

**Министерство науки и высшего образования Российской Федерации  
(МИНОБРНАУКИ РОССИИ)**

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ**

**им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова**

**Российской академии наук**

**(ИБХ РАН)**

На правах рукописи

Миркасымов Азиз Бахтиярович

**Блокада системы мононуклеарных фагоцитов  
для повышения эффективности доставки наноагентов в опухоль**

Специальность: 1.5.3 Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
доктор биологических наук, академик РАН, профессор  
Деев Сергей Михайлович

Москва, 2022 г.

## Оглавление

<b>Введение:</b> .....	4
<b>1. Обзор литературы</b> .....	10
<b>1.1. Зачем нужны наночастицы: стабильность, лучше кинетика, пассивная и таргетная доставка, фотодинамическая терапия, гипертермия</b> .....	10
<b>1.2. Проблемы направленной доставки: неспецифичное поглощение, плохая проходимость барьеров</b> .....	12
<b>1.3. Опсонизация/поглощение системой мононуклеарных фагоцитов</b> .....	13
<b>1.4. Гидродинамика наночастиц в кровотоке</b> .....	14
<b>1.5. Внутриопухолевое давление и экстравазация наночастиц</b> .....	15
<b>1.6. Проникновение через клеточную мембрану и эндосомальная компартментализация</b> .....	18
<b>1.7. Доставка генетического материала и барьер ядерной мембраны</b> .....	19
<b>1.8. Поглощение, рецепторы</b> .....	19
1.8.1. Фагоцитоз .....	20
1.8.2. Клатрин-опосредованный эндоцитоз.....	22
1.8.3. Кавеола-опосредованный эндоцитоз .....	24
1.8.4. Клатрин- и кавеола-независимый эндоцитоз .....	25
1.8.5. Макропиноцитоз .....	26
1.8.6. Пассивная диффузия .....	27
<b>1.9. Белковая корона</b> .....	27
<b>1.10. Биораспределение наночастиц и их рациональный дизайн</b> .....	30
1.10.1. Размер.....	33
1.10.2. Геометрия .....	35
1.10.3. Поверхностный заряд .....	35
1.10.4. Деформируемость .....	36
<b>1.11. Стратегии преодоления биологических барьеров</b> .....	37
1.11.1. Опсонизация .....	37
1.11.2. Маргинация.....	39
1.11.3. Интернализация .....	41
1.11.4. Доставка генетического материала.....	43
<b>2. Материалы и методы</b> .....	44
<b>2.1. Материалы</b> .....	44
<b>2.2. Методы</b> .....	44
2.2.1. Синтез магнитных частиц.....	44
2.2.2. Синтез частиц из оксида кремния .....	45
2.2.3. Синтез ферригидритных частиц.....	47
2.2.4. Характеризация наночастиц .....	47

2.2.5. Метод количественной оценки магнитных частиц (Magnetic Particle Quantification) .....	49
2.2.6. Исследование фармакокинетики магнитных наночастиц .....	49
2.2.7. Магнитно-резонансная томография (МРТ) .....	50
2.2.8. Модель воспаления, вызванная ЛПС .....	50
2.2.9. Опухолевая модель .....	51
2.2.10. Токсичность <i>in vivo</i> .....	51
2.2.11. Статистический анализ .....	52
<b>3. Результаты и их обсуждение .....</b>	<b>53</b>
<b>3.1. Синтез блокирующих и целевых частиц для СМФ блокады и их полная характеристика ..</b>	<b>53</b>
<b>3.2. СМФ блокада и биораспределение наночастиц .....</b>	<b>60</b>
<b>3.3. Факторы, влияющие на эффективность СМФ блокады .....</b>	<b>63</b>
3.3.1. Доза блокирующих частиц .....	63
3.3.2. Размер целевых частиц .....	64
3.3.3. Размер блокирующих частиц .....	65
3.3.4. $\zeta$ -потенциал и покрытие блокирующих частиц .....	66
3.3.5. Линия мышей .....	66
3.3.6. Влияние болезней .....	67
<b>3.4. Синтез частиц ферригидрита и характеристика .....</b>	<b>70</b>
<b>3.5. СМФ блокада ферригидритными наночастицами .....</b>	<b>75</b>
<b>3.6. Токсичность высокой дозы ферригидритных частиц .....</b>	<b>82</b>
<b>4. Заключение .....</b>	<b>88</b>
<b>5. Выводы .....</b>	<b>89</b>
<b>6. Список сокращений .....</b>	<b>90</b>
<b>7. Список работ, опубликованных по теме диссертации .....</b>	<b>93</b>
<b>8. Список литературы .....</b>	<b>96</b>

**Введение:****Цель:**

- повышение эффективности доставки наноагентов в опухоль

**Задачи:**

- 1) улучшение фармакокинетики частиц методом блокировки системы мононуклеарных фагоцитов (СМФ)
- 2) исследование эффективности СМФ блокады в зависимости от физико-химических свойств частиц
- 3) сравнение эффективности метода СМФ блокады в разных *in vivo* моделях
- 4) разработка нового СМФ блокатора и изучение его эффективности и токсичности

**Предмет и объекты исследования**

Данное исследование направлено на изучение фармакокинетики наноагентов (их циркуляции в кровотоке, поглощение различными органами), метода продления циркуляции наноагентов путем СМФ блокады, а также различных характеристик наночастиц (НЧ) и параметров используемой модели, определяющие поведение НЧ *in vitro* и *in vivo* (в том числе фармакокинетику и эффективность СМФ блокады).

**Актуальность исследования**

За последние десятилетия наномедицина открыла новые перспективы для диагностики и лечения рака, обеспечив высококонтрастную прижизненную визуализацию, эффективную адресную доставку лекарств и возможность контролируемого высвобождения лекарств [1, 2]. Установлено, что противоопухолевые препараты, инкапсулированные в наноконтейнеры, способны смягчать побочные эффекты при системном введении и увеличивать эффективность доставки к опухолям [3, 4]. Однако система мононуклеарных фагоцитов (СМФ) (также называемая ретикулоэндотелиальной системой или РЭС) быстро распознает и изолирует системно вводимые наночастицы (НЧ), ограничивая время их циркуляции в кровотоке и последующее накопление в тканях-мишенях [5] так, что в среднем лишь 0,7% вводимых внутривенно

наноагентов достигает опухоли в организме [6]. Кроме того, накопление частиц в главных органах СМФ, печени и селезенке потенциально может привести к неблагоприятным побочным эффектам [7].

Было разработано несколько стратегий, позволяющих избежать выведения НЧ клетками СМФ и продлить циркуляцию частиц в кровотоке [8]. Различные инженерные подходы включают, например, модификацию поверхности «стелс»-покрытиями, такими как полиэтиленгликоль [9, 10], конъюгацию с ауто-пептидами [11] или «don't eat me» белками [12], связывание с дисопсонидами [13], маскировка нанопрепаратов мембранами эритроцитов [14], использование несферических агентов [15] и др. Эти методы высокоэффективны для увеличения времени циркуляции частиц, но могут ухудшить адресную доставку [16, 17], затруднить проникновение частиц в клетки [18] или даже вызвать иммунный или воспалительный ответ [19, 20]. Более того, такие методы борьбы с интенсивным поглощением макрофагами не подходят для умных наноматериалов, биокомпьютерных структур и других наноагентов, функциональность которых основана на преобразованиях архитектуры поверхности [21–24].

В то же время существует несколько методов, продлевающих циркуляцию частиц в кровотоке без модификации их структуры. К ним относятся использование клеток-переносчиков для частиц [25, 26], предварительно индуцированная гибель макрофагов за счет введения клондроната/хлорида гадолиния [27–29], мягкая клеточная блокада макрофагов [30], либо СМФ блокада различными наноагентами [31, 32].

Термин СМФ охватывает системы клеток фагоцитов различных органов, в первую очередь, печени и селезенки, которые представляют собой первый барьер, с которым сталкиваются НЧ при системном введении [5]. СМФ блокада подразумевает временное снижение фагоцитарной активности макрофагов за счет захвата малотоксичных «блокирующих» агентов, обычно липосом или других наночастиц. В результате терапевтические или диагностические частицы,

введенные после индукции СМФ блокады, значительно медленнее захватываются из кровотока макрофагами, дольше циркулируют и лучше накапливаются в ткани-мишени. Так, например, СМФ блокада эффективно применяется для усиления адресной доставки [33–36]. Более того, индукция СМФ блокады имеет место при поглощении многих различных микро- и наноагентов (таблица 1) и крайне важно учитывать этот эффект в исследованиях с многократным введением диагностических или лечебных наночастиц.

Несмотря на высокую значимость этого явления, было опубликовано лишь несколько систематических исследований, проливающих свет на липосомальную СМФ блокаду [35–38], но влияние свойств более широкого спектра твердых наноматериалов на блокаду макрофагов подробно не изучалось. И хотя влияние свойств частиц на их поглощение клетками является предметом многочисленных исследований [39], тем не менее однозначно предсказать их влияние на эффективность индуцированной СМФ блокады не является возможным, так как СМФ блокада может быть обусловлена несколькими механизмами, включая, помимо прочего, насыщение поверхностных рецепторов [40], истощение опсонинов крови [41], повреждение макрофагов [42] и их поляризацию [43] в ответ на поглощение частиц.

Блокирующие частицы	Целевые частицы	Эффект	Комментарий	Источник
Липосомы с холестер. (0.3 – 3мкм)	25нм ПЭГ-фосфолипидные НЧ	AUC вырос более чем в 4 раза	376мг/кг вв за 1,5ч до	[35]
Липосомы (0.5 – 2мкм)	Липосомы (0.5 – 2мкм)	Концентрация в крови 120мин 18%→75%	63мг/крысу вв за 1ч до	[37]
Липосомы (60 – 200мкм)	Липосомы (0.5 – 2мкм)	Концентрация в крови 120мин 18%→42%	38мг/крысу вв за 24ч до	[37]
Липосомы (60нм) модиф. аминманнозой	Однослойные липосомы Нейтральные, положительные и негативные	Концентрация в опухоли 18%→29% Концентрация в селезенке 19%→14% Улучшает биораспределение нейтральн. Эффект с положительными хуже Нет эффекта с негативными	0,5-8мг/мышь вв за 1ч до	[44]
Этилстеарат и этилолеат	Углерод	K=0,034→0,006 & 0,018	0.25мл эмульсии/20г вв за 24ч до	[45]
Интралипид	SPION и микронные PION	Время циркуляции выросло в 3,1 и 2,5 раз	2г/кг вв за 1ч до	[34]
Холин и триолеин	Липосомы	Нет эффекта	120мг/100г вв 2 раза в день	[46]
Метилпальмитат	Липосомы	Концентр. в печени уменьшилась в 3 раза	120мг/100г вв 2 раза в день	[46]
Декстрансульфат 500000 г/моль Углерод	Липосомы	Концентр. в крови 60мин 5%→19% Концентр. в печени 60мин 69%→46%	750мг/мышь вв за 2ч до 6мг/мышь вв за 2ч до	[47]
Агрегированный альбумин	Агрегированный альбумин	76% ↓ скорости выведения	Человек, 50мг/кг вв за 30мин до	[48]
Агрегированный альбумин	Золото в желатине	31% ↓ скорости выведения	Человек, 50мг/кг вв за 30мин до	[48]
Желатин	Агрегированный альбумин	28% ↓ скорости выведения	Человек, 50мг/кг вв за 30мин до	[48]
Желатин	Золото в желатине	74% ↓ скорости выведения	Человек, 50мг/кг вв за 30мин до	[48]
Желатин	Золото в желатине	Время полувыведения = 2,6 →7,6 мин	50мг/кг вв за 1ч до	[49]
Углерод, углерод в желатине	Золото в желатине	Нет эффекта	5мг/кг вв за 1ч до	[49]
Углерод в желатине, (желатин)	Золото в желатине	Блокада	200 (150) мг/кг вв за 1ч до	[49]
Желатин	Золото в желатине	Время полувыведения = 0,92→7 мин	10мг/100г вв за 1ч до	[50]
Углерод в желатине	Золото в желатине	Время полувыведения = 0,92→16,4 мин	8мг/100г вв за 1ч до	[50]
Золото в желатине	Золото в желатине	Время полувыведения = 0,92→19,2 мин	4мг/100г вв за 1ч до	[50]
Фосфат хрома в желатине	Золото в желатине	Время полувыведения = 0,92→13,8 мин	5мг/100г вв за 1ч до	[50]
Железо в крахмале	Фосфат хрома	Время полувыведения = 0,83→3,84 мин	40мг/кг вв за 24ч до	[51]
Тиомалат золота	Поврежденные теплом эритроц.	Время полувыведения = 10→120 мин	Человек, 50-100мг вв, за 5ч до	[52]
Латексные частицы (0,76мкм)	Липосомы (0,5 – 2мкм)	Концентрация в крови 120мин 18%→40%	2мл 0,2% раствора/крысу вв за 1ч до	[37]
Торотраст, частицы латекса (0,8мкм)	Золото в желатине	Нет эффекта	5мг/кг вв за 1ч до	[49]
Торотраст	Углерод	k=0,05→0,01 k=0,05→0,08	3мл/кг вв за 4ч до 3мл/кг вв за 48ч до	[53]
Оксид кремния (0,5-10мкм)	Альбуминовые частицы	Время полувыведения 24% ↑	50мг/кг вв за 48ч до	[54]
Оксид кремния (<5мкм)	Углерод в желатине	Фагоцитарный индекс = 0,75→0,54	вв за 2ч до	[55]
λ-карагинан	ПЭГ-золотые палочки (8x24нм)	Время полувыведения = 150→250 мин	50мг/кг вв непосредственно перед	[31]
Человеческие эритроциты (6-8мкм)	Липосомы (0,5 – 2мкм)	Концентрация в крови 120мин 18%→55%	2,5мл/крысу вв за 1ч до	[37]
Бактериальная инфекция	Агрегированный альбумин	Время полувыведения ↓	Человек	[56]
Вирусная инфекция	Агрегированный альбумин	Время полувыведения ↑	Человек	[56]
ПЭГ-пептид	ПЭГ-пептид ДНК-наночастицы	Концентрация в печени 5мин ~25%→15%	1-80нмоль/мышь вв совместно	[57]

**Таблица 1.** Различные частицы, примененные для индукции СМФ блокады.

Среди различных способов блокады макрофагов клеточная блокада, вызванная искусственно ускоренным старением эритроцитов и поглощением их макрофагами с помощью антиэритроцитарных антител [30], является высокоэффективным, но сопровождается временным снижением гематокрита. Липосомы и липидные эмульсии, характеризующиеся завидной биосовместимостью, также известны как широко распространенные блокаторы СМФ, хотя их эффективность не является самой высокой, достигая продления циркуляции частиц в кровотоке примерно в 3 раза [34–36, 58]. Белковые частицы [48, 57], несколько полимеров и полимерных НЧ [31, 47], а также неорганические наноматериалы [37, 54] также использовались в качестве блокаторов СМФ с умеренной эффективностью.

СМФ блокада продемонстрировала значительные успехи, однако необходимость в большой дозе блокирующего агента (сотни мг на кг массы тела) вызывает опасения по поводу токсичности данного подхода [59]. Таким образом, оптимальный блокирующий агент с точки зрения его эффективности и биосовместимости считается краеугольным камнем метода СМФ блокады.

### **Научная новизна исследования**

Чтобы пролить свет на явление СМФ блокады, мы показываем, как размер,  $\zeta$ -потенциал и поверхностное покрытие, а также вводимая доза широкого спектра неорганических блокирующих наночастиц влияют на эффективность СМФ блокады. Блокирующие частицы, покрытые карбоксиметилдекстраном, показали наибольшую эффективность среди протестированных полимерных покрытий и позволили в десятки раз увеличить время циркуляции магнитных НЧ в кровотоке. Эффективность СМФ блокады также определяли на различных *in vivo* моделях, включая мышей разных генетических линий, животных с опухолями и острым воспалением, индуцированным липополисахаридом.

Кроме того, вдохновленные природным ферритином, мы синтезировали наночастицы ферригидрата и изучили возможность их применения для СМФ блокады. Частицы были покрыты карбоксиметил-декстраном и охарактеризованы с точки зрения состава, физического и гидродинамического размера,  $\zeta$ -потенциала



и магнитной восприимчивости. Мы применили синтезированные НЧ ферригидрита для СМФ блокады *in vivo* и показали, что циркуляция магнитных частиц в кровотоке значительно продлевается, что приводит к улучшенному накоплению частиц в костном мозге и опухоли. Также мы показали биосовместимость такого подхода, проведя системное исследование биораспределения НЧ ферригидрита в тканях лабораторных животных и их токсичности.

### **Область применения и практическая значимость исследования**

Результаты данного исследования ключевых факторов, определяющих степень СМФ блокады, необходимы для фундаментального понимания поведения наноагентов *in vivo* и расширения возможностей моделирования их фармакокинетики.

Среди различных параметров, влияющих на эффективность СМФ блокады, наиболее важным оказалось покрытие частиц, а наилучшим полимерным покрытием – карбоксиметил-декстран. Применение данного полимера привело к созданию блокатора нового поколения на основе биосовместимого вещества – ферригидрита, что позволило в разы повысить направленную доставку наноагентов. Разработанный блокирующий агент может улучшить фармакокинетику и соответственно эффективность существующих нанопрепаратов, а также открыть дорогу только разрабатываемым наноматериалам с умной архитектурой.

Более того, проделанная работа позволила сформировать методологию поиска и дизайна других высокоэффективных блокаторов и план первоочередных экспериментов для проверки их действенности и биосовместимости. Ведь только в совокупности этих параметров можно сравнивать между собой различные блокирующие агенты.

## **1. Обзор литературы**

### **1.1. Зачем нужны наночастицы: стабильность, лучше кинетика, пассивная и таргетная доставка, фотодинамическая терапия, гипертермия**

Наночастицы давно являются одним из ключевых направлений развития современной медицины [60]. С помощью этих агентов можно решить множество проблем, с которыми сталкиваются традиционные лекарства. Среди них малая проницаемость биологических барьеров [8], низкая растворимость и стабильность в организме пациента [3], неспецифичное биораспределение и токсичность [61]. Использование наноструктур позволяет преодолеть подобные недостатки обычных препаратов, а также открывает широкие возможности в использовании совершенно новых методов диагностики и терапии, основанных на физических свойствах разнообразных материалов, применяемых в синтезе наночастиц [62, 63]. Более того, регулирование основных параметров частиц, таких как форма, размер, заряд и покрытие, делают допустимым создание наноагентов, заточенных для достижения каждой определенной цели [60]. Причем структура наночастиц позволяет комбинировать различные модули, каждый из которых обладает своим специфическим свойством. Все это в совокупности предоставляет ученым невероятно обширный набор инструментов для решения задач в биологии и медицине.

Часто наноагенты используют для доставки гидрофобных веществ, улучшения стабильности лекарственного средства, обеспечения его сохранности или наоборот ограничения токсичности, пока оно не достигнет терапевтической цели [64]. Ярким примером служит доставка генетического материала [65]. В данном случае, частицы позволяют не только защищать РНК от энзиматической деградации в крови, но и позволяют использовать клеточные механизмы транспорта для концентрации в клетке. Также с помощью наночастиц продлевают циркуляцию препарата в кровотоке. В пример можно привести полимерные частицы на основе полиэтиленгликоля (ПЭГ) [66]. Вдобавок, применяя гидрофобные материалы, можно создавать платформы для контролируемого высвобождения лекарства и улучшать фармакокинетику [67].

Помимо этого, наночастицы по сравнению с традиционными лекарствами пользуются преимуществом так называемого EPR-эффекта (Enhanced permeability and retention), который заключается в повышенном накоплении наноразмерных агентов в некоторых видах твердых опухолей [68]. Эффект вызван наличием крупных щелей в неправильно сформированных капиллярах кровеносной системы, питающей опухолевые ткани, а также плохим лимфатическим дренажем, позволяющим концентрироваться лекарству в ткани [69]. Однако данное явление скорее работает в опухолевых моделях на грызунах, но не свойственно человеческому организму [70].

Кроме такой пассивной доставки лекарств в ткани можно также реализовать направленную доставку препарата к определенному типу клеток. Для этого на поверхность наночастиц прикрепляют специальные лиганды, специфически узнающие и связывающие какую-либо мишень, обычно рецептор или антигенную детерминанту на поверхности клетки [71]. Другим распространенным способом направленной доставки является навигация магнитных частиц посредством градиента магнитного поля [72].

Применение наноматериалов с их разнообразными физическими свойствами позволило разработать новые методы диагностики и визуализации, а также усовершенствовать старые [73]. Среди них наиболее популярными являются визуализация посредством квантовых точек [74], МРТ (магнитно-резонансная томография) с контрастированием частицами из оксида железа [75], а также метод визуализации магнитных частиц (МРІ) [76], ультразвуковая и КТ диагностика с контрастированием полыми заполненными газом частицами [77] и частицами тяжелых элементов [78] соответственно. Также были усовершенствованы методы лечения злокачественных образований, такие как фотодинамическая терапия [79], фототермия [80] и магнитная гипертермия [81].

## **1.2. Проблемы направленной доставки: неспецифичное поглощение, плохая проходимость барьеров**

Тем не менее, широкое применение наноагентов для направленной доставки лекарств на данный момент ограничено в связи с пока нерешенными проблемами неспецифического поглощения, а также плохой проходимостью преград на пути к терапевтической цели (рисунок 1). При внутривенном введении наночастицы, содержащие лекарство, сталкиваются с рядом последовательных биологических барьеров, препятствующих эффективной доставке к опухолям. Наночастицы подвергаются опсонизации и последующему поглощению резидентными макрофагами СМФ. Это приводит к высокому накоплению наночастиц в органах, таких как селезенка и печень, что способствует неспецифическому распределению нанотерапевтических средств в здоровые органы. При нормальных условиях кровотока в кровеносных сосудах размер и геометрия НЧ значительно влияют на динамику миграции частиц к сосудистой стенке. Сферические частицы небольшого размера мигрируют в бесклеточном слое на значительном расстоянии от эндотелиальных поверхностей, ограничивая как активные, так и пассивные стратегии нацеливания. Еще одним существенным барьером для накопления наночастиц в опухолях является высокое внутриопухолевое давление, возникающее в результате прерывистой сосудистой сети, агрессивного характера клеточного роста, фиброза, плотного внеклеточного матрикса и нарушения лимфатических сосудов. Клеточная интернализация и эндосомы также оказываются серьезными барьерами, при этом размер и оформление поверхности влияют на путь интернализации (например, клатрин- или кавеолин-опосредованный эндоцитоз) и внутриклеточную судьбу. Интернализированные наночастицы затем подвергаются воздействию среды с низким рН и ферментов внутри лизосом, что вредно сказывается на доставляемом лекарстве, особенно для генетического материала. И последнее, но не менее важное: при попадании в клетку помпы оттока лекарств, которые придают устойчивость к терапии, выталкивают химиотерапевтические препараты из клетки.

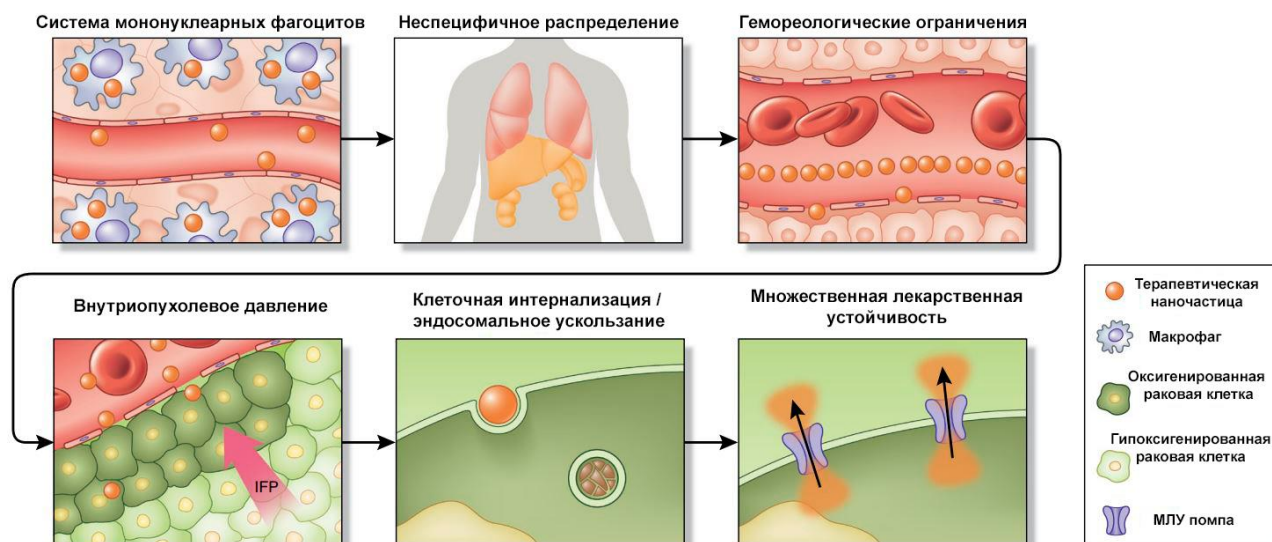


Рисунок 1. Биологические барьеры для доставки лекарств на наночастицах. IFP - внутритканевое давление жидкости. Адаптировано из [8].

### 1.3. Опсонизация/поглощение системой мононуклеарных фагоцитов

Система мононуклеарных фагоцитов (СМФ), состоящая из системы фагоцитарных клеток, преимущественно резидентных макрофагов, в селезенке, лимфатических узлах и печени (в печени называемых клетками Купфера), выводит из кровотока и поглощает наночастицы сразу после инъекции [82]. Этому процессу предшествует опсонизация наночастиц, включающая адсорбцию белков плазмы, таких как сывороточный альбумин, аполипопротеины, компоненты комплемента и иммуноглобулины, на поверхность циркулирующих наночастиц [83]. Формирование белковой короны вокруг наночастиц зависит от нескольких факторов, включая размер наночастиц, поверхностный заряд, гидрофобность и химию поверхности [84]. После адсорбции белка наночастицы прикрепляются к специфическим рецепторам на поверхности фагоцитов, после чего наночастицы интернализируются, транспортируются в фагосомы и сливаются с лизосомами [85]. В дополнение к усилению поглощения наночастиц СМФ опсонизация часто оказывается вредной для стратегий активного нацеливания наночастиц, поскольку прилипшая биологическая корона маскирует нацеливающие лиганды, что приводит к заметному снижению специфичности [86]. Таким образом, белковая

корона контролирует судьбу НЧ *in vivo* и определяет взаимодействие с клетками [87].

#### 1.4. Гидродинамика наночастиц в кровотоке

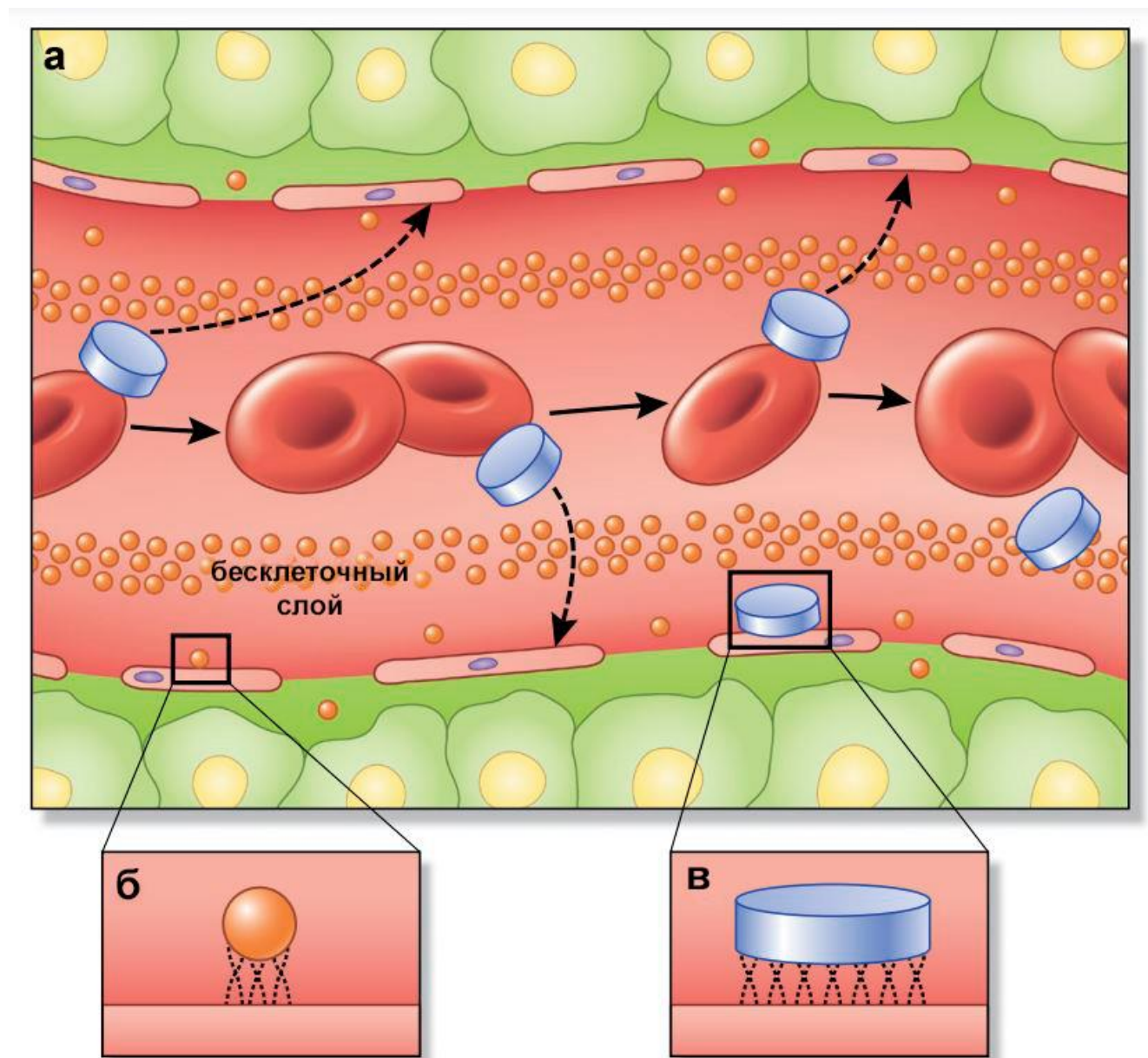


Рисунок 2. Движение наночастиц в кровотоке зависит от геометрии частиц. (а) циркуляция в кровотоке и процесс маргинации (латеральный дрейф), (б,в) контакт с эндотелиальными клетками. Адаптировано из [8].

Гидродинамика наночастиц в кровеносных сосудах сильно зависит от размера и геометрии конструкции. Стандартные наноагенты, предназначенные специально для внутривенного введения, такие как липосомы и полимерные наночастицы, обычно имеют сферическую форму и диаметр 10–100 нм. Однако оказывается, что небольшие сферические частицы обнаруживаются в особой области сосуда, известной как бесклеточный слой, что является прямым результатом тенденции эритроцитов преимущественно накапливаться в центре сосуда (рис. 2). Было показано, что наночастицы, обладающие традиционной сферической геометрией, демонстрируют минимальный латеральный дрейф и с меньшей вероятностью примыкают к стенкам сосудов и устанавливают точки контакта/связывания с эндотелиальными клетками [88]. Таким образом, в отсутствие специфических внешних сил, таких как магнитное поле [89], сферические частицы хуже других проникают через эндотелиальный барьер.

### **1.5. Внутриопухолевое давление и экстравазация наночастиц**

Перспективы использования наночастиц для доставки лекарств в первую очередь связаны с их способностью преимущественно накапливаться в местах повреждений, инфекций и воспалений. Это пассивное нацеливание в первую очередь связано с наличием эндотелиальной дисфункции и фенестр кровеносных сосудов, так называемый EPR эффект [68, 90]. Это явление бывает выражено при раке, где хаотичная и дезорганизованная сосудистая сеть является следствием агрессивной ангиогенной природы опухолей. Эта особенность опухолей, отнюдь не уникальная для рака, привела к разработке стратегий, нацеленных на ангиогенные сосуды, посредством лигандов к сверхэкспрессированным на эндотелиальных клетках сосудистой сети опухоли рецепторам, таким как  $\alpha v \beta 3$  [91], или посредством положительно заряженных липосом [92].

Хотя EPR в основном связан с фенестрами в сосудах, уникальное микроокружение опухоли играет важную роль в накоплении наночастиц. Недавно было показано, что повышенная проницаемость и удерживание нанотерапевтических средств зависят от типа опухоли и органа, в котором локализовано заболевание [93]. Изучая

накопление липосом в клетках 4T1 (рак молочной железы), 3LL (рак легкого) и CT26 (рак толстой кишки) в различных первичных и метастатических участках, относительное соотношение матриксной металлопротеиназы 9 (ММП-9) и тканевого ингибитора металлопротеиназы 1 коррелирует с накоплением наночастиц; повышенные уровни ММП-9 указывали на повышенную проницаемость сосудов (рис. 3). Эти данные свидетельствуют о том, что эти металлопротеиназы могут быть использованы в качестве потенциальных биомаркеров для EPR и позволят выявлять пациентов, которые получают пользу от использования нанолекарств.

Влияние структуры коллагена на диффузию терапевтических средств разного размера было изучено посредством компьютерного моделирования в сочетании с *in vivo* экспериментами [94]. Исследование подчеркивает прямую корреляцию между содержанием коллагена в сосудистой сети опухоли и проницаемостью сосудистой стенки для наночастиц (рис. 3) и предлагает еще один потенциальный маркер для стратификации пациентов.



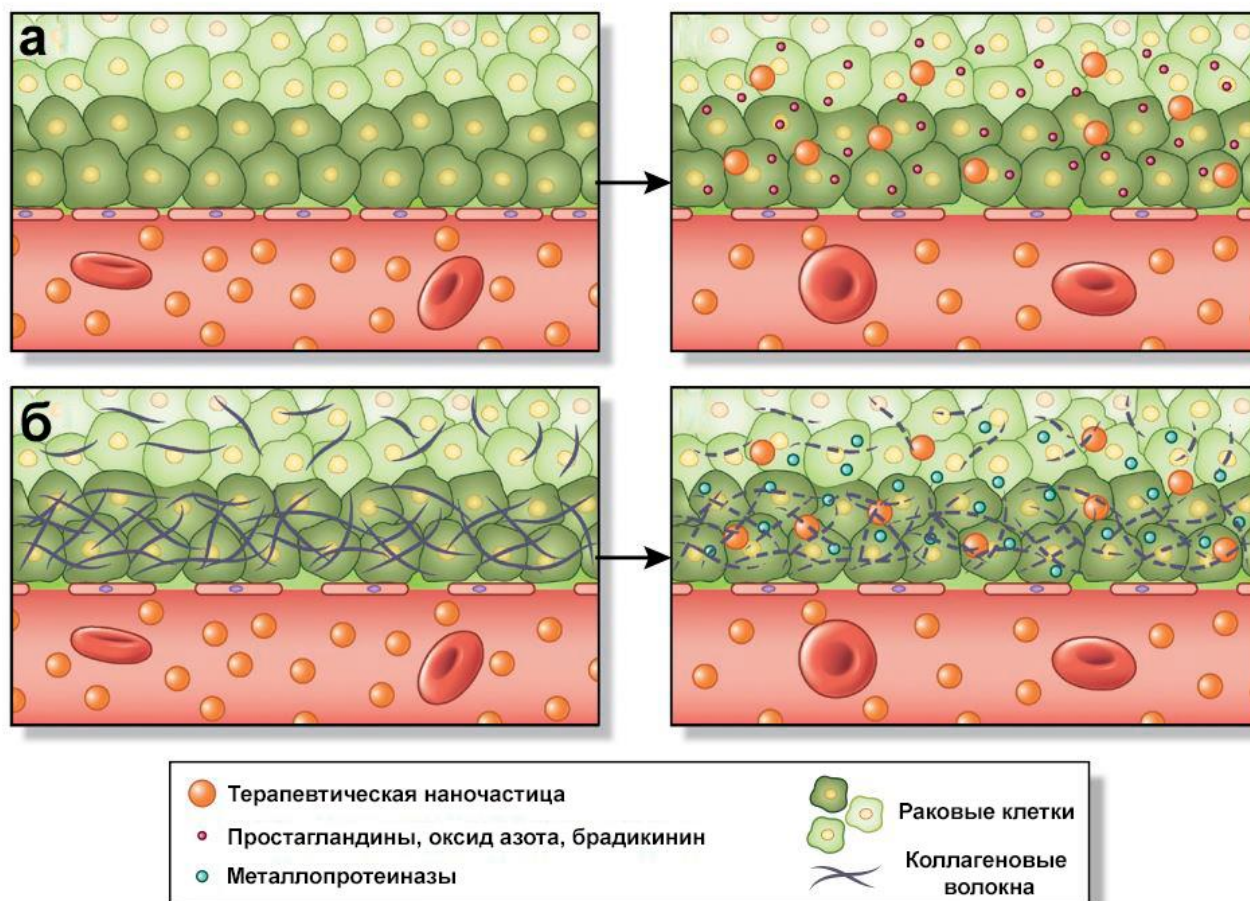


Рисунок 3. Малая проницаемость эндотелия и межклеточного пространства и стратегии прайминга, повышающие экстравазацию наночастиц в опухолевые ткани. (а) VEGF, оксид азота и др. увеличивают размер фенестр в эндотелии. (б) Металлопротеиназы ММП-2 и ММП-9 разрушают плотный коллагеновый матрикс и улучшают проницаемость опухоли. Адаптировано из [8].

