны с молекулярной массой 60 кДа, обладают более высоким биостимулирующим действием по сравнению с композициями, содержащими окисленные декстраны с молекулярной массой 35 кДа.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены автором в отчетах НИР по гранту Федеральной целевой научно-технической программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007 – 2012 годы» (в отдельных главах отчетов по 1, 2, 3, 4 этапам) в соответствии с государственным контрактом № 02.513.11.3183 от «23» апреля 2007 года «Разработать технологию конструирования молекулярно-наносомальных гибридных биосовместимых композиций для адресной доставки биологически активных веществ в клетки и клеточные системы». Материалы диссертации обсуждались на межлабораторных семинарах отдела общей патологии Государственного учреждения Научный центр клинической и экспериментальной медицины СО РАМН (2007, 2008). Основные идеи диссертации нашли отражение в 3 опубликованных журнальных статьях. Работа была обсуждена на кафедре гистологии, эмбриологии и цитологии ГОУ Сибирского государственного медицинского университета Росздрава 10 октября 2008 г. и рекомендована к защите.

Публикации. По материалам научного исследования опубликовано 5 научных работ, из них 3 статьи в журнале, рекомендованном ВАК РФ для публикации материалов диссертации на соискание ученой степени кандидата наук.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, глав "Результаты исследования" и "Обсуждение результатов", выводов и библиографического указателя. Работа изложена на 151 странице машинописного текста, иллюстрирована 28 рисунками и 5 таблицами. Список литературы включает 237 источника (69 отечественных и 168 зарубежных).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методы получения и культивирования перитонеальных клеток

Работа выполнена на 90 самцах мышей линии BALB/c (возраст 2 мес., масса тела 21-22 г., из вивария Института цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск). В каждом эксперименте *in vitro* для посадки клеток в культуру использовали пулированные транссудаты перитонеальных клеток (от 6-12 мышей в зависимости от количества посадок клеток в культуры, из расчета не менее 1 животного на три культуры). Животных умерщвляли

методом дислокации шейных позвонков под эфирным наркозом. Перитонеальный транссудат получали путем введения в брюшную полость 3,5 мл среды RPMI 1640 («Биолот», С.-Петербург), содержащей гентамицин (50мкг/мл), по стандартной методике (Конки Д., 1989). Перитонеальные клетки культивировали на покровных стеклах (10^6 клеток в 2 мл культуральной среды RPMI 1640), содержащей 10% сыворотки эмбрионов коров и гентамицин (50мкг/мл), в стеклянных флаконах при температуре 37^0 С.

Методы исследования структурно-размерных параметров молекулярно-наносомальных гибридных композиций (МНГК)

Исследовали МНГК липосомальной формы, разработанные и полученные в группе биохимии биосовместимых наночастиц и наноматериалов отдела общей патологии ГУ НЦКЭМ СО РАМН. В качестве источников декстрана М.м. 35 кДа использовали плазмозамещающий раствор «Реополиглюкин». В качестве источника декстрана М.м. 60 кДа использовали плазмозамещающий раствор «Полиглюкин». Для получения образцов окисленных декстранов использовали перманганатный способ окисления. Получение МНГК на основе фосфатидилхолина (Sigma, USA), содержащих окисленные декстраны и их конъюгаты с гидразидом изоникотиновой кислоты (ГИНК), осуществляли методом механического диспергирования и микрофльтрационного фракционирования (вортексирования). Образцы МНГК разводили в дистиллированной воде в 5 раз и заключали под покровное стекло на предметном стекле для последующего микроскопического исследования. Исследование проводили методом фазового интерференционного контраста на микроскопе AxioImager Z1 (Zeiss) с использованием цифровой камеры AxioCam MRc и программного обеспечения AxioVision V. 4.5. Цифровые изображения нанолипосом бинаризовали по яркости, автоматический анализ и измерение изображений проводили при помощи программы ВидеоТест Морфо 3.2 с последующим транспонированием и статистической обработкой в программе Statistica V.6.

Методы оценки биологических свойств МНГК и их компонентов.

МНГК и их компоненты

Опытные образцы МНГК представляли собой суспензии нанолипосом (НЛ), содержащие декстранали (DX) или конъюгаты DX (М.м. 35 или 60 кДа) с ГИНК декстразиды (DXZ), заключенные в НЛ, в трис-фосфатном буфере, содержащим соответствующие DX или DXZ в концентрации 2,5%. По данным исследования структурно-размерных параметров МНГК исследуемые образцы содержали НЛ, находящиеся в 3-х наноразмерных диапазонах: 150-200, 200-450 и 450-800 нм.

Методы оценки биосовместимости МНГК и их компонентов

Степень биосовместимости МНГК и их компонентов оценивали по количеству адгезированных перитонеальных клеток, числу макрофагов (МФ) с высокой степенью распластывания и показателю жизнеспособности клеток в культурах. МНГК, а также их компоненты (DX и DXZ) вносили в культуры

перитонеальных клеток на 2-й час культивирования (в конечном разведении 1:200). Оценку всех параметров клеточных культур, характеризующих их биосовместимость с исследуемыми образцами МНГК или их компонентами, проводили через 24 часа после внесения в культуры клеток.

Показатель жизнеспособности оценивали при помощи витальной окраски клеток трипановым синим. После окрашивания клетки фотографировали на микроскопе Axiostar Plus (Zeiss) при помощи цифровой фотокамеры Nikon Coolpix 5000 при увеличении объектива $\times 20$. В 5-х полях зрения подсчитывали общее количество всех типов перитонеальных клеток, количество живых клеток (не окрасившихся трипановым синим), количество распластанных МФ. Показатель жизнеспособности (ПЖ) рассчитывали по формуле:

$$\text{ПЖ} = (N \text{ жив. кл.} / N \text{ всех кл.}) \times 100\%;$$

где N жив. кл. – количество живых клеток; N всех кл. – количество всех клеток

По аналогичной формуле рассчитывали среднюю величину плотности клеточного монослоя (среднего числа адгезированных перитонеальных клеток в одном поле зрения) и среднюю величину (долю в %) числа МФ с высокой степенью распластывания.