Другой важной проблемой является низкая эффективность инфильтрации ткани наночастицами. Из-за их сравнительно крупного размера, а также взаимодействия с клетками частицам тяжело проникать из кровеносного сосуда в межклеточное пространство, они медленнее диффундируют вглубь ткани и, обычно, застревают и скапливаются в области, прилегающей к капилляру. Хотя эффект EPR потенциально может привести к накоплению наночастиц, внутритканевое давление жидкости все же может препятствовать проникновению наночастиц вглубь опухоли. В опухоли нормальное движение небольших молекул и растворенных веществ по градиентам в сосуды и из сосудов серьезно нарушено вследствие

гидростатического и осмотических давлений, что в свою очередь вызвано теми же нарушениями локального микроокружения опухоли и сосудистой сети что и EPR [95]. Кроме того, плохой лимфатический дренаж, вызванный агрессивным делением раковых клеток, обширный фиброз и плотный внеклеточный матрикс, приводят к повышенному давлению интерстициальной жидкости. Это высокое внутриопухолевое давление предотвращает надлежащую экстравазацию макромолекул и наночастиц в дистальные отделы опухоли и препятствует эффективной доставке.

### **1.6. Проникновение через клеточную мембрану и эндосомальная компартментализация**

После экстравазации и диффузии вглубь ткани, наночастицам предстоит клеточная интернализация, а затем высвобождение груза (например, лекарства, белки, пептиды или нуклеиновые кислоты) для оказания терапевтического воздействия на цитоплазматические и ядерные мишени. Если низкомолекулярные, гидрофобные молекулы способны к простой диффузии через липидную бислойную мембрану клеток, то микро- и наноразмерные супрамолекулярные конструкции требуют активных механизмов поглощения.

В неспециализированных клетках млекопитающих клатрин-опосредованный эндоцитоз представляет собой классический механизм, регулирующий поглощение наночастиц [96]. Эндоцитоз наночастиц включает поглощение мембранными инвагинациями и образование внутриклеточных везикул (эндосом), которые в конечном итоге сливаются с лизосомами [97]. Сильнокислая среда лизосом, богатая ферментами, способствует деградации органических наночастиц, лекарств и особенно генетического материала [98]. Точнее фагосомы и эндосомы, связанные с фагоцитозом и клатрин-опосредованным эндоцитозом соответственно, в конечном итоге направляются к лизосомам. В то время как механизм эндоцитоза, опосредованный кавеолами, приводит к образованию кавеол, которые отщепляются от мембраны и сливаются с кавеосомами с нейтральным рН, которые в некоторых случаях, обходят лизосомы [85, 99].

### **1.7. Доставка генетического материала и барьер ядерной мембраны**

Генотерапия ряда опасных для жизни заболеваний, включая В-клеточный лейкоз, глиомы, болезнь Паркинсона и артрит [100], невозможна без разработки и совершенствования стратегий доставки. Хотя терапия нуклеиновыми кислотами традиционно основывалась на использовании вирусных векторов в качестве носителей для трансфекции [101], параллельное направление исследований было сосредоточено на использовании платформ на основе наночастиц для доставки генов, включая липосомы [102], магнитные наночастицы [103] и наночастицы золота [104].

В дополнение к биологическим барьерам, ограничивающим адресную доставку, генная терапия наночастицами сталкивается с дополнительными проблемами, связанными с нестабильностью генетического материала и в некоторых случаях необходимостью пересечения ядерной мембраны. Эндосомальная компартиментализация создает богатую ферментами среду с низким рН, способную разрушать генетический материал. Более того, ДНК, которая выживает после выхода из эндосомы, подвергается деградации цитоплазматическими нуклеазами [105]. Если ДНК успешно преодолевает разрушающее действие ферментов и нуклеаз, составляющих внутриклеточную среду, следующим шагом будет проникновение в ядро. Ядерная оболочка отделяет клеточный геном и состоит из внешней и внутренней мембран, которые образуют непрерывную структуру с эндоплазматическим ретикуломом [106]. Внутренняя и внешняя мембраны сливаются вместе в местах комплексов ядерных пор, что ограничивает движение макромолекул с молекулярной массой ~40 кДа и более [107].

### **1.8. Поглощение, рецепторы**

Когда наночастица достигает внешней мембраны клетки, она может взаимодействовать с компонентами плазматической мембраны или внеклеточным матриксом и проникать в клетку в основном посредством эндоцитоза. Эндоцитоз приводит к обволакиванию наночастиц мембраной, а затем отпочкованию внутрь клетки с формированием эндоцитозного пузырька [5]. В зависимости от типа

клетки, а также белков, липидов и других молекул, вовлеченных в процесс, эндоцитоз может быть классифицирован на несколько типов. Основными двумя являются фагоцитоз и пиноцитоз. Пиноцитоз в свою очередь разделяется на подтипы: клатрин-опосредованный эндоцитоз, кавеолин-опосредованный эндоцитоз, клатрин/кавеолин-независимый эндоцитоз и макропиноцитоз. Если фагоцитоз в основном присущ только профессиональным фагоцитам, то пиноцитоз является более распространенным механизмом.

### 1.8.1. Фагоцитоз

Фагоцитоз обычно происходит в профессиональных фагоцитах, таких как макрофаги, моноциты, нейтрофилы и дендритные клетки, которые ответственны за защиту организма от чужеродных объектов, поглощению мертвых клеток и клеточного мусора. Однако, несколько других видов клеток, таких как фибробласты, эпителиальные и эндотелиальные клетки, тоже обладают фагоцитарной активностью, хоть и в меньшей степени [108].

Фагоцитоз наночастиц начинается с вышеописанного процесса опсонизации (рис. 4). Затем опсонизированные частицы узнаются и прикрепляются к фагоциту посредством лиганд-рецепторных взаимодействий. Это инициирует сигнальный каскад, который приводит к образованию актинового ансамбля, формированию мембранных расширений и последующего обволакивания частицы мембраной и интернализации, посредством образования фагосомы [109]. Все эти события требуют от 30 минут до нескольких часов, в зависимости от типа клетки и наночастицы. Рецепторы, участвующие в данном процессе, включают Fc-рецептор, рецепторы комплемента, а также другие, такие как рецепторы маннозы/фруктозы и сквенджер рецепторы.

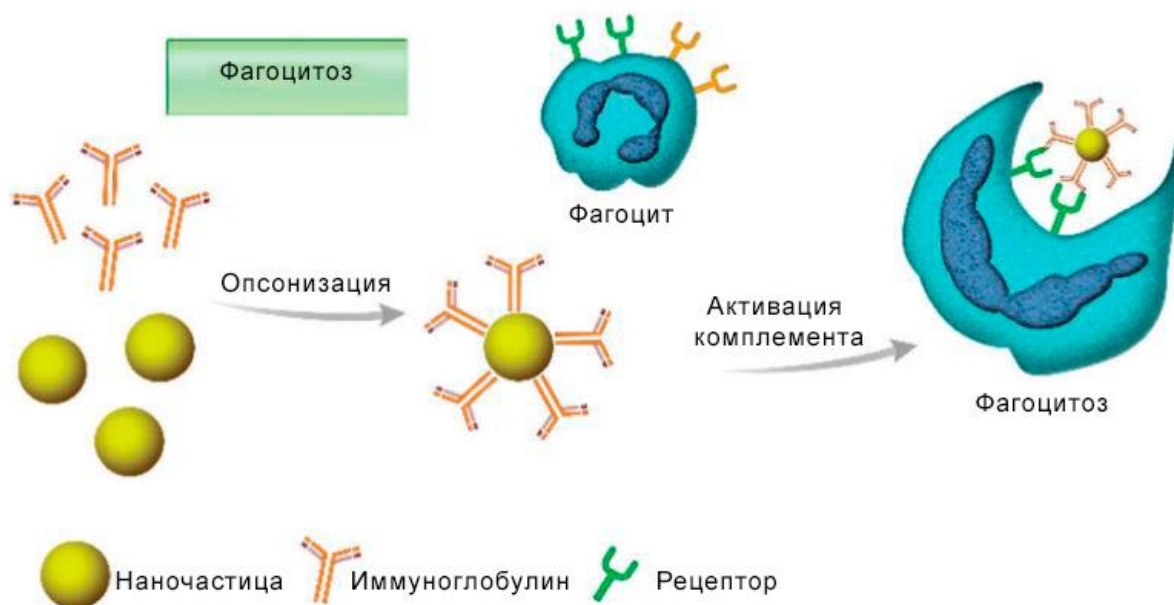


Рисунок 4. Опсонизация и фагоцитоз. Адаптировано [110].

Поглощение наночастиц посредством фагоцитоза определяется основными физико-химическими характеристиками частицы, такими как размер, форма, и поверхностные свойства [109]. Конкретный механизм фагоцитоза зависит также от типа, вовлеченных рецепторов. Так, например, Fc-опосредованный фагоцитоз приводит к высвобождению провоспалительных медиаторов, тогда как использование рецепторов комплемента нет [111]. Таким образом, рецепторы, отвечающие за взаимодействие клеток с наночастицами, определяют не только доставку наноагентов, но и их токсичность.

Размер частицы влияет на скорость ее поглощения фагоцитами. Исследования, проведенные *in vitro* показали, что в целом, более крупные частицы лучше поглощаются фагоцитами. При исследовании в диапазоне от 200-2000нм пик эффективности поглощения приходился на наночастицы из микрометровой области [112–114]. Поэтому, в целом, использование крупных наноструктур помогает при направленной доставке в макрофаги.

Не менее важную роль играет форма частиц [15, 84]. Было показано, что сферические наночастицы лучше поглощаются, чем палочковидные. Таким

образом, синтез наночастиц с отношением продольного размера к поперечному далеком от единицы может быть предпочтительным, например, в случае решения задачи уменьшения поглощения частиц СМФ и продления их циркуляции в кровотоке.

Следующим важным параметром, регулирующим поглощение наноагентов посредством фагоцитоза, являются поверхностные свойства частицы. Свойства поверхности в первую очередь влияют на процесс опсонизации, а затем на взаимодействие с мембранными рецепторами, опосредующими фагоцитоз. Функционализация поверхности наночастиц стерически экранирующими полимерами, такими как гидрофильный полиэтиленгликоль (ПЭГ), предотвращает или минимизирует адсорбцию белков на поверхность частицы [5]. В свою очередь, частицы с заряженной или гидрофобной поверхностью привлекают белки комплемента и, таким образом, ускоряют поглощение фагоцитами [109].

### 1.8.2. Клатрин-опосредованный эндоцитоз

Клатрин-опосредованный эндоцитоз – это главный механизм, используя который клетка получает нутриенты и мембранные компоненты, например, холестерин посредством липопротеинов низкой плотности, или железо посредством трансферрина. Он может инициироваться как связыванием со специфическими рецепторами мембраны, так и неспецифической адсорбцией (рис. 5). При таком рецептор-независимом эндоцитозе поглощение происходит посредством неспецифических гидрофобных и электростатических взаимодействий [115].

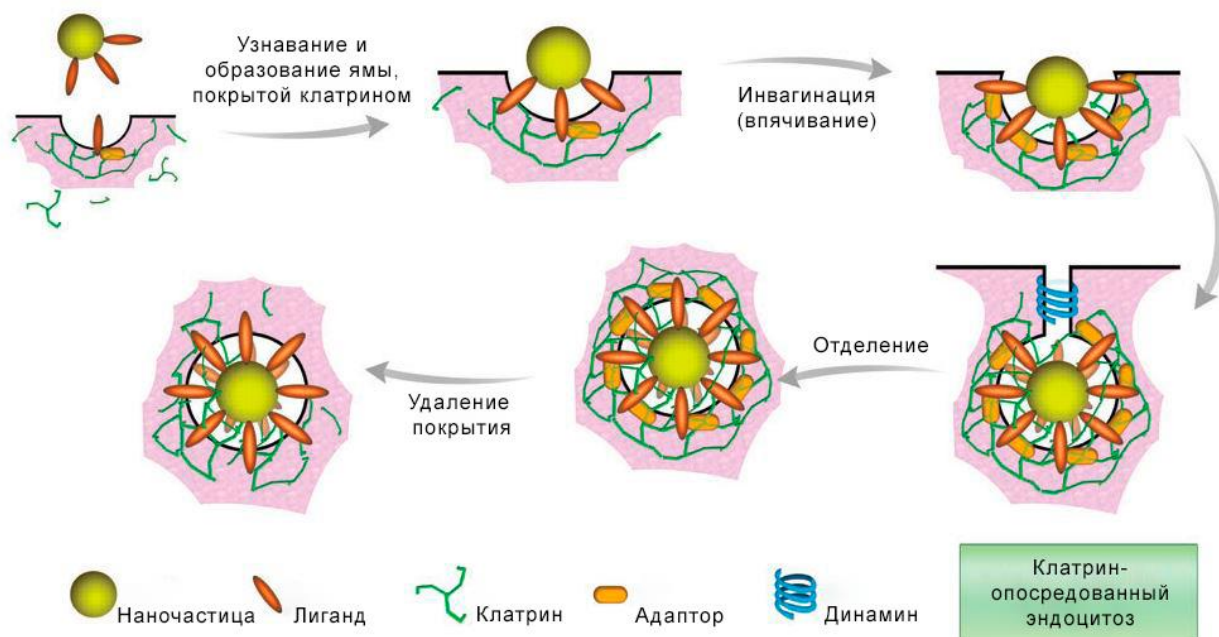


Рисунок 5. Схема клатрин-опосредованного эндоцитоза. Процесс инициируется узнаванием лиганда, а затем образованием ямок, покрытых клатрином. С помощью клатриновых трискелионов образуется гексагональная решетка, вызывающая инвагинацию плазматической мембраны. После этого динамин (белок расщепления) высвобождает везикулу в цитоплазму, где происходит удаление оболочки. Адаптировано [110].

Клатрин опосредованный эндоцитоз происходит в области мембраны, богатой клатрином, такие домены покрывают порядка 1% поверхности клетки [116]. Клатрин - это гомотримерный белок, который способен к спонтанной сборке в изогнутые пента и гексагональные решетки, генерирующие и стабилизирующие мембранные изгибы почкообразной структуры, обращенные внутрь клетки [117]. Адапторные белки, являющиеся сайтами узнавания, совместно с другими вспомогательными белками ответственны за нуклеацию клатрина в области интернализации частицы [118]. Также вспомогательные белки рекрутируют разрезающий мембрану белок динамин к горлышку образованной структуры [119]. После отрыва таких 100-150нм везикул от мембраны клатриновый комплекс диссоциирует и может быть снова использован. Однако, обычно, частицы, поглощенные посредством этого механизма, попадают в лизосомы, и поэтому



данный путь не может быть использован для доставки наноагентами веществ, подверженных деградации лизосомальными ферментами [120, 121].

Изучение свойств частиц и путей их поглощения клетками, показало влияние заряда поверхности. Оказалось, что анионные частицы поглощаются как клатрин-, так и кавеола- опосредованным эндоцитозом, в то время как, положительно заряженные частицы поглощаются исключительно клатрин-опосредованным [122]. Также было показано, что положительно заряженные наноструктуры поглощаются лучше нейтральных [123].

### 1.8.3. Кавеола-опосредованный эндоцитоз

Кавеола-опосредованный эндоцитоз играет важную роль во многих биологических процессах, таких как клеточная сигнализация, трансцитоз, а также регуляция липидов, жирных кислот, мембранных белков и натяжения мембраны. Вдобавок, данный механизм считается вовлеченным в развитии множества заболеваний, включая рак, диабет и вирусные инфекции [124–131].

Кавеолы – небольшие 50-80нм колбообразные впячивания мембраны во многих клетках позвоночных, в особенности эндотелиальных, а также адипоцитах и клетках эпителия легочных альвеол [110]. В случае неэпителиальных клеток, таких как адипоциты и гладкомышечные клетки, кавеолы составляют значительную часть клеточной мембраны, увеличивая площадь поверхности до 75% [132, 133]. В их образовании участвует димерный белок кавеолин и множество других вспомогательных белков, в том числе динамин, необходимый для отпочковывания везикулы от мембраны (рис. 6).



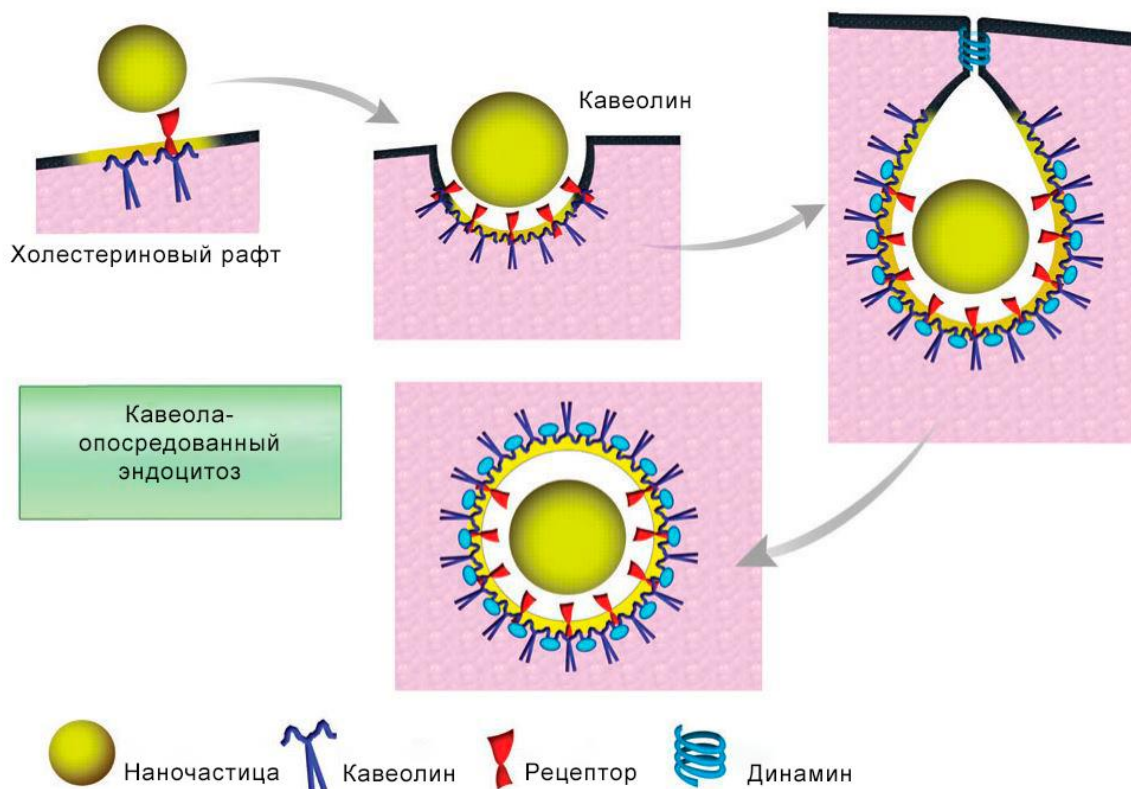


Рисунок. 6. Схема эндоцитоза, опосредованного кавеолами. Белки кавеолы играют основную роль в формировании искривления мембраны. Как и в клатрин-опосредованном эндоцитозе, динамин является расщепляющим белком, который позволяет отпочковываться везикулам и высвобождаться в клетку. Адаптировано [110].

Коммерчески доступный противоопухолевый препарат Абраксан, представляющий собой химиотерапевтическое лекарство паклитаксель, связанное с альбумином, использует кавеолин-опосредованный механизм транспорта альбумина эндотелиальными клетками для проникновения в ткани опухоли [85]. Также данный механизм в некоторых случаях позволяет избежать деградации в лизосоме [134] и поэтому может быть полезен для доставки генов и белков [135].

#### 1.8.4. Клатрин- и кавеола-независимый эндоцитоз

Клатрин- и кавеола-независимый эндоцитоз происходит в клетках, не имеющих ни того, ни другого. Эти клетки поглощают различные вещества, такие как клеточные жидкости, интерлейкины, гормоны роста, используя другие пути, требующие

специфического липидного состава мембраны, в основном состоящего из холестерина [136–138].

Ярким примером вещества, поглощающегося таким путем, является фолиевая кислота [120]. Наночастицы, модифицированные фолиевой кислотой, используются для направленной доставки в опухолевые клетки. Причем данный механизм тоже позволяет избежать попадания в наноагентов в лизосомы [139, 140].

### 1.8.5. Макропиноцитоз

Макропиноцитоз – это процесс пиноцитоза, не включающий использование липидных рафтов и белков, формирующих мембранные впячивания. Большие мембранные изгибы формируются как результат реорганизации цитоскелета, создавая большие 0,2-5мкм везикулы, которые захватывают много внеклеточной жидкости [141] (рис. 7). При этом все частицы и молекулы, растворенные во внеклеточной жидкости, поглощаются в независимости от наличия или отсутствия специфических рецепторов.

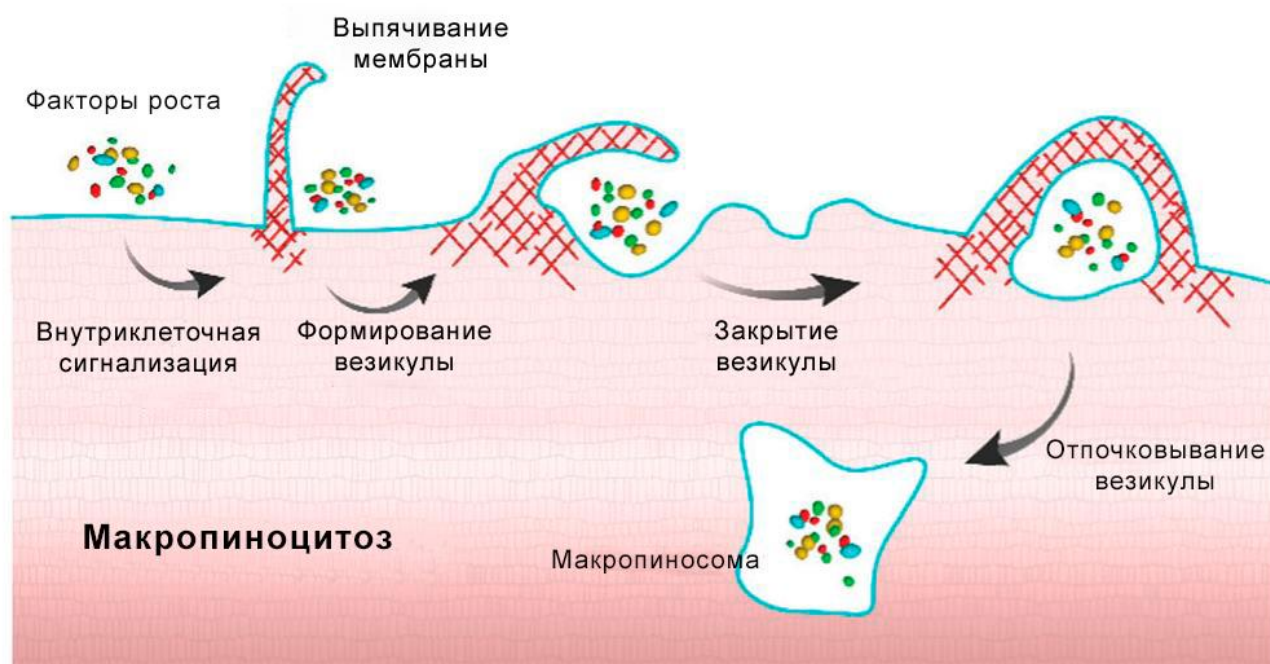


Рисунок 7. Схематическая иллюстрация процесса макропиноцитоза. При распознавании активируются внутриклеточные сигнальные пути, что способствует образованию больших расширений мембраны. Затем эти складки снова сливаются, образуя большую везикулу, захватывающую содержимое внеклеточной жидкости путем поглощения мембранными расширениями/отростками. Адаптировано [110].

Макропиноцитоз очень важен в реализации многих физиологических функций, таких как антигенная презентация [142], а также открывает возможность микробным патогенам, включая бактерии и вирусы, интернализироваться в клетку [141]. Так как в данном процессе формируются большие везикулы, то он считается ключевым для поглощения крупных наночастиц, захват которых невозможен посредством клатрин и кавеолин-опосредованным эндоцитозом [143].

#### 1.8.6. Пассивная диффузия

Хотя различные механизмы эндоцитоза, описанные ранее, считаются основными процессами, посредством которых наночастицы попадают в клетку, есть также и другие механизмы, такие как пассивная диффузия [144–146]. Мелкие наночастицы, имеющие диаметр порядка нескольких нанометров, способны проникать через клеточную мембрану, не используя эндоцитоз.

### **1.9. Белковая корона**

Работа многих наноконструкций подразумевает попадание в системный кровоток. Как только частицы оказываются в крови, они начинают взаимодействовать с белками плазмы [83]. Белки адсорбирующиеся на поверхности частицы, модулируют поверхностные свойства частицы и в дальнейшем во многом определяют поведение частиц в организме. Основными белками, участвующими в создании белковой короны, при этом являются альбумины, глобулины и фибриноген, составляющие наибольшую долю белков плазмы. При этом белки, ускоряющие фагоцитоз частиц иммунными клетками (в первую очередь макрофаги), называются опсонинами [147]. Их составляют белки системы комплемента, иммуноглобулины, а также секретируемые рецепторы

распознавания паттернов. Поэтому процесс образования белковой короны еще называют опсонизацией. Также предполагается наличие белков, замедляющих фагоцитоз и соответственно называемых дисопсонинами [148, 149].

Адсорбированные белки влияют на размер частиц. В случае стабильных частиц гидродинамический размер после опсонизации обычно меняется не сильно ( $<10$  нм). Однако если в плазме крови агрегационная стабильность теряется, то могут формироваться иногда даже стабильные агрегаты из нескольких частиц, что приводит к изменению размера на  $\sim 50$  нм для 100 нм частиц [83].

Помимо размера, меняется также и заряд поверхности (дзета-потенциал). Оказывается, что какими бы характеристиками не обладали частицы, при попадании в кровь за счет адсорбированной белковой короны их потенциал становится примерно одинаковым и равным  $-10$  мВ. Причем как положительно, так и отрицательно заряженные частицы имеют именно отрицательно заряженную белковую корону [83]. Таким образом, утверждение о том, что положительные частицы предпочтительно взаимодействуют с отрицательно заряженными белками, слишком упрощено.

При этом белковая корона является динамической структурой, которая претерпевает ряд изменений прежде, чем ее структура более-менее установится. Данное явление называется эффектом Вромена [150–152]. На поверхности частиц в первую очередь адсорбируются наиболее мобильные белки, которые затем заменяются на менее мобильные, но имеющие большую аффинность к данной поверхности. Порядок следования: альбумин, глобулин, фибриноген, фибронектин, фактор 12, высокой молекулярной массы кининоген. Причем данный процесс замедлен в тесном пространстве и на гидрофобных поверхностях, что приводит к тому, что фибриноген далее не сменяется.

В основном белковая корона устанавливается в первые 30 секунд и далее остается почти неизменной. Однако различимые изменения все же есть и в соответствии с эффектом Вромена в белковой короне присутствуют фракции, изменяющиеся во времени [83]. Однако не все фракции объясняются эффектом Вромена. Некоторые

белки имеют пиковые значения в начале и в конце периода. Таким образом, полученные экспериментальные данные нельзя объяснить с помощью существующих математических моделей, а наше понимание процессов образования белковой короны на наночастице остается далеким от совершенства.

Принято подразделять белковую корону на две фракции – твердую и мягкую [83]. Данное разделение связано с различиями в энергии связи между белком и наночастицей и соответственно с силой взаимодействия. Считается, что в связи с необходимой очисткой образца от не связавшихся белков в плазме, слабосвязанные белки тоже будут удалены с частицы и не смогут быть зарегистрированы. Таким образом, наличие мягкой белковой короны, которая возможно отделяется от частиц при отмывании от плазмы, остается под вопросом. Твердая белковая корона при этом остается связанной с частицей, и соответственно все исследования описывают именно эту фракцию адсорбированных белков.

Часто бывает, что частицы с немодифицированной поверхностью являются токсичными для организма. Активация тромбоцитов и гемолиз эритроцитов случаются, например, при использовании частиц из оксида кремния. Однако если заранее проинкубировать частицы в плазме, то такие, покрытые белковой короной частицы уже не вызывают таких токсичных эффектов [153, 154]. Поэтому важно понимать, что белковая корона наноагентов играет огромную роль в дальнейшем их взаимодействии с клетками.

Не менее важным является то, что адсорбция белков на поверхность наноагентов может негативно сказаться на функциональности направляющих лигандов, необходимых для направленной доставки лекарств [86]. Было показано, что таргетные наночастицы теряют свою специфичность по отношению к терапевтической цели в сложных биологических средах из-за того, что лиганды на поверхности наноструктур блокируются белковой короной. Белковая корона может вызвать потерю функциональности лигандов за счет плохой их ориентации в пространстве или вытеснения, структурного или конформационного нарушения, интерференции в специфическом взаимодействии.

Чтобы преодолеть вызванные белковой короной проблемы направленной доставки стали синтезировать частицы, не адсорбирующие белки, или наоборот адсорбирующие на своей поверхности дисопсоины [148, 155, 156].

Белковая корона играет важную биологическую роль, обволакивая наноагенты и маскируя поверхностные свойства частиц и, таким образом, усложняя задачу выяснения взаимоотношения между химической функциональностью наночастиц и оказываемых ими биологических эффектов [157]. Для решения данной проблемы было предложено использовать цвиттерионные наноструктуры, способные ингибировать белковую адсорбцию. Для таких наночастиц в физиологических средах происходит только формирование мягкой белковой короны. При этом все возрастающее количество данных о нано-биовзаимодействии будет направлять разработку наночастиц и приведет к способности контролировать это взаимодействие без интерференции с белковой короной.

Также необходимо понимать, что в случае определенных заболеваний состав плазмы крови может меняться и соответственно меняться белковая корона наноагентов [158]. Интересно, что один и тот же вид наночастиц с различными белковыми коронами, соответствующими различным заболеваниям, может иметь существенно различные воздействия на клетки. Таким образом, развитие представлений об образовании белковой короны, ее составе и роли в био-нано взаимодействии также является необходимым для прогресса персонализированной медицины.

### **1.10. Биораспределение наночастиц и их рациональный дизайн**

На биораспределение наноагентов влияет множество факторов, включая способ введения, свойства наночастиц и физиологической среды, в которой они оказываются. Среди различных способов администрации наноагентов, таких как пероральное, легочное, кожное и внутривенное, наиболее изучено последнее [159, 160].

Когда наночастицы попадают в кровоток, их дальнейший транспорт в окружающие ткани определяется размером наноагентов, а также морфологией кровеносных сосудов. В среднем эндотелий млекопитающих характеризуется непрерывной морфологией, позволяющей только маленьким молекулам (меньше 5нм) проникать через стенку сосуда. Однако капилляры почек, гланд и слизистой оболочки пищеварительного тракта имеют фенестры, а эндотелий сосудов печени, селезенки и костного мозга является прерывистым [161, 162]. Как фенестрированный, так и прерывистый эндотелий связаны с большими порами. Эти поры повышают вероятность проникновения наночастиц с гидродинамическим диаметром вплоть до 60 нм в ткани, снабжаемые такими кровеносными сосудами [159, 163].

Кроме того, характеристики поверхности и размер наночастиц могут сильно влиять на адсорбцию белка наночастицами в кровотоке. В крови существует множество белков, и исследования показывают, что конкретные белки, которые адсорбируются на наночастицах, и степень адсорбции зависят от размера наночастиц, кривизны, гидрофобности и поверхностного заряда [164, 165]. Адсорбция белков на поверхности наночастиц может увеличить их общий гидродинамический размер, изменить поверхностный заряд или привести к агрегации, вызывая резкое изменение их физико-химических свойств. Кроме того, специфические белки, адсорбирующиеся на наночастицах, могут определять типы клеток, способных поглотить данные частицы [164, 166, 167]. Важное значение для судьбы наночастицы имеет адсорбция специфических белков, называемых опсонинами (например, белки комплемента, IgG и ламинин), которые помогают иммунным клеткам, таким как макрофаги, распознавать и быстро поглощать наночастицы [164, 167, 168]. Если антитела или белки комплемента адсорбируются на наночастицы, может быть инициирован каскад комплемента, запускающий фагоцитоз макрофагами и привлекающий увеличенное количество макрофагов [169]. В ответ на поглощение наночастиц макрофаги могут также секретировать сигнальные молекулы цитокинов, возможно, стимулируя системный иммунный ответ [167].

Введенные в кровь наноагенты подвергаются процессу опсонизации и соответственно интенсивно поглощаются фагоцитами. Способные к фагоцитозу моноциты и макрофаги, составляющие основную долю СМФ, имеются по всему телу, но наибольшую в поглощении роль они играют в печени (клетки Купфера) и селезенке (макрофаги красной пульпы) [170]. Моноциты формируются в костном мозге, циркулируют в крови и мигрируют в ткани. Макрофаги же, либо резидентные, либо происходящие из моноцитов, имеются почти во всех тканях и носят соответствующие названия, например, в легких (альвеолярные), лимфоузлах (синусовые гистиоциты), центральной нервной системе (микроглия), брюшине (перитонеальные) и т.д.

Несмотря на то, что наиболее интенсивное поглощение наночастиц в печени реализуется макрофагами, другие клетки (гепатоциты, эндотелиальные и др.) тоже участвуют в процессе. При этом частицы, поглощенные фагоцитами, обычно остаются внутри клетки, в то время как поглощение другими клетками может сопровождаться экскрецией через желчь [170]. В селезенке макрофаги выстилают сосуды красной пульпы и венозные синусы, где и происходит секвестрация наноагентов. Вдобавок, разрывы в эндотелии сосудов селезенки составляют 200нм и служат фильтром для состарившихся и поврежденных эритроцитов [171], поэтому долго циркулирующие наночастицы, размер которых превышает 200нм, будут сильнее аккумулироваться в селезенке [172].

Вдобавок к поглощению СМФ, наноагенты также могут претерпевать выведение через почки. Если гидродинамический размер частиц меньше 8 нм, то они могут фильтроваться почками и выводиться с мочой [170]. Значение этого критического для почечной фильтрации размера частиц может меняться в зависимости от характеристик частиц, например, отрицательно заряженная мембрана является плохо проницаемой для анионных наноструктур.

Аккумуляция наночастиц в опухоли интенсивно изучается в целях диагностики и доставки лекарств. Однако в среднем в опухоль попадает 0,7% от общей введенной



дозы, и несмотря на усилия ученых в области таргетной доставки, это значение почти не менялось за последние 10 лет [6]. При этом в среднем с большей эффективностью аккумулируются неорганические частицы, чем органические, хотя относительно недавно появившиеся дендримеры показывают пока наилучший результат. Малые наноагенты имеют преимущество по сравнению со структурами размером 100 нм и более, причем они и проникают глубже в опухоль. Что касается заряда частиц, наиболее эффективными оказываются нейтральные наночастицы. Наиболее эффективной формой частиц являются палочковидные. А активные стратегии доставки в среднем лучше стратегий, рассчитывающих только на пассивную аккумуляцию, хотя при прямом сравнении с контролем разница незначительная. Тем не менее, решающим фактором, определяющим эффективность доставки лекарств на наночастицах, оказывается именно модель опухоли. Причем вышеупомянутый EPR-эффект, как оказалось свойственный далеко не всем опухолям, но широко используемый в исследованиях, пока давал малую эффективность.

Глубокое понимание вышеописанных барьеров, а также заметные достижения в области наноматериалов привели к возможности оптимизации параметров конструкции наночастиц, таких как размер и форма, с целью успешного преодоления этих барьеров.

#### 1.10.1. Размер

Размер наночастиц можно адаптировать с целью управления распределением частиц *in vivo* (рис. 8). Размер определяет время циркуляции в кровотоке, экстравазацию через фенестры в сосудистой сети и поглощение макрофагами. Например, наночастицы диаметром  $<5,5$  нм быстро подвергаются почечному клиренсу при внутривенном введении [173]. В печени присутствует прерывистый эндотелий с фенестрами размером 50–100 нм [174], что приводит к неспецифическому накоплению более крупных частиц. Кроме того, селезеночная фильтрация объясняет удержание частиц, превышающих 200 нм в диаметре, из-за размеров межэндотелиальных щелей 200–500 нм [175]. Частицы микронного

размера (2–5 мкм) легко накапливаются в капиллярах легких, что может быть использовано при нацеливании на эту, одну из преобладающих локализаций метастаз.

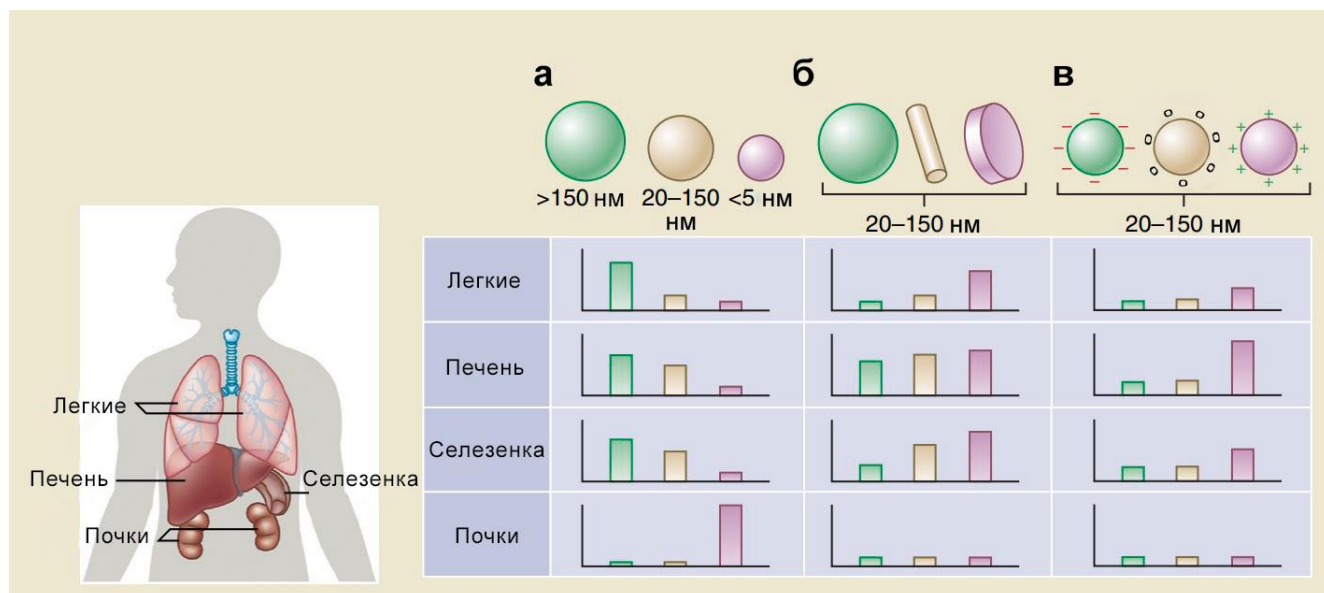


Рисунок 8. Размер, форма и поверхностный заряд наночастиц определяют их биораспределение. Адаптировано из [8].

В совокупности наночастицы со средним размером ~100 нм способны долго циркулировать в кровотоке. Длительный период полувыведения из кровотока дает больше возможностей для экстравазации через фенестры в сосудистой сети опухоли. И хотя EPR эффект продвинул вперед область доставки лекарств на основе наночастиц, было показано, что это явление резко различается в зависимости от степени васкуляризации опухоли. Например, было показано, что различные полимерные мицеллы (30 нм, 50 нм, 70 нм и 100 нм) хорошо проникают в высокопроницаемые опухоли. Однако в малопроницаемой аденокарциноме поджелудочной железы человека, характеризующейся низкой васкуляризацией и плотным фиброзом, в опухолях способны накапливаться только наночастицы небольшого размера <50 нм в диаметре [176]. Степень накопления наночастиц также варьируется в зависимости от типа опухоли из-за взаимодействия различных факторов микросреды. Некоторые солидные опухоли имеют повышенный уровень факторов проницаемости, таких как брадикинин, простагландины, VEGF и MMP

[177]. Тем не менее, лейкемия представляет собой пример несолидного рака крови и костного мозга, лишённого EPR эффекта. В этом случае эффективное лечение нанопрепаратами обычно основано на долго циркулирующих наночастицах с активным нацеливанием на определенные клеточные популяции, ответственные за прогрессирование заболевания.

### 1.10.2. Геометрия

Геометрия частиц влияет на гемореологическую динамику, клеточное поглощение и биораспределение (рис. 8). Например, дисковые частицы способны к опрокидыванию в кровотоке и маргинации к стенкам капилляра, что способствует адгезии частиц к эндотелию и экстравазации [178]. Время циркуляции частиц также сильно зависит от формы. Например, было продемонстрировано, что мицеллы нитевидных полимеров (филомицеллы) имеют более длительное время циркулирования ( $> 1$  недели после введения) по сравнению со сферическими аналогами (2–3 дня), благодаря их склонности к выравниванию вдоль тока жидкости [179]. При этом геометрические параметры, такие как кривизна и соотношение сторон, также влияют на поглощение макрофагами [180]. Были исследованы различные формы от эллипсоидальных, цилиндрических и дисковых до червеобразных частиц [15] и вышеупомянутых филомицелл для повышенного накопления терапевтических средств в опухолях. При внутривенном введении филомицеллы, содержащие паклитаксел, демонстрировали более высокую кумуляцию в опухолях, чем сферические мицеллы [181]. Аналогичные результаты были получены с использованием наночервей оксида железа [182].

### 1.10.3. Поверхностный заряд

Поверхностный заряд наночастиц представляет собой еще один фактор, определяющий время циркуляции наночастиц и их судьбу *in vivo* (рис. 8). Было показано, что наночастицы с нейтральным и отрицательным поверхностным зарядом снижают адсорбцию белков сыворотки, что приводит к увеличению периода полувыведения из кровотока [183, 184]. Положительно заряженные наночастицы наоборот имеют более высокую скорость неспецифического

поглощения в большинстве клеток и быстро выводятся из кровотока. Однако катионные липосомы преимущественно связываются и интернализируются ассоциированными с опухолью ангиогенными эндотелиальными клетками по сравнению с нормальной сосудистой сетью [92], явление, также наблюдаемое в очагах хронического воспаления. Важно отметить, что положительно заряженные частицы облегчают эндосомальное высвобождение посредством механизмов, таких как «эффект протонной губки» [84], препятствующих деградации лекарства в эндосоме. Таким образом, для эффективной доставки наночастиц к опухолям желательнее иметь нейтральный или слегка отрицательный поверхностный заряд наночастиц при внутривенном введении, но переключаться на положительный заряд по прибытии в участок опухоли. Такой рациональный дизайн для максимального накопления в опухоли и поглощения клетками был реализован путем разработки цвиттер-ионных наночастиц с переключаемым зарядом на основе стимула окружающей среды [185].

#### 1.10.4. Деформируемость

Деформируемость также следует учитывать при рациональном дизайне наноагентов. Как упоминалось ранее, такие органы, как печень и селезенка, имеют прерывистый или фенестрированный эндотелий, отвечающий за фильтрацию частиц из кровотока. Например, твердые частицы с диаметром, превышающим порог отсечения межэндотелиальных щелей селезенки, легко удаляются этими органами [171]. Наночастицы различной жесткости могут быть получены управлением степени сшивки. Наногели различной жесткости были разработаны с использованием цвиттер-ионных мономеров и сшивающих агентов [186], и результаты показали, что более мягкие наночастицы, более склонные к деформации, имеют более длительный период циркуляции и меньше накапливаются в селезенке. Аналогичные результаты были получены с частицами мягкого гидрогеля разного диаметра (в том числе размером с эритроцит), изготовленными с использованием метода PRINT (репликация частиц в несмачиваемых шаблонах) [187]. При внутривенном введении высокодеформируемые частицы демонстрируют длительное время циркуляции,

превышающее 30 часов. Интересно, что хотя частицы действительно накапливались в селезенке в ранние сроки, их способность мигрировать через межэндотелиальные щели проявлялась уменьшением количества частиц в органе с течением времени, что коррелировало с увеличением количества частиц в крови в более поздние моменты времени. Деформируемость также может играть роль в содействии транспорту крупных частиц через мелкие капилляры, как например в легких, что было продемонстрировано в экспериментах на микрофлюидных моделях кровеносных капилляров [188].

## **1.11. Стратегии преодоления биологических барьеров**

### 1.11.1. Опсонизация

Стратегия покрытия наночастиц полиэтиленгликолем (ПЭГ) значительно продлевает циркуляцию наночастиц в кровотоке. Процесс ПЭГилирования подразумевает прикрепление ПЭГ к поверхности наночастиц, при этом звенья этиленгликоля образуют прочные ассоциации с молекулами воды, что приводит к образованию гидратного слоя [189]. Этот гидратный слой, в свою очередь, препятствует адсорбции белка и последующему клиренсу посредством СМФ. Ярким примером такого эффекта является ПЭГилирование липосомального доксорубина, которое увеличило время жизни лекарства с минут до часов [190]. Хотя были предприняты попытки функционализации наночастиц материалами, обладающими схожими экранирующими эффектами, такими как поллоксамер, поливиниловый спирт, поли(аминокислоты) и полисахариды, ПЭГ остается наиболее широко используемым материалом [191].

Помимо таких «stealth» покрытий существуют стратегии «активной скрытности». Одним из таких способов является прикрепление на поверхность частицы маркерных пептидов CD47 «не ешь меня», чтобы избежать фагоцитарного клиренса [12]. В этом исследовании «собственные» пептиды были сконструированы компьютерным путем, синтезированы и прикреплены к 160-нм наногранулам, и после введения мышам пептиды существенно пролонгировали циркуляцию лекарственного средства, задерживая фагоцитарный клиренс печени

и селезенки. Кроме того, наночастицы с паклитакселом, функционализированные собственным пептидом, показали лучшее накопление в опухолях A549 в течение 10 минут после введения и к значительному уменьшению размера опухоли по сравнению с обычным составом препарата Cremophor EL.

К стратегии «активной скрытности» можно также отнести покрытие частиц мембранами клеток. Среди таких биомиметических покрытий, снижающих опсонизацию и последующее поглощение СМФ, используются, например мембраны, выделенные из эритроцитов [14] и лейкоцитов [192]. Наночастицы поли(молочно-ко-гликолевой кислоты), покрытые эритроцитарными мембранами (как липидными, так и белковыми компонентами), продемонстрировали пролонгированную до 72 часов циркуляцию в крови. Функционализация поверхности частиц лейкоцитарной мембраной привела к примерно десятикратному снижению адсорбции белка (IgG и альбумина) на поверхности, а также к значительно меньшему поглощению частиц мышинными макрофагами J774 (снижение на ~75%) и моноцитами человека THP-1 (снижение на ~50%), особенно когда покрытие было получено от одного и того же вида доноров. Исследования *in vivo* показали меньшее накопление в печени. Более того, покрытые частицы в основном поглощались не в клетках Купфера, а преимущественно связывались с эндотелием печени. Это снижение поглощения СМФ привело к усиленному накоплению частиц (примерно в два раза) в мышинной модели меланомы.

Интересно, что исследовательские группы пытались использовать белковую корону в своих интересах для нацеливания на определенные клетки и/или очаги заболеваний. Например, для доставки лекарств через гематоэнцефалический барьер использовали наночастицы поли(бутилцианоакрилата), покрытые полисорбатом 80 [193]. Эти частицы, адсорбируя аполилопротеины на поверхности полисорбата 80, действуют как «троянские кони» - имитируя частицы липопротеинов, преодолевают гематоэнцефалический барьер посредством эндоцитоза, опосредованного липопротеинами низкой плотности. Другой привлекательной мишенью для доставки нанолекарств являются макрофаги в

области воспаления, например участвующие в развитии рака [194] или атеросклероза [195]. В одной из таких работ поверхность квантовых точек CdSe/ZnS была функционализирована воспалительным метаболитом холестерина 5,6-секостеролом атероналом-В. Такое покрытие индуцировало конформационные изменения (неправильное сворачивание/агрегацию) белков, составляющих белковую корону, в частности аполипопротеина В, белковой части липопротеина низкой плотности, что, в свою очередь, усиливало поглощение наночастиц макрофагами. Та же самая стратегия потенциально может быть использована для увеличения поглощения наночастиц другими клетками посредством разработки или программирования белковой короны.

### 1.11.2. Маргинация

Было разработано несколько стратегий усиления маргинации наночастиц для повышения взаимодействия со стенками сосудов и экстравазации в очаги заболевания. Первые исследования были сосредоточены на переосмыслении геометрии наночастиц, их классической сферической формы. Динамика несферических частиц в потоке демонстрирует опрокидывания и качения, при этом скорость бокового дрейфа прямо пропорциональна соотношению размеров наночастицы [196]. В то время как сферическая наночастица течет на определенном расстоянии от стенки сосуда параллельно ей, частица с эллипсоидальной геометрией способна кувыркаться и в процессе колебаний передвигаться от одной стенки сосуда к противоположной. В экспериментах с проточной камерой с параллельными пластинами в контролируемых гидродинамических условиях было продемонстрировано, что дисковые частицы примыкают к стенкам сосуда чаще, чем квазиполусферические и сферические частицы [178].

Для обхода и последовательного преодоления нескольких преград, с которыми сталкиваются наночастицы после внутривенного введения, разрабатываются новые многоступенчатые векторы для доставки лекарств [197, 198]. Платформа направлена на улучшение доставки и высвобождения терапевтических средств в опухоли путем инкапсуляции наночастиц, содержащих лекарство, в конструкцию

носителя, состоящего из мезопористого кремния. Фотолитографические методы были приняты для изготовления различных форм несферических нанопористых частиц с размерами в диапазоне от нанометра до микрона [198, 199]. Для достижения идеальной геометрии частиц был использован рациональный подход к дизайну, при котором учитывались максимальная маргинальность и прочная адгезия. Математическое моделирование в сочетании с экспериментами *in vitro* и *in vivo* продемонстрировало, что дисковая геометрия имела наиболее благоприятную динамику маргинальности [196]. Благодаря способности преодолевать несколько различных биологических барьеров, в том числе надлежащую защиту груза, примыкание к эндотелиальным стенкам [178], накопление в очагах заболевания [200] и контролируемое высвобождение груза, многоэтапный подход к доставке активно применялся для химиотерапевтических применений, а также в стратегиях РНК-интерференции (РНКи) в мышечных моделях рака яичников [201] и рака молочной железы [202, 203].

Другая интересная стратегия накопления наночастиц была реализована на наночастицах, способных «общаться» друг с другом, чтобы увеличить накопление в опухоли [204]. В рамках этой стратегии плазмонные золотые наностержни или укороченные белки тканевого фактора, нацеленные на опухоль, которые инициируют каскад коагуляции, осуществляют передачу сигналов. Другая наночастица, в данном случае неорганические наночерви или липосомы, получает сигнал в виде коагуляционного трансглутаминазного фактора XIII (FXIII) или через нацеливание на полимеризованный фибрин, что приводит к накоплению в опухолях.

Было предложено несколько стратегий для преодоления высокого давления интерстициальной жидкости в опухолях, включая нормализацию сосудистой сети опухоли [205]. Было исследовано введение антиангиогенных, а также ангиогенных агентов в попытках нормализовать сосуды, связанные с опухолью, для облегчения диффузии лекарств, полимер-лекарственных конъюгатов и наночастиц в опухоли [206, 207]. Также было показано, что введение сосудистого эндотелиального



фактора роста (VEGF) усиливает экстравазацию наночастиц в мышечных моделях опухолей [208]. Другая стратегия, направленная на преодоление высокого давления интерстициальной жидкости для увеличения накопления наночастиц в опухолях, включает снижение плотности коллагена в опухоли. Было показано, что лозартан, антагонист рецепторов ангиотензина II и антифиброзный агент, ингибирует выработку коллагена I фибробластами, ассоциированными с карциномой, и улучшает накопление и эффективность доксорубицин-содержащих липосом [209].

### 1.11.3. Интернализация

Доказано, что поверхностный заряд наночастиц является основной детерминантой клеточной интернализации, при этом поглощение на основе заряда сильно зависит от типа клеток. Известно о повышенной интернализации положительно заряженных наночастиц по сравнению с их отрицательно заряженными аналогами в различных типах раковых клеток, таких как клетки HeLa [210, 211], клетки MCF-7 [212] и эндотелиальные клетки [213]. Это наблюдение привело к инновационным стратегиям «преобразования заряда», направленным на конкретное переключение заряда наночастиц в ответ на стимулы окружающей среды, такие как pH [214]. Среди них, например, цвиттер-ионные наночастицы с доксорубицином [185]. Нейтральное покрытие обеспечивало пролонгированную циркуляцию, однако при экстравазации в микроокружение опухоли с более низкими значениями pH ~ 6,8 анионный компонент поверхности сбрасывался, оставляя положительный поверхностный заряд на наночастицах, что способствовало повышенному проникновению в опухолевые клетки и улучшало терапевтический эффект *in vivo*.

В связи с пагубным влиянием лизосомальной среды на доставляемый наночастицами груз стали разрабатываться стратегии, направленные на обеспечение эндосомального ускользания или полного избегания лизосом. Мембрано-дестабилизирующие пептиды, такие как INF7, H5WYG и GALA, представляют собой жизнеспособную стратегию для индукции эндосомального ускользания [215]. Включение катионных полимеров, таких как поли(этиленимин)

(ПЭИ) и поли(1-лизин) (PLL), в конструкции наночастиц также привело к эффективному высвобождению терапевтических средств из эндосомальных компартментов. Катионный заряд наночастицы взаимодействует с внешней отрицательно заряженной поверхностью эндосомальной мембраны, что приводит к переворачиванию мембраны и последующей дестабилизации (т. е. механизм «flip-flop») [216]. Полимеры, содержащие способные к протонированию вторичные и/или третичные аминогруппы (например, ПЭИ, гистидин), могут поглощать протоны, что приводит к набуханию из-за приток ПЭИа воды в эндосомальный компартмент, что в конечном итоге приводит к разрыву, также известному как «эффект протонной губки» [145].

Другой жизнеспособной стратегией предотвращения деградации наночастиц лизосомами является обеспечение их клеточной интернализации посредством эндоцитоза, опосредованного кавеолами. Было показано, что функционализация поверхности наночастиц лигандами, такими как фолиевая кислота, альбумин и холестерин, приводит к поглощению наночастиц посредством кавеолин-опосредованного эндоцитоза [217]. Лучшим примером этого является паклитаксел, связанный с альбумином в виде наночастиц. Паклитаксел, связанный с альбумином в виде наночастиц, подвергается опосредованному кавеолами поглощению путем связывания с гликопротеином 60 (ГП60), рецептором альбумина, присутствующим в кавеолах эндотелиальных клеток [218]. Это, в свою очередь, облегчает транспорт через сосудистые стенки в интерстициальное пространство опухоли и не только улучшает терапию метастатического рака молочной железы, но и уменьшает токсичность традиционного препарата [219].

Вышеупомянутая стратегия функционализации наночастиц биомиметическими лейкоцитарными мембранами также оказалась полезной для проникновения в клетки и избегания лизосом [192]. Интернализация таких наноагентов приводит к перестройке цитоскелета вокруг частиц, при этом актиновые филаменты организуются в каналы образования. При этом посредством трансмиссионной электронной микроскопии было показано, что они не были изолированы в

лизосомах, тогда как непокрытые частицы были захвачены внутри эндолизосомных компартментов через 24 часа.

#### 1.11.4. Доставка генетического материала

Для доставки генетического материала был разработан новый липосомальный состав, решающий проблемы нестабильности груза и пересечения ядерной оболочки, и применен для лечения заболеваний печени, таких как вирусный гепатит и болезнь Вильсона [220]. Наночастица содержала ДНК и пептиды окта-аргинина, инкапсулированные в ядро из фосфата кальция, а поверхность была функционализирована ПЭГ для обеспечения длительной циркуляции и лиганда, нацеленного на галактозу, чтобы гарантировать поглощение клетками печени. При этом предполагалось, что чувствительное к кислоте ядро из фосфата кальция должно приводить к быстрому ускользанию из эндосом перед слиянием с лизосомами, тогда как восстанавливаемый циклический олигоаргинин будет способствовать импорту ДНК в ядро. Наночастицы размером ~50 нм накапливались в гепатоцитах, а инкапсулированная ДНК эффективно проникала в ядро, приводя к значительному усилению экспрессии генов.

## **2. Материалы и методы**

### **2.1. Материалы**

Химические вещества: тетрагидрат хлорида железа (II) и гексагидрат хлорида железа (III), тетраэтилортосиликат (ТЭОС), 3-аминопропилтриэтоксисилан (АПТЭС), натриевая соль карбоксиметилдекстрана (Sigma-Aldrich, США), липополисахарид (ЛПС) из E.coli 0111: B4, бычий сывороточный альбумин (БСА) (Sigma-Aldrich, США); азотная кислота, водный раствор аммиака, спирт этиловый, спирт изопропиловый, цитрат натрия, хлорид аммония, натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), гидрокарбонат натрия, раствор формалина (Химмед, Россия); Золетил (Virbac, Франция); Рометар (Биовета, Чехия); модифицированная Дульбекко среда Игла (DMEM), эмбриональная бычья сыворотка (HyClone, США); L-глутамин (ПанЭко, Россия), гепарин (Московский эндокринный завод ФГУП, Россия).

Наночастицы: 100-нм магнитные наночастицы, покрытые глюкуроновой кислотой (fluidMag-ARA), полиакриловой кислотой (fluidMag-PAS), карбоксиметилдекстраном (fluidMag-CMX), и частицы размером 1000 нм, покрытые SiO<sub>2</sub>-карбоксиллом (SiMAG-Carboxyl) были приобретены в Chemicell, Германия.

Животные: самки мышей BALB/c, C57Bl/6 массой 18-22 г и самки мышей CD-1 массой 32-44 г были использованы для исследования. Все процедуры с животными проводили в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных Института биоорганической химии Российской академии наук (ИБХ РАН) и были одобрены Институциональным комитетом по уходу и использованию животных.

### **2.2. Методы**

#### **2.2.1. Синтез магнитных частиц**

Наночастицы были синтезированы посредством щелочного соосаждения солей железа (II) и (III). Для этого смесь 0,86 г FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O и 2,36 г FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O растворяли в 40 мл дистиллированной воды и при постоянном перемешивании добавляли 5 мл 30% NH<sub>4</sub>OH. Затем раствор инкубировали при 80°C в течение 2 часов. Полученные

частицы обрабатывали 10 мл 2 М  $\text{HNO}_3$ , а затем трижды промывали 10 мл дистиллированной воды, используя магнитную сепарацию на NdFeB магните диаметром 25 мм. Мелкие наночастицы, которые не притянулись к магниту через 5 мин на последнем этапе промывки, собирали и использовали в дальнейших экспериментах.

Магнитные НЧ стабилизировали лимонной кислотой перед покрытием оксидом кремния. Для этого к 0,9 мл НЧ добавляли 0,1 мл цитрата натрия с концентрацией 25 г/л. Смесь перемешивали, обрабатывали ультразвуком и инкубировали при  $80^\circ\text{C}$  в течение 30 мин в трех повторах. От несвязавшегося цитрата отмывались центрифугированием при 20 000 g в течение 15 мин.

### 2.2.2. Синтез частиц из оксида кремния

Для приготовления наночастиц  $\text{SiO}_2$  использовали модифицированный метод Штобера (рис. 9) [221]. Вкратце, дистиллированную воду, ТЭОС и гидроксид аммиака добавляли к этиловому или изопропиловому спирту и перемешивали. После инкубации в течение суток при комнатной температуре полученные частицы отмывали дистиллированной водой посредством центрифугирования. Для синтеза магнитных  $\text{SiO}_2$  частиц в смесь также добавляли магнитные НЧ, покрытые цитратом. Точные соотношения реагентов приведены в таблице 2.

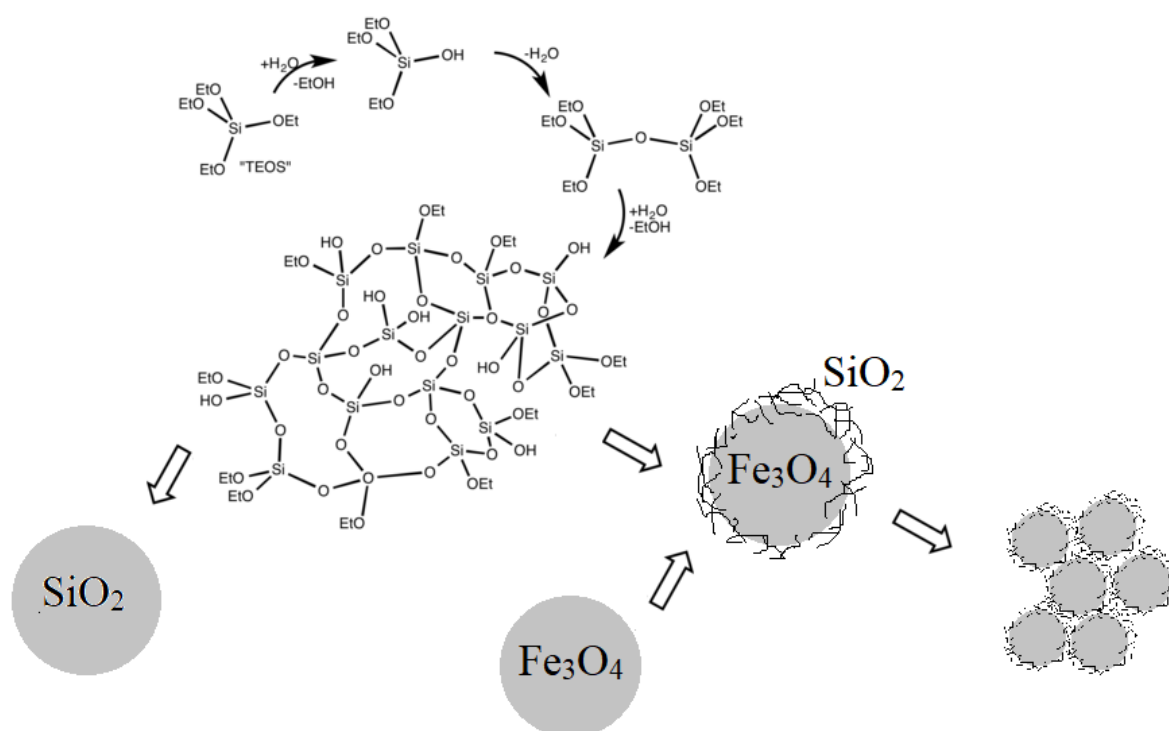


Рисунок 9. Синтез частиц оксида кремния по методу Штобера.

Частицы	Спирт, 950 мкл	Вода, мкл	30% NH <sub>4</sub> OH, мкл	ТЭОС, мкл	Частицы- затравки, 50 мкл	Отмывание на центрифуге	
						От супер- натанта	От преци- питата
SiO <sub>2</sub> - 100 нм	этиловый	60	10	40	---	12 000 g 5 мин	300 g 5 мин
SiO <sub>2</sub> - 250 нм	этиловый	60	30	50	---	5 000 g 10 мин	100 g 2 мин
SiO <sub>2</sub> - 500 нм	изо- пропиловый	60	12	40	---	500 g 4 мин	0 g 70 мин
SiO <sub>2</sub> - 1000 нм	изо- пропиловый	60	20	40	---	100 g 5 мин	---
SiO <sub>2</sub> MP - 50 нм	этиловый	20	5	3	покрытые цитратом МЧ	12 000 g 5 мин	200 g 5 мин
SiO <sub>2</sub> MP - 100 нм	этиловый	20	20	10	покрытые цитратом МЧ	12 000 g 5 мин	200 g 5 мин
SiO <sub>2</sub> MP - 200 нм	этиловый	20	23	17	покрытые цитратом МЧ	3 000 g 5 мин	200 g 5 мин

Таблица 2. Соотношения реагентов, используемых для получения магнитных и немагнитных наночастиц SiO<sub>2</sub>.

Для получения наночастиц с положительным ζ-потенциалом 1 мг синтезированных частиц SiO<sub>2</sub> (в 10 мкл H<sub>2</sub>O) смешивали с 1 мл 1% раствора АПТЭС в этаноле и

инкубировали раствор в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем частицы промывали 3 раза дистиллированной водой.

### 2.2.3. Синтез ферригидритных частиц

Наночастицы ферригидрита (ФН) были синтезированы путем щелочного осаждения хлорида железа (III) с последующей кислотной пептизацией в ультразвуковой ванне. Для этого 88,5 мг гексагидрата хлорида железа (III) растворяли в 1 мл дистиллированной воды. Затем раствор смешивали с 125 мкл 30% гидроксида аммония и инкубировали 3 ч при 80°C. Далее пробирку центрифугировали при 700 g в течение 2 мин и сливали надосадочную жидкость. Затем добавляли 500 мкл 0,4 М азотной кислоты и обрабатывали ультразвуком. Через 5 мин частицы осаждали центрифугированием и трижды промывали дистиллированной водой (20 000 g, сначала 10 мин, затем 30 мин и, наконец, 60 мин). В конце частицы ФН отмывали от крупного мусора (4000 g, 15 мин).

Для применения *in vivo* наночастицы ФН перемешивали с 50 г/л карбоксиметилдекстрана (CMD), обрабатывали ультразвуком и инкубировали при 80°C в течение 30 мин в трех повторах. Затем трижды промывали при 20 000 g в течение 1,5 ч от несвязавшегося полимера и один раз при 4000 g в течение 15 мин от крупных частиц.

### 2.2.4. Характеризация наночастиц

Измерения гидродинамического размера и  $\zeta$ -потенциала проводили методом динамического и электрофоретического светорассеяния с использованием анализатора Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Великобритания). В качестве величины гидродинамического диаметра использовали Number size. Для исследования агрегационной стабильности наночастицы инкубировали в PBS в течение 15 мин перед измерением их размера методом динамического светорассеяния. Измерения  $\zeta$ -потенциала проводили в 10 mM NaCl, используя для анализа модель Смолуховского.

Для рентгеноструктурного анализа наночастицы разводили в этаноле, центрифугировали при 20 000 g в течение 1 ч, декантировали и высушивали под вакуумом. Рентгенограммы порошка НЧ получали на рентгеновском дифрактометре Miniflex 600 (Rigaku, Япония) по углу  $2\theta$  в диапазоне 20–70° со скоростью сканирования 2°/мин.

Инфракрасные Фурье-спектры соединений регистрировали на спектрометре FSM 2203 (Инфраспек, Россия).

Изображения сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) получены на микроскопе Tescan MAIA3 (Чехия) в режиме регистрации вторичных электронов и ускоряющем напряжении 10-20 кВ. Образцы частиц наносили на кремниевую пластину и сушили на воздухе. Размер наночастиц измеряли с помощью программного обеспечения ImageJ.

Изображения просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) получали на микроскопе JEOL JEM 2100 (Япония) при ускоряющем напряжении 200 кВ. Образцы частиц помещали на медную сетку с углеродным покрытием, а затем сушили на воздухе.

Спектры поглощения наночастиц измеряли на УФ-видимом спектрофотометре Ultrospec 7000 (Biochrom Ltd., Великобритания). Наночастицы известной массы разводили в воде до концентрации 0,01 – 0,1 г/л и измеряли спектры в диапазоне длин волн от 200 до 1000 нм в 1 см кварцевых кюветах.

Измерения намагниченности частиц проводили с помощью СКВИД-магнитометра MPMS XL (Quantum Design, США). 100 мкл НЧ в концентрации 10 г/л помещали в пластиковую пробирку и регистрировали намагниченность в диапазоне амплитуд поля от -1000 до 1000 Э. Намагниченность 100 мкл воды в пластиковой пробирке была также измерена и вычтена из намагниченности образца.



### 2.2.5. Метод количественной оценки магнитных частиц (Magnetic Particle Quantification)

Магнитные наночастицы количественно определяли методом MPQ [222]. Вкратце, образец с магнитными частицами подвергался воздействию переменного магнитного поля, генерируемого на двух частотах  $f_1$  и  $f_2$ , и детектирование проводилось на комбинаторных частотах  $n \cdot f_1 \pm m \cdot f_2$ , где  $n$  и  $m$  — целые числа,  $n^2 + m^2 \neq 0$ . Этот метод нечувствителен к диа- и парамагнитным материалам и совместим с различными конфигурациями измерительных катушек [223]; полученный магнитный сигнал в высокой степени коррелирует с концентрацией магнитных НЧ [224].

### 2.2.6. Исследование фармакокинетики магнитных наночастиц

Мышей анестезировали внутрибрюшинной инъекцией 200 мкл раствора 90 г/л Золетила и 0,16 г/л ксилазина гидрохлорида (Рометар) в PBS. Хвост мыши помещали в измерительную катушку MPQ-ридера и осторожно фиксировали липкой лентой. Затем в ретроорбитальный синус вводили 200 мкг  $\text{SiO}_2\text{MP}$  и измеряли их концентрацию в крови в хвостовых венах и артериях методом MPQ в режиме реального времени. Циркуляцию суперпарамагнитных частиц в крови также измеряли путем забора крови из лицевой вены и последующего анализа в детекторной катушке MPQ прибора. Полученные данные аппроксимировали моноэкспоненциальной функцией и рассчитывали период полувыведения. Начальный и конечный участки кривой были исключены из анализа из-за возможного неравномерного распределения частиц в объеме крови и малого отношения сигнал/шум соответственно.