Методы оценки параметров, характеризующих биотропность МНГК **Методы оценки фагоцитозной активности МФ в отношении МНГК**

Для определения биотропных свойств МНГК и их компонентов оценивали фагоцитозную активность перитонеальных МФ в отношении МНГК, а также адгезивную способность нанولیпосом МНГК в отношении мембран МФ. Оценку фагоцитозной активности МФ, проводили через 24 часа после внесения в культуры клеток МНГК. После инкубации с МНГК клеточные культуры фиксировали в 4% растворе формальдегида (4% раствор в фосфатном буфере). Для выявления нанولیпосом клетки окрашивали липофильным красителем суданом черным ($C_{29}P_{24}N_8$, 0,25% раствор в 70% этаноле), отмывали дистиллированной водой и окрашивали сафранином (1% водный р-р). Далее окрашенные препараты помещали на предметное стекло «клетками вниз». Между предметным и покровным стеклами вносили раствор фосфатного буфера. Клетки фотографировали на микроскопе AxioImager Z1 (Zeiss) при помощи цифровой камеры высокого разрешения AxioCamHr при установленных увеличениях объектива $\times 40$ и $\times 100$. При увеличении объектива $\times 40$ в 10-ти полях зрения подсчитывали общее число МФ и количество МФ, содержащих в цитоплазме окрашенные нанولیпосомы. Рассчитывали индекс фагоцитоза (ИФ) по формуле:

$$\text{ИФ} = (N \text{ фагоцит. МФ} / N \text{ всех МФ}) \times 100\%;$$

где N фагоцит. МФ – количество макрофагов, фагоцитирующих МНГК;
 N всех МФ – количество всех МФ.

Оценку условного показателя количества МНГК, фагоцитированных МФ, проводили методом компьютерной морфометрии при помощи программы ВидеоТест-Морфо 3.2. Цифровые изображения клеток (при увеличении об.

x100) бинаризовали по цвету судана черного, а среднее значение суммы площадей (pixel²) бинарных изображений МНГК, окрашенных суданом черным, принимали за условный показатель их суммарного содержания в одном МФ (при анализе клеток в 10-ти полях зрения).

Методы оценки адгезивной способности МНГК к мембранам МФ

Адгезивные свойства МНГК оценивали по показателю адгезии НЛ к перитонеальными МФ. Образцы МНГК с размерами 200-450 нм, включающие DXZ-35 и DXZ-60, вносили в культуры перитонеальных клеток на 3-й час культивирования. Оценку адгезивной способности МНГК в отношении МФ проводили через 1, 3, 5, 10, 15 и 20 минут после внесения МНГК в культуры клеток. Для выявления НЛ на поверхности МФ фиксированные клетки окрашивали липофильным красителем суданом черным, отмывали дистиллированной водой и окрашивали сафранином (1% водный раствор). Окрашенные препараты помещали на предметное стекло «клетками вверх» в растворе фосфатного буфера и заключали под второе покровное стекло. Клетки фотографировали на микроскопе AxioImager Z1 (Zeiss) с помощью цифровой камеры AxioCamHr при установленных увеличениях объектива x40 и x100 с использованием модуля оптического сканирования Z-stacker программы AxioVision v. 3.5 (Zeiss), позволяющего делать фотографии «оптических срезов» исследуемых объектов заданной «толщины». Для оценки адгезивной способности НЛ использовали фотографии 2-х верхних оптических «срезов» клеток (шаг – 200 нм), на которых регистрировались адгезированные на клетках НЛ. Рассчитывали количество (долю в %) МФ с адгезированными на них НЛ, а также индекс адгезивной способности - условный показатель количества НЛ, адгезированных на одной клетке-мишени (МФ), пропорциональный их числу на поверхности МФ. Оценку индекса адгезивной способности МНГК проводили методом компьютерной морфометрии при помощи программы Видео Тест-Морфо 3.2. Цифровые изображения клеток бинаризовали по цвету судана черного, а среднее значение суммы площадей (pixel²) бинарных изображений НЛ, окрашенных суданом черным, принимали за условный средний показатель суммарного их содержания на поверхности МФ (при анализе клеток в 5-ти полях зрения, при увеличении об. x40).

Методы определения биоактивных свойств МНГК

Метод оценки влияния МНГК на процессы фагосомно-лизосомного слияния в МФ

Для оценки влияния МНГК на процессы фагосомно-лизосомного слияния в МФ использовали следующую экспериментальную модель. Исследуемые МНГК размерами 200-450 нм, содержащие DXZ-35 или DXZ-60, вносили на 3-й час после посадки клеток в культуру. Клетки инкубировали с МНГК в течение 24 часов (в конечном разведении 1:300). Далее инкубационную среду, содержащую МНГК, заменяли на аналогичную по составу среду для культивирования, содержащую гранулы зимозана (лиофилизированные дрожжеподобные грибки *Saccharomyces cerevisiae*). Через 0,5 час после

инкубации клеток с гранулами зимозана, в культуры вносили среду, содержащую лизосомотропный краситель акридиновый оранжевый (10 мкг/мл). Количество образующихся в фагоцитах фаголизосом определяли по числу гранул зимозана, окрашенных в оранжево-красный цвет (Булычев А.Г., 1991; Kielian M., Cohn F.A., 1982; Travers M.A., 2008). По количеству неокрашенных акридиновым оранжевым гранул зимозана, фагоцитированных МФ, оценивали число фагосом, не слившихся с лизосомами. После окрашивания клетки исследовали при помощи микроскопа AxioImager Z1 в режиме флуоресцентного анализа клеток. Окрашенные клетки фотографировали при увеличении объектива $\times 100$. Рассчитывали среднее количество МФ с относительно высоким уровнем фагосомно-лизосомного слияния (долю МФ в %, в которых количество фаголизосом > 5) и условный показатель уровня фагосомно-лизосомного слияния в МФ (среднее число фаголизосом в МФ с высоким уровнем фагосомно-лизосомного слияния, к которым относили МФ при наличии > 5 фаголизосом на клетку) при анализе 10-ти полей зрения.