Для исследования биораспределения наночастиц после их полного выведения из кровотока мышей умерщвляли посредством цервикальной дислокации, извлекали основные органы (печень, селезенка, легкие, почки, сердце, бедренная кость) и помещали в измерительную катушку MPQ. Измеренный сигнал нормировали на сумму магнитных сигналов от всех исследуемых органов и представляли в % от введенной дозы.

В серии экспериментов с ферригидритом для исследования биораспределения суперпарамагнитных НЧ мышей умерщвляли, а печень, селезенку, легкие, почки, сердце, бедренные кости и опухоль собирали и помещали в детекторную катушку MPQ магнитометра. Это было выполнено через 2 часа после введения суперпарамагнитных НЧ здоровым мышам BALB/c, а также через 2, 6 и 24 часа после введения суперпарамагнитных НЧ мышам C57Bl/6 с опухолями. Количество частиц, измеренное в каждом органе, нормировали на сумму магнитных сигналов от всех исследуемых органов (%ID). Данные, нормированные на массу органа (%ID/г), приведены в таблице S2.

Также распределение железных частиц внутри опухоли изучали на срезах после окраски ткани берлинской лазурью по методу Перлса (более подробно описано в разделе Токсичность *in vivo*).

#### 2.2.7. Магнитно-резонансная томография (МРТ)

МРТ выполняли на аппарате ICON 1T MRI (Bruker, США) с использованием радиочастотной катушки для всего тела мыши. Использовалась последовательность FLASH (TR/TE = 1000/5 мс, разрешение 200 мкм, FOV = 80 мм × 30 мм, без усреднения, 1 повторение, 20 срезов на сканирование, толщина среза 1 мм).

#### 2.2.8. Модель воспаления, вызванная ЛПС

Для экспериментов использовали мышей C57Bl/6. ЛПС вводили внутривенно в дозе 5 мг/кг и возвращали мышей в клетки со свободным доступом к пище и воде на 16 ч. Образцы крови для анализа брали до и через 16 ч после введения ЛПС. Затем 50 мкл гепаринизированной крови смешивали с 400 мкл буфера для лизиса эритроцитов (150 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 0,1 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА, 10 мМ NaHCO<sub>3</sub>, pH 7,3) и инкубировали 10 мин при комнатной температуре. Затем образцы центрифугировали 10 мин при 100 g при +4 °C, сливали надосадочную жидкость и повторяли процедуру лизиса эритроцитов. Наконец, клетки ресуспендировали в 70 мкл PBS с 1% BSA и анализировали с помощью проточной цитометрии. Количество лимфоцитов, нейтрофилов и общее количество лейкоцитов определяли

на основе их рассеяния прямого света (размер клеток) и рассеяния бокового света (зернистость клеток), см. примеры выбора гейтов на рисунке 10.

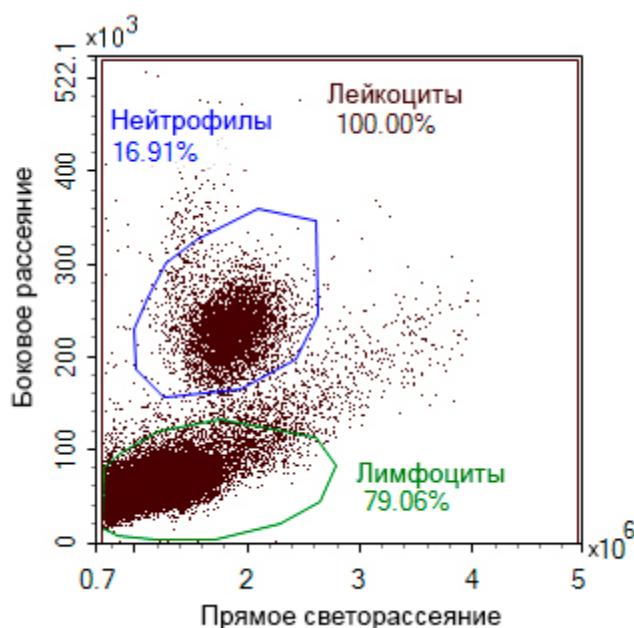


Рисунок 10. Стратегия выбора гейтов для анализа образцов крови проточным цитометром. Черная, зеленая и синяя границы показывают популяции лейкоцитов, лимфоцитов и нейтрофилов соответственно.

#### 2.2.9. Опухолевая модель

Клетки меланомы B16-F1 и карциномы молочной железы EMT6/P выращивали в среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 2 mM L-глутамин при 37°C в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Клетки собирали из чашки для культивирования и переносили в PBS, чтобы получить концентрацию 10<sup>7</sup> клеток на мл. Затем суспензии клеток B16-F1 и EMT6/P (100 мкл) вводили подкожно в боковую область мышей C57Bl/6 или BALB/c соответственно. Для экспериментов с иммунным статусом использовали мышей с опухолями объемом 1 см<sup>3</sup>. Для серии экспериментов с ферригидритом использовались мыши с опухолями объемом 300 мм<sup>3</sup>.

#### 2.2.10. Токсичность *in vivo*

После СМФ блокады 5 мг покрытых СМД частиц FH (250 мкг/г массы тела) мышей BALB/c возвращали в клетки с неограниченным доступом к пище и воде. Их массу

измеряли в течение 11 дней каждые 2-3 дня. У них анализировали биохимические показатели крови, такие как аспартатаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), щелочная фосфатаза (ЩФ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), мочевины и креатинина, через 1, 3 и 7 дней после введения FH-CMD. Для этого кровь извлекали путем пункции ретроорбитального синуса и отбирали в пробирки с гепарином в качестве антикоагулянта. Плазму крови выделяли центрифугированием при 1000 g в течение 2 мин, и затем трижды разбавляли PBS. Хранили в мокром льду до проведения анализа. Биохимический анализ проводили на ветеринарном автоматическом биохимическом анализаторе iMagic-V7 (Shenzhen iCubio Biomedical Technology Co., Китай).

Основные органы (печень, селезенка, сердце, почки и легкие) мышей каждой группы фиксировали 4% формальдегидом и заливали в парафин по стандартной методике на Tissue-Tek TEC (Sakura, США). Для гистологической оценки получали срезы толщиной 5-7 мкм на микротоме Microm HM340E (Thermo Scientific, США) и окрашивали гематоксилином и эозином или эозином и берлинской лазурью по Перлсу по стандартным протоколам. Изображения получены с использованием микроскопа Leica DM2500 (Leica Microsystems, Австрия) с увеличением 400x. Морфометрическое исследование отложений гемосидерина в печени и селезенке проводили в программе ImageJ с использованием плагина Color Threshold. Количество отложений гемосидерина (площадь, окрашенная в синий цвет по реакции Перлса) нормировали на общую площадь среза. Для каждой группы анализировали по три мыши.

#### 2.2.11. Статистический анализ

Все эксперименты проводились не менее чем в трехкратной повторности. Результаты представлены в виде среднего  $\pm$  стандартное отклонение. Статистическую значимость между двумя группами определяли с использованием t-теста Уэлча с неравными дисперсиями. Значения  $P < 0,05$  и  $< 0,01$  обозначались \* и \*\* соответственно.

### **3. Результаты и их обсуждение**

#### **3.1. Синтез блокирующих и целевых частиц для СМФ блокады и их полная характеристика**

Для выявления свойств твердых неорганических частиц, способных влиять на эффективность СМФ блокады, мы синтезировали ряд наноагентов разного размера и  $\zeta$ -потенциала. В качестве основного материала для приготовления частиц был выбран оксид кремния. Он обеспечивает долговременную химическую стабильность [225], простую настройку размера частиц  $\text{SiO}_2$  во время синтеза, а также изменение  $\zeta$ -потенциала путем реакции с соответствующими производными силана [226].

Наночастицы оксида кремния получали водным гидролизом ТЭОС в спиртовой среде в присутствии гидроксида аммония. Путем оптимизации условий синтеза (см. табл. 2) были получены частицы  $\text{SiO}_2$  со средним диаметром 100, 250, 500 нм и 1 мкм, которые затем использовались для блокады СМФ.

Кроме того, мы синтезировали суперпарамагнитные наночастицы оксида железа размером 50, 100 и 200 нм, покрытые оксидом кремния ( $\text{SiO}_2\text{MP}$ ), которые в дальнейшем использовали в качестве целевых частиц для анализа их циркуляции в кровотоке. Для этого наночастицы магнетита  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  были получены посредством соосаждения солей  $\text{Fe}^{2+}$  и  $\text{Fe}^{3+}$ , как описано ранее [226]. Их стабилизировали цитратом натрия, а затем использовали в качестве затравки в реакции Штобера.

УФ-видимый анализ и просвечивающая электронная микроскопия подтвердили успешное покрытие магнитных наночастиц. УФ-видимая спектроскопия (рисунок 11) показала, что непокрытые частицы  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и частицы  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , покрытые цитратом, имеют два пика поглощения в 220-нм и 360-нм областях. Для 250-нм  $\text{SiO}_2$  частиц мы наблюдали экспоненциальное уменьшение их экстинкции с увеличением длины волны из-за сильного рассеяния и незначительного поглощения света оксидом кремния в наблюдаемом спектральном диапазоне. Частицы  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , покрытые  $\text{SiO}_2$ , имели характер экстинкции, присущий обоим материалам: пик поглощения в 360-нм области и интенсивное рассеяние коротковолнового света. Сканирующая

электронная микроскопия продемонстрировала круглую форму частиц  $\text{SiO}_2$  размером 250 нм, 500 нм и 1 мкм, в то время как 100-нм  $\text{SiO}_2$  частицы и магнитные  $\text{SiO}_2$  частицы имели неправильную форму (рисунок 12).

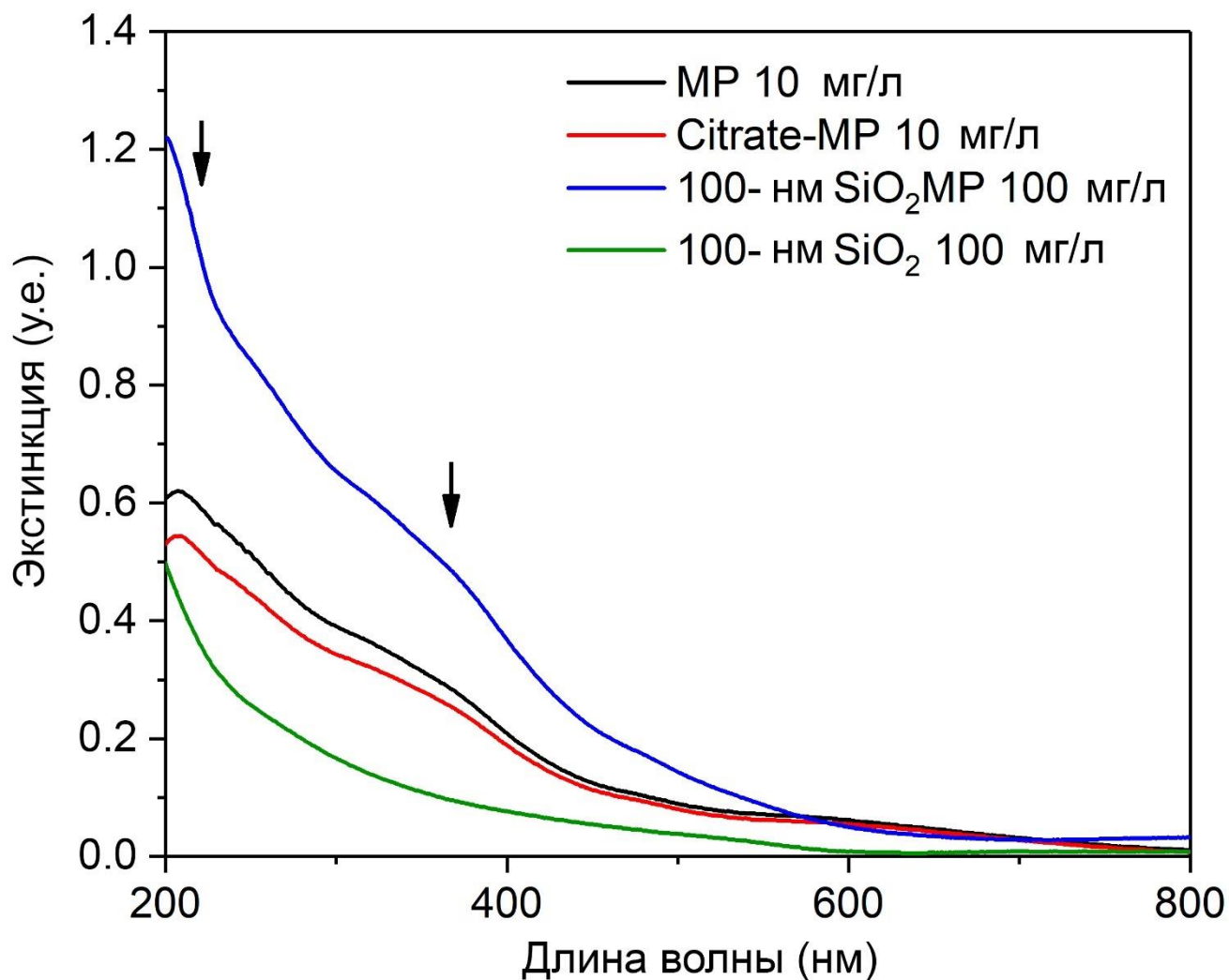


Рисунок 11. Спектры поглощения для коллоидных суспензий магнитных наночастиц без покрытия (MP), магнитных наночастиц, покрытых цитратом (Citrate-MP), магнитных наночастиц, покрытых диоксидом кремния (100-нм  $\text{SiO}_2$ MP) и наночастиц диоксида кремния (100-нм  $\text{SiO}_2$ ). Черные стрелки при 220 нм и 360 нм показывают пик рассеяния оксида кремния и полосу поглощения магнетита соответственно.

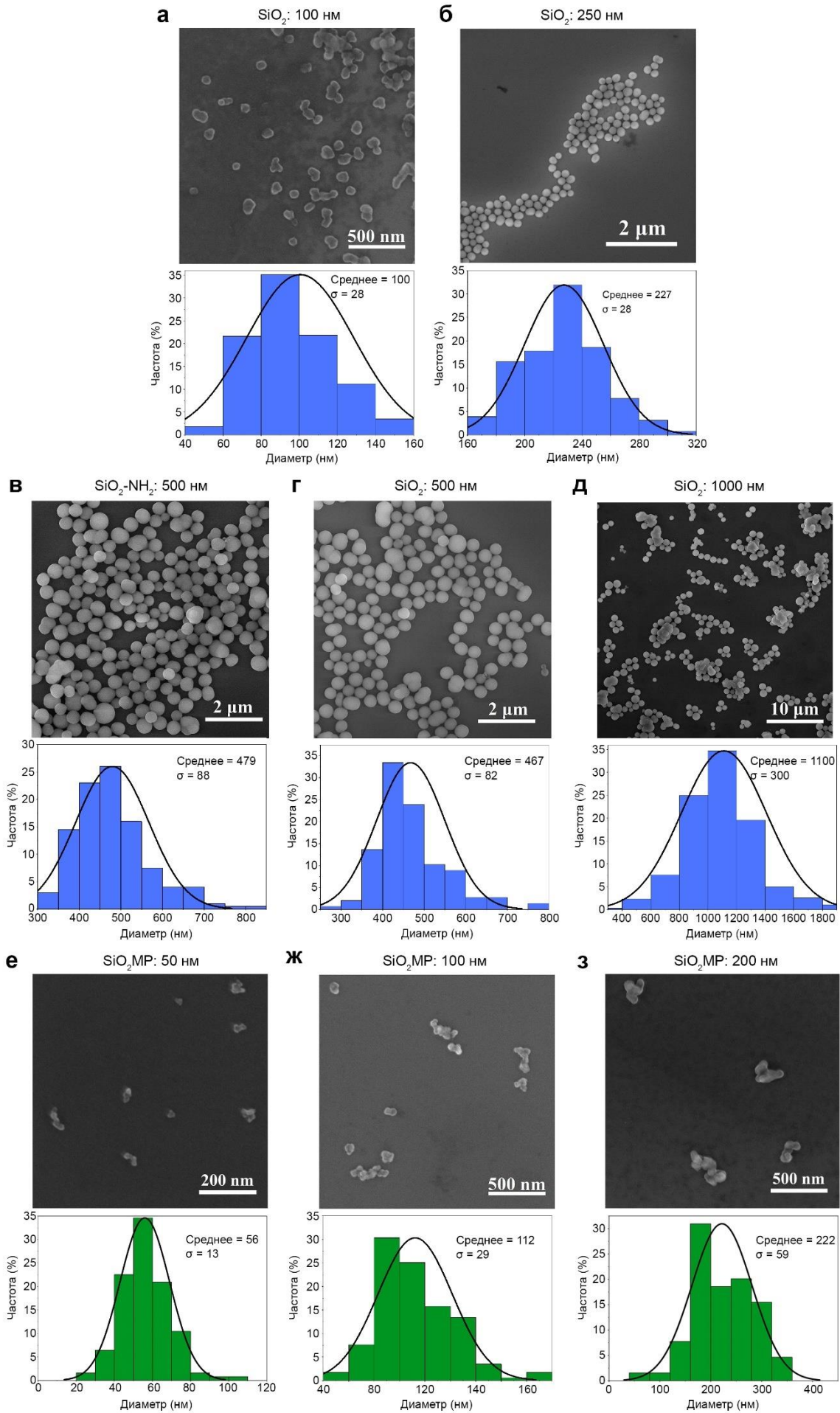


Рисунок 12. Свойства синтезированных наночастиц. Микрофотографии методом сканирующей электронной микроскопии (вверху) и распределение по размерам (внизу) для: немагнитных  $\text{SiO}_2$  100 нм (а); 250 нм (б); амино-модифицированных и немодифицированных 500 нм (в, г); 1000 нм (д) частиц и магнитных  $\text{SiO}_2$  50 нм (е); 100 нм (ж); 200-нм (з) наночастиц.

Магнитные частицы состояли из нескольких ядер, окруженных плотной оболочкой  $\text{SiO}_2$ , как было обнаружено с помощью просвечивающей электронной микроскопии (рисунок 13). Все синтезированные частицы имели нормальное мономодальное распределение по размерам (рисунок 12).

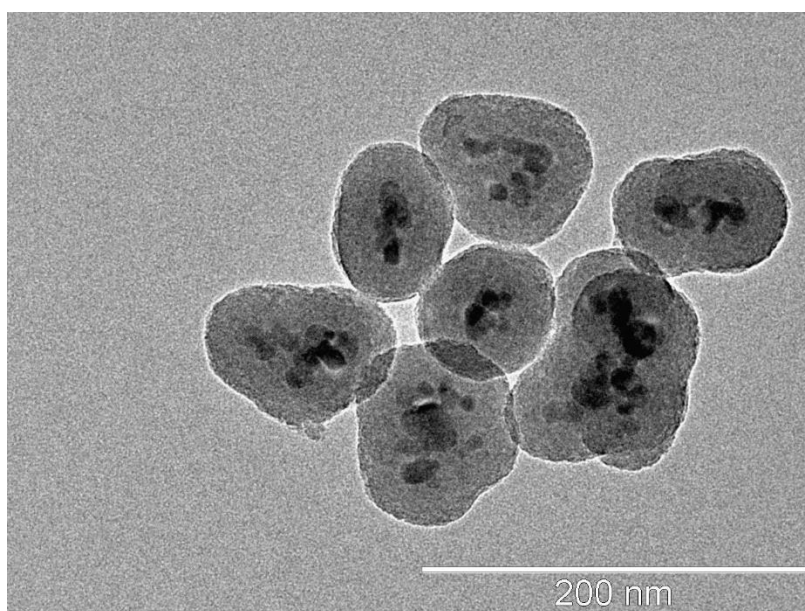


Рисунок 13. Микрофотография 100-нм магнитных наночастиц, покрытых  $\text{SiO}_2$ , методом просвечивающей электронной микроскопии.

Динамическое рассеяние света показало, что гидродинамический размер наночастиц в воде почти равен их физическому диаметру (рисунок 14, таблица 3). Увеличение гидродинамического размера наночастиц в PBS оказалось незначительным, что свидетельствует об отсутствии агрегации наночастиц в физиологическом растворе.



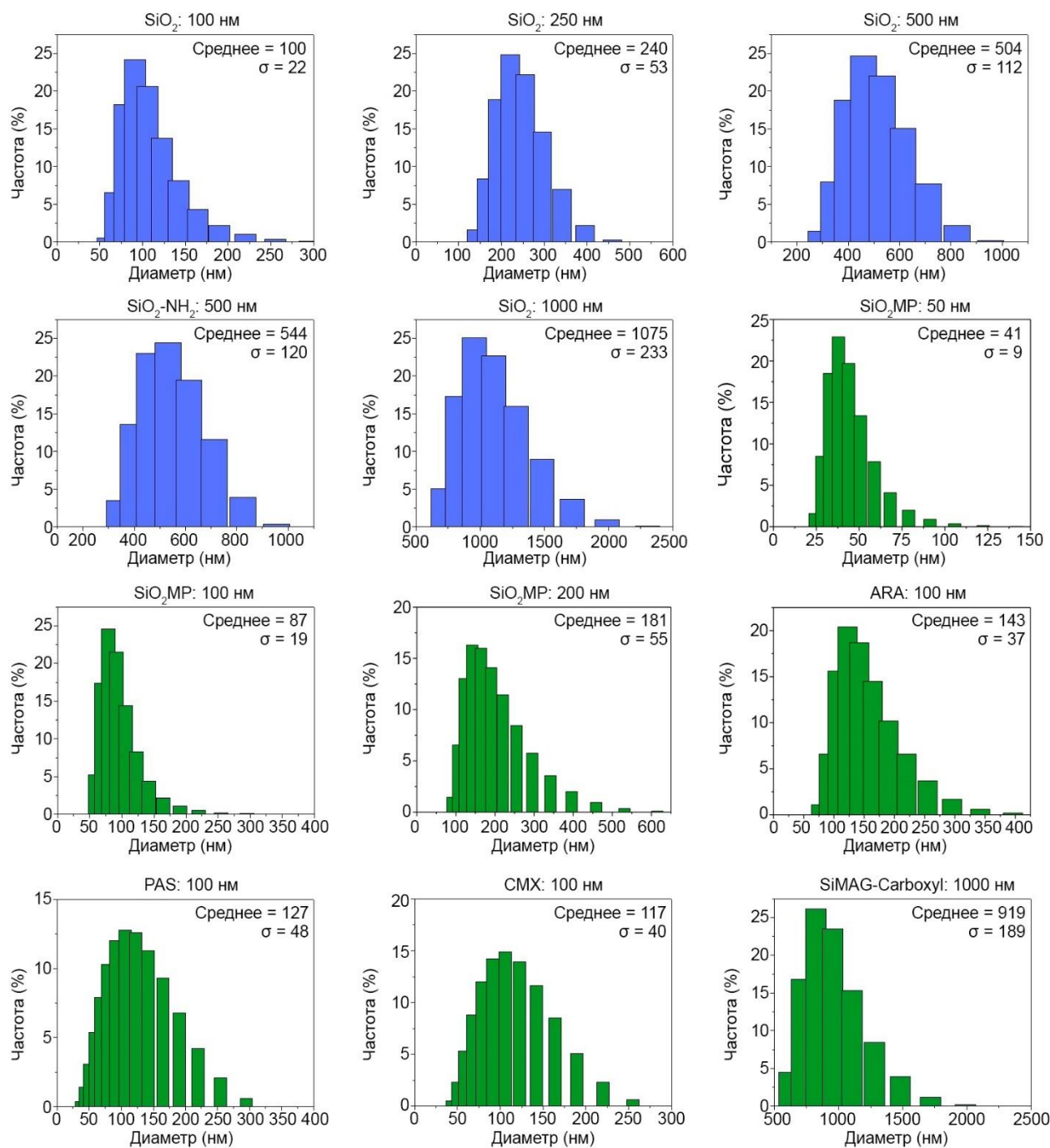


Рисунок 14. Гидродинамическое распределение по размерам: немагнитных 100-нм, 250-нм, 500-нм, 1000-нм SiO<sub>2</sub> частиц; amino-модифицированных 500-нм SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> частиц; 50-нм, 100-нм, 200-нм магнитных частиц, покрытых оксидом кремния (SiO<sub>2</sub>MP); 100-нм магнитных частиц, покрытых глюконовой кислотой (ARA), полиакриловой кислотой (PAS), карбоксиметилдекстраном (CMX); магнитных частиц, покрытых оксидом кремния и модифицированных карбоксилем, 1000-нм SiMAG-Carboxyl.

Обозначение частиц	Покрытие	Физический размер (нм)	Гидродинамический размер в воде (нм)	Гидродинамический размер в PBS, pH 7,4 (нм)
SiO <sub>2</sub> 100 нм	SiO <sub>2</sub>	100±28	100±22	99±32
SiO <sub>2</sub> 250 нм	SiO <sub>2</sub>	227±28	240±53	281±96
SiO <sub>2</sub> 500 нм	SiO <sub>2</sub>	467±82	504±112	491±143
SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> 500 нм	SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	479±88	544±120	552±155
SiO <sub>2</sub> 1000 нм	SiO <sub>2</sub>	1100±300	1075±233	1177±322
SiO <sub>2</sub> MP 50 нм	SiO <sub>2</sub>	56±13	45±13	44±12
SiO <sub>2</sub> MP 100 нм	SiO <sub>2</sub>	112±29	87±19	100±32
SiO <sub>2</sub> MP 200 нм	SiO <sub>2</sub>	222±59	193±73	189±64

Таблица 3. Характеристика синтезированных наночастиц. Физический размер, определенный с помощью сканирующей электронной микроскопии, и гидродинамические размеры в дистиллированной воде и буфере PBS, определенные с помощью динамического светорассеяния.

Сразу после синтеза все полученные частицы имели отрицательный  $\zeta$ -потенциал менее -40 мВ (см. табл. 4) из-за наличия на их поверхности силанольных групп. Для создания положительно заряженных блокирующих агентов мы модифицировали поверхность частиц посредством преципитации производных аminosилана. Для модификации были взяты 500-нм частицы с  $\zeta$ -потенциалом -67 мВ. После завершения реакции  $\zeta$ -потенциал достиг +27 мВ (см. рисунок 15).

Обозначение частиц	Покрытие	$\zeta$ -потенциал (мВ)	Диаметр (нм)	Время циркуляции (мин)
Блокирующие частицы				
SiO <sub>2</sub> 100 нм	SiO <sub>2</sub>	-49±8	100±30	70±20 мин
SiO <sub>2</sub> 250 нм	SiO <sub>2</sub>	-45±8	230±30	26±2 мин
SiO <sub>2</sub> 500 нм	SiO <sub>2</sub>	-67±7	470±80	12±3 мин
SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub> 500 нм	SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	+27±3	480±90	12±3 мин
SiO <sub>2</sub> 1000 нм	SiO <sub>2</sub>	-77±9	1100±300	7±2 мин
SiMAG-Carboxyl 1000 нм	SiO <sub>2</sub> -COOH	-33±5	920±190 *	70±30 мин
ARA 100 нм	Полиглюкуроновая кислота	-33±7	140±40 *	180±5 мин

PAS 100 нм	Полиакриловая кислота	$-47 \pm 10$	$130 \pm 50^*$	$170 \pm 60$ мин
CMX 100 нм	Карбоксиметил-декстран	$-21 \pm 8$	$120 \pm 40^*$	$210 \pm 30$ мин
Целевые частицы				
SiO <sub>2</sub> MP 50 нм	SiO <sub>2</sub>	$-52 \pm 11$	$56 \pm 13$	—
SiO <sub>2</sub> MP 100 нм	SiO <sub>2</sub>	$-52 \pm 7$	$110 \pm 30$	—
SiO <sub>2</sub> MP 200 нм	SiO <sub>2</sub>	$-47 \pm 6$	$220 \pm 60$	—

Таблица 4. Свойства блокирующих и целевых частиц. Значения представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. \* - указан гидродинамический размер.

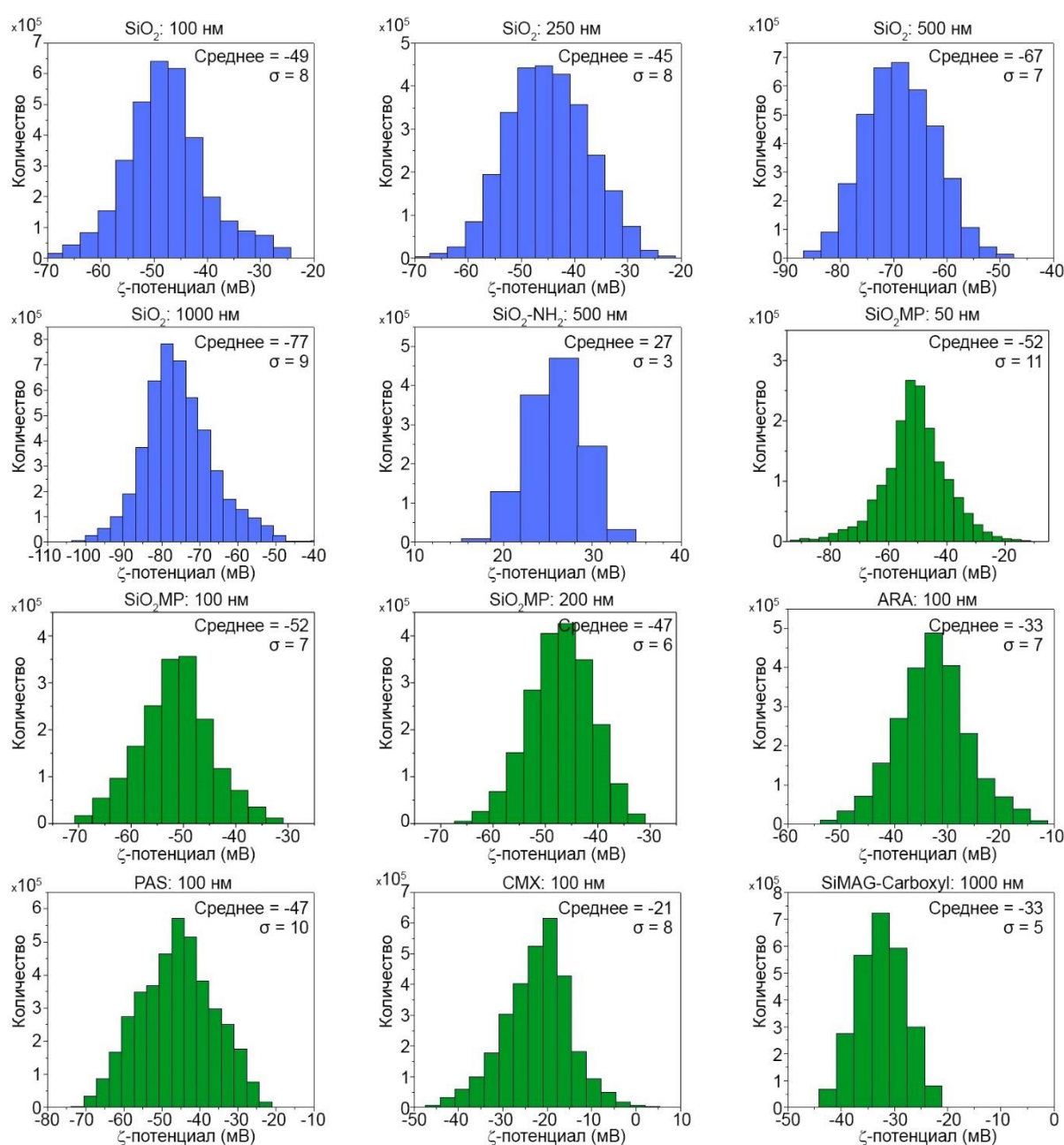


Рисунок 15. Распределение  $\zeta$ -потенциала для: немагнитных 100-нм, 250-нм, 500-нм, 1000-нм  $\text{SiO}_2$  частиц; амино-модифицированных 500-нм  $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  частиц; а также 50-нм, 100-нм, 200-нм магнитных частиц, покрытых оксидом кремния ( $\text{SiO}_2\text{MP}$ ); 100-нм магнитных частиц, покрытых глюкуроновой кислотой (ARA), полиакриловой кислотой (PAS), карбоксиметил-декстраном (CMX); магнитных частиц, покрытых оксидом кремния и модифицированных карбоксилем, 1000-нм SiMAG-Carboxyl.

Помимо таких важных параметров, как размер и  $\zeta$ -потенциал, на эффективность блокады может влиять структура покрытия частиц. Тип покрытия, например, определяет состав белковой короны, образующейся на поверхности частиц в крови, и, следовательно, активность их фагоцитоза макрофагами [227]. Поэтому в качестве блокирующих НЧ мы также использовали ряд коммерчески доступных наночастиц оксида железа с различными покрытиями: оксид кремния (SiMAG-Carboxyl), полиглюкуроновую кислоту (ARA), полиакриловую кислоту (PAS) и карбоксиметилдекстран (CMX). В Таблице 4 приведены физико-химические свойства всех частиц, использованных в данной работе.

### **3.2. СМФ блокада и биораспределение наночастиц**

Для индукции блокады системы мононуклеарных фагоцитов мышам внутривенно вводили большую дозу блокирующих частиц (обычно 5 мг). После полного выведения наночастиц блокатора из кровотока вводили небольшую дозу (200 мкг) целевых наночастиц. Эффективность ингибирования фагоцитоза СМФ оценивали по продлению времени циркуляции в крови целевых наночастиц.

Кинетику циркуляции наночастиц в кровотоке регистрировали неинвазивно в реальном времени в хвостовых венах и артериях мышей с помощью количественного метода МРQ. Для точного определения момента полного выведения из кровотока немагнитных блокирующих частиц  $\text{SiO}_2$  (см. табл. 4) перед введением их смешивали с небольшим количеством частиц оксида кремния того же физического размера и свойств поверхности, но имеющих магнитное ядро.

В результате были получены кинетики выведения из кровотока блокирующих и целевых наночастиц (см. пример на рис. 16). Затем кинетика циркуляции целевых НЧ аппроксимировалась моноэкспоненциальной функцией и рассчитывался период полувыведения наночастиц из кровотока. В итоге, время полувыведения целевых частиц использовали для сравнения эффективности СМФ блокады в разных экспериментах.

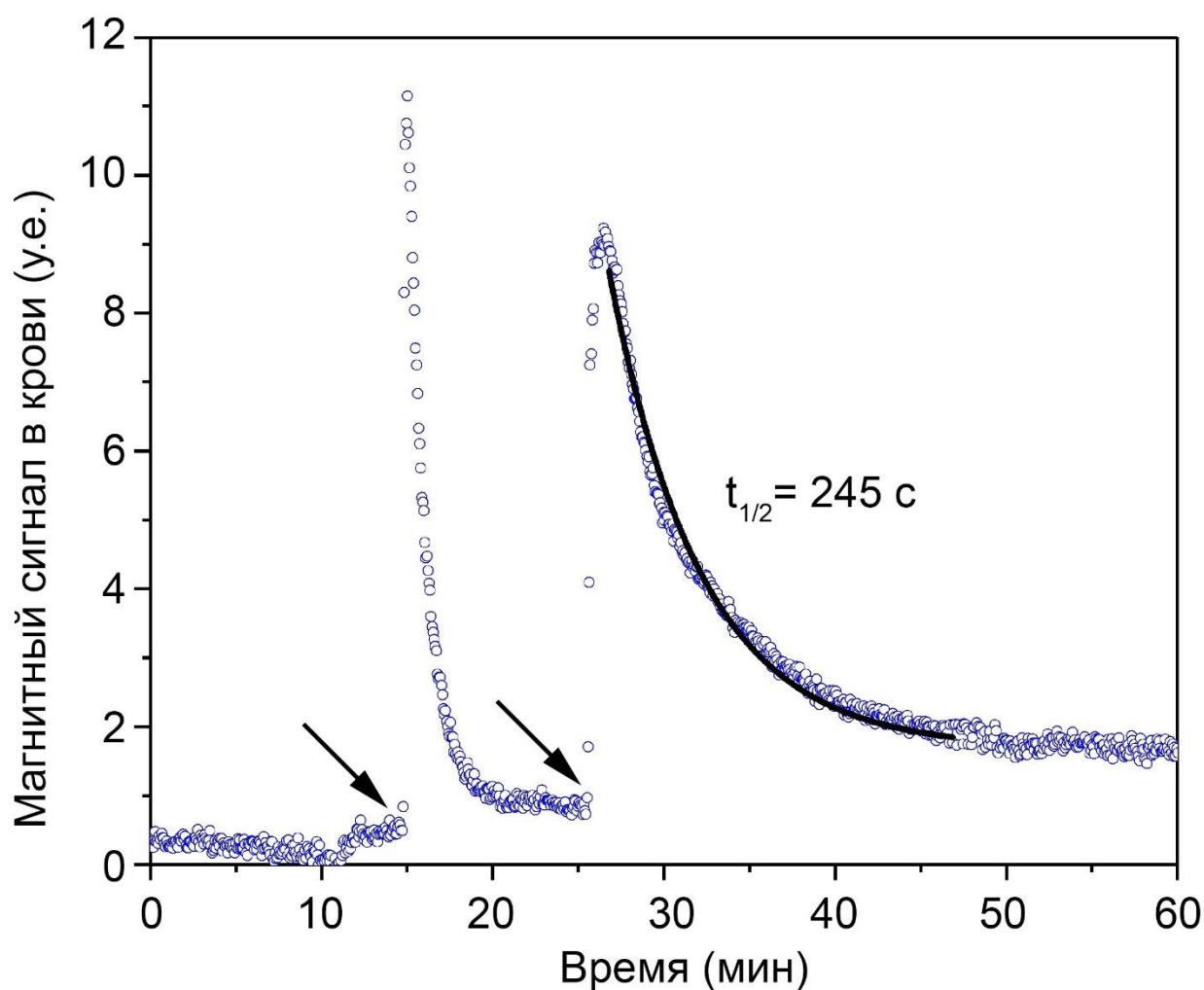


Рисунок 16. Репрезентативная кинетика выведения из кровотока частиц блокатора (первая инъекция) и целевых наночастиц (вторая инъекция). Черные стрелки указывают моменты введения частиц.

Было обнаружено (рисунок 17), что доза наночастиц блокатора в 5 мг в основном накапливалась в печени (от 60 % до 90 % в зависимости от типа НЧ) и селезенке (от 8 % до 19 %) - два основных органа системы мононуклеарных фагоцитов,

ответственных за выведение из кровотока наночастиц размером более 10 нм [228]. Низкая доза 200 мкг целевых наночастиц характеризовалась аналогичной картиной распределения: от 85 % до 90 % было обнаружено в печени, 9–14 % — в селезенке и 0–0,8 % — в легких (рисунок 18). Сходное биораспределение блокирующих и целевых частиц *in vivo* дополнительно подтверждает возможность насыщения макрофагов высокой дозой твердых наноматериалов.

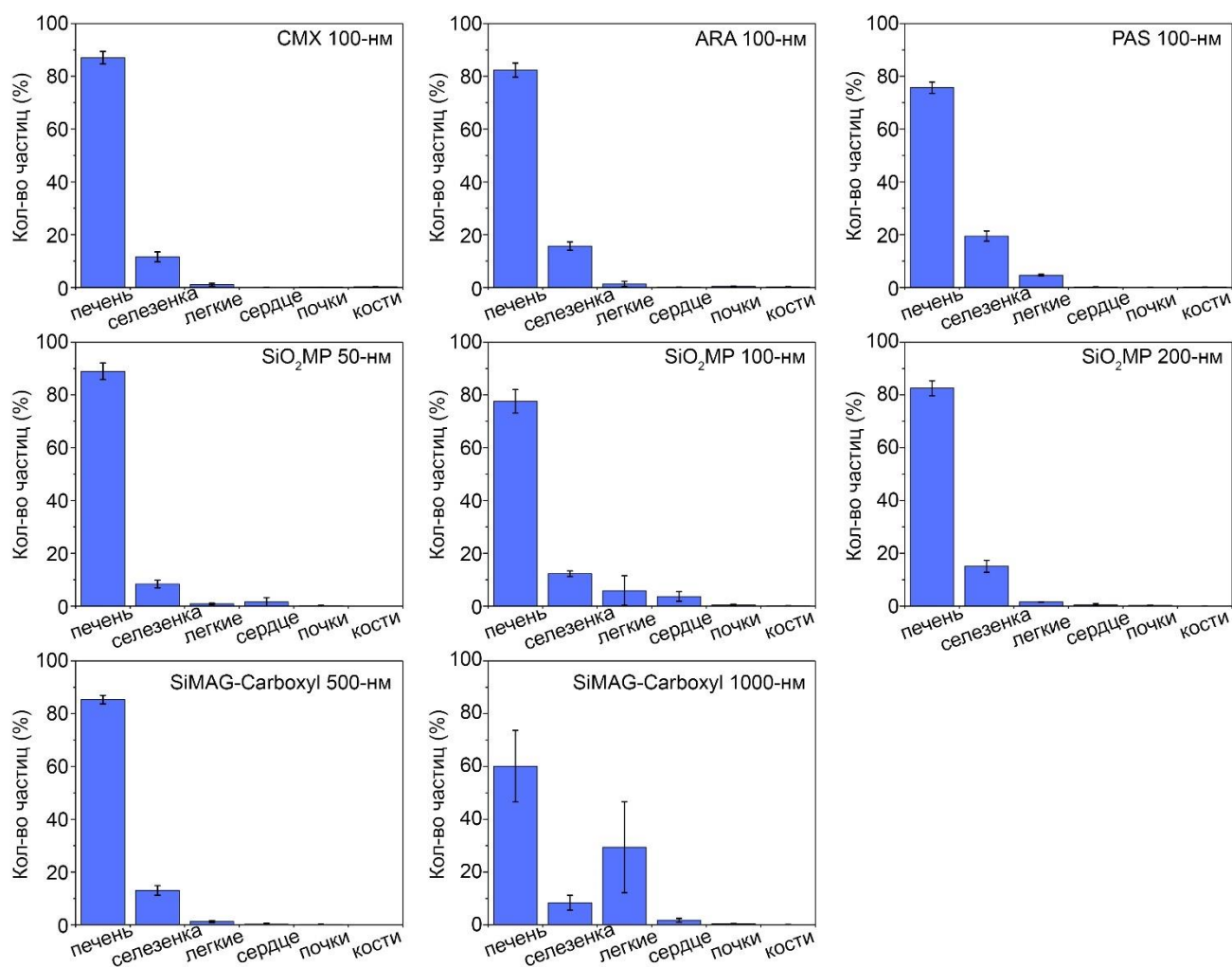


Рисунок 17. Биораспределение 5 мг различных «блокирующих» наночастиц.

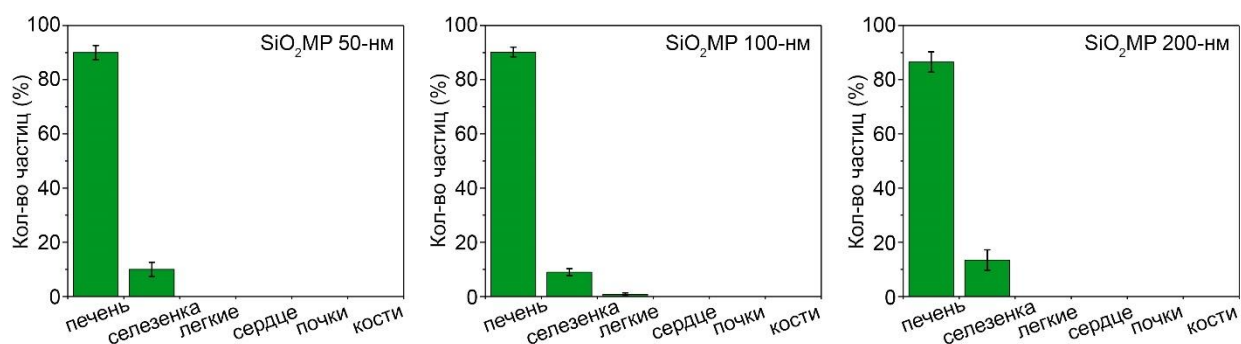


Рисунок 18. Биораспределение 200 мкг различных «целевых» магнитных наночастиц, покрытых оксидом кремния.

### 3.3. Факторы, влияющие на эффективность СМФ блокады

#### 3.3.1. Доза блокирующих частиц

Количество блокирующих наноагентов, достаточное для индукции СМФ блокады, определяли в экспериментах с 1000-нм частицами SiMAG-Carboxyl. После полного выведения из кровотока 500 мкг частиц (25 мкг/г ткани) мы не наблюдали каких-либо изменений в циркуляции 100-нм целевых частиц. Введение 1, 3 или 5 мг блокирующих НЧ на мышь вызывало продление времени циркуляции 100-нм целевых НЧ в 1,4, 1,9 и 3,2 раза соответственно за счет снижения активности СМФ (рис. 19а). Для дальнейших экспериментов мы использовали блокирующие НЧ в дозе 5 мг для индукции СМФ блокады.



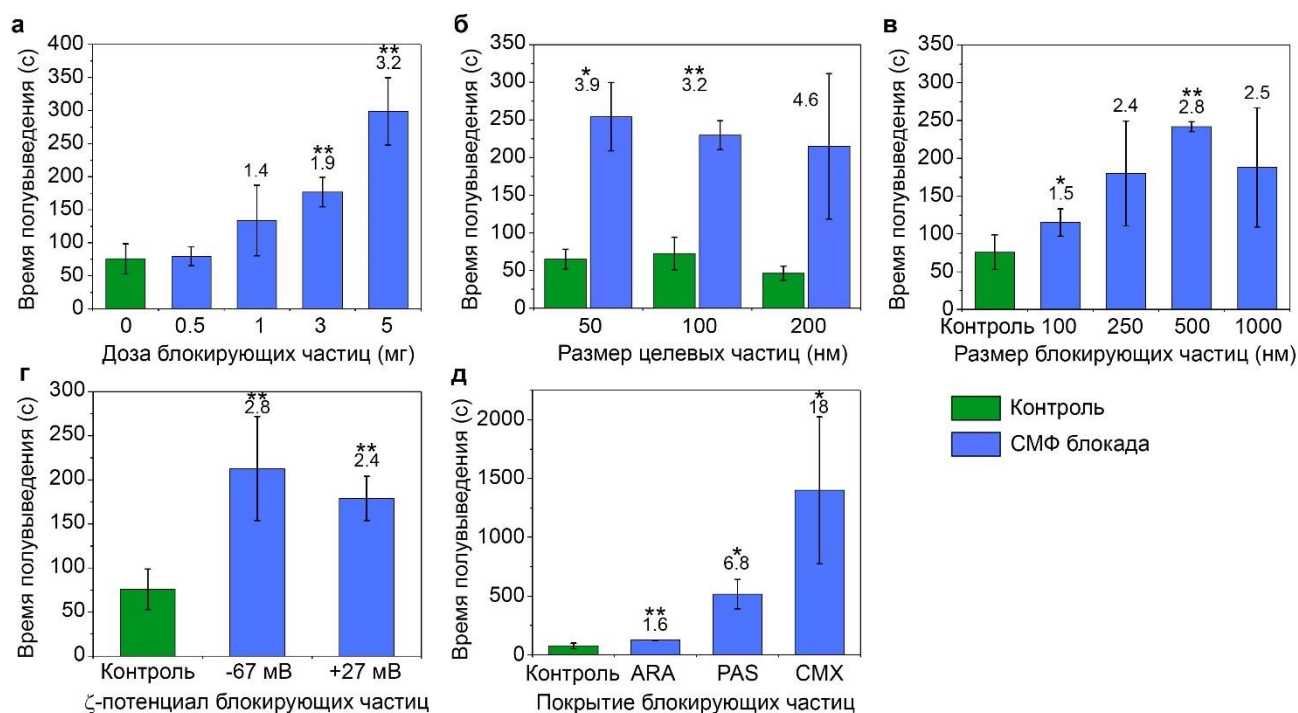


Рисунок 19. Влияние на индуцированную СМФ блокаду: (а) дозы блокирующих НЧ; (б) размера целевых НЧ; (в) размера НЧ блокатора; (г) ζ-потенциала НЧ блокатора; (д) покрытия НЧ блокатора. Эффективность блокады в (а, в-д) определяется временем полувыведения из кровотока 100-нм магнитных частиц, покрытых SiO<sub>2</sub>. Эффективность блокады СМФ указана над столбиками. Звездочками отмечены достоверные различия по сравнению с циркуляцией НЧ без СМФ блокады (зеленая полоса на каждом графике), t-критерий Уэлча: \* - P < 0,05; \*\* - P < 0,01.

Ранее на модели перфузии печени *ex vivo* [229] мы показали, что даже очень малая доза (около 10 мкг) частиц может привести к кратковременному снижению поглощения НЧ клетками Купфера. Эксперименты в настоящем исследовании показывают, что для обеспечения более длительной СМФ блокады *in vivo* требуются значительно большие дозы блокирующих наноагентов.

### 3.3.2. Размер целевых частиц

Мы изучили, как размер целевых НЧ влияет на время их полувыведения из кровотока при СМФ блокаде. Наночастицы с размерами в диапазоне (10-200) нм обычно используются для доставки терапевтических средств *in vivo* [230]. Поэтому



для различных целевых частиц в этом диапазоне (см. табл. 4) была определена пролонгация циркуляции НЧ при СМФ блокаде. СМФ блокада, индуцированная 5 мг частиц SiO<sub>2</sub> с размерами 500 нм, продлевала время циркуляции целевых частиц с размерами 50, 100, 200 нм в  $3,9\pm 1,1$ ,  $3,2\pm 1,0$  и  $4,6\pm 2,3$  раза соответственно (рис. 19б). Однако разница между результатами была в основном связана с разным временем полувыведения этих НЧ без СМФ блокады. Между тем, СМФ блокада продлевала время полувыведения любых протестированных целевых наночастиц практически до того же значения 220-250 с. Для следующих экспериментов мы выбрали 100-нм целевые НЧ с размером в середине исследуемого диапазона.

### *3.3.3. Размер блокирующих частиц*

Затем мы исследовали зависимость эффективности СМФ блокады от размера блокирующего агента (рис. 19в). Время полувыведения целевых наночастиц увеличилось в 1,5, 2,4, 2,8 и 2,5 раза для 100-, 250-, 500- и 1000-нм блокирующих НЧ соответственно. Мы обнаружили, что наноагенты-блокаторы с размером 500 нм вызывают наиболее выраженное ингибирование СМФ.

Интересно, что предыдущие исследования СМФ блокады показали обратную зависимость: более крупные частицы блокатора приводили к более слабой блокаде [231]. Возможная причина этого противоречия заключается в том, что в других исследованиях целевые частицы вводили внутривенно в фиксированное время (обычно через несколько часов) после введения блокирующих. Кроме того, макрофаги захватывают и поглощают крупные частицы гораздо быстрее, чем мелкие [110, 232]. Вероятно, на момент введения целевых НЧ малоразмерные блокаторы не полностью выводились из кровотока и продолжали конкурировать за связывание с макрофагами, что еще больше улучшало фармакокинетику целевых частиц. Кроме того, быстрое выведение крупных блокирующих частиц означало, что момент максимальной эффективности блокады мог быть упущен к моменту введения целевых НЧ. В наших экспериментах исключено влияние вышеперечисленных факторов. Таким образом, мы наблюдали СМФ блокаду, вызываемую только теми наноагентами, которые связывались макрофагами.

### *3.3.4. $\zeta$ -потенциал и покрытие блокирующих частиц*

При блокировании макрофагов 500-нм частицами с отрицательным (-67 мВ) и положительным (+27 мВ)  $\zeta$ -потенциалом существенной разницы в фармакокинетике целевых частиц не наблюдалось. Период полувыведения из кровотока увеличился в 2,4 раза при использовании положительно заряженных блокаторов и в 2,8 раза при использовании отрицательно заряженных (рис. 19г). Незначительная разница, скорее всего, связана с белковой короной, которая образуется на поверхности частицы в кровотоке и делает ее  $\zeta$ -потенциал слабо отрицательным независимо от типа частицы [83].

Кроме того, мы исследовали эффект СМФ блокады, используя в качестве блокаторов 100-нм частицы с различными полимерными покрытиями (рис. 19д). Частицы, покрытые глюкуроновой кислотой, увеличивали время полувыведения в 1,6 раза; с полиакриловой кислотой – в 6,8 раза, а с карбоксиметилдекстраном – в 18 раз. Интересно, что СМФ блокада, вызванная НЧ, покрытыми полимером, была намного сильнее, чем наноагентами на основе оксида кремния.

### *3.3.5. Линия мышей*

В этом исследовании мы впервые экспериментально изучили и подтвердили влияние линии мышей на эффективность СМФ блокады, вызванной поглощением наноагентов (рис. 20а). Циркуляция целевых частиц при СМФ блокаде 500-нм частицами SiO<sub>2</sub> продлевалась в  $3,4 \pm 0,9$ ,  $4,2 \pm 1,1$  и  $3,2 \pm 1,0$  раза у мышей CD-1, C57Bl/6 и BALB/c соответственно. Этот эффект можно объяснить разницей в количестве макрофагов в печени и селезенке [233] у разных линий мышей, а также доминирующим иммунным подтипом [83], влияющим на активность макрофагов по распознаванию и фагоцитозу экзогенных материалов.

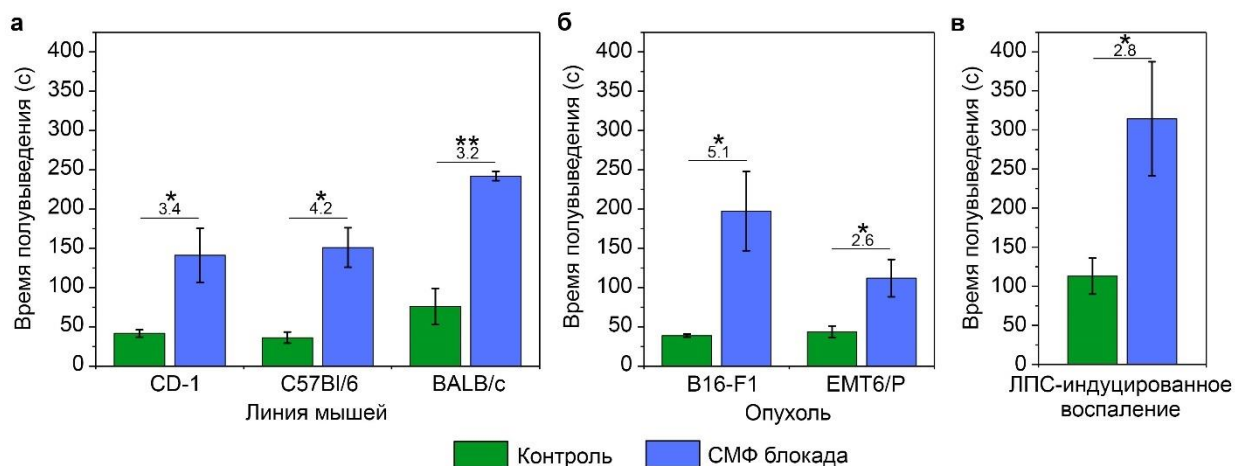


Рисунок 20. Факторы животной модели, влияющие на СМФ блокаду: (а) линия мышей; (б) наличие меланомы В16-F1 (мыши С57В1/6) или карциномы ЕМТ6/Р (мыши ВАLВ/с); (в) воспаление, вызванное LPS (мыши С57В1/6). Эффективность СМФ блокады указана для каждого исследования над столбиками. Статистическая разница между группами указана звездочками (t-критерий Уэлча): \* -  $P < 0,05$ ; \*\* -  $P < 0,01$ .

Таким образом, при сравнении различных исследований следует учитывать влияние линии мышей на эффективность СМФ блокады.

### 3.3.6. Влияние болезней

В этой серии экспериментов мы изучали влияние иммунного статуса мышей на СМФ блокаду, в частности, как хроническое патологическое состояние, вызванное развитием опухоли, а также острое воспаление, вызванное введением липополисахаридов, влияет на выведение частиц из кровотока.

Перед экспериментами два различных типа трансплантированных опухолей, а именно меланома В16-F1 для мышей С57В1/6 и карцинома молочной железы ЕМТ6/Р для мышей ВАLВ/с, развивались в течение не менее недели, пока они не достигли объема  $1 \text{ см}^3$ . Опухоли повлияли на СМФ блокаду, как видно на рисунке 20б. Циркуляция целевых НЧ продлилась в  $5,1 \pm 1,3$  раза при меланоме и в  $2,6 \pm 0,7$  раза при раке молочной железы. Следует отметить, что в исследовании с опухолью ЕМТ6/Р время циркуляции значительно сократилось при отсутствии СМФ

блокады, что может быть обусловлено активацией макрофагов и их поляризацией [234, 235]. В то же время опухоль В16-F1 не влияла на скорость элиминации частиц из кровотока в отсутствие СМФ блокады.

СМФ блокаду также тестировали на классической модели острого воспаления, индуцированного внутривенным введением ЛПС (5 мг/кг) мышам линии С57В1/6 за 16 ч до эксперимента. Анализы крови с помощью цитометрии показали повышенный уровень нейтрофилов и снижение уровня лимфоцитов (рис. 21). Это согласуется с общепринятой моделью липополисахарид-индуцированного воспаления [236]. Воспаление вызывало 3-кратное увеличение времени полувыведения частиц из кровотока без блокады (рис. 20в). Также воспаление значительно повлияло на эффективность СМФ блокады, которая изменилась с  $4,2 \pm 1,1$  до  $2,8 \pm 0,9$  раза.

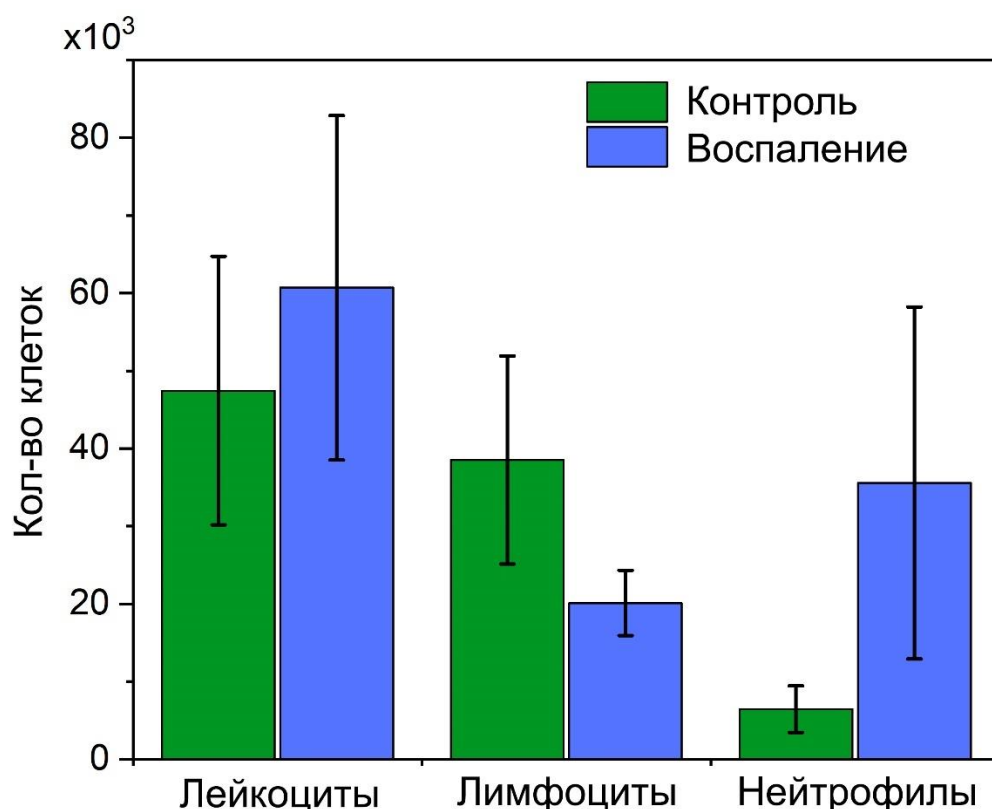


Рисунок 21. Изменение количества лейкоцитов, лимфоцитов и нейтрофилов в образцах крови объемом 40 мкл через 16 ч после воспаления, вызванного ЛПС.

Мы изучили ключевые факторы, определяющие эффективность СМФ блокады твердыми наноматериалами *in vivo*. Тип покрытия частиц оказался наиболее значимым. Более того, мы заметили, что блокада некоторыми материалами увеличила время циркуляции в 18 раз, что является чрезвычайно высоким значением, согласно опубликованным данным (см. таблицу 1). Для сравнения, хорошо известная липосомальная СМФ блокада продлевает циркуляцию с гораздо меньшей эффективностью [35], хотя этот метод широко используется для улучшения доставки частиц к опухолям [35, 36, 44].

Наша схема эксперимента позволила впервые наблюдать эффект «чистой» СМФ блокады, вызываемой только частицами, уже выведенными из кровотока и связанными с макрофагами. Этот подход ставится в противовес исследованиям, использующим СМФ блокаду без полного выведения блокирующих частиц. В таких исследованиях продление циркуляции целевых частиц возможно как за счет увеличения суммарной дозы НЧ в крови, так и за счет частичного насыщения скорости поглощения НЧ макрофагами [224]. В нашем исследовании мы скорее уменьшаем поглощение частиц макрофагами, подавляя способность клеток СМФ к фагоцитозу и уменьшая количество поверхностных рецепторов, доступных для связывания НЧ.

Наши исследования устраняют одно из ключевых ограничений терапевтического применения СМФ блокады нефункциональными агентами. Для липосомальной блокады требовалось введение достаточно больших доз наноматериалов (~100 мг/кг). Однако, исходя из наших данных о зависимости доза-эффект, блокада может быть вызвана даже введением наноагентов в дозе, характерной для контрастных агентов, используемых для визуализации и диагностики рака и других заболеваний. Например, компьютерная (рентгеновская) томография [237] или фотоакустическая визуализация [238] с наночастицами золота требуют столь же больших доз контрастных веществ. Таким образом, СМФ блокада выглядит особенно привлекательно, когда за томографией следует терапия другими наноагентами. Данные, полученные в данной работе, могут помочь

оптимизировать характеристики контрастных наночастиц, чтобы вызвать более глубокую блокаду или, наоборот, минимизировать их влияние на иммунные клетки.

Следует отметить, что метод СМФ блокады все еще имеет некоторые ограничения, препятствующие его клиническому применению. Во-первых, наночастицы в нашем исследовании накапливаются в основном в печени и селезенке и потенциально могут вызывать токсический стресс, проявляющийся через окислительный, воспалительный процесс, изменение поляризации иммунных клеток и т.д. может привести к серьезному повреждению системы защиты макрофагов. Таким образом, малотоксичные частицы с умеренной или быстрой скоростью биodeградации могут быть более подходящими в качестве блокирующих НЧ для СМФ блокады. Для этого могут применяться различные полимерные наноматериалы, кремниевые и магнитные наночастицы с периодом полураспада в пределах недели. Наконец, макрофаги являются основным барьером защиты хозяина от различных чужеродных патогенов, в т.ч. бактерии. Ранее было показано, что введение углеродной суспензии снижает образование антител [239]. Напротив, СМФ блокада липосомами [35] или сенсibilизированными антителами эритроцитами [30] практически не изменяла скорость элиминации бактерий из крови. Кроме того, СМФ блокада 5 мг твердых магнитных частиц временно подавляла поглощение клетками СМФ на несколько часов, после чего активность макрофагов восстанавливалась [30]. В целом, перед применением СМФ блокаторов необходимо тщательно изучить потенциальные побочные эффекты, чтобы оценить соотношение риска и пользы для терапии.

### **3.4. Синтез частиц ферригидрита и характеристика**

Магнитные НЧ оксида железа широко используются в качестве тераностических агентов (интегрирующих в себе диагностику и терапию) благодаря их биосовместимости и мультимодальной функциональности, включая неинвазивную визуализацию, адресную доставку и терапию [62]. Поскольку биосовместимость магнитных НЧ оксида железа тесно связана с их безопасными путями метаболизма

[240], продукт биодegradации всех частиц железа – ферригидрит – является подходящим кандидатом на роль биосовместимого блокатора. Ферригидрит повсеместно присутствует в организме в виде НЧ размером 2-8 нм внутри белкового комплекса апоферритина и используется в качестве депо железа [241]. В отличие от многих магнитных НЧ ферригидрит состоит только из трехвалентного железа, ионы которого вызывают гораздо меньший окислительный стресс, чем двухвалентное железо [242]. Кроме того, покрытые полимером частицы ферригидрита не вызывают гемолиза, не влияют на массу мышечной массы, не приводят к повреждению или воспалению внутренних органов при внутривенном введении в дозе до 800 мкмоль Fe на кг массы тела [243].

Вдохновленные природным ферритином [241], мы применили НЧ ферригидрита (FH) в качестве блокаторов СМФ. Синтезированные НЧ FH были проанализированы с помощью сканирующей электронной микроскопии (рис. 22а). Ядра частиц имели унимодальное распределение со средним диаметром 46 нм (рис. 22б).

Рентгенограмма порошка только что синтезированных частиц (рис. 22в) содержала две широкие полосы при 35 и 63 градусах  $2\theta$ , которые соответствовали 2-линейному ферригидриту ферритинового ядра [244]. Известно, что фаза аморфного ферригидрита обладает низкой химической стабильностью и способностью к трансформации в другие виды оксидов железа [245]. Мы предположили, что такая низкая химическая стабильность способствует более быстрому гидролизу и метаболизму НЧ FH *in vivo*, что может снизить возможную неблагоприятную токсичность, связанную с длительным воздействием этих частиц на организм.

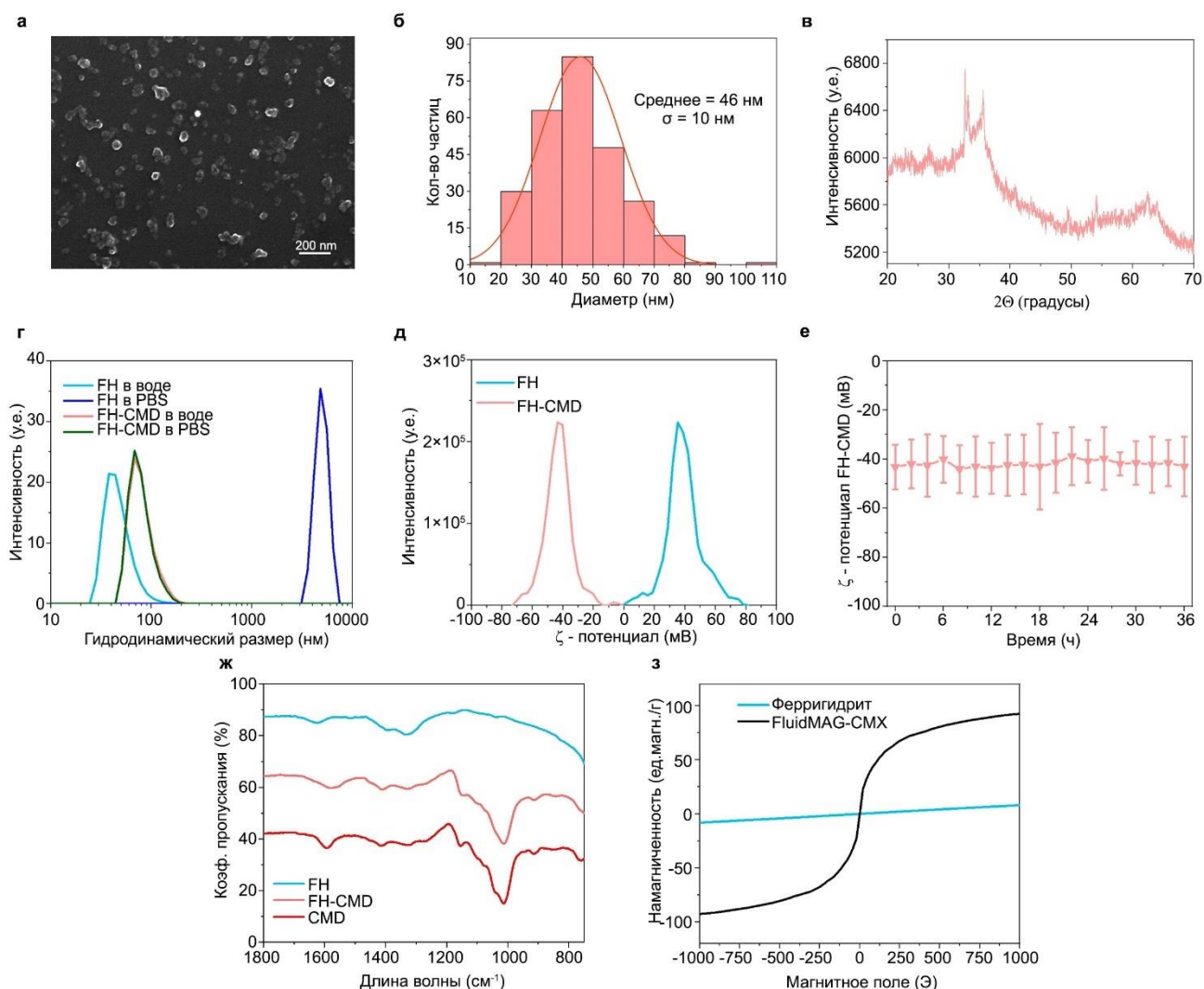


Рисунок 22. Характеризация частиц ферригидрита (FH). (а) СЭМ-изображение синтезированного FH. (б) Распределение размеров ядер FH. (в) Рентгенограмма FH. (г) Распределение гидродинамических размеров частиц FH без покрытия и покрытых карбоксиметил-декстраном (FH-CMD) в воде и PBS. (д) Распределение  $\zeta$ -потенциала FH и FH-CMD. (е) Эволюция  $\zeta$ -потенциала частиц FH-CMD во времени, подтверждающая стабильность их покрытия. (ж) FTIR-спектры непокрытых FH и покрытых CMD. (з) Намагниченность частиц ферригидрита и FluidMAG-CMX, измеренная с помощью СКВИД-магнитометра.

Частицы FH были нековалентно покрыты карбоксиметил-декстраном (CMD) для экспериментов *in vivo*. Считается, что CMD иммобилизован на поверхности FH за счет электростатических взаимодействий, сил Ван-дер-Ваальса и водородных



связей [246]. FH-CMD были охарактеризованы динамическим и электрофоретическим светорассеянием. Полимерное покрытие привело к увеличению гидродинамического размера с 48 до 81 нм (рис. 22г), а средний  $\zeta$ -потенциал уменьшился с +39 до -43 мВ (рис. 22д) из-за анионной природы карбоксиметильных групп CMD. Покрытие оставалось стабильным в течение времени, достаточного для исследования фармакокинетики (рис. 22е). Это обеспечило коллоидную стабильность FH-CMD в буфере PBS в отличие от FH без покрытия, которые быстро агрегировали, образуя структуры микронного размера (рис. 22г).