Иммуноцитохимические (ИЦХ) методы выявления внутриклеточной продукции фактора GM-CSF и антиапоптотического белка Bcl-2, экспрессии кластера дифференцировки CD 25 на мембранах МФ

Для изучения биологической активности МНГК использовали непрямой ИЦХ-метод оценки экспрессии цитокинов и кластеров дифференцировки. Анализ проводили через 24 часа после внесения исследуемых композиций в первичные культуры перитонеальных клеток (МНГК в конечном разведении 1:200 вносили на 3-й час после посадки клеток в культуру). Клетки фиксировали в 4% растворе формальдегида (в фосфатном буфере), демаскировку антигенов проводили при инкубировании с тритоном X-100 (0,3% раствор в фосфатном буфере). Далее препараты клеточных культур инкубировали с «первыми» антителами к соответствующим антигенам/маркерам: GM-CSF (Rat Anti-Mouse GM-CSF; Isotype: Rat IgG2a), CD 25 (Biotin Rat Anti-Mouse CD 25; Isotype: Rat IgM4), Bcl-2 (Hamster Anti-Mouse Bcl-2; Isotype: Armenian Hamster IgG) во влажной камере. Препараты, обработанные небиотинилированными крысиными антителами, дополнительно инкубировали с антикрысиными биотинилированными антителами овцы (biotin-conjugated goat anti-rat Ig specific polyclonal antibody) во влажной камере. Препараты, обработанные небиотинилированными Hamster Anti-Mouse Bcl-антителами, дополнительно инкубировали с биотинилированными антителами Mouse Anti-Hamster (Isotype: Mouse BALB/c, IgG) во влажной камере (30 мин). Все препараты, инкубированные с биотинилированными антителами, инкубировали со стрептавидин-пероксидазным комплексом. Далее окраску препаратов проводили в растворе диаминобензидина (DAB) с субстратом, содержащим H_2O_2 , (использовали стандартный BD DAB Kit). Клетки отмывали от свободного DAB дистиллированной водой, препараты высушивали и докрашивали водным 1% раствором метилового зеленого. Все процедуры ИЦХ-окраски клеток проводили при комнатной температуре. Зоны клеточных мембран или

цитоплазмы, содержащие выявляемые маркеры, окрашивались в «специфический» темно-коричневый цвет. Интенсивность такой окраски прямо пропорциональна количеству экспрессируемого маркера. Биоактивные свойства МНГК оценивали по количеству (доле в %) клеток, экспрессирующих оцениваемый маркер. Дополнительно оценивали уровни продукции соответствующего маркера по условному показателю, оцениваемому в баллах (1 - низкий уровень продукции, 2 – средний уровень продукции, 3 – высокий уровень продукции). Рассчитывали среднюю величину этого показателя в каждой экспериментальной группе культур.

Вероятность достоверности различий между средними величинами исследуемых показателей в экспериментальных группах культур оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Вычисляли стандартную величину (M), стандартную ошибку среднего (m). Данные представлены в виде $M \pm m$. Различия считали достоверными при $P < 0,05$. Полученные данные были статистически обработаны с помощью лицензированных пакетов программ «Statistica V. 6» и Excel (2002).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Конструирование МНГК представляет собой процесс подбора составных компонентов, каждый из которых имеет индивидуальные характеристики и способен оказывать определенное воздействие на клетки. Размеры НЛ могут определять интенсивность их захвата МФ. Однако в зависимости от размеров МНГК характеризуются различной внутриклеточной стабильностью и могут либо активировать фагоциты, если компоненты МНГК обладают таким действием, либо подавлять жизнедеятельность клеток, если в процессе внутриклеточного разрушения МНГК образуются компоненты с деструктивно-цитотоксическим действием. При создании МНГК с заданными параметрами, предназначенных для модуляции свойств клеток и клеточных систем, необходимо определить и учесть биологические эффекты их компонентов в отдельности. Для определения биологических эффектов МНГК и их компонентов на клетки и клеточные системы была проведена оценка свойств их биосовместимости, биотропности и биоактивности.

Результаты исследования структурно-размерных параметров НЛ

На основании результатов испытаний было установлено, что примененный метод получения МНГК позволяет получать НЛ в диапазоне размеров 150 – 800 нм. Установлено, что при этом в зависимости от диаметра пор фильтра, используемого для вортексирования, получается суспензия НЛ, более 90% которой обладают следующими характеристиками: при использовании фильтра с диаметром пор 0,8 мкм размер получаемых НЛ находится в пределах 450-800 нм ($M=640,7 \pm 7,9$); при использовании фильтра с диаметром пор 0,45 мкм размер получаемых НЛ находится в пределах 200 - 450 нм ($M=302,4 \pm 3,1$); при использовании фильтра с диаметром пор 0,2 мкм размер получаемых НЛ находится в пределах 150 - 200 нм ($M=174,2 \pm 2,1$).

Оценка свойств биосовместимости МНГК и их компонентов

Изучение свойств биосовместимости компонентов МНГК

Для сравнения свойств биосовместимости DX-35 и DX-60 были проанализированы показатели плотности клеточного слоя, жизнеспособности всех перитонеальных клеток (% живых клеток) и показатели адгезивной активности перитонеальных МФ (% МФ с высокой степенью распластывания). Не было выявлено различий в показателях биосовместимости DX-35, DX-60 по сравнению с контрольной группой. Показатель адгезивной активности МФ максимален для DX-35, показатели жизнеспособности всех перитонеальных клеток сравнимы для DX-35, DX-60 и контрольной группы (таблица 1). Отсутствие влияния DX на жизнеспособность клеток в культуре, без нарушений адгезивной активности МФ, свидетельствует о высокой степени их биосовместимости.

Таблица 1

Влияние декстранов, окисленных химическим способом (декстраналей), на перитонеальные клетки *in vitro* в зависимости от их молекулярной массы ($M \pm m$)

Опытный образец	Плотность клеточного монослоя	Показатель жизнеспособности всех перитонеальных клеток (%)	Показатель адгезивной активности перитонеальных МФ (%)
декстраналь-35	617,0±114,8	91,5± 1,8	33,4±7,7*
декстраналь-60	591,5±62,1	88,1±2,7	21,5±2,3
Контроль	861,9±54,7	90,7±1,4	16,7±4,9

Примечание: P - вероятность достоверности различий между средними величинами исследованных показателей в опыте (внесение декстраналей) и контроле (интактная культура перитонеальных клеток): *P<0,05 (количество культур в каждой группе опыта - 5, в контроле - 7).

Сравнительный анализ показателей плотности клеточного слоя, показателя жизнеспособности всех перитонеальных клеток (% живых клеток) и показателя адгезивной активности перитонеальных МФ (% МФ с высокой степенью распластывания) выявил снижение биосовместимости DXZ-35 и DXZ-60 по сравнению с DX-35 и DX-60. Плотность клеточного монослоя и показатель жизнеспособности перитонеальных клеток с DXZ-35 и DXZ-60 снижены. Однако показатели адгезивной активности МФ при воздействии DXZ сравнимы с таковыми в контроле. Снижение плотности клеточного монослоя перитонеальных клеток при инкубации с DXZ характеризовалось уменьшением количества (доли, в %) лимфоцитов в культурах и, соответственно, увеличением доли МФ в составе монослоя. Вероятно, этот эффект обусловлен снижением адгезивной активности лимфоцитов при наличии в культуральной среде DXZ (таблица 2).

Таблица 2

Влияние декстразидов на перитонеальные клетки *in vitro* в зависимости от молекулярной массы окисленных декстранов ($M \pm m$)

Опытный образец	Плотность клеточного монослоя	Показатель жизнеспособности всех перитонеальных клеток (%)	Показатель адгезивной активности перитонеальных МФ (%)
декстразид-35	386,6±30,0*	69,9±6,4**	17,6±2,8*
декстразид-60	351,3±12,4*	66,6±8,3**	35,8±5,6
Контроль	675,0±9,7	91,2±7,0	65,1±29,1

Примечание: P - вероятность достоверности различий между средними величинами исследованных показателей в опыте (внесение декстразидов) и контроле: *P<0,05; **P<0,01 (количество культур в каждой группе опыта - 5, в контроле - 7).

Изучение свойств биосовместимости нанолипосомальных форм МНГК трех размеров, содержащих DX и DXZ с М.м. 35 и 60 кДа

Были проанализированы показатели биосовместимости МНГК, содержащих декстранали М.м. 35 и 60 кДа, в трех размерных диапазонах НЛ: 150-200 нм, 200-450 нм и 450-800 нм (таблица 3).

Таблица 3

Влияние МНГК на перитонеальные *in vitro* в зависимости от размеров нанолипосом и М.м. декстраналей ($M \pm m$)

Опытный образец МНГК	Плотность клеточного монослоя	Показатель жизнеспособности всех перитонеальных клеток (%)	Показатель адгезивной активности перитонеальных МФ (%)
МНГК 150-200 нм с декстраналем-35	492,4 ±32,4*	79,8±1,6*	27,0±14,6***
МНГК 150-200 нм с декстраналем-60	509,8±25,4*	81,5±5,5	36,9±12,0***
МНГК 200-450 нм с декстраналем-35	470,5±43,4*	75,3±2,8*	84,3±9,8
МНГК 200-450 нм с декстраналем-60	527,8±21,9*	68,6±5,7**	15,1±7,7***
МНГК 450-800 нм с декстраналем-35	445,8±45,3	76,7±9,0	19,1±4,1***
МНГК 450-800 нм с декстраналем-60	667,6±75,3	79,7±9,0	19,1±4,1***
Контроль	681,0±13,3	91,1±4,0	97,7±24,3

Примечание: P - вероятность достоверности различий между средними величинами показателей в опыте (внесение МНГК) и контроле: *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 (количество культур в каждой группе опыта - 5, в контроле - 7).

Внесение в культуру перитонеальных клеток МНГК с DX М.м. 35 или 60 кДа снижало плотность клеточного монослоя, за исключением МНГК с размерами НЛ 450-800 нм и DXZ с М.м. 60 кДа. Максимальные показатели жизнеспособности перитонеальных клеток при оценке МНГК с DX М.м. 35 и 60 кДа в НЛ 450-800нм и с DXZ-60 в НЛ 150-200 нм. Показатель адгезивной активности перитонеальных МФ снижался при внесении в культуральную среду МНГК с DXZ М.м. декстрановых матриц 35 и 60 кДа (таблица 3).

При сравнении показателей биосовместимости МНГК с DXZ М.м. 35 и 60 кДа с размерами НЛ 150-200 нм, 200-450 нм и 450-800 нм были отмечены следующие особенности. Плотность клеточного монослоя с МНГК, содержащих DXZ М.м. 35 и 60 кДа с размерами НЛ 150-200 нм, 200-450 нм и 450-800 нм, не снижалась относительно контроля. МНГК с DXZ-35 и размерами НЛ 450-800 нм уменьшали плотность клеточного монослоя. Показатели жизнеспособности всех перитонеальных клеток в большинстве опытных группах культур оставались высокими, кроме культур при воздействии МНГК с DXZ-60 и размеров НЛ 450-800 нм. Большинство образцов МНГК с DXZ М.м. 35 и 60 кДа с размерами НЛ в диапазоне 150-800 нм снижали показатели адгезивной активности перитонеальных МФ по сравнению с контролем, кроме МНГК с DXZ-35 кДа и размерами НЛ 150-200 нм (таблица 4).

Таблица 4

Влияние МНГК на перитонеальные клетки *in vitro* в зависимости от размеров МНГК и М.м. декстранов, конъюгированных с ГИНК (M±m)

Опытный образец МНГК	Плотность клеточного монослоя	Показатель жизнеспособности всех перитонеальных клеток (%)	Показатель адгезивной активности перитонеальных МФ (%)
МНГК 150-200нм с декстразидом-35	584,4±48,8	67,9±19,2	44,7±22,4
МНГК 150-200 нм с декстразидом-60	890,5±25,2	95,2±4,2	3,3±0,7***
МНГК 200-450 нм с декстразидом-35	521,8±82,8	72,8±9,6	16,4±21,9**
МНГК 200-450 нм с декстразидом-60	517,1±77,2	70,1±9,7	18,0±6,0**
МНГК 450-800 нм с декстразидом-35	389,1±85,5*	85,4±3,4	9,1±4,0***
МНГК 450-800 нм с декстразидом-60	615,5±6,2	65,4±10,9*	35,4±11,2**
Контроль	675,0±9,7	91,2±7,0	65,1±9,1

Примечание: P - вероятность достоверности различий между средними величинами показателей в опыте (внесение МНГК) и контроле: *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001 (количество культур в каждой группе опыта - 5, в контроле - 7).

Оценка свойств биотропности МНГК, содержащих декстранали, конъюгированные с ГИНК

Одним из главных условий, которое необходимо учитывать при разработке наноразмерных материалов для направленной доставки и воздействия на биологические мишени является обладание ими биотропных свойств, а также возможность их визуализации при мониторинге их направленной доставки в биологические мишени. Поэтому на втором этапе исследования была проведена оценка поглощения разрабатываемых МНГК фагоцитирующими клетками – МФ, а также адгезивная способность липосомальной формы МНГК в отношении мембран МФ.