Инфракрасная спектроскопия (рис. 22ж) FH-CMD выявила появление интенсивных пиков при  $1014\text{ см}^{-1}$  и  $1150\text{ см}^{-1}$ , соответствующих колебаниям C-O и C-H карбоксиметил-декстрана соответственно. Кроме того, пики деформационных колебаний C-H, связанные с цепями CMD в FH-CMD, наблюдались при  $1330\text{ см}^{-1}$  и  $1413\text{ см}^{-1}$ . Поглощение при  $1337\text{ см}^{-1}$  и  $1395\text{ см}^{-1}$  чистого FH было отнесено к поверхностной адсорбции ионов  $\text{CO}_2^{2-}$  из воздуха и поверхностной адсорбции  $\text{NO}_3^-$  во время пептизации, соответственно [247]. Пик при  $1624\text{ см}^{-1}$ , наблюдаемый в чистом FH, был отнесен к изгибанию H-O-H связи в воде, адсорбированной на НЧ, а пик при  $1583\text{ см}^{-1}$  в CMD-FH был отнесен к карбоксильным группам CMD [248]. Таким образом, ИК-Фурье-спектроскопия подтвердила успешное покрытие FH полимером CMD.

Свойства только что синтезированных FH-CMD наночастиц были полезны для блокады макрофагов. Во-первых, их размер был достаточно велик, чтобы они быстро выводились из кровотока клетками СМФ [224]. Во-вторых, твердые неорганические частицы, покрытые CMD, показали лучшую эффективность в СМФ блокаде по сравнению с другими НЧ, покрытыми полимером [59]. Более того, отрицательно заряженный декстрановый полимер сам по себе был способен частично блокировать поглощение макрофагами, хотя эффективность не была слишком впечатляющей [47, 249].

В качестве суперпарамагнитных частиц использовали частицы FluidMAG-CMX (Chemicell), циркуляцию в кровотоке и биораспределение которых исследовали после СМФ блокады. Эти частицы оксида железа, покрытые карбоксиметил-декстраном, имели гидродинамический диаметр  $120\pm 50$  нм и слабоотрицательный  $\zeta$ -потенциал  $-16\pm 7$  мВ [240]. Фотография этих частиц со сканирующего электронного микроскопа показана на рисунке 23. В отличие от FN наночастиц, они проявляли нелинейное суперпарамагнитное поведение (рис. 22з), что определило возможность их количественного обнаружения с использованием метода MPQ.

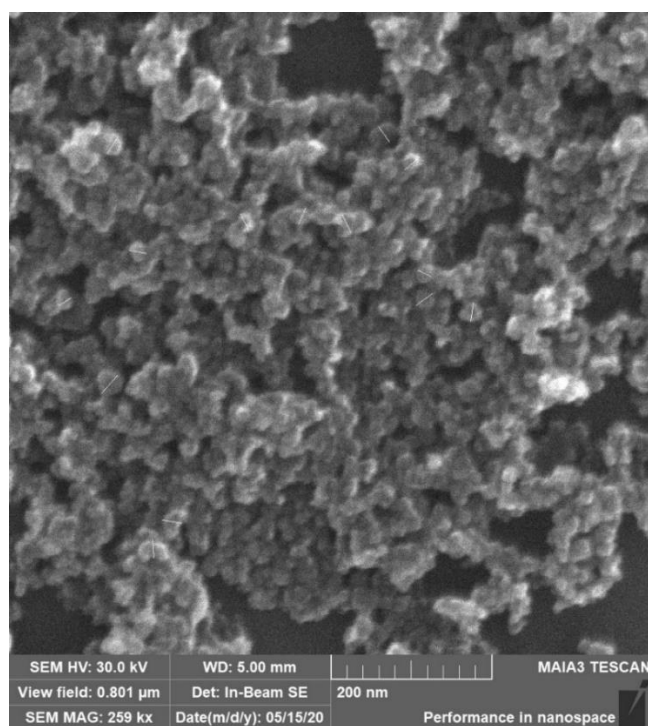


Рисунок 23. СЭМ-изображение частиц FluidMAG-CMX. Масштабная линейка – 200 нм.

Данный магнитно-спектральный подход применялся для анализа нелинейной намагниченности материалов в ответ на приложенное переменное магнитное поле [223]. Метод нечувствителен к пара- и диамагнетикам, что делает его удобным для обнаружения небольших количеств суперпарамагнитных НЧ в присутствии больших концентраций фонового эндогенного железа [222]. При этом

концентрация магнитных НЧ в образцах тканей или крови количественно коррелирует с измеренным магнитным сигналом [224].

### **3.5. СМФ блокада ферригидритными наночастицами**

Покрытые полимером FH наночастицы использовали для СМФ блокады. Доза 5 мг блокирующих частиц на мышь была выбрана на основании предыдущих исследований СМФ блокады твердыми наноматериалами [59]. Чтобы показать, что FH-CMD НЧ действительно подвергаются поглощению клетками СМФ, мы изучили их биораспределение через 24 часа после внутривенного введения. Ранее было показано, что FH НЧ индуцируют T2-взвешенный контраст [250], поэтому анализ распределения частиц был выполнен с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) (рис. 24 а, б). Видна усиленная контрастность органов СМФ после введения НЧ: печени, селезенки и костного мозга, что свидетельствует о биораспределении FH.

Далее СМФ блокада с помощью FH НЧ была применена для продления циркуляции суперпарамагнитных частиц в кровотоке здоровых мышей BALB/c. Частицы FluidMAG-CMX в низкой дозе (300 мкг) вводили через 1 ч после внутривенного введения блокирующего агента и анализировали концентрацию НЧ в образцах крови с помощью магнитометра MPQ. На рис. 24в представлена кинетика циркуляции магнитных частиц в кровотоке с индукцией СМФ блокады и без. Аппроксимация данных моноэкспоненциальной функцией и расчет периода полувыведения FluidMAG-CMX ( $t_{1/2}$ ) из кровотока показали 9-кратное продление их  $t_{1/2}$  в кровотоке с 2,7 мин до 24,7 мин после СМФ блокады.

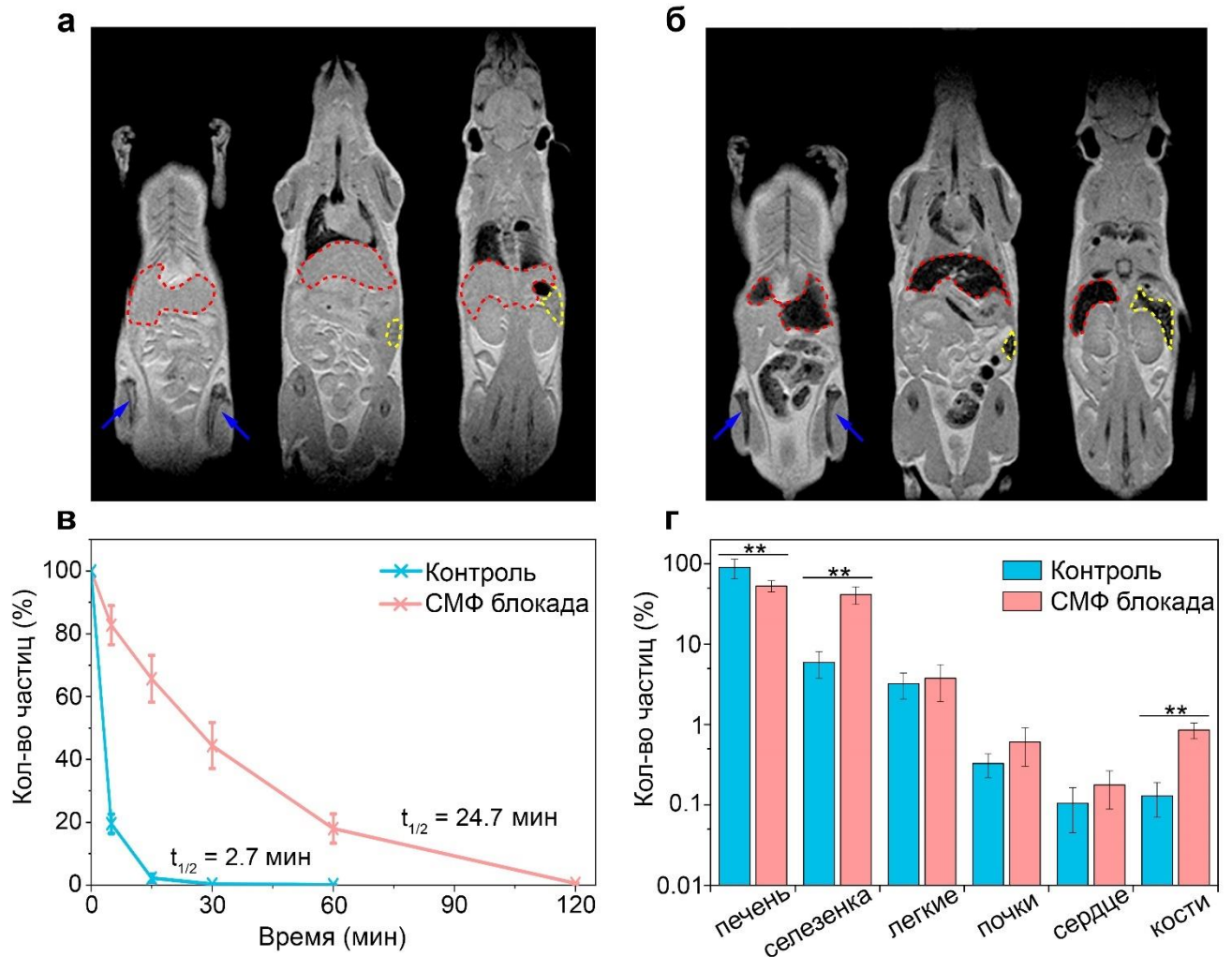


Рисунок 24. СМФ блокада частицами ферригидрита, покрытыми СМД (FH-CMD), у здоровых мышей BALB/c. (а,б) МРТ-изображения мышей без блокады (а) и через 24 ч после (б) СМФ блокады частицами FH-CMD. Печень, селезенка и кости обведены красным, желтым и отмечены синими стрелками соответственно. (в) Кинетика циркуляции частиц FluidMAG-CMX в крови после СМФ блокады и без. (г) Биораспределение частиц FluidMAG-CMX у здоровых мышей BALB/c через 2 часа после введения наночастиц после СМФ блокады и без. \*\* -  $P < 0,01$ , t-критерий Уэлча.

В дополнение к фармакокинетическому профилю суперпарамагнитных частиц в кровотоке мы наблюдали эффект СМФ блокады через значительные изменения в биораспределении суперпарамагнитных частиц (рис. 24г). Поглощение частиц FluidMAG-CMX печенью снизилось с 90% введенной дозы (ID) до 53% ID, в то

время как в селезенке оно увеличилось с 6% ID до 41% ID. Это перераспределение частиц является репрезентативной демонстрацией неспецифической блокады, когда селезенка берет на себя функцию главного фильтрующего органа [33]. Также в 6 раз увеличилось количество частиц, захваченных в костях (с 0,13% ID до 0,85% ID), в то время как содержание FluidMAG-CMX в остальных органах осталось на прежнем уровне. Этот интересный результат предполагает, что СМФ блокада частицами FH-CMD потенциально может быть использована для улучшения эффективности нанотерапевтических средств, нацеленных на кости.

Затем мы применили СМФ блокаду с помощью FH-CMD НЧ, чтобы улучшить адресную доставку FluidMAG-CMX к опухоли (рис. 25а). С этой целью использовали подкожную модель меланомы B16-F1 у мышей C57Bl/6. Целенаправленную доставку FluidMAG-CMX к опухоли осуществляли путем создания градиента магнитного поля с помощью небольшого NdFeB магнита размером  $1 \times 2 \times 0,5$  см, расположенного вплотную к поверхности опухоли. На рисунке 25а показано отсутствие значительного усиления контраста опухолей после введения только FH-CMD или магнитных FluidMAG-CMX НЧ, что указывает на отсутствие значительного накопления ферригидритных и магнитных частиц в опухоли при их отдельном использовании. Однако после СМФ блокады FluidMAG-CMX эффективно доставлялись к опухоли, что приводило к высококонтрастной визуализации опухоли.

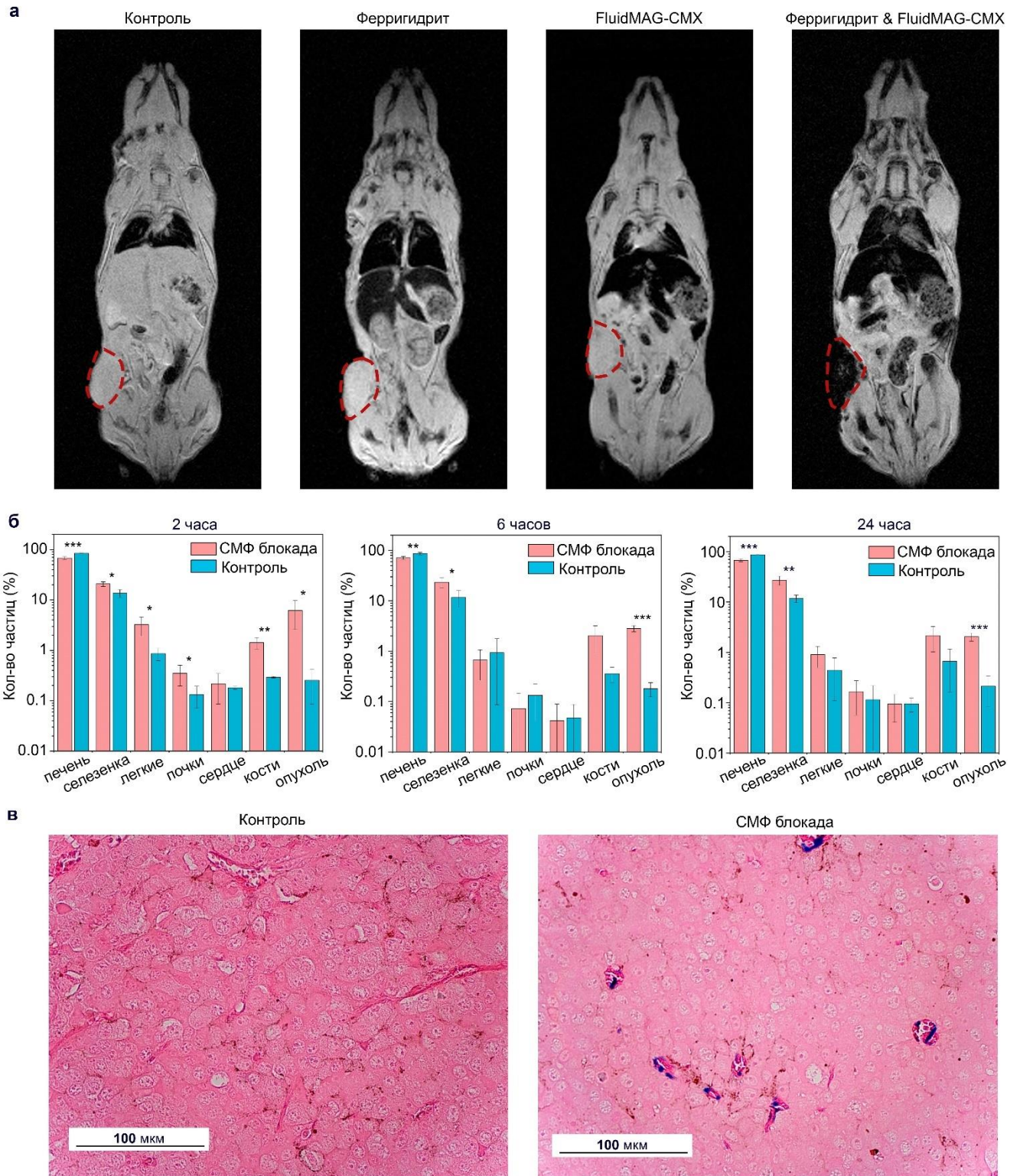


Рисунок 25. SMФ блокада у мышей C57Bl/6 с опухолями V16-F1. (а) Справа на лево: МРТ-изображения мышей с опухолями без частиц, через 3 часа после введения частиц FH-CMD, через 2 часа после введения FluidMAG-CMX без SMФ блокады, через 2 часа после введения FluidMAG-CMX после SMФ блокады.



Опухоли очерчены пунктирными красными контурами. (б) Биораспределение частиц FluidMAG-CMX через 2, 6 и 24 часа после введения после СМФ блокады и без. (в) Гистологические изображения опухолей через 2 часа после введения частиц FluidMAG-CMX, окрашенные эозином и берлинской лазурью Перлса после СМФ блокады и без. Железо обнаруживается по синему цвету из-за окрашивания берлинской лазурью.

В мышинной модели меланомы СМФ блокада приводила к аналогичному эффекту на общее биораспределение FluidMAG-CMX (рис. 25б, табл. 5, 6). Поглощение FluidMAG-CMX было значительно снижено в печени (с  $86,8 \pm 2,3\%$  до  $67,6 \pm 4,4\%$  ID) и повышено в других органах: селезенке, легких, почках, костях и опухоли. Усиление сигнала в легких (в 3,7 раза) и почках (в 2,7 раза) носило временный характер и прекращалось через 6 ч, в то время как в селезенке, костях и опухоли сигнал сохранялся, оставаясь наблюдаемым через 1 сутки. Этот период считается достаточным для высвобождения лекарства в большинстве систем доставки лекарств на основе наночастиц. Поглощение селезенкой увеличилось со временем до максимального значения  $27,1 \pm 5,7\%$  ID, что указывает на продолжающуюся фильтрацию длительно циркулирующих частиц, в то время как без СМФ блокады оно составляло  $11,7 \pm 2,0\%$  ID. Поглощение FluidMAG-CMX в костях также увеличивалось в ходе исследования до  $2,2 \pm 1,1\%$  ID, в то время как без СМФ блокады оно составляло  $0,66 \pm 0,50\%$  ID. Напротив, поглощение опухолью монотонно снижалось с  $6,2 \pm 3,5\%$  ID через 2 часа до  $2,8 \pm 0,4\%$  ID и  $2,1 \pm 0,4\%$  ID через 6 и 24 часа соответственно. Тем не менее СМФ блокада привела к 14-кратному увеличению воздействия FluidMAG-CMX на опухоль в соответствии с площадью под кривой (AUC), рассчитанной по таблице 5. Увеличение поглощения опухолью было выше, чем в любых других тканях, благодаря направленной доставке с помощью магнита. Однако продление циркуляции наночастиц в кровотоке приводит к побочному увеличению поглощения и в других органах с потенциально возможной побочной токсичностью, что требует дальнейшего изучения и оптимизации стратегии нацеливания.

	2 часа		6 часов		24 часа	
	СМФ блокада, %ID	Контроль, %ID	СМФ блокада, %ID	Контроль, %ID	СМФ блокада, %ID	Контроль, %ID
Печень	67,8±4,5	84,6±2,6	71±5,2	86,7±5	67,6±4,4	86,8±2,3
Селезенка	20,8±2,2	13,6±2,5	23,4±5,1	11,7±4,3	27,1±5,7	11,7±2
Легкие	3,2±1,3	0,86±0,24	0,66±0,4	0,93±0,84	0,9±0,4	0,44±0,33
Почки	0,35±0,16	0,13±0,06	0,07±0,07	0,13±0,09	0,17±0,11	0,11±0,1
Сердце	0,22±0,13	0,18±0,01	0,04±0,05	0,05±0,04	0,09±0,05	0,1±0,03
Кости	1,4±0,4	0,36±0,29	2±1,1	0,36±0,12	2,2±1,1	0,66±0,5
Опухоль	6,2±3,5	0,26±0,17	2,8±0,4	0,18±0,06	2,1±0,4	0,21±0,13

Таблица 5. Биораспределение магнитных частиц у мышей C57Bl/6 с опухолями после СМФ блокады.

	2 часа		6 часов		24 часа	
	СМФ блокада, %ID/г	Контроль, %ID/г	СМФ блокада, %ID/г	Контроль, %ID/г	СМФ блокада, %ID/г	Контроль, %ID/г
Печень	62,7±4,2	78,3±2,4	65,7±4,8	80,2±4,6	62,5±4,1	80,3±2,1
Селезенка	236±25	154±28	265±58	133±49	307±65	133±23
Легкие	21,1±8,6	5,7±1,6	4,3±2,6	6,1±5,5	5,9±2,6	2,9±2,2
Почки	1,3±0,6	0,50±0,23	0,27±0,27	0,50±0,35	0,65±0,42	0,42±0,38
Сердце	2,0±1,2	1,6±0,09	0,36±0,45	0,45±0,36	0,81±0,45	0,90±0,27
Кости	8,0±2,3	2,1±1,7	11,5±6,3	2,1±0,7	12,6±6,3	3,8±2,9
Опухоль	14,6±8,3	0,61±0,40	6,6±0,9	0,42±0,14	5,0±0,9	0,50±0,31

Таблица 6. Биораспределение магнитных частиц, нормированное на массу ткани, у мышей C57Bl/6 с опухолями после СМФ блокады.

Усиление сигнала в легких и почках мышей после СМФ блокады, скорее всего, было связано с тем, что FluidMAG-CMX оставался в кровотоке через 2 ч после инъекции. Этим также можно объяснить усиление сигнала с течением времени исследования в селезенке и костях, где макрофаги селезенки и эндотелиальные клетки костного мозга с фагоэндоцитозной активностью [251] были способны поглощать наночастицы. Напротив, высокая доля ID, оставшаяся в опухоли, в первую очередь была связана с притяжением частиц к магниту, удерживаемому вплотную к опухоли. Удаление магнита через 2 часа привело к вымыванию FluidMAG-CMX, накопленного в микроциркуляторном русле опухоли, и постепенному снижению сигнала в течение следующих 22 часов. Таким образом, временная часть магнитного сигнала опухоли соответствовала захвату FluidMAG-



СМХ в тканевой микроциркуляторной системе, тогда как стойкий остаточный сигнал предположительно вызван частицами, захваченными клетками стенки кровеносных капилляров и локальными фагоцитами, или соответствует частицам, задержанным в интерстиции после проникновения через стенки капилляров.

Чтобы более детально изучить судьбу FluidMAG-СМХ в опухоли, мы провели гистологический анализ собранных опухолей через 2 часа после введения частиц FluidMAG-СМХ (рис. 25в). После СМФ блокады опухоли, окрашенные берлинской лазурью по Перлсу, свидетельствовали о накоплении FluidMAG-СМХ преимущественно в просвете сосудов, а также в периваскулярных отделах вокруг сосудов микроциркуляторного русла (вероятно, в перицитах). Из-за более развитой сосудистой сети на периферии опухоли концентрация FluidMAG-СМХ была значительно выше, чем в ядре опухоли. В зонах кровоизлияний во внеклеточном пространстве также выявляли FluidMAG-СМХ. Окрашивание наблюдалось и в клетках воспалительного инфильтрата (вероятно, макрофагах). Как и ожидалось для доставки, опосредованной магнитным полем, FluidMAG-СМХ НЧ в основном обнаруживались в кровеносных капиллярах опухоли и в периваскулярных областях и не обнаруживались в опухолевых клетках. Напротив, в отсутствие СМФ блокады FluidMAG-СМХ почти не был обнаружен в опухолях мышей.

Эффективность магнитной доставки НЧ к опухоли в контрольной группе была крайне низкой (рис. 25) из-за интенсивной фильтрации НЧ FluidMAG-СМХ печенью и селезенкой. Активное нацеливание НЧ требует длительной (обычно несколько часов) циркуляции НЧ в кровотоке. Многие разработанные внутривенные наноагенты быстро поглощаются клетками СМФ, поэтому общее среднее накопление НЧ в опухолях составляет всего 0,7% ID [6]. Таким образом, СМФ блокада улучшает накопление частиц в опухоли за счет увеличения времени циркуляции частиц в кровотоке. В этом исследовании поглощение опухолью НЧ FluidMAG-СМХ достигло 6,2% от введенной дозы, что было очень высоким значением даже для адресной доставки НЧ. Согласно вышеприведенному обзору, только 3% исследований показали эффективность доставки выше 5% ID.

В данной работе НЧ доставляли к опухоли и удерживали магнитным полем в течение 2 часов. Удержание магнита близко к опухоли в течение более длительного времени могло бы значительно увеличить значение AUC и, соответственно, терапевтический индекс. Время воздействия магнитного поля следует выбирать исходя из времени высвобождения лекарственного средства наноагентами.

Суперпарамагнитные частицы FluidMAG-CMX имеют функциональные карбоксильные группы на поверхности, что позволяет их легко модифицировать, присоединяя молекулы лекарств или нацеливающих лигандов, с использованием подходов химии карбодиимидов [252]. Например, доксорубин может быть ковалентно присоединен к частицам FluidMAG-CMX путем образования амидной связи [253]. Также эти частицы можно использовать для контролируемого высвобождения лекарств [253] или гипертермии [254], вызванной приложенным переменным магнитным полем. Кроме того, их можно использовать в качестве контрастных веществ для МРТ (рис. 25а).

В нашей предыдущей работе [59] указан широкий спектр частиц, в том числе нагруженных лекарственными средствами или визуализирующими агентами, для которых была успешно применена СМФ блокада. Здесь СМФ блокада улучшила адресную доставку НЧ магнетита, покрытых карбоксиметил-декстраном. Однако, учитывая неспецифичность механизма блокады, мы считаем, что блокирование СМФ с помощью СМД-покрытых FN НЧ может быть успешно применено для улучшения доставки других типов частиц, таких как полимерные наночастицы, содержащие лекарство, твердые наноматериалы или липосомальные препараты.

### **3.6. Токсичность высокой дозы ферригидритных частиц**

Необходимость введения больших доз блокирующих частиц для индукции СМФ блокады вызывает беспокойство по поводу возможного токсического стресса для организма. Поэтому мы изучили системную токсичность блокатора СМФ с помощью гистопатологического анализа и мониторинга показателей биохимии крови, а также массы мышечной ткани.

Гистологический анализ с окрашиванием эозином и берлинской лазурью Перлса показал отложение железа на клеточном уровне (рис. 26). Скоплений гемосидерина в сердце и легких не наблюдалось. Вызванный частицами гемосидероз клеток Купфера в печени и макрофагов в селезенке, а также накопление гемосидерина в почках наблюдались через 7 и 30 дней после введения FH-CMD. В селезенке количество железо-положительных клеток увеличилось в течение месяца (таблица 7), в то время как отложение гемосидерина в печени оставалось почти неизменным в течение периода исследования (таблица 8). Это соответствует опубликованным данным о деградации частиц оксида железа, свидетельствующим о перераспределении метаболизированного железа из печени в селезенку [255]. Следует отметить, что такое перераспределение могло быть незаметным для содержания частиц в печени, так как масса печени почти в 10 раз превышает массу селезенки. Через 7 дней после введения FH-CMD железо в основном определялось в красной пульпе селезенки. Выявлено повышение уровня гемосидерина в белой пульпе и маргинальной зоне селезенки в течение месяца, что свидетельствует об активном перераспределении форм железа внутри органа за это время.

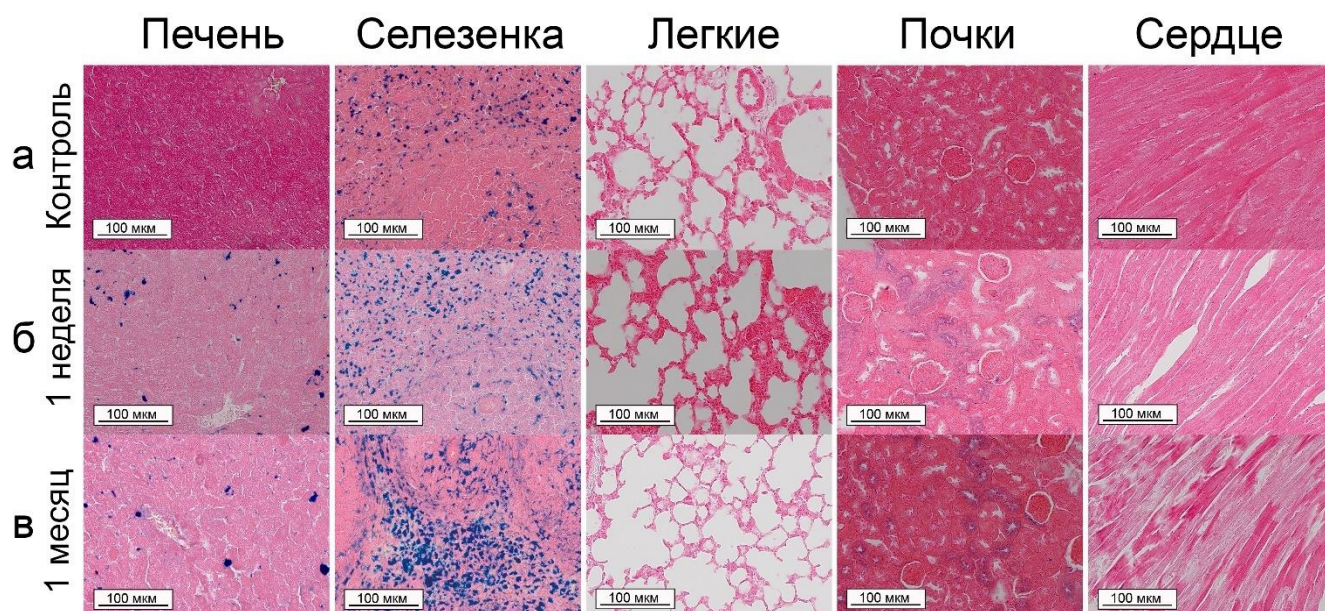


Рисунок 26. Гистологические изображения тканей, окрашенных эозином и берлинской лазурью Перлса. Репрезентативные гистологические изображения

печени, селезенки, легких, почек и сердца мышей без СМФ блокады (а), через неделю (б) и через месяц (в) после СМФ блокады. Железо обнаруживается по синему цвету из-за окрашивания берлинской лазурью. Шкала – 100 мкм.

Экспериментальная группа	Относительная площадь гистологического среза селезенки с отложениями гемосидерина по отношению к общей площади среза, %	р - статистическая значимость различий
Контроль	1,6 (1,6 – 7,3) <sup>1</sup>	$p^{1-2} = 0,27$
Неделя после введения НЧ	7,2 (6,3 – 10,9) <sup>2</sup>	$p^{2-3} = 0,049$
Месяц после введения НЧ	11,9 (11,3 – 18,2) <sup>3</sup>	$p^{1-3} = 0,046$

Таблица 7. Анализ отложений гемосидерина в селезенке (n = 3). Статистическую значимость измеряли с помощью ANOVA.

Экспериментальная группа	Относительная площадь гистологического среза печени с отложениями гемосидерина по отношению к общей площади среза, %	р - статистическая значимость различий
Неделя после введения НЧ	2,1 (1,7 – 2,3) <sup>1</sup>	$p^{1-2} = 0,38$
Месяц после введения НЧ	1,9 (1,6 – 2,1) <sup>2</sup>	

Таблица 8. Анализ отложений гемосидерина в печени (n = 3). Статистическую значимость измеряли с помощью ANOVA.

В просветах почечных канальцев и собирательных трубочек НЧ FH-CMD обнаруживали в течение месяца. Однако в клубочках почек FH-CMD были выявлены через неделю после инъекции, но полностью отсутствовали через месяц. FH-CMD фильтровали в клубочках, а в эпителии канальцев наблюдались зернистые отложения, что указывало на небольшое поглощение FH-CMD канальцевым эпителием. Отложение железа в почечных канальцах и собирательных трубочках свидетельствует о возможном участии почечного клиренса в метаболизме железа. Обычно НЧ выводятся почками, если они меньше

5,5 нм [173]. Это свидетельствует о биодegradации НЧ FH-CMD в организме, поскольку после синтеза мы не наблюдали частиц с ядрами <10 нм (рис. 22б).

Затем мы исследовали влияние FH-CMD НЧ на органы с высоким поглощением блокирующих частиц или их метаболитов: печень, селезенку, кости и почки. На рисунке 27а представлены биохимические показатели крови, такие как аспаратаминотрансфераза (АСТ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), щелочная фосфатаза (ЩФ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), мочевины и креатинин. Результаты этого исследования показали, что активность ЛДГ, АЛТ и АСТ была повышена по сравнению с контрольными значениями на 1-й день после введения частиц FH-CMD (рис. 27а), что указывает на стресс клеток печени, в то время как активность ЩФ, уровни мочевины и креатинина были в пределах нормы, что указывает на отсутствие повреждения костей и почек. На 3-и и 7-е сутки после введения все исследуемые биохимические показатели не отличались от контрольных показателей. Также небольшая аномалия была обнаружена по временному и незначительному снижению веса мышей на 4% на 2-й день, которое, однако, восстановилось уже к 3-му дню (рис. 27б).

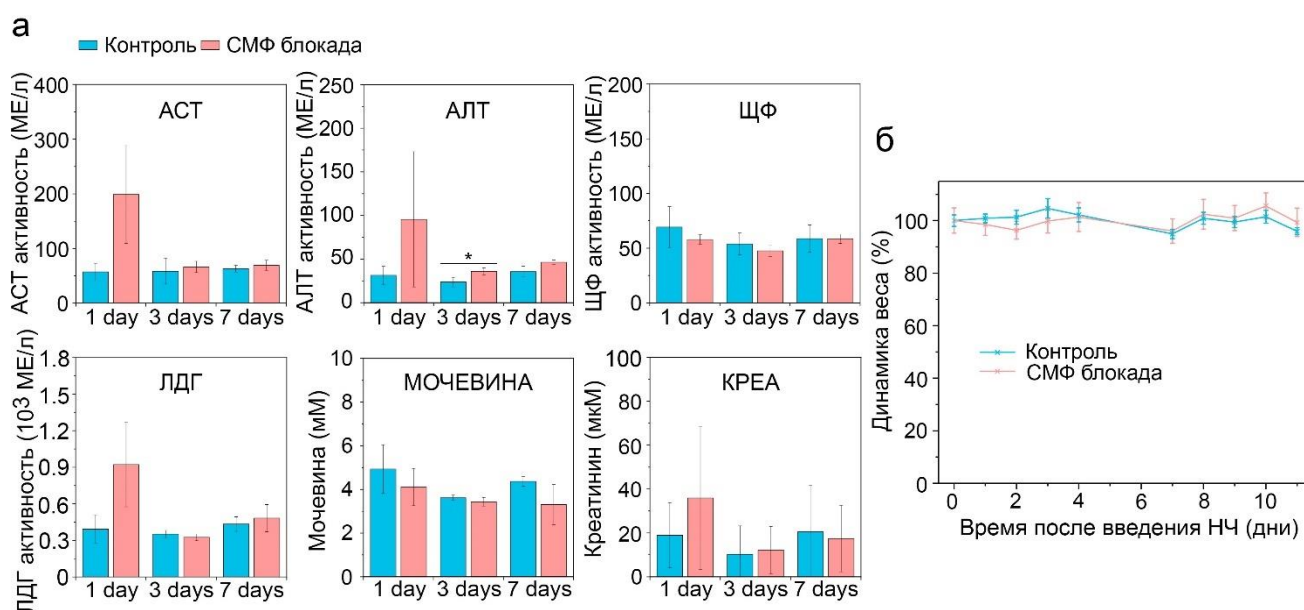


Рисунок 27. Токсичность 5-мг дозы частиц FH-CMD. (а) Биохимический анализ крови после SMF блокады: аспаратаминотрансфераза (АСТ),



аланинаминотрансфераза (АЛТ), щелочная фосфатаза (ЩФ), лактатдегидрогеназа (ЛДГ), мочевины (МОЧЕВИНА) и креатинина (КРЕА). (б) Динамика веса мышц с СМФ блокадой и без нее. \* -  $P < 0,05$ , t-критерий Уэлча.

Затем мы провели морфологическое исследование печени, селезенки, почек, сердца и легких с помощью окрашивания гематоксилином и эозином (рис. 28). Отмечено повышение клеточности красной пульпы селезенки в течение недели после введения НЧ FH-CMD, что, скорее всего, было обусловлено неоднократным забором крови в больших объемах для биохимического анализа крови. Это предположение подтверждалось отсутствием таких изменений в тканях селезенки в анализируемой экспериментальной группе через 1 мес. Других признаков патологических изменений, связанных с НЧ FH-CMD, в исследуемых органах за период исследования не выявлено.