Оценка фагоцитозной активности перитонеальных МФ в отношении МНГК, содержащих декстранали, конъюгированные с ГИНК

Для оценки свойств биотропности МНГК, содержащих DXZ с М.м. декстрановых матриц 35 и 60 кДа, с размерами НЛ в диапазоне 150-800 нм были проведены сравнения индекса фагоцитоза (ИФ) МФ по % МФ, содержащих в цитоплазме фагосомы, и сравнения условного показателя количества фагоцитированных липосом МФ (таблица 5).

Таблица 5

Фагоцитозная активность перитонеальных МФ в отношении нанолипосом, входящих в состав МНГК, в зависимости от размеров нанолипосом и М.м. окисленных декстранов, конъюгированных с гидразидом изоникотиновой кислоты

Экспериментальная группа	Количество МФ, фагоцитирующих нанолипосомы (%)	Условный показатель количества нанолипосом, поглощенных фагоцитирующим МФ (Pixel ²)
МНГК 150-200нм с декстразидом-35	99.2±0.5**	7700.5±65.4**
МНГК 150-200 нм с декстразидом-60	98.0±0.7**	7010.0±53.2**
МНГК 200-450 нм с декстразидом-35	98.1±0.6**	7100.3±70.4**
МНГК 200-450 нм с декстразидом-60	95.0±3.2**	6920.9±60.8**
МНГК 450-800 нм с декстразидом-35	82.5±2.58	5150.0±55.4
МНГК 450-800 нм с декстразидом-60	70.6±6.6	3350.5±70.8

Примечание. Р - вероятность достоверности различий между средними величинами показателей в группе с МНГК НЛ 450-800 нм и декстразидом-60 и аналогичными показателями в других экспериментальных группах культур: **P<0,01 (количество культур в каждой группе эксперимента – 5).

При сравнении экспериментальных групп было выявлено, что ИФ МФ, культивированных с МНГК в размерном диапазоне нанолипосом 150-450 нм, выше ИФ МФ при оценке НЛ форм МНГК с размерами 450-800 нм не зависимо от М.м. DXZ, входящих в состав МНГК.

Таким образом, наиболее эффективное поглощение МНГК МФ отмечали при использовании в составе МНГК НЛ в размерном диапазоне 150-450 нм. При этом к главному фактору, определяющему биотропность МНГК в отношении МФ, отнесен размер частиц. Биотропность МНГК, оцениваемая по фагоцитозу, возрастала при их уменьшении. М.м. DXZ, входящего в МНГК, существенно определяла биотропность исследуемых композиций при размерах частиц в диапазоне 450-800 нм. При этом следует принимать во внимание, что согласно технологии получения МНГК конъюгат ГИНК с окисленным декстраном находится не только внутри наносом, но и на их поверхности. Это, наряду с размерами НЛ, могло модифицировать их биотропные свойства, определившие как количество фагоцитированных НЛ, так и количество клеток, участвующих в процессе фагоцитоза при изменении физико-химических параметров исследуемых МНГК.

Оценка способности к адгезии нанолипосом МНГК, содержащих декстранали, конъюгированные с ГИНК, на мембранах МФ

Одним из главных свойств, которое необходимо учитывать при разработке наноразмерных материалов и молекулярно-наносомальных гибридных биосовместимых композиций для направленной доставки и воздействия на биологические мишени, в том числе основанных на эндоцитозной активности клеток, является обладание ими адгезивной активности при их взаимодействии с биологическими мишенями. При контакте с биологическими мембранами различных типов клеток адгезивная активность МНГК может определяться как минимум двумя составляющими – неспецифическим связыванием МНГК с поверхностью клеток, зависящим от физико-химических свойств мембран наносом, и мембран клеток (наличие различных молекул адгезии, мембранного электрического потенциала и др.), так и от «специфических» взаимодействий МНГК и клеток, обусловленных рецептор-опосредованным связыванием наносом с клеточными мембранами.

При оценке количества НЛ, адгезированных на поверхности МФ, было установлено, что уже через 10 мин после внесения НЛ в культуры клеток, более 70% МФ содержали НЛ в цитоплазме, что указывало не только на высокую скорость процесса адгезии НЛ на поверхности МФ, но и высокую скорость проникновения НЛ в МФ, очевидно обусловленную их высокой фагоцитозной активностью в отношении исследованных МНГК. Через 20 минут инкубации доля МФ, фагоцитировавших НЛ, превысила 90%. Таким образом, было установлено, что адгезивную способность НЛ в отношении МФ следует оценивать в более короткие временные интервалы, чем в предварительном эксперименте.

Для более точной оценки адгезивной способности исследуемых МНГК были исследованы образцы суспензий МНГК с DXZ-35, DXZ-60 в размерном

диапазоне 200-450 нм. Оценку проводили через 1, 3 и 5 минут после внесения исследуемых композиций в культуры перитонеальных клеток (на 3-й час после посадки клеток в культуру). Оценивали количество НЛ, адгезированных на поверхности МФ (после окраски нанолипосом суданом черным). Для визуализации ядер МФ использовали окраску сафранином. Черным цветом (окраска суданом черным) окрашивались только МНГК, структурной основой которых являются нанолипосомы.

Было установлено, что МНГК активно адгезируются на всех МФ, о чем свидетельствовало большое количество окрашенных НЛ на поверхности МФ.

Было выявлено, что через 5 минут после внесения нанолипосом в культуры перитонеальных клеток индексы адгезивной способности МНГК (отражающие количество нанолипосом, адгезированных на поверхности клеток), включающих DXZ-35, были больше по величине, чем у МНГК, включающих DXZ-60. При этом наиболее выраженные различия в адгезивной способности НЛ (эта активность определяется взаимодействием мембран НЛ с клеточной мембраной МФ) выявлены при ее оценке через 1 минуту после внесения МНГК в клеточные культуры (Рис. 1).



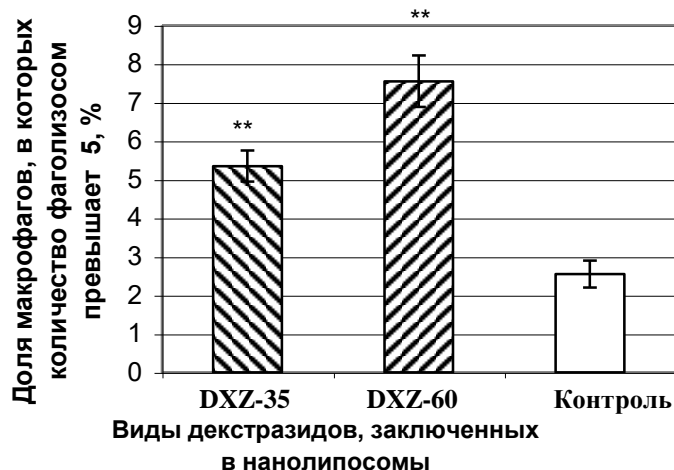
Рис. 1. Адгезивная способность МНГК с размером нанолипосом 200-450 нм с DXZ-35 и DXZ-60 в отношении перитонеальных МФ.

Вероятно, это детерминировано физико-химическими взаимо-действиями наружной мембраны НЛ, и интегрированными в её состав DXZ, с клеточными стенками, что косвенно подтверждается различиями в адгезивной способности НЛ с DXZ различной М.м., включенными в их состав.

Оценка влияния МНГК, содержащих декстразиды, на процесс фагосомно-лизосомного слияния в макрофагах, в зависимости от молекулярной массы декстрановых матриц

Учитывали МФ с количеством фаголизосом ≥ 5 для оценки доли (%) МФ, обладающих относительно высоким уровнем фагосомно-лизосомного слияния, так как единичные фаголизосомы были выявлены в большинстве МФ контрольной группы (в качестве объекта фагоцитоза использовали гранулы зимозана).

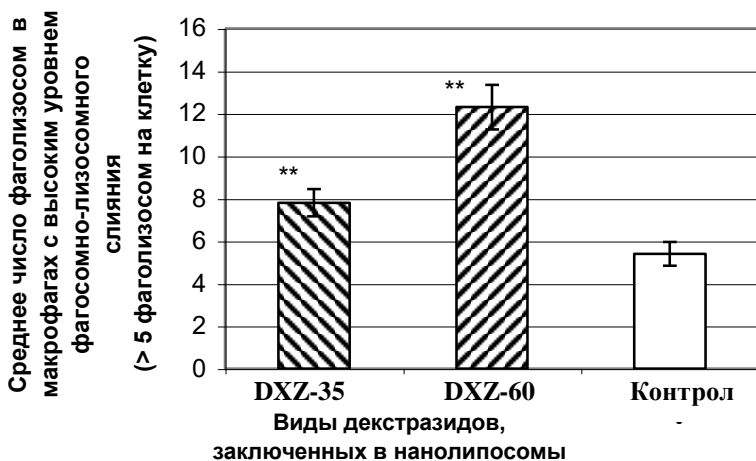
В большей степени стимуляция процесса фагосомно-лизосомного слияния проявилась при воздействии МНГК с DXZ-60. Это выразилось в увеличении доли МФ с относительно высоким уровнем фагосомно-лизосомного слияния (рис. 2).



P - вероятность достоверности различий между средними величинами исследованных показателей в опыте (внесение МНГК) и контроле (внесение буферного раствора): *P<0,05; **P<0,01.

Рис. 2. Количество макрофагов с относительно высоким уровнем фагосомно-лизосомного слияния при воздействии МНГК (НЛ размерами 200-450 нм) с декстразидом-35 и декстразидом-60 (в конечном разведении образцов 1:300) на процесс фагосомно-лизосомного слияния в макрофагах ($M \pm m$).

Аналогичные результаты были получены при оценке среднего числа фаголизосом в МФ, отнесенных к фагоцитам с относительно высоким уровнем фагосомно-лизосомного слияния (как показатель активности этого процесса в «отдельных» макрофагах) (Рис. 3).



P - вероятность достоверности различий между средними величинами исследованных показателей в опыте (внесение МНГК) и контроле (внесение буферного раствора): **P<0,01.

Рис. 3. Условный показатель уровня фагосомно-лизосомного слияния в макрофагах при воздействии МНГК (НЛ размерами 200-450 нм) с декстразидом-35 и декстразидом-60 (в конечном разведении образцов 1:300) на уровень фагосомно-лизосомного слияния в макрофагах ($M \pm m$).

В большей степени процесс фагосомно-лизосомного слияния стимулировали МНГК, содержащие DXZ-60. Это выразилось в увеличении

количества фаголизосом в МФ (учитывали МФ, в которых количество выявленных фаголизосом было не менее 5).

Таким образом, в результате проведенных экспериментов было показано, что МНГК с НЛ 200-450 нм, содержащие DXZ-35 и DXZ-60, активируют процесс фагосомно-лизосомного слияния в макрофагах при использовании в качестве объектов фагоцитоза гранул зимозана. К наиболее оптимальным по эффекту стимуляции отнесены МНГК, содержащие DXZ-60.

Оценка свойств биоактивности МНГК, содержащих декстразиды в зависимости от М.м. декстрановых матриц

Для оценки биоактивных свойств были выбраны МНГК с размером 200-450 нм. В качестве показателей активации МФ были выбраны уровни экспрессии следующих маркеров: кластера дифференцировки CD25 (выполняющего функции рецептора к IL-2), как активационного маркера МФ, принимающего участие в регуляции иммунного ответа; GM-CSF, продуцируемого активированными МФ и способствующего росту и дифференцировке полипотентных гемопоэтических клеток-предшественников гранулоцитов и МФ; Vcl-2, антиапоптотического внутриклеточного белка-регулятора.

Анализ эффектов исследуемых МНГК показал увеличение экспрессии CD25 на мембранах МФ при воздействии МНГК с DXZ-35 и DXZ-60, а также PolyI:PolyC (активатор МФ) относительно соответствующего показателя в контроле (рис.4).