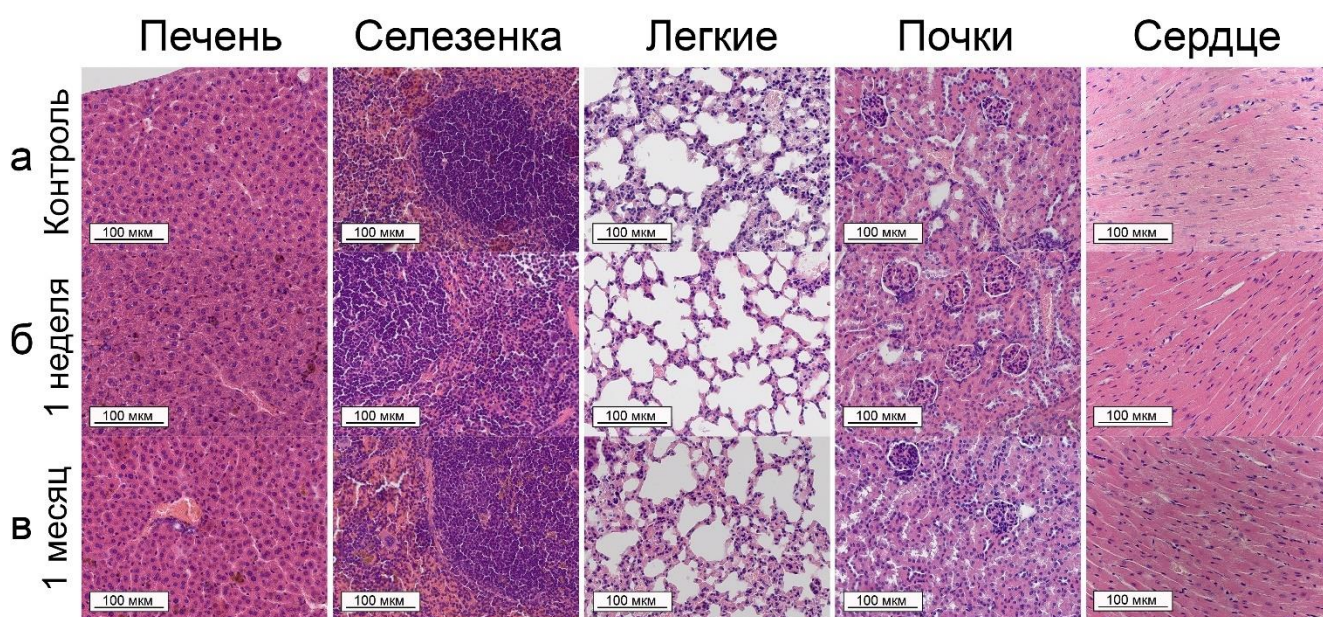


Рисунок 28. Гистологические изображения тканей, окрашенных гематоксилином и эозином. Репрезентативные гистологические изображения печени, селезенки, легких, почек и сердца мышей без СМФ блокады (а), через 1 неделю (б) и через 1 месяц (в) после СМФ блокады. Шкала – 100 мкм.

Мы исследовали возможность применения НЧ FH-CMD для блокирования системы мононуклеарных фагоцитов *in vivo*. Было показано, что СМФ блокада,

индуцированная у мышей 5 мг частиц ферригидрита, эффективна для 9-кратного продления циркуляции НЧ FluidMAG-CMX в кровотоке и значительного увеличения до 6,2% ID адресной доставки НЧ в опухоль.

НЧ оксида железа редко использовались *in vivo* в сопоставимо больших дозах (250 мг/кг), поэтому механизмы их острой токсичности недостаточно изучены. Поскольку ферригидрит известен как метаболит частиц железа / оксида железа, ожидалось, что НЧ FH будут менее токсичными, что было подтверждено результатами нашего исследования. Действительно, введение высоких доз (5 мг) НЧ FH-CMD вызывало лишь небольшую токсичность у мышей (потеря веса на 4% и повышение в крови АЛТ, АСТ и ЛДГ), но через 3 дня исследуемые показатели возвращались к контрольным значениям, что свидетельствует о быстром восстановлении и обратимости побочных эффектов.

Низкая токсичность НЧ FH может быть объяснена их обилием в организме, депонирующем ферритин в высоких дозах в печени и селезенке [256]. Кроме того, этот минерал быстро превращается в биогенное железо в макрофагах. Например, нанопрепараты на основе ферригидрита были клинически одобрены для лечения железодефицитной анемии (Ferrlecit, Venofer) [257]. Поэтому, мы считаем, что использование НЧ FH-CMD в качестве СМФ блокаторов принесет пользу для одновременного лечения опухолей и улучшения анемии, связанной с раком [258].

#### **4. Заключение**

СМФ блокада является мощным методом продления циркуляции наночастиц в кровотоке. Как показано в этом всестороннем исследовании, наряду с некоторыми очевидными факторами, определяющими эффективность СМФ блокады (такими как доза, размер и поверхностные свойства частиц блокатора), существуют некоторые параметры, которые ранее никогда не обсуждались: генетическая линия животного, воспаление или наличие опухоли. Результаты этого исследования могут быть использованы для рационального дизайна частиц, блокирующих СМФ, и приближают эту технологию к введению в клиническую практику для улучшения фармакокинетики и эффективности ряда умных терапевтических и диагностических наноматериалов.

Кроме того, был разработан новый биосовместимый агент, пригодный для блокады системы мононуклеарных фагоцитов – наночастицы ферригидрита (FH), имитирующие эндогенное железо, связанное с ферритином. В работе был продемонстрирован простой синтез FH, покрытого карбоксиметил-декстраном (CMD), который был применен для повышения эффективности адресной доставки нанопрепаратов в опухоль, управляемой магнитным полем. В результате адресная доставка суперпарамагнитных наночастиц, введенных через 1 час после инъекции наночастиц FH-CMD, увеличилась в 24 раза по сравнению с контролем. При этом НЧ FH-CMD поглощались в основном печенью и селезенкой и обладали достаточно низкой токсичностью. Полученные результаты демонстрируют, что подсказанные природой НЧ ферригидрита представляют собой почти оптимальный наноматериал для высокоэффективной блокады СМФ с практически незначительными побочными эффектами.



## **5. Выводы**

- 1) Изучено влияние дозы, размера, зета-потенциала и покрытия частиц блокатора на эффективность СМФ блокады
- 2) СМФ блокада продлевает циркуляцию частиц различного размера
- 3) СМФ блокада эффективна в различных *in vivo* моделях
- 4) СМФ блокада ферригидритом улучшает направленную доставку наночастиц и имеет низкую токсичность

## **6. Список сокращений**

СМФ – система мононуклеарных фагоцитов

НЧ – наночастица

МЧ – магнитная наночастица

РЭС – ретикуло-эндотелиальная система

ПЭГ – полиэтиленгликоль

AUC – area under curve, площадь под кривой «концентрация-время»

вб – внутрибрюшинно

вв – внутривенно

вм – внутримышечно

SPION – superparamagnetic iron oxide nanoparticle, суперпарамагнитная наночастица оксида железа

PION – paramagnetic iron oxide nanoparticle, парамагнитная наночастица оксида железа

EPR – enhanced permeability and retention, эффект повышенного накопления и удержания наночастиц в опухоли

MPT – магнитно-резонансная томография

MPI – magnetic particle imaging, визуализация магнитных наночастиц

КТ – компьютерная томография

ММП – матриксная металлопротеиназа

VEGF – vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов

IgG – иммуноглобулин класса G

PRINT – particle replication in non-wetting templates, репликация частиц на несмачиваемой матрице

ПЭИ – полиэтиленимин

PLL – poly-L-lysine, поли-L-лизин

ГП60 – гликопротеин 60

ТЭОС – тетраэтоксисилан

АПТЭС – (3-аминопропил)триэтоксисилан

ЛПС – липополисахарид

БСА – бычий сывороточный альбумин

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium, модифицированная Дульбекко среда Игла

ФН – ferrihydrite, ферригидрит

СМД – carboxymethyl-dextran, карбоксиметилдекстран

СЭМ – сканирующая электронная микроскопия

ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

СКВИД – сверхпроводящий квантовый интерферометр

MPQ – magnetic particle quantification, количественная детекция магнитных частиц

%ID – % of injected dose, % от введенной дозы

TR – repetition time, время повторения

TE – echo time, время эхо

FOV – field of view, поле зрения

PBS – phosphate-buffered saline, натрий-фосфатный буфер

АСТ – аспаратаминотрансфераза

АЛТ – аланинаминотрансфераза

ЩФ – щелочная фосфатаза

ЛДГ – лактатдегидрогеназа

MP – magnetic particles, магнитные частицы

ARA – покрытие частиц из полиглюкуроновой кислоты

PAS – покрытие частиц из полиакриловой кислоты

CMX – покрытие частиц из карбоксиметил-декстрана

FTIR – Fourier-transform infrared spectroscopy, инфракрасная спектроскопия с преобразованием Фурье

## **7. Список работ, опубликованных по теме диссертации**

Список статей:

1. Mirkasymov AB, Zelepukin IV, Nikitin PI, Nikitin MP, Deyev SM. In vivo blockade of mononuclear phagocyte system with solid nanoparticles: Efficiency and affecting factors. *Journal of Controlled Release*. 2021. Т. 330. С.111-118.
2. Mirkasymov AB, Zelepukin IV, Ivanov IN, Belyaev IB, Dzhililova DS, Trushina DB, Yaremenko AV, Ivanov VY, Nikitin MP, Nikitin PI, Zvyagin AV, Deyev SM. Macrophage Blockade using Nature-Inspired Ferrihydrite for Enhanced Nanoparticle Delivery to Tumor. *International Journal of Pharmaceutics*. 2022. Т. 621. С.121795.
3. Zelepukin IV, Shipunova VO, Mirkasymov AB, Nikitin PI, Nikitin MP, Deyev SM. Synthesis and Characterization of hybrid core-shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> nanoparticles for biomedical applications. *Acta Naturae* (англоязычная версия). 2017. Т. 9.4 (34). С.58-65.

Список тезисов конференций:

1. А.Б. Миркасымов, И.В. Зелепукин, М.П. Никитин, П.И. Никитин, С.М. Деев. Влияние размера частиц на эффективность блокировки системы мононуклеарных фагоцитов. Международный молодежный научный форум «ЛОМОНОСОВ-2017». 10-14 апреля 2017 (стр. 1).
2. А.Б. Миркасымов, И.В. Зелепукин, М.П. Никитин, П.И. Никитин, С.М. Деев. Влияние покрытия частиц и их размера на эффективность блокировки системы мононуклеарных фагоцитов. 60-я Всероссийская научная конференция МФТИ. 20-26 ноября 2017 (стр. 7-8).
3. А.Б. Миркасымов, И.В. Зелепукин, М.П. Никитин, П.И. Никитин, С.М. Деев. Изучение блокировки системы мононуклеарных фагоцитов, вызываемой поглощением высоких доз наночастиц. XXX Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». 12-15 февраля 2018 (стр. 92-93).
4. A.B. Mirkasymov, I.V. Zelepukin, M.P. Nikitin, P.I. Nikitin, S.M. Deyev. Mononuclear phagocyte system blockade, caused by the uptake of magnetic nanoparticles. 12th International Conference on the Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers. 2018 May 22-26 (p. 72).

5. А.Б. Миркасымов, И.В. Зелепукин, М.П. Никитин, П.И. Никитин, С.М. Деев. Исследование параметров, влияющих на эффективность блокировки системы мононуклеарных фагоцитов. Международный форум «Биотехнология: состояние и перспективы развития». 23-25 мая 2018 (стр. 254-255).
6. Миркасымов А.Б., Зелепукин И.В., Никитин М.П., Никитин П.И., Деев С.М. Блокировка системы мононуклеарных фагоцитов, вызываемая поглощением магнитных наночастиц. Четвертый междисциплинарный научный форум с международным участием «Новые материалы и перспективные технологии». 27-30 ноября 2018 (стр. 127-128).
7. A. Mirkasymov, I. Zelepukin, P. Nikitin, M. Nikitin, S. Deyev. Prolongation of nanoparticles blood circulation via macrophage inhibition. IV International Symposium on «Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine». 2019 October 26-30 (pp. 182-183).
8. А.Б. Миркасымов, И.В. Зелепукин, М.П. Никитин, П.И. Никитин, С.М. Деев. Продление циркуляции наночастиц в кровотоке посредством ингибирования способности макрофагов к фагоцитозу. 62-я Всероссийская научная конференция МФТИ. 18-24 ноября 2019 (стр. 48).
9. А.Б. Миркасымов, И.В. Зелепукин, П.И. Никитин, М.П. Никитин, С.М. Деев. Блокировка макрофагов наноматериалами улучшает фармакокинетику наночастиц. XXXII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». 10-13 февраля 2020 (стр. 21).
10. A. Mirkasymov, I. Zelepukin, P. Nikitin, M. Nikitin, S. Deyev. Mononuclear phagocyte system blockade by nanoagents in various in vivo models. V International Symposium on «Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine». 2020 November 7-11 (стр. 126-127).
11. А.Б. Миркасымов, И.В. Зелепукин, П.И. Никитин, М.П. Никитин, С.М. Деев. Блокировка макрофагов наночастицами *in vivo* в различных иммунных состояниях. 63-я Всероссийская научная конференция МФТИ. 23-29 ноября 2020 (стр. 80-81).
12. А.Б. Миркасымов, И.В. Зелепукин, П.И. Никитин, М.П. Никитин, С.М. Деев. Блокировка системы мононуклеарных фагоцитов наноагентами в различных иммунных состояниях. XXXIII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». 8-11 февраля 2021 (стр. 157).

13. A. Mirkasymov, I. Zelepukin, I. Belyaev, I. Ivanov, A. Zvyagin, S. Deyev. FERRIHYDRITE MEDIATED MONONUCLEAR PHAGOCYTE SYSTEM BLOCKADE FOR IMPROVED TUMOR TARGETING OF NANOMATERIALS. The 6-th International Symposium and Schools for Young Scientists on Physics, Engineering and Technologies for Biomedicine. 2021 November 20-24 (стр. 182-183).

14. А.Б. Миркасымов, И.В. Зелепукин, И.Н. Иванов, Д.Ш. Джалилова, С.М. Деев. Блокада системы мононуклеарных фагоцитов наночастицами ферригидрита для улучшения доставки наноагентов в опухоль. XXXIV Международная зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». 8-11 февраля 2022 (стр. 145).

### **Благодарности**

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2020-773).

## 8. Список литературы

1. Development of nanoparticle-delivery systems for antiviral agents: A review / R. Delshadi, A. Bahrami, D.J. McClements [и др.] // *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. – 2021. – Т. 331. – С.30–44.
2. Maslanka Figueroa, S. Biomedical nanoparticle design: What we can learn from viruses / S. Maslanka Figueroa, D. Fleischmann, A. Goepferich // *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. – 2021. – Т. 329. – С.552–569.
3. Nanoparticle-Based Medicines: A Review of FDA-Approved Materials and Clinical Trials to Date / D. Bobo, K.J. Robinson, J. Islam [и др.] // *Pharmaceutical research*. – 2016. – Т. 33, №10. – С.2373–2387.
4. Drozdov, A.S. Systematic Review of Cancer Targeting by Nanoparticles Revealed a Global Association between Accumulation in Tumors and Spleen / A.S. Drozdov, P.I. Nikitin, J.M. Rozenberg // *International journal of molecular sciences*. – 2021. – Т. 22, №23.
5. Nanoparticle Uptake: The Phagocyte Problem / H.H. Gustafson, D. Holt-Casper, D.W. Grainger, H. Ghandehari // *Nano today*. – 2015. – Т. 10, №4. – С.487–510.
6. Analysis of nanoparticle delivery to tumours / S. Wilhelm, A.J. Tavares, Q. Dai [и др.] // *Nature Reviews Materials*. – 2016. – Т. 1, №5.
7. Nanoparticle-liver interactions: Cellular uptake and hepatobiliary elimination / Y.-N. Zhang, W. Poon, A.J. Tavares [и др.] // *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. – 2016. – Т. 240. – С.332–348.
8. Blanco, E. Principles of nanoparticle design for overcoming biological barriers to drug delivery / E. Blanco, H. Shen, M. Ferrari // *Nature biotechnology*. – 2015. – Т. 33, №9. – С.941–951.
9. The controlled intravenous delivery of drugs using PEG-coated sterically stabilized nanospheres / R. Gref, A. Domb, P. Quellec [и др.] // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 1995. – Т.16, №2-3. – С.215–233.
10. Effect of core diameter, surface coating, and PEG chain length on the biodistribution of persistent luminescence nanoparticles in mice / T. Maldiney, C. Richard, J. Seguin [и др.] // *ACS nano*. – 2011. – Т. 5, №2. – С.854–862.
11. Reduced phagocytosis of colloidal carriers using soluble CD47 / Y.-C. Hsu, M. Acuña, S.M. Tahara, C.-A. Peng // *Pharmaceutical research*. – 2003. – Т. 20, №10. – С.1539–1542.
12. Minimal "Self" peptides that inhibit phagocytic clearance and enhance delivery of nanoparticles / P.L. Rodriguez, T. Harada, D.A. Christian [и др.] // *Science (New York, N.Y.)*. – 2013. – Т. 339, №6122. – С.971–975.
13. Dysopsonin activity of serum DNA-binding proteins favorable for gene delivery / F. Liu, A. Frick, X. Yuan, L. Huang // *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. – 2010. – Т. 332, №2. – С.500–504.
14. Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform / C.-M.J. Hu, L. Zhang, S. Aryal [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2011. – Т. 108, №27. – С.10980–10985.
15. Champion, J.A. Shape induced inhibition of phagocytosis of polymer particles / J.A. Champion, S. Mitragotri // *Pharmaceutical research*. – 2009. – Т. 26, №1. – С.244–249.
16. Hatakeyama, H. The polyethyleneglycol dilemma: advantage and disadvantage of PEGylation of liposomes for systemic genes and nucleic acids delivery to tumors / H. Hatakeyama, H. Akita, H. Harashima // *Biological & pharmaceutical bulletin*. – 2013. – Т. 36, №6. – С.892–899.
17. Direct comparison of liposomal doxorubicin with or without polyethylene glycol coating in C-26 tumor-bearing mice: is surface coating with polyethylene glycol beneficial? / R.L. Hong, C.J. Huang, Y.L. Tseng [и др.] // *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. – 1999. – Т. 5, №11. – С.3645–3652.



18. Chithrani, B.D. Determining the size and shape dependence of gold nanoparticle uptake into mammalian cells / B.D. Chithrani, A.A. Ghazani, W.C.W. Chan // *Nano letters*. – 2006. – T. 6, №4. C.662–668.
19. Abu Lila, A.S. The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: clinical challenge and approaches to manage / A.S. Abu Lila, H. Kiwada, T. Ishida // *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. – 2013. – T. 172, №1. – C.38–47.
20. Anti-polyethylene glycol antibodies alter the protein corona deposited on nanoparticles and the physiological pathways regulating their fate in vivo / P. Grenier, I.M.d.O. Viana, E.M. Lima, N. Bertrand // *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. – 2018. – T. 287. – C.121–131.
21. Nanoparticle Beacons: Supersensitive Smart Materials with On/Off-Switchable Affinity to Biomedical Targets / V.R. Cherkasov, E.N. Mochalova, A.V. Babenyshev [и др.] // *ACS nano*. – 2020. – T. 14, №2. – C.1792–1803.
22. Biocomputing based on particle disassembly / M.P. Nikitin, V.O. Shipunova, S.M. Deyev, P.I. Nikitin // *Nature nanotechnology*. – 2014. – T. 9, №9. C.716–722.
23. Versatile Platform for Nanoparticle Surface Bioengineering Based on SiO<sub>2</sub>-Binding Peptide and Proteinaceous Barnase\*Barstar Interface / V.O. Shipunova, I.V. Zelepukin, O.A. Stremovskiy [и др.] // *ACS applied materials & interfaces*. – 2018. – T. 10, №20. C.17437–17447.
24. Tregubov, A.A. Advanced Smart Nanomaterials with Integrated Logic-Gating and Biocomputing: Dawn of Theranostic Nanorobots / A.A. Tregubov, P.I. Nikitin, M.P. Nikitin // *Chemical reviews*. – 2018. – T. 118, №20. C.10294–10348.
25. Chambers, E. Prolonged circulation of large polymeric nanoparticles by non-covalent adsorption on erythrocytes / E. Chambers, S. Mitragotri // *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. – 2004. – T. 100, №1. C.111–119.
26. Nanoparticle-based drug delivery via RBC-hitchhiking for the inhibition of lung metastases growth / I.V. Zelepukin, A.V. Yaremenko, V.O. Shipunova [и др.] // *Nanoscale*. – 2019. – T. 11, №4. C.1636–1646.
27. Gadolinium chloride augments tumor-specific imaging of targeted quantum dots in vivo / P. Diagaradjane, A. Deorukhkar, J.G. Gelovani [и др.] // *ACS nano*. – 2010. – T. 4, №7. C.4131–4141.
28. Temporary suppression the sequestrated function of host macrophages for better nanoparticles tumor delivery / J. Hao, T. Han, M. Wang [и др.] // *Drug delivery*. – 2018. – T. 25, №1. C.1289–1301.
29. Effect of removing Kupffer cells on nanoparticle tumor delivery / A.J. Tavares, W. Poon, Y.-N. Zhang [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2017. – T. 114, №51. – E10871-E10880.
30. Enhancement of the blood-circulation time and performance of nanomedicines via the forced clearance of erythrocytes / M.P. Nikitin, I.V. Zelepukin, V.O. Shipunova [и др.] // *Nature biomedical engineering*. – 2020. – T. 4, №7. C.717–731.
31. Suppression of the reticuloendothelial system using  $\lambda$ -carrageenan to prolong the circulation of gold nanoparticles / I.B. Magaña, R.B. Yendluri, P. Adhikari [и др.] // *Therapeutic delivery*. – 2015. – T. 6, №7. C.777–783.
32. Normann, S.J. Function of the reticuloendothelial system. I. A study on the phenomenon of carbon clearance inhibition / S.J. Normann, E.P. Benditt // *The Journal of experimental medicine*. – 1965. – T. 122, №4. C.693–707.
33. Targeting zinc protoporphyrin liposomes to the spleen using reticuloendothelial blockade with blank liposomes / C.J. Hamori, D.D. Lasic, H.J. Vreman, D.K. Stevenson // *Pediatric research*. – 1993. – T. 34, №1. C.1–5.

34. Decreased reticuloendothelial system clearance and increased blood half-life and immune cell labeling for nano- and micron-sized superparamagnetic iron-oxide particles upon pre-treatment with Intralipid / L. Liu, T.K. Hitchens, Q. Ye [и др.] // *Biochimica et biophysica acta*. – 2013. – Т. 1830, №6. С.3447–3453.
35. RES blockade: A strategy for boosting efficiency of nanoparticle drug / T. Liu, H. Choi, R. Zhou, I.-W. Chen // *Nano today*. – 2015. – Т.10, №1. – С.11–21.
36. Improved Tumor Uptake by Optimizing Liposome Based RES Blockade Strategy / X. Sun, X. Yan, O. Jacobson [и др.] // *Theranostics*. – 2017. – Т. 7, №2. С.319–328.
37. Kao, Y.J. Interactions of liposomes with the reticuloendothelial system effects of reticuloendothelial blockade on the clearance of large unilamellar vesicles / Y.J. Kao, R.L. Juliano // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. – 1981. – Т.677, №3-4. – С.453–461.
38. Influence of dose on liposome clearance: critical role of blood proteins / C.D. Oja, S.C. Semple, A. Chonn, P.R. Cullis // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. – 1996. – Т.1281, №1. – С.31–37.
39. Influence of nanoparticle shape, size, and surface functionalization on cellular uptake / N. Ma, C. Ma, C. Li [и др.] // *Journal of nanoscience and nanotechnology*. – 2013. – Т. 13, №10. С.6485–6498.
40. Jin, F. Mechanisms of intravenous immunoglobulin action in immune thrombocytopenic purpura / F. Jin, J.P. Balthasar // *Human immunology*. – 2005. – Т. 66, №4. С.403–410.
41. Saba, T.M. Reticuloendothelial blockade and recovery as a function of opsonic activity / T.M. Saba, N.R. Di Luzio // *The American journal of physiology*. – 1969. – Т. 216, №1. С.197–205.
42. Allen, T.M. Toxicity of drug carriers to the mononuclear phagocyte system / T.M. Allen // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 1988. – Т.2, №1. – С.55–67.
43. The vacuolization of macrophages induced by large amounts of inorganic nanoparticle uptake to enhance the immune response / J. Cheng, Q. Zhang, S. Fan [и др.] // *Nanoscale*. – 2019. – Т. 11, №47. С.22849–22859.
44. Liposomal blockade of the reticuloendothelial system: improved tumor imaging with small unilamellar vesicles / R.T. Proffitt, L.E. Williams, C.A. Presant [и др.] // *Science (New York, N.Y.)*. – 1983. – Т. 220, №4596. С.502–505.
45. The Stimulation and Depression of Reticulo-endothelial Phagocytic Function by Simple Lipids / A.E. Stuart, G. Biozzi, C. Stiffel [и др.] // *British Journal of Experimental Pathology*. – 1960. – Т. 41, №6. С.599–604.
46. Application of liposomes to the pharmaceutical modification of the distribution characteristics of drugs in the rat / T. Tanaka, K. Taneda, H. Kobayashi [и др.] // *Chemical & pharmaceutical bulletin*. – 1975. – Т. 23, №12. С.3069–3074.
47. Souhami, R.L. The effect of reticuloendothelial blockade on the blood clearance and tissue distribution of liposomes / R.L. Souhami, H.M. Patel, B.E. Ryman // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. – 1981. – Т.674, №3. – С.354–371.
48. WAGNER, H.N. STUDIES OF THE RETICULOENDOTHELIAL SYSTEM (RES). 3. BLOCKADE OF THE RES IN MAN / H.N. WAGNER, M. IIO // *The Journal of clinical investigation*. – 1964. – Т. 43. С.1525–1532.
49. THE DYNAMICS OF RETICULOENDOTHELIAL BLOCKADE / M.G. KOENIG, R.M. HEYSSEL, M.A. MELLY, D.E. ROGERS // *The Journal of experimental medicine*. – 1965. – Т. 122. С.117–142.
50. MURRAY, I.M. The mechanism of blockade of the reticuloendothelial system / I.M. MURRAY // *The Journal of experimental medicine*. – 1963. – Т. 117. С.139–147.
51. GABRIELI, E.R. Studies in the blockade of the reticulo-endothelial system / E.R. GABRIELI, H. HOLMGREN // *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*. – 1952. – Т. 31, №2. С.205–211.

52. Williams, B.D. Inhibition of reticuloendothelial function by gold and its relation to postinjection reactions / B.D. Williams, C.M. Lockwood, B.A. Pussell // *British medical journal*. – 1979. – T. 2, №6184. C.235–238.
53. Wiener, J. An Electron Microscopic Study of Reticuloendothelial System Blockade / J. Wiener, D. Spiro, W. Margaretten // *The American Journal of Pathology*. – 1964. – T. 45, №5. C.783–803.
54. Merion, R.M. Measurements of reticuloendothelial system phagocytic activity in the rat after treatment with silica, liposomes, and cyclosporine / R.M. Merion // *Transplantation*. – 1985. – T. 40, №1. C.86–90.
55. Levy, M.H. Effects of intravenous silica on immune and non-immune functions of the murine host / M.H. Levy, E.F. Wheelock // *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. – 1975. – T. 115, №1. C.41–48.
56. WAGNER, H.N. Studies of the reticuloendothelial system (RES). II. Changes in the phagocytic capacity of the RES in patients with certain infections / H.N. WAGNER, M. IIO, R.B. HORNICK // *The Journal of clinical investigation*. – 1963. – T. 42. C.427–434.
57. Allen, R.J. PEG-Peptide Inhibition of Scavenger Receptor Uptake of Nanoparticles by the Liver / R.J. Allen, B. Mathew, K.G. Rice // *Molecular pharmaceuticals*. – 2018. – T. 15, №9. C.3881–3891.
58. A Nanoprimer To Improve the Systemic Delivery of siRNA and mRNA / N.R.M. Saunders, M.S. Paolini, O.S. Fenton [и др.] // *Nano letters*. – 2020. – T. 20, №6. C.4264–4269.
59. In vivo blockade of mononuclear phagocyte system with solid nanoparticles: Efficiency and affecting factors / A.B. Mirkasymov, I.V. Zelepukin, P.I. Nikitin [и др.] // *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. – 2021. – T. 330. C.111–118.
60. Engineering precision nanoparticles for drug delivery / M.J. Mitchell, M.M. Billingsley, R.M. Haley [и др.] // *Nature reviews. Drug discovery*. – 2021. – T. 20, №2. C.101–124.
61. Transporter-Guided Delivery of Nanoparticles to Improve Drug Permeation across Cellular Barriers and Drug Exposure to Selective Cell Types / L. Kou, Y.D. Bhutia, Q. Yao [и др.] // *Frontiers in pharmacology*. – 2018. – T. 9. C.27.
62. Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications / L.H. Reddy, J.L. Arias, J. Nicolas, P. Couvreur // *Chemical reviews*. – 2012. – T. 112, №11. C.5818–5878.
63. Cherukuri, P. Targeted hyperthermia using metal nanoparticles / P. Cherukuri, E.S. Glazer, S.A. Curley // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2010. – T. 62, №3. C.339–345.
64. Alconcel, S.N.S. FDA-approved poly(ethylene glycol)–protein conjugate drugs / S.N.S. Alconcel, A.S. Baas, H.D. Maynard // *Polymer Chemistry*. – 2011. – T.2, №7. – C.1442.
65. Riley, M.K. Recent Advances in Nanomaterials for Gene Delivery-A Review / M.K. Riley, W. Vermerris // *Nanomaterials (Basel, Switzerland)*. – 2017. – T. 7, №5.
66. A novel PEGylated interferon beta-1a for multiple sclerosis: safety, pharmacology, and biology / X. Hu, L. Miller, S. Richman [и др.] // *Journal of clinical pharmacology*. – 2012. – T. 52, №6. C.798–808.
67. Hines, D.J. Poly(lactic-co-glycolic) acid-controlled-release systems: experimental and modeling insights / D.J. Hines, D.L. Kaplan // *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*. – 2013. – T. 30, №3. C.257–276.
68. Matsumura, Y. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumortropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs / Y. Matsumura, H. Maeda // *Cancer research*. – 1986. – T. 46, №12 Pt 1. C.6387–6392.
69. Maeda, H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting / H. Maeda // *Advances in Enzyme Regulation*. – 2001. – T.41, №1. – C.189–207.

70. Danhier, F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? / F. Danhier // *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. – 2016. – Т. 244, №Pt A. С.108–121.
71. Targeted drug delivery strategies for precision medicines / M.T. Manzari, Y. Shamay, H. Kiguchi [и др.] // *Nature Reviews Materials*. – 2021. – Т. 6, №4. С.351–370.
72. McBain, S.C. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery / S.C. McBain, H.H.P. Yiu, J. Dobson // *International journal of nanomedicine*. – 2008. – Т. 3, №2. С.169–180.
73. Applications of nanoparticles in biomedical imaging / X. Han, K. Xu, O. Taratula, K. Farsad // *Nanoscale*. – 2019. – Т. 11, №3. С.799–819.
74. Fluorescent nanoparticle probes for cancer imaging / S. Santra, D. Dutta, G.A. Walter, B.M. Moudgil // *Technology in cancer research & treatment*. – 2005. – Т. 4, №6. С.593–602.
75. A verification study of proposed pelvic lymph node localisation guidelines using nanoparticle-enhanced magnetic resonance imaging / M.J. Vilarino-Varela, A. Taylor, A.G. Rockall [и др.] // *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. – 2008. – Т. 89, №2. С.192–196.
76. Recent developments in magnetic particle imaging / A. Neumann, K. Gräfe, A. von Gladiss [и др.] // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2022. – Т.550. – С.169037.
77. Synthesis, characterization and in vitro and in vivo investigation of C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>-filled poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles as an ultrasound contrast agent / C.-W. Wang, S.-P. Yang, H. Hu [и др.] // *Molecular medicine reports*. – 2015. – Т. 11, №3. С.1885–1890.
78. Ultra-efficient, widely tunable gold nanoparticle-based fiducial markers for X-ray imaging / G. Maiorano, E. Mele, M.C. Frassanito [и др.] // *Nanoscale*. – 2016. – Т. 8, №45. С.18921–18927.
79. Lucky, S.S. Nanoparticles in photodynamic therapy / S.S. Lucky, K.C. Soo, Y. Zhang // *Chemical reviews*. – 2015. – Т. 115, №4. С.1990–2042.
80. Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy / J.B. Vines, J.-H. Yoon, N.-E. Ryu [и др.] // *Frontiers in chemistry*. – 2019. – Т. 7. С.167.
81. Comprehensive understanding of magnetic hyperthermia for improving antitumor therapeutic efficacy / X. Liu, Y. Zhang, Y. Wang [и др.] // *Theranostics*. – 2020. – Т. 10, №8. С.3793–3815.
82. Moghimi, S. Serum-mediated recognition of liposomes by phagocytic cells of the reticuloendothelial system – The concept of tissue specificity / S. Moghimi, H. Patel // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 1998. – Т.32, №1-2. – С.45–60.
83. Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology / S. Tenzer, D. Docter, J. Kuharev [и др.] // *Nature nanotechnology*. – 2013. – Т. 8, №10. С.772–781.
84. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface / A.E. Nel, L. Mädler, D. Velegol [и др.] // *Nature materials*. – 2009. – Т. 8, №7. С.543–557.
85. Sahay, G. Endocytosis of nanomedicines / G. Sahay, D.Y. Alakhova, A.V. Kabanov // *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. – 2010. – Т. 145, №3. С.182–195.
86. Transferrin-functionalized nanoparticles lose their targeting capabilities when a biomolecule corona adsorbs on the surface / A. Salvati, A.S. Pitek, M.P. Monopoli [и др.] // *Nature nanotechnology*. – 2013. – Т. 8, №2. С.137–143.
87. Emerging understanding of the protein corona at the nano-bio interfaces / M. Mahmoudi, N. Bertrand, H. Zope, O.C. Farokhzad // *Nano today*. – 2016. – Т.11, №6. – С.817–832.
88. A theoretical model for the margination of particles within blood vessels / P. Decuzzi, S. Lee, B. Bhushan, M. Ferrari // *Annals of biomedical engineering*. – 2005. – Т. 33, №2. С.179–190.
89. Locoregional cancer treatment with magnetic drug targeting / C. Alexiou, W. Arnold, R.J. Klein [и др.] // *Cancer research*. – 2000. – Т. 60, №23. С.6641–6648.