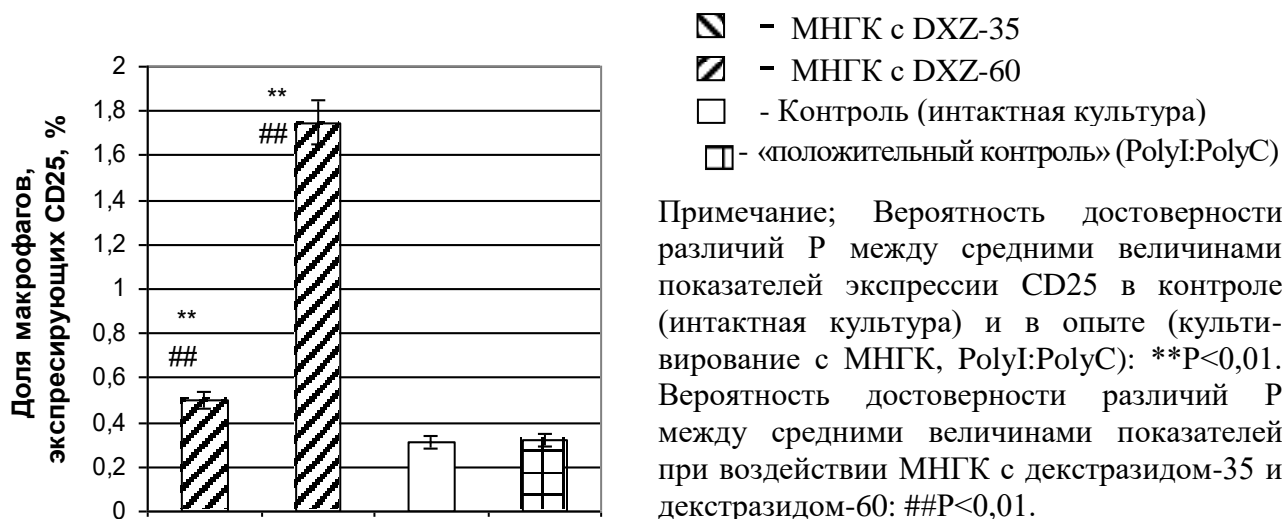


Рис. 4. Количество макрофагов, экспрессирующих CD25, при воздействии МНГК (находящихся в наноразмерном диапазоне 200-450 нм) с декстразидом-35 и декстразидом-60 (M±m).

Наибольшую экспрессию CD25 индуцировали МНГК с DXZ-60 по сравнению с МНГК, содержащими DXZ-35. Внесение в среду для культивирования PolyI:PolyC в конечной концентрации 25 мкг/мл (рассматривался как «положительный» контроль с точки зрения ожидаемого эффекта активации макрофагов в ответ на указанный стимул) не изменило доли МФ, экспрессирующих CD25, по сравнению контрольной группой.

При оценке уровня экспрессии кластера дифференцировки CD25 на мембранах отдельных МФ был отмечен активационный эффект PolyI:PolyC - повышение экспрессии CD25 в 2 раза относительно контроля (рис. 5).



Рис. 5. Уровни экспрессии CD25 в активированных макрофагах при воздействии МНГК (находящихся в наноразмерном диапазоне 200-450 нм) с декстразидами-35 и декстразидами-60 ($M \pm m$).

Аналогичное повышение активности отмечено при оценке МНГК, содержащих DXZ-60. Культивирование МФ с МНГК, содержащими DXZ-35, не изменяло уровня экспрессии CD25 на мембранах МФ (рис 6).

Таким образом, по результатам оценки количества МФ, экспрессирующих кластер дифференцировки CD25, и экспрессии активационного маркера CD25 на мембранах отдельных МФ, наиболее выраженная активация МФ наблюдается при воздействии на клетки МНГК, содержащих DXZ-60.

Внесение в культуру перитонеальных клеток МНГК, содержащих DXZ-35 и DXZ-60, значительно увеличило долю МФ, экспрессирующих GM-CSF по сравнению контрольной группой и культурами, в которые вносили PolyI:PolyC. При воздействии МНГК с DXZ-35 доля МФ, продуцирующих GM-CSF, возросла в 26,1 раз относительно показателя контрольных культур. А внесение в культуральную среду МНГК с DXZ-60 увеличило продукцию GM-CSF более чем в 30 раз в сравнении с показателями контрольной культуры и оказалось выше количества продуцирующих GM-CSF МФ, инкубированных с PolyI:PolyC и с МНГК, содержащих DXZ-35. (рис. 6).



Рис. 6. Количество макрофагов, продуцирующих GM-CSF, при воздействии МНГК (находящихся в наноразмерном диапазоне 200-450 нм) с декстразидом-35 и декстразидом-60 ($M \pm m$).

Культивирование с PolyI:PolyC стимулировало продукцию GM-CSF в меньшем количестве МФ – их доля в 5 раз меньше по сравнению с числом МФ, инкубированных МНГК, содержащих DXZ-35 (составила в среднем 6,6%). При дополнительной оценке уровней экспрессии GM-CSF в отдельных МФ было отмечено, что внесение в культуральную среду как PolyI:PolyC, так и МНГК, содержащих DXZ, достоверно повышает величину продукции GM-CSF (рис. 7).



Рис. 7. Уровни продукции GM-CSF в активированных макрофагах при воздействии МНГК (находящихся в наноразмерном диапазоне 200-450 нм) с декстразидом-35 и декстразидом-60 ($M \pm m$).

При сравнении влияния DXZ-35 и DXZ-60 в составе МНГК на МФ наиболее выраженный активационный эффект наблюдался при воздействии МНГК с DXZ-60. Также более высокий уровень продукции GM-CSF в МФ

наблюдался при воздействии DXZ-60 в составе МНГК в сравнении с показателями активации группы «положительного» контроля с PolyI:PolyC.

Таким образом, по результатам оценки продукции GM-CSF в МФ наиболее выраженный эффект активации МФ наблюдался при воздействии на клетки МНГК, содержащих DXZ-60.

При ИЦХ-анализе способности МФ продуцировать антиапоптотический белок Bcl-2 в контроле было установлено, что 95% МФ в той или иной степени продуцируют указанный антиапоптогенный фактор. При оценке уровня продукции Bcl-2 в отдельных МФ, отмечено возрастание величины, отражающей количество продуцируемого Bcl-2, при внесении в культуральную среду МНГК с DXZ-35 и DXZ-60 (рис. 8).



Рис. 8. Уровни экспрессии белка Bcl-2 в макрофагах при воздействии МНГК (находящихся в наноразмерном диапазоне 200-450 нм) с декстразидами-35 и декстразидами-60 ($M \pm m$).

При этом наибольшее увеличение уровня продукции Bcl-2 отмечено при воздействии МНГК с DXZ-60. Менее выраженное возрастание уровня продукции Bcl-2 в «Bcl-2-положительных» МФ выявлено при внесении в культуральную среду МНГК, содержащих DXZ-35. Аналогичная по величине активация МФ в отношении исследуемого показателя выявлена при внесении в культуральную среду PolyI:PolyC.

Таким образом, по результатам всех оценок влияния исследуемых форм МНГК (в размерном диапазоне НЛ 200-450 нм) на перитонеальные МФ наибольший эффект активации МФ был отмечен при воздействии МНГК, содержащих DXZ-60.

ВЫВОДЫ

1. Окисленные декстраны (декстраналь-35 и декстраналь-60) обладают свойством биосовместимости: не снижают жизнеспособность перитонеальных клеток в культуре и адгезивную активность перитонеальных макрофагов.

2. Высокой биосовместимостью обладают молекулярно-наносомальные гибридные композиции с диаметром нанолипосом 150-200 нм, содержащие декстраналь-60, и с диаметром нанолипосом 450-800 нм, содержащие декстраналь-35 и декстраналь-60.

3. Высокой биосовместимостью обладают молекулярно-наносомальные гибридные композиции с диаметром нанолипосом 150-200 нм, содержащие декстразид-35 и декстразид-60, с диаметром нанолипосом 200-450 нм, содержащие декстразид-35 и декстразид-60, и с диаметром нанолипосом 450-800 нм, содержащие декстразид-35.

4. Высокой биотропностью по показателям фагоцитозной активности в отношении нанолипосомальных композиций обладают молекулярно-наносомальные гибридные композиции с диаметром нанолипосом 150-450 нм, содержащие декстразид-35 и декстразид-60.

5. Нанолипосомы, входящие в состав молекулярно-наносомальных гибридных композиций в размерном диапазоне 200-450 нм с декстразидом-35 обладают более высокой адгезивной активностью в отношении перитонеальных макрофагов по сравнению с нанолипосомами, содержащими декстразид-60.

6. Молекулярно-наносомальные гибридные композиции, содержащие декстразид-60, обладают более высокой биостимулирующей активностью в отношении макрофагов по сравнению композициями, содержащими декстразид-35, по показателям фагосомно-лизосомного слияния в отношении тестируемого корпускулярного агента – гранул зимозана.

7. Молекулярно-наносомальные гибридные композиции в размерном диапазоне 200-450 нм с декстразидами обладают биостимулирующими свойствами в отношении фагоцитирующих клеток по показателям продукции макрофагами колониестимулирующего фактора GM-CSF и антиапоптотического белка Bcl-2, экспрессии кластера дифференцировки CD25 на мембранах макрофагов. Молекулярно-наносомальные гибридные композиции, содержащие декстразид-60, обладают более высокой биостимулирующей активностью в отношении макрофагов по сравнению композициями, содержащими декстразид-35.

Рекомендации по практическому применению.

Результаты работы могут быть использованы при разработке научных основ технологии получения принципиально новых наносомальных композиций оптимальной формы и размеров с контролируемым сродством к биологическим структурам.

Результаты работы могут быть использованы в учебном процессе при чтении лекций и проведении практических занятий и семинаров на кафедрах патологической анатомии, цитологии, гистологии и патологической физиологии.

Список опубликованных работ по теме диссертации:

1. Зайковская, М.В. Влияние окисленных декстранов на перитонеальные клетки *in vitro*. В.А. Шкурупий, С.А. Архипов, А.В.Троицкий, Н.Г. Лузгина, М.В. Зайковская, Т.Н. Гуляева, Е.Г. Уфимцева, Д.А. Ильин, Е.С. Ахраменко //

Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – Приложение № 1. – С. 120 - 122.

2. Зайковская, М.В. Сравнительная оценка влияния нанолипосом с окисленными декстранами на перитонеальные клетки *in vitro*. В.А. Шкурупий, С.А. Архипов, А.В.Троицкий, Н.Г. Лузгина, М.В. Зайковская, Т.Н. Гуляева, Е.Г. Уфимцева, Д.А. Ильин, Е.С. Ахраменко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. - Приложение № 1 - С. 123 - 126.

3. Зайковская, М.В. Эффекты молекулярно-наносомальных гибридных композиций с окисленными декстранами, конъюгированными с гидразидом изоникотиновой кислоты, на перитонеальные макрофаги *in vitro*. В.А. Шкурупий, С.А. Архипов, В.О. Ткачев, А.В. Троицкий, Н.Г. Лузгина, М.В. Зайковская, Е.П. Гуляева, Т.Н. Быстрова, Е.Г. Уфимцева // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - № 11. – 2008. – С. 563 - 566.

4. Зайковская, М.В. Оценка влияния нанолипосом с различными физико-химическими характеристиками, содержащих окисленные декстраны, на некоторые параметры их биосовместимости и биотропности в культурах перитонеальных клеток *in vitro* / В.А. Шкурупий, С.А. Архипов, А.В. Троицкий, Н.Г. Лузгина, М.В. Зайковская, Т.Н. Гуляева, Е.Г. Уфимцева, Д.А. Ильин, Е.С. Ахраменко. Актуальные проблемы клинической и экспериментальной медицины: Всероссийская научно-практическая конференция, посвященная 55-летию ЧГМА. - 1-2 окт. 2008 г.: Мат. конф. – Чита: ИМЦ ЧГМА. - 2008. – С. 230 - 231.

5. Зайковская, М.В. Сравнительная оценка влияния декстранов с различной молекулярной массой, окисленных химическим и радиационно-химическим методами, на перитонеальные клетки *in vitro* / В.А. Шкурупий, С.А. Архипов, А.В. Троицкий, Н.Г. Лузгина, М.В. Зайковская, Т.Н. Гуляева, Т.Н. Быстрова, Е.Г. Уфимцева, Д.А. Ильин, Е.С. Ахраменко. Успехи современного естествознания. - № 8. – 2008. – С. 109.

СПИСОК УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БАВ – биологически активное вещество

ГИНК – гидразид изоникотиновой кислоты

ИФ - индекс фагоцитоза

ИЦХ – иммуноцитохимия

М.м. – молекулярная масса

МФ - макрофаги

МНГК – молекулярно-наносомальная гибридная композиция

НЛ - нанолипосомы

GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор

ДАВ - диаминобензидин

DX – химически окисленный декстран (декстраналь)

DXZ - химически окисленный декстран, конъюгированный с ГИНК (декстразид)

PolyI:PolyC – полиинозин – полицитидиловая кислота

Соискатель

Зайковская М.В.