90. Maeda, H. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo / H. Maeda, H. Nakamura, J. Fang // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2013. – Т. 65, №1. С.71–79.
91. Nanoparticle-mediated drug delivery to tumor vasculature suppresses metastasis / E.A. Murphy, B.K. Majeti, L.A. Barnes [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – Т. 105, №27. С.9343–9348.
92. Cationic liposomes target angiogenic endothelial cells in tumors and chronic inflammation in mice / G. Thurston, J.W. McLean, M. Rizen [и др.] // *The Journal of clinical investigation*. – 1998. – Т. 101, №7. С.1401–1413.
93. Serum biomarkers for personalization of nanotherapeutics-based therapy in different tumor and organ microenvironments / K. Yokoi, T. Tanei, B. Godin [и др.] // *Cancer letters*. – 2014. – Т. 345, №1. С.48–55.
94. Capillary-wall collagen as a biophysical marker of nanotherapeutic permeability into the tumor microenvironment / K. Yokoi, M. Kojic, M. Milosevic [и др.] // *Cancer research*. – 2014. – Т. 74, №16. С.4239–4246.
95. High interstitial fluid pressure - an obstacle in cancer therapy / C.-H. Heldin, K. Rubin, K. Pietras, A. Ostman // *Nature reviews. Cancer*. – 2004. – Т. 4, №10. С.806–813.
96. Le Roy, C. Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling / C. Le Roy, J.L. Wrana // *Nature reviews. Molecular cell biology*. – 2005. – Т. 6, №2. С.112–126.
97. Gould, G.W. New roles for endosomes: from vesicular carriers to multi-purpose platforms / G.W. Gould, J. Lippincott-Schwartz // *Nature reviews. Molecular cell biology*. – 2009. – Т. 10, №4. С.287–292.
98. Luo, D. Synthetic DNA delivery systems / D. Luo, W.M. Saltzman // *Nature biotechnology*. – 2000. – Т. 18, №1. С.33–37.
99. Bareford, L.M. Endocytic mechanisms for targeted drug delivery / L.M. Bareford, P.W. Swaan // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2007. – Т. 59, №8. С.748–758.
100. Sheridan, C. Gene therapy finds its niche / C. Sheridan // *Nature biotechnology*. – 2011. – Т. 29, №2. С.121–128.
101. Kay, M.A. Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics / M.A. Kay, J.C. Glorioso, L. Naldini // *Nature medicine*. – 2001. – Т. 7, №1. С.33–40.
102. Preparation and characterization of liposome-encapsulated plasmid DNA for gene delivery / R.M. Levine, T.R. Pearce, M. Adil, E. Kokkoli // *Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids*. – 2013. – Т. 29, №29. С.9208–9215.
103. Dobson, J. Gene therapy progress and prospects: magnetic nanoparticle-based gene delivery / J. Dobson // *Gene therapy*. – 2006. – Т. 13, №4. С.283–287.
104. Pissuwan, D. The forthcoming applications of gold nanoparticles in drug and gene delivery systems / D. Pissuwan, T. Niidome, M.B. Cortie // *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. – 2011. – Т. 149, №1. С.65–71.
105. Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol: a potential barrier to gene transfer / D. Lechardeur, K.J. Sohn, M. Haardt [и др.] // *Gene therapy*. – 1999. – Т. 6, №4. С.482–497.
106. Anderson, D.J. Nuclear envelope formation by chromatin-mediated reorganization of the endoplasmic reticulum / D.J. Anderson, M.W. Hetzer // *Nature cell biology*. – 2007. – Т. 9, №10. С.1160–1166.
107. Raices, M. Nuclear pore complex composition: a new regulator of tissue-specific and developmental functions / M. Raices, M.A. D'Angelo // *Nature reviews. Molecular cell biology*. – 2012. – Т. 13, №11. С.687–699.
108. Swanson, J.A. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes / J.A. Swanson // *Nature reviews. Molecular cell biology*. – 2008. – Т. 9, №8. С.639–649.

109. Hillaireau, H. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery / H. Hillaireau, P. Couvreur // *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. – 2009. – Т. 66, №17. С.2873–2896.
110. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell / S. Behzadi, V. Serpooshan, W. Tao [и др.] // *Chemical Society reviews*. – 2017. – Т. 46, №14. С.4218–4244.
111. Underhill, D.M. Phagocytosis of microbes: complexity in action / D.M. Underhill, A. Ozinsky // *Annual review of immunology*. – 2002. – Т. 20. С.825–852.
112. Tabata, Y. Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage / Y. Tabata, Y. Ikada // *Biomaterials*. – 1988. – Т.9, №4. – С.356–362.
113. Phagocytosis of nanoparticles by human immunodeficiency virus (HIV)-infected macrophages: a possibility for antiviral drug targeting / V. Schäfer, H. von Briesen, R. Andreesen [и др.] // *Pharmaceutical research*. – 1992. – Т. 9, №4. С.541–546.
114. Impact of hydrogel nanoparticle size and functionalization on in vivo behavior for lung imaging and therapeutics / Y. Liu, A. Ibricevic, J.A. Cohen [и др.] // *Molecular pharmaceutics*. – 2009. – Т. 6, №6. С.1891–1902.
115. Conner, S.D. Regulated portals of entry into the cell / S.D. Conner, S.L. Schmid // *Nature*. – 2003. – Т. 422, №6927. С.37–44.
116. Brown, C.M. Free clathrin triskelions are required for the stability of clathrin-associated adaptor protein (AP-2) coated pit nucleation sites / C.M. Brown, N.O. Petersen // *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire*. – 1999. – Т. 77, №5. С.439–448.
117. Ungewickell, E. Assembly units of clathrin coats / E. Ungewickell, D. Branton // *Nature*. – 1981. – Т. 289, №5796. С.420–422.
118. Role of the AP2 beta-appendage hub in recruiting partners for clathrin-coated vesicle assembly / E.M. Schmid, M.G.J. Ford, A. Burtay [и др.] // *PLoS biology*. – 2006. – Т. 4, №9. – e262.
119. Praefcke, G.J.K. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? / G.J.K. Praefcke, H.T. McMahon // *Nature reviews. Molecular cell biology*. – 2004. – Т. 5, №2. С.133–147.
120. Doherty, G.J. Mechanisms of endocytosis / G.J. Doherty, H.T. McMahon // *Annual review of biochemistry*. – 2009. – Т. 78. С.857–902.
121. Endocytosis by random initiation and stabilization of clathrin-coated pits / M. Ehrlich, W. Boll, A. van Oijen [и др.] // *Cell*. – 2004. – Т. 118, №5. С.591–605.
122. Targeting of nanoparticles to the clathrin-mediated endocytic pathway / O. Harush-Frenkel, N. Debotton, S. Benita, Y. Altschuler // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2007. – Т. 353, №1. С.26–32.
123. Cellular uptake and cytotoxicity of silica nanotubes / A. Nan, X. Bai, S.J. Son [и др.] // *Nano letters*. – 2008. – Т. 8, №8. С.2150–2154.
124. Caveolin-2 localizes to the golgi complex but redistributes to plasma membrane, caveolae, and rafts when co-expressed with caveolin-1 / R. Mora, V.L. Bonilha, A. Marmorstein [и др.] // *The Journal of biological chemistry*. – 1999. – Т. 274, №36. С.25708–25717.
125. Anderson, H.A. Bound simian virus 40 translocates to caveolin-enriched membrane domains, and its entry is inhibited by drugs that selectively disrupt caveolae / H.A. Anderson, Y. Chen, L.C. Norkin // *Molecular biology of the cell*. – 1996. – Т. 7, №11. С.1825–1834.
126. Anderson, R.G. The caveolae membrane system / R.G. Anderson // *Annual review of biochemistry*. – 1998. – Т. 67. С.199–225.
127. Kurzchalia, T.V. Membrane microdomains and caveolae / T.V. Kurzchalia, R.G. Partan // *Current Opinion in Cell Biology*. – 1999. – Т.11, №4. – С.424–431.
128. Pelkmans, L. Endocytosis via caveolae / L. Pelkmans, A. Helenius // *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. – 2002. – Т. 3, №5. С.311–320.
129. Raucher, D. Characteristics of a Membrane Reservoir Buffering Membrane Tension / D. Raucher, M.P. Sheetz // *Biophysical Journal*. – 1999. – Т.77, №4. – С.1992–2002.

130. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats / K.G. Rothberg, J.E. Heuser, W.C. Donzell [и др.] // *Cell*. – 1992. – Т.68, №4. – С.673–682.
131. Sens, P. Budded membrane microdomains as tension regulators / P. Sens, M.S. Turner // *Physical review. E, Statistical, nonlinear, and soft matter physics*. – 2006. – Т. 73, №3 Pt 1. С.31918.
132. Gabella, G. Effect of stretch and contraction on caveolae of smooth muscle cells / G. Gabella, D. Blundell // *Cell and tissue research*. – 1978. – Т. 190, №2. С.255–271.
133. Taggart, M.J. Smooth muscle excitation-contraction coupling: a role for caveolae and caveolins? / M.J. Taggart // *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*. – 2001. – Т. 16. С.61–65.
134. Carver, L.A. Caveolae: mining little caves for new cancer targets / L.A. Carver, J.E. Schnitzer // *Nature reviews. Cancer*. – 2003. – Т. 3, №8. С.571–581.
135. Rejman, J. Gene transfer by means of lipo- and polyplexes: role of clathrin and caveolae-mediated endocytosis / J. Rejman, M. Conese, D. Hoekstra // *Journal of liposome research*. – 2006. – Т. 16, №3. С.237–247.
136. Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae / E.-M. Damm, L. Pelkmans, J. Kartenbeck [и др.] // *The Journal of cell biology*. – 2005. – Т. 168, №3. С.477–488.
137. Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles / M. Kirkham, A. Fujita, R. Chadda [и др.] // *The Journal of cell biology*. – 2005. – Т. 168, №3. С.465–476.
138. Kumari, S. Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell / S. Kumari, S. Mg, S. Mayor // *Cell research*. – 2010. – Т. 20, №3. С.256–275.
139. Kelemen, L.E. The role of folate receptor alpha in cancer development, progression and treatment: cause, consequence or innocent bystander? / L.E. Kelemen // *International journal of cancer*. – 2006. – Т. 119, №2. С.243–250.
140. Lu, Y. Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents / Y. Lu, P.S. Low // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2012. – Т.64. – С.342–352.
141. Lim, J.P. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps / J.P. Lim, P.A. Gleeson // *Immunology and cell biology*. – 2011. – Т. 89, №8. С.836–843.
142. Class I MHC presentation of exogenous soluble antigen via macropinocytosis in bone marrow macrophages / C.C. Norbury, L.J. Hewlett, A.R. Prescott [и др.] // *Immunity*. – 1995. – Т.3, №6. – С.783–791.
143. Different endocytotic uptake mechanisms for nanoparticles in epithelial cells and macrophages / D.A. Kuhn, D. Vanhecke, B. Michen [и др.] // *Beilstein journal of nanotechnology*. – 2014. – Т. 5. С.1625–1636.
144. Cellular uptake of nanoparticles by membrane penetration: a study combining confocal microscopy with FTIR spectroelectrochemistry / T. Wang, J. Bai, X. Jiang, G.U. Nienhaus // *ACS nano*. – 2012. – Т. 6, №2. С.1251–1259.
145. Chou, L.Y.T. Strategies for the intracellular delivery of nanoparticles / L.Y.T. Chou, K. Ming, W.C.W. Chan // *Chemical Society reviews*. – 2011. – Т. 40, №1. С.233–245.
146. Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells / M. Geiser, B. Rothen-Rutishauser, N. Kapp [и др.] // *Environmental health perspectives*. – 2005. – Т. 113, №11. С.1555–1560.
147. Protein corona: Opportunities and challenges / S. Zanganeh, R. Spitler, M. Erfanzadeh [и др.] // *The international journal of biochemistry & cell biology*. – 2016. – Т. 75. С.143–147.

148. Papini, E. Oponins and Dysopsonins of Nanoparticles: Facts, Concepts, and Methodological Guidelines / E. Papini, R. Tavano, F. Mancin // *Frontiers in immunology*. – 2020. – Т. 11. С.567365.
149. The functional dissection of the plasma corona of SiO<sub>2</sub>-NPs spots histidine rich glycoprotein as a major player able to hamper nanoparticle capture by macrophages / C. Fedeli, D. Segat, R. Tavano [и др.] // *Nanoscale*. – 2015. – Т. 7, №42. С.17710–17728.
150. Time evolution of the nanoparticle protein corona / E. Casals, T. Pfaller, A. Duschl [и др.] // *ACS nano*. – 2010. – Т. 4, №7. С.3623–3632.
151. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials / M.P. Monopoli, C. Aberg, A. Salvati, K.A. Dawson // *Nature nanotechnology*. – 2012. – Т. 7, №12. С.779–786.
152. Quantitative proteomics analysis of adsorbed plasma proteins classifies nanoparticles with different surface properties and size / H. Zhang, K.E. Burnum, M.L. Luna [и др.] // *Proteomics*. – 2011. – Т. 11, №23. С.4569–4577.
153. Saha, K. Protein coronas suppress the hemolytic activity of hydrophilic and hydrophobic nanoparticles / K. Saha, D.F. Moyano, V.M. Rotello // *Materials horizons*. – 2014. – Т. 1, №1. С.102–105.
154. Suppression of the hemolytic effect of mesoporous silica nanoparticles after protein corona interaction: independence of the surface microchemical environment / A.J. Paula, D.S.T. Martinez, R.T. Araujo Júnior [и др.] // *Journal of the Brazilian Chemical Society*. – 2012. – Т.23, №10. – С.1807–1814.
155. Coating particles with a block co-polymer (poloxamine-908) suppresses opsonization but permits the activity of dysopsonins in the serum / S. Moghimi, I. Muir, L. Illum [и др.] // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. – 1993. – Т.1179, №2. – С.157–165.
156. The effect of block co-polymers on the uptake of model polystyrene microspheres by Kupffer cells--in vitro and in vivo studies / I.S. Muir, S.M. Moghimi, L. Illum [и др.] // *Biochemical Society transactions*. – 1991. – Т. 19, №3. – 329S.
157. Fabrication of corona-free nanoparticles with tunable hydrophobicity / D.F. Moyano, K. Saha, G. Prakash [и др.] // *ACS nano*. – 2014. – Т. 8, №7. С.6748–6755.
158. Personalized protein corona on nanoparticles and its clinical implications / C. Corbo, R. Molinaro, M. Tabatabaei [и др.] // *Biomaterials science*. – 2017. – Т. 5, №3. С.378–387.
159. Choi, H.S. Nanoparticles for biomedical imaging: fundamentals of clinical translation / H.S. Choi, J.V. Frangioni // *Molecular imaging*. – 2010. – Т. 9, №6. С.291–310.
160. Adisheshaiah, P.P. Nanomaterial standards for efficacy and toxicity assessment / P.P. Adisheshaiah, J.B. Hall, S.E. McNeil // *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*. – 2010. – Т. 2, №1. С.99–112.
161. In vivo biodistribution of nanoparticles / J.P.M. Almeida, A.L. Chen, A. Foster, R. Drezek // *Nanomedicine (London, England)*. – 2011. – Т. 6, №5. С.815–835.
162. Chrastina, A. Overcoming in vivo barriers to targeted nanodelivery / A. Chrastina, K.A. Massey, J.E. Schnitzer // *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*. – 2011. – Т. 3, №4. С.421–437.
163. Physiologically based pharmacokinetic modeling of nanoparticles / M. Li, K.T. Al-Jamal, K. Kostarelos, J. Reineke // *ACS nano*. – 2010. – Т. 4, №11. С.6303–6317.
164. Karmali, P.P. Interactions of nanoparticles with plasma proteins: implication on clearance and toxicity of drug delivery systems / P.P. Karmali, D. Simberg // *Expert opinion on drug delivery*. – 2011. – Т. 8, №3. С.343–357.
165. Interaction of gold nanoparticles with common human blood proteins / S.H.D.P. Lacerda, J.J. Park, C. Meuse [и др.] // *ACS nano*. – 2010. – Т. 4, №1. С.365–379.



166. Nanoparticle interaction with plasma proteins as it relates to particle biodistribution, biocompatibility and therapeutic efficacy / P. Aggarwal, J.B. Hall, C.B. McLeland [и др.] // *Advanced Drug Delivery Reviews*. – 2009. – Т. 61, №6. С.428–437.
167. Dobrovolskaia, M.A. Immunological properties of engineered nanomaterials / M.A. Dobrovolskaia, S.E. McNeil // *Nature nanotechnology*. – 2007. – Т. 2, №8. С.469–478.
168. Owens, D.E. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles / D.E. Owens, N.A. Peppas // *International journal of pharmaceutics*. – 2006. – Т. 307, №1. С.93–102.
169. Preclinical studies to understand nanoparticle interaction with the immune system and its potential effects on nanoparticle biodistribution / M.A. Dobrovolskaia, P. Aggarwal, J.B. Hall, S.E. McNeil // *Molecular pharmaceutics*. – 2008. – Т. 5, №4. С.487–495.
170. Longmire, M. Clearance properties of nano-sized particles and molecules as imaging agents: considerations and caveats / M. Longmire, P.L. Choyke, H. Kobayashi // *Nanomedicine (London, England)*. – 2008. – Т. 3, №5. С.703–717.
171. Moghimi, S.M. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice / S.M. Moghimi, A.C. Hunter, J.C. Murray // *Pharmacological reviews*. – 2001. – Т. 53, №2. С.283–318.
172. Yoo, J.-W. Factors that control the circulation time of nanoparticles in blood: challenges, solutions and future prospects / J.-W. Yoo, E. Chambers, S. Mitragotri // *Current pharmaceutical design*. – 2010. – Т. 16, №21. С.2298–2307.
173. Renal clearance of quantum dots / H.S. Choi, W. Liu, P. Misra [и др.] // *Nature biotechnology*. – 2007. – Т. 25, №10. С.1165–1170.
174. Contribution of high-resolution correlative imaging techniques in the study of the liver sieve in three-dimensions / F. Braet, E. Wisse, P. Bomans [и др.] // *Microscopy research and technique*. – 2007. – Т. 70, №3. С.230–242.
175. Chen, L.-T. The Role of the Sinus Wall in the Passage of Erythrocytes Through the Spleen / L.-T. Chen, L. Weiss // *Blood*. – 1973. – Т.41, №4. – С.529–537.
176. Accumulation of sub-100 nm polymeric micelles in poorly permeable tumours depends on size / H. Cabral, Y. Matsumoto, K. Mizuno [и др.] // *Nature nanotechnology*. – 2011. – Т. 6, №12. С.815–823.
177. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review / H. Maeda, J. Wu, T. Sawa [и др.] // *Journal of Controlled Release*. – 2000. – Т.65, №1-2. – С.271–284.
178. The effect of shape on the margination dynamics of non-neutrally buoyant particles in two-dimensional shear flows / F. Gentile, C. Chiappini, D. Fine [и др.] // *Journal of biomechanics*. – 2008. – Т. 41, №10. С.2312–2318.
179. Shape effects of filaments versus spherical particles in flow and drug delivery / Y. Geng, P. Dalhaimer, S. Cai [и др.] // *Nature nanotechnology*. – 2007. – Т. 2, №4. С.249–255.
180. Champion, J.A. Role of target geometry in phagocytosis / J.A. Champion, S. Mitragotri // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – Т. 103, №13. С.4930–4934.
181. Flexible filaments for in vivo imaging and delivery: persistent circulation of filomicelles opens the dosage window for sustained tumor shrinkage / D.A. Christian, S. Cai, O.B. Garbuzenko [и др.] // *Molecular pharmaceutics*. – 2009. – Т. 6, №5. С.1343–1352.
182. Systematic surface engineering of magnetic nanoworms for in vivo tumor targeting / J.-H. Park, G. von Maltzahn, L. Zhang [и др.] // *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*. – 2009. – Т. 5, №6. С.694–700.
183. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles / F. Alexis, E. Pridgen, L.K. Molnar, O.C. Farokhzad // *Molecular pharmaceutics*. – 2008. – Т. 5, №4. С.505–515.

184. Long-circulating poly(ethylene glycol)–poly(d,l-lactide) block copolymer micelles with modulated surface charge / Y. Yamamoto, Y. Nagasaki, Y. Kato [и др.] // *Journal of Controlled Release*. – 2001. – Т. 77, №1-2. – С.27–38.
185. Surface charge switchable nanoparticles based on zwitterionic polymer for enhanced drug delivery to tumor / Y.-Y. Yuan, C.-Q. Mao, X.-J. Du [и др.] // *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*. – 2012. – Т. 24, №40. С.5476–5480.
186. Softer zwitterionic nanogels for longer circulation and lower splenic accumulation / L. Zhang, Z. Cao, Y. Li [и др.] // *ACS nano*. – 2012. – Т. 6, №8. С.6681–6686.
187. The effect of particle size on the biodistribution of low-modulus hydrogel PRINT particles / T.J. Merkel, K. Chen, S.W. Jones [и др.] // *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. – 2012. – Т. 162, №1. С.37–44.
188. Super-soft hydrogel particles with tunable elasticity in a microfluidic blood capillary model / J. Cui, M. Björnmalm, K. Liang [и др.] // *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*. – 2014. – Т. 26, №43. С.7295–7299.
189. Harris, J.M. Effect of pegylation on pharmaceuticals / J.M. Harris, R.B. Chess // *Nature reviews. Drug discovery*. – 2003. – Т. 2, №3. С.214–221.
190. EORTC 10968: a phase I clinical and pharmacokinetic study of polyethylene glycol liposomal doxorubicin (Caelyx, Doxil) at a 6-week interval in patients with metastatic breast cancer. European Organization for Research and Treatment of Cancer / A. Hamilton, L. Biganzoli, R. Coleman [и др.] // *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. – 2002. – Т. 13, №6. С.910–918.
191. Guo, S. Nanoparticles Escaping RES and Endosome: Challenges for siRNA Delivery for Cancer Therapy / S. Guo, L. Huang // *Journal of Nanomaterials*. – 2011. – Т.2011. – С.1–12.
192. Synthetic nanoparticles functionalized with biomimetic leukocyte membranes possess cell-like functions / A. Parodi, N. Quattrocchi, A.L. van de Ven [и др.] // *Nature nanotechnology*. – 2013. – Т. 8, №1. С.61–68.
193. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier / J. Kreuter, D. Shamenkov, V. Petrov [и др.] // *Journal of drug targeting*. – 2002. – Т. 10, №4. С.317–325.
194. Sica, A. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development / A. Sica, V. Bronte // *The Journal of clinical investigation*. – 2007. – Т. 117, №5. С.1155–1166.
195. Woollard, K.J. Monocytes in atherosclerosis: subsets and functions / K.J. Woollard, F. Geissmann // *Nature reviews. Cardiology*. – 2010. – Т. 7, №2. С.77–86.
196. Intravascular delivery of particulate systems: does geometry really matter? / P. Decuzzi, R. Pasqualini, W. Arap, M. Ferrari // *Pharmaceutical research*. – 2009. – Т. 26, №1. С.235–243.
197. Ferrari, M. Frontiers in cancer nanomedicine: directing mass transport through biological barriers / M. Ferrari // *Trends in biotechnology*. – 2010. – Т. 28, №4. С.181–188.
198. Mesoporous silicon particles as a multistage delivery system for imaging and therapeutic applications / E. Tasciotti, X. Liu, R. Bhavane [и др.] // *Nature nanotechnology*. – 2008. – Т. 3, №3. С.151–157.
199. Tailored porous silicon microparticles: fabrication and properties / C. Chiappini, E. Tasciotti, J.R. Fakhoury [и др.] // *Chemphyschem : a European journal of chemical physics and physical chemistry*. – 2010. – Т. 11, №5. С.1029–1035.
200. Rapid tumoritropic accumulation of systemically injected plateloid particles and their biodistribution / A.L. van de Ven, P. Kim, O. Haley [и др.] // *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. – 2012. – Т. 158, №1. С.148–155.
201. Sustained small interfering RNA delivery by mesoporous silicon particles / T. Tanaka, L.S. Mangala, P.E. Vivas-Mejia [и др.] // *Cancer research*. – 2010. – Т. 70, №9. С.3687–3696.

202. Targeting RPL39 and MLF2 reduces tumor initiation and metastasis in breast cancer by inhibiting nitric oxide synthase signaling / B. Dave, S. Granados-Principal, R. Zhu [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2014. – Т. 111, №24. С.8838–8843.
203. XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1 $\alpha$  pathway / X. Chen, D. Iliopoulos, Q. Zhang [и др.] // *Nature*. – 2014. – Т. 508, №7494. С.103–107.
204. Nanoparticles that communicate in vivo to amplify tumour targeting / G. von Maltzahn, J.-H. Park, K.Y. Lin [и др.] // *Nature materials*. – 2011. – Т. 10, №7. С.545–552.
205. Normalization of tumour blood vessels improves the delivery of nanomedicines in a size-dependent manner / V.P. Chauhan, T. Stylianopoulos, J.D. Martin [и др.] // *Nature nanotechnology*. – 2012. – Т. 7, №6. С.383–388.
206. Jain, R.K. Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers / R.K. Jain // *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2013. – Т. 31, №17. С.2205–2218.
207. Jain, R.K. Delivering nanomedicine to solid tumors / R.K. Jain, T. Stylianopoulos // *Nature reviews. Clinical oncology*. – 2010. – Т. 7, №11. С.653–664.
208. Augmentation of transvascular transport of macromolecules and nanoparticles in tumors using vascular endothelial growth factor / W.L. Monsky, D. Fukumura, T. Gohongi [и др.] // *Cancer research*. – 1999. – Т. 59, №16. С.4129–4135.
209. Losartan inhibits collagen I synthesis and improves the distribution and efficacy of nanotherapeutics in tumors / B. Diop-Frimpong, V.P. Chauhan, S. Krane [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2011. – Т. 108, №7. С.2909–2914.
210. The effect of particle design on cellular internalization pathways / S.E.A. Gratton, P.A. Ropp, P.D. Pohlhaus [и др.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2008. – Т. 105, №33. С.11613–11618.
211. Liposome-cell interactions in vitro: effect of liposome surface charge on the binding and endocytosis of conventional and sterically stabilized liposomes / C.R. Miller, B. Bondurant, S.D. McLean [и др.] // *Biochemistry*. – 1998. – Т. 37, №37. С.12875–12883.
212. Effect of surface charge of magnetite nanoparticles on their internalization into breast cancer and umbilical vein endothelial cells / T. Osaka, T. Nakanishi, S. Shanmugam [и др.] // *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*. – 2009. – Т. 71, №2. С.325–330.
213. The association of silicon microparticles with endothelial cells in drug delivery to the vasculature / R.E. Serda, J. Gu, R.C. Bhavane [и др.] // *Biomaterials*. – 2009. – Т. 30, №13. С.2440–2448.
214. A protein nanocarrier from charge-conversion polymer in response to endosomal pH / Y. Lee, S. Fukushima, Y. Bae [и др.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2007. – Т. 129, №17. С.5362–5363.
215. Intracellular delivery of nanomaterials: How to catch endosomal escape in the act / T.F. Martens, K. Remaut, J. Demeester [и др.] // *Nano today*. – 2014. – Т.9, №3. – С.344–364.
216. Wasungu, L. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes / L. Wasungu, D. Hoekstra // *Journal of Controlled Release*. – 2006. – Т. 116, №2. С.255–264.
217. Intracellular delivery of nanometric DNA particles via the folate receptor / E. Dauty, J.-S. Remy, G. Zuber, J.-P. Behr // *Bioconjugate chemistry*. – 2002. – Т. 13, №4. С.831–839.
218. Gradishar, W.J. Albumin-bound paclitaxel: a next-generation taxane / W.J. Gradishar // *Expert opinion on pharmacotherapy*. – 2006. – Т. 7, №8. С.1041–1053.
219. Multicenter phase II trial of ABI-007, an albumin-bound paclitaxel, in women with metastatic breast cancer / N.K. Ibrahim, B. Samuels, R. Page [и др.] // *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. – 2005. – Т. 23, №25. С.6019–6026.

220. A highly efficient synthetic vector: nonhydrodynamic delivery of DNA to hepatocyte nuclei in vivo / Y. Hu, M.T. Haynes, Y. Wang [и др.] // *ACS nano*. – 2013. – Т. 7, №6. С.5376–5384.
221. Stöber, W. Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range / W. Stöber, A. Fink, E. Bohn // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 1968. – Т.26, №1. – С.62–69.
222. Highly sensitive room-temperature method of non-invasive in vivo detection of magnetic nanoparticles / M.P. Nikitin, P.M. Vetoshko, N.A. Brusentsov, P.I. Nikitin // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2009. – Т.321, №10. – С.1658–1661.
223. Multiplex biosensing with highly sensitive magnetic nanoparticle quantification method / M.P. Nikitin, A.V. Orlov, S.L. Znoyko [и др.] // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2018. – Т.459. – С.260–264.
224. Fast processes of nanoparticle blood clearance: Comprehensive study / I.V. Zelepukin, A.V. Yaremenko, M.V. Yuryev [и др.] // *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. – 2020. – Т. 326. С.181–191.
225. Hadipour Moghaddam, S.P. In vitro and in vivo evaluation of degradation, toxicity, biodistribution, and clearance of silica nanoparticles as a function of size, porosity, density, and composition / S.P. Hadipour Moghaddam, R. Mohammadpour, H. Ghandehari // *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. – 2019. – Т. 311-312. С.1–15.
226. Synthesis and Characterization of Hybrid Core-Shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> Nanoparticles for Biomedical Applications / I.V. Zelepukin, V.O. Shipunova, A.B. Mirkasymov [и др.] // *Acta naturae*. – 2017. – Т. 9, №4. С.58–65.
227. Nanoparticle size and surface chemistry determine serum protein adsorption and macrophage uptake / C.D. Walkey, J.B. Olsen, H. Guo [и др.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2012. – Т. 134, №4. С.2139–2147.
228. Mechanism of hard-nanomaterial clearance by the liver / K.M. Tsoi, S.A. MacParland, X.-Z. Ma [и др.] // *Nature materials*. – 2016. – Т. 15, №11. С.1212–1221.
229. Magnetometry based method for investigation of nanoparticle clearance from circulation in a liver perfusion model / I.V. Zelepukin, A.V. Yaremenko, E.V. Petersen [и др.] // *Nanotechnology*. – 2019. – Т. 30, №10. С.105101.
230. Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles / M.J. Ernsting, M. Murakami, A. Roy, S.-D. Li // *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. – 2013. – Т. 172, №3. С.782–794.
231. Drutz, D.J. Further observations on the mechanism of reticuloendothelial blockade / D.J. Drutz, M.G. KOENIG, D.E. ROGERS // *The Journal of experimental medicine*. – 1967. – Т. 126, №6. С.1087–1098.
232. The effect of nanoparticle size on in vivo pharmacokinetics and cellular interaction / N. Hoshyar, S. Gray, H. Han, G. Bao // *Nanomedicine (London, England)*. – 2016. – Т. 11, №6. С.673–692.
233. The comparative immunology of wild and laboratory mice, *Mus musculus domesticus* / S. Abolins, E.C. King, L. Lazarou [и др.] // *Nature communications*. – 2017. – Т. 8. С.14811.
234. Tumor Presence Induces Global Immune Changes and Enhances Nanoparticle Clearance / M.P. Kai, H.E. Brighton, C.A. Fromen [и др.] // *ACS nano*. – 2016. – Т. 10, №1. С.861–870.
235. Elucidating the Influence of Tumor Presence on the Polymersome Circulation Time in Mice / R.M. de Kruijff, R. Raavé, A. Kip [и др.] // *Pharmaceutics*. – 2019. – Т. 11, №5.
236. Nanoparticle distribution during systemic inflammation is size-dependent and organ-specific / K.-H. Chen, D.J. Lundy, E.K.-W. Toh [и др.] // *Nanoscale*. – 2015. – Т. 7, №38. С.15863–15872.
237. Targeted gold nanoparticles enable molecular CT imaging of cancer: an in vivo study / T. Reuveni, M. Motiei, Z. Romman [и др.] // *International journal of nanomedicine*. – 2011. – Т. 6. С.2859–2864.

238. Gold nanoparticles as a contrast agent for in vivo tumor imaging with photoacoustic tomography / Q. Zhang, N. Iwakuma, P. Sharma [и др.] // *Nanotechnology*. – 2009. – Т. 20, №39. С.395102.
239. Sabet, T. The effect of RES blockade on cellular antibody formation to sheep erythrocytes / T. Sabet, C. Newlin, H. Friedman // *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.). – 1968. – Т. 128, №1. С.274–278.
240. Long-Term Fate of Magnetic Particles in Mice: A Comprehensive Study / I.V. Zelepukin, A.V. Yaremenko, I.N. Ivanov [и др.] // *ACS nano*. – 2021. – .
241. Chasteen, N.D. Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage / N.D. Chasteen, P.M. Harrison // *Journal of structural biology*. – 1999. – Т. 126, №3. С.182–194.
242. Touati, D. Iron and oxidative stress in bacteria / D. Touati // *Archives of biochemistry and biophysics*. – 2000. – Т. 373, №1. С.1–6.
243. Blue light-triggered Fe<sup>2+</sup>-release from monodispersed ferrihydrite nanoparticles for cancer iron therapy / Y. Yang, Q. Tian, S. Wu [и др.] // *Biomaterials*. – 2021. – Т. 271. С.120739.
244. Structural Model for Ferrihydrite / V.A. Drits, B.A. Sakharov, A.L. Salyn, A. Manceau // *Clay Minerals*. – 1993. – Т.28, №2. – С.185–207.
245. Schwertmann. From Fe(III) Ions to Ferrihydrite and then to Hematite / Schwertmann, Friedl, Stanjek // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 1999. – Т. 209, №1. С.215–223.
246. Synthesis and characterization of dextran-coated iron oxide nanoparticles / A.M. Predescu, E. Matei, A.C. Berbecaru [и др.] // *Royal Society open science*. – 2018. – Т. 5, №3. С.171525.
247. Cudennec, Y. The transformation of ferrihydrite into goethite or hematite, revisited / Y. Cudennec, A. Lecerf // *Journal of Solid State Chemistry*. – 2006. – Т.179, №3. – С.716–722.
248. Structural and magnetic characteristics of carboxymethyl dextran coated magnetic nanoparticles: From characterization to immobilization application / K. Vasić, Ž. Knez, E.A. Konstantinova [и др.] // *Reactive and Functional Polymers*. – 2020. – Т.148. – С.104481.
249. Efficient production and enhanced tumor delivery of engineered extracellular vesicles / D.C. Watson, D. Bayik, A. Srivatsan [и др.] // *Biomaterials*. – 2016. – Т. 105. С.195–205.
250. Paramagnetic colloidal ferrihydrite nanoparticles for MRI contrasting / I.L. Sokolov, V.R. Cherkasov, A.V. Vasilyeva [и др.] // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2018. – Т.539. – С.46–52.
251. Bone targeting for the treatment of osteoporosis / T. Luhmann, O. Germershaus, J. Groll, L. Meinel // *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*. – 2012. – Т. 161, №2. С.198–213.
252. Yüce, M. How to make nanobiosensors: surface modification and characterisation of nanomaterials for biosensing applications / M. Yüce, H. Kurt // *RSC Adv*. – 2017. – Т.7, №78. – С.49386–49403.
253. Magnetically triggered drug release from nanoparticles and its applications in anti-tumor treatment / X. Hua, Q. Yang, Z. Dong [и др.] // *Drug delivery*. – 2017. – Т. 24, №1. С.511–518.
254. Suitability of commercial colloids for magnetic hyperthermia / M. Kallumadil, M. Tada, T. Nakagawa [и др.] // *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*. – 2009. – Т.321, №10. – С.1509–1513.
255. Long term in vivo biotransformation of iron oxide nanoparticles / M. Levy, N. Luciani, D. Alloyeau [и др.] // *Biomaterials*. – 2011. – Т. 32, №16. С.3988–3999.
256. Mössbauer spectroscopy of the iron cores in human liver ferritin, ferritin in normal human spleen and ferritin in spleen from patient with primary myelofibrosis: preliminary results of comparative analysis / M.I. Oshtrakh, I.V. Alenkina, A.V. Vinogradov [и др.] // *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*. – 2013. – Т. 26, №2. С.229–239.

257. Structural characterization of iron oxide/hydroxide nanoparticles in nine different parenteral drugs for the treatment of iron deficiency anaemia by electron diffraction (ED) and X-ray powder diffraction (XRPD) / S. Fütterer, I. Andrusenko, U. Kolb [и др.] // Journal of pharmaceutical and biomedical analysis. – 2013. – Т. 86. С.151–160.
258. Cancer-related anemia: pathogenesis, prevalence and treatment / G. Birgegård, M.S. Aapro, C. Bokemeyer [и др.] // Oncology. – 2005. – Т. 68 Suppl 1. С.3–11